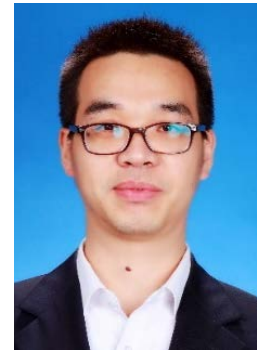


• 产业培育推进 •

陈久洲 中国科学院天津工业生物技术研究所高级工程师。主要研究方向为工业菌种设计创制和应用，多项技术成果已实现产业化落地。现主持国家重点研发计划子课题、山东省重点研发计划课题、国家自然科学基金青年基金等多个科研项目。以第一作者在 *Trends Biotechnol*、*Biotechnol Biofuels* 等期刊发表论文 10 余篇，申请发明专利 40 余项，PCT 专利 6 项。



郑平 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师，第三届中国生物发酵产业协会氨基酸专业技术委员会委员。长期从事微生物代谢工程改造和系统生物学研究，先后主持国家重点研发计划、国家自然科学基金面上项目、山东省重点研发计划等 10 余项。在 *Nat Commun*、*Trends Biotechnol*、*Metab Eng* 等国际权威期刊发表论文 60 余篇，申请发明专利 90 余项，获得中国轻工业联合会科学技术进步二等奖、中国科学院科技促进发展奖和中国产学研合作创新成果奖。



L-谷氨酸生产关键技术创新与产业化应用

李学朋¹，陈久洲^{2,3}，张东旭¹，李树标¹，王小平⁴，吕金东¹，周敬¹，许志颖¹，郑平^{2,3}，孙际宾^{2,3}

1 内蒙古阜丰生物科技有限公司 内蒙古自治区生物发酵节能环保技术企业重点实验室，
内蒙古 呼和浩特 010030

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室，天津 300308

3 国家合成生物技术创新中心，天津 300308

4 呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司，内蒙古 呼伦贝尔 162650

李学朋，陈久洲，张东旭，李树标，王小平，吕金东，周敬，许志颖，郑平，孙际宾. L-谷氨酸生产关键技术创新与产业化应用. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4343-4351.

LI XP, CHEN JZ, ZHANG DX, LI SB, WANG XP, LÜ JD, ZHOU J, XU ZY, ZHENG P, SUN JB. Innovation of key technologies in fermentative production of L-glutamate and industrial application. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4343-4351.

Received: August 16, 2022; **Accepted:** September 5, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904900); National Natural Science Foundation of China (32000023)

Corresponding authors: CHEN Jiuzhou. E-mail: chen_jz@tib.cas.cn
ZHENG Ping. E-mail: zheng_p@tib.cas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0904900); 国家自然科学基金 (32000023)

摘要: L-谷氨酸是目前产量最大的氨基酸品种,也是我国生产规模最大的生物发酵产品。随着合成生物技术以及新型生产装备和技术的发展,国内 L-谷氨酸菌种和生产技术近年来取得了明显的提升。本文从 L-谷氨酸产业的现状分析和关键技术创新需求的角度出发,概述了 L-谷氨酸菌种和生产技术的研究进展,介绍了近年来 L-谷氨酸生产关键技术的创新开发和产业应用的进展。

关键词: L-谷氨酸; 谷氨酸棒杆菌; 工业菌种; 氨基酸生产

Innovation of key technologies in fermentative production of L-glutamate and industrial application

LI Xuepeng¹, CHEN Jiuzhou^{2,3}, ZHANG Dongxu¹, LI Shubiao¹, WANG Xiaoping⁴, LÜ Jindong¹, ZHOU Jing¹, XU Zhiying¹, ZHENG Ping^{2,3}, SUN Jibin^{2,3}

1 Key Laboratory of Bio-Fermentation Energy Saving and Environmental Protection Technology Enterprise of Inner Mongolia Autonomous Region, Inner Mongollia Fufeng Biotechnologies Co. Ltd., Huhhot 010030, Inner Mongolia, China

2 Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

4 Hulunbeier Northeast Fufeng Biotechnologies Co. Ltd., Hulunbuir 162650, Inner Mongolia, China

Abstract: The fermentative production of L-glutamate is by far the largest among the amino acids commercially produced. L-glutamate is also the largest fermentation product in China in terms of the production scale. With the rapid development in synthetic biotechnology, production equipment and process technologies, the performance of industrial strains and the production technology of L-glutamate have been advanced remarkably in recent years. By analyzing the current situation of L-glutamate industry and the demand for innovation of key technologies, this review summarizes the research progress of L-glutamate production strains and technologies, as well as the development of other key technologies in L-glutamate production and industrial application.

Keywords: L-glutamate; *Corynebacterium glutamicum*; industrial strains; amino acid production

L-谷氨酸是世界第一大氨基酸产品,全球年产量近 400 万 t。作为重要的食品鲜味剂,L-谷氨酸主要用于生产味精、鸡精等调味料以及各种食品,并在医药、化工、畜牧等领域应用广泛。我国是 L-谷氨酸最主要的生产国和消费国,年产量近 300 万 t,产值近 200 亿元。因此,L-谷氨酸产业在我国发酵工业中占据重要的地位。

20 世纪 50 年代,谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium*

glutamicum) 被分离并鉴定能够合成 L-谷氨酸,经过几十年的发展,通过生物发酵技术生产 L-谷氨酸已经取得了巨大进步,同时也引领和推动了其他氨基酸发酵技术的研究与应用^[1]。尽管发酵生产 L-谷氨酸的技术已经达到很高的水平,然而,我国 L-谷氨酸产业仍然面临创新性不足的问题,限制了产业的良性发展。近年来,随着工业菌种创制技术以及新型生产装备

和技术的快速发展, L-谷氨酸这一传统发酵产品生产关键技术的产业创新也逐步展开。阜丰集团与中国科学院天津工业生物技术研究所合作, 基于研究所先进的系统育种技术, 获得了高转化率新菌种, 结合企业工艺技术的创新开发和系统升级, 实现了 L-谷氨酸高效生产关键技术的产业创新与应用, 为我国发酵工业的创新发展提供了新的借鉴。本文对 L-谷氨酸产业现状、技术创新的必要性和研究现状进行了综述, 并对创新技术成果的开发和产业化应用情况进行了介绍。

1 国内外产业现状和技术创新的必要性

1.1 国内外产业现状

根据全球销售额统计, 谷氨酸钠 (即味精) 是全球第一大的氨基酸产品。国外 L-谷氨酸生产的厂家主要有日本味之素、协和发酵和田边制药以及德国德固赛等企业, 其中日本企业在技术指标和先进性上均居世界领先地位。国内方面, 1950 年发酵技术出现之前, 国内 L-谷氨酸产量只有 600 t, 随着发酵生产技术的发展, 1960 年产量增加到 6 000 t, 在 20 世纪 80 年代中期, L-谷氨酸产量达到了 8 万 t, 20 世纪 90 年代中期产量迅速增加到 65 万 t。据生物发酵产业协会 2020 年统计, 当年我国谷氨酸钠总产量达到了 295 万 t, 占世界总产量的 70% 以上。国内 L-谷氨酸市场经过几十年的发展和竞争, 生产企业已从最初的 300 家左右减少到 2018 年的 10 余家。

目前国外生产厂家主要使用价格更低、供给更可靠的甘蔗糖浆作为 L-谷氨酸产品的原料, 而国内大部分生产厂家以价格较高的玉米淀粉糖作为原料。与发达国家相比, 国内 L-谷

氨酸生产存在的问题有: (1) 传统育种技术落后, 菌种水平低; (2) 发酵过程控制精度差, 生产效率低; (3) 产品质量低, 污染物排放量大。

1.2 L-谷氨酸产业技术创新的必要性

技术层面上, 目前 L-谷氨酸产业最突出的问题主要表现在菌种产酸水平和转化率低、原料处理技术相对落后、发酵资源综合利用程度低、污染严重等方面, 造成这一系列问题的主要原因如下: (1) 现有 L-谷氨酸工业菌种主要通过传统诱变育种获得, 技术水平虽然较高, 但菌株遗传背景复杂, 高产机制不清晰, 基因操作也比较困难, 加上 L-谷氨酸合成途径较短, 可改造靶点和策略相对有限, 因此工业菌种水平进一步改造提升的难度很大。(2) 补料控制工艺不成熟, 虽然发酵过程补料的理论成果层出不穷, 可是实际生产中应用效果却难如人意, 发酵过程的自动优化补料问题一直未得到很好地解决。(3) 发酵培养基成分的影响, L-谷氨酸发酵培养基中大量使用玉米浆、豆粕水解液和糖蜜等有机氮源, 其虽然价格低, 营养丰富, 但是也含有大量的杂质, 像蛋白质、色素、淀粉粒和不溶性沉淀物等其他有毒有害物质, 这些物质的存在使得发酵过程稳定性差, 发酵效益低, 且为后续 L-谷氨酸的分离提取造成了很大的困难。

综上所述, 现阶段我国 L-谷氨酸产业的发展处于较大的瓶颈阶段, 行业内企业面临较大的国际竞争压力, 且具有提升自身菌种和整体技术水平的强烈需求和内在动力。针对 L-谷氨酸发酵工业中存在的不足, 加快 L-谷氨酸等传统氨基酸品种高效绿色生产技术等方面的技术集成创新和应用推广, 符合国家产业发展的方向和重大战略需求。

2 L-谷氨酸菌种和生产技术研究进展

自日本木下祝郎以发酵法制取 L-谷氨酸成功以来,用微生物发酵法生产味精就成为世界味精生产的主要方法,L-谷氨酸生产菌种和发酵工艺研究也得到了充足的发展,工业规模也在逐年扩大。但是,随着原料价格的上涨和市场竞争的加剧,选育优良菌种并开发绿色高效的生产工艺成为了 L-谷氨酸生产和研究的重点。谷氨酸棒杆菌具有天然合成 L-谷氨酸的能力,是目前 L-谷氨酸工业普遍采用的菌种。近年来,一些耐酸性新底盘凭借其优秀的抗逆性能也被用作 L-谷氨酸生产的研究^[2-3],但目前尚未在产业中广泛推广使用,因此本文主要探讨谷氨酸棒杆菌菌种和生产技术的研究进展。

2.1 L-谷氨酸菌种研究

谷氨酸棒杆菌虽然具有天然的 L-谷氨酸高效合成能力,然而正常培养条件下谷氨酸棒杆菌几乎不产 L-谷氨酸,这种高产 L-谷氨酸的能力需要在特定的培养条件下提高细胞膜的通透性来实现,例如生物素限制、升高温度或者添加影响细胞外膜合成的抑制剂^[4-5]。现有 L-谷氨酸生产菌株主要通过诱变筛选获得,近年来,随着基因工程技术和合成生物技术的快速发展,L-谷氨酸高产机制逐步得到解析,基于新型合成生物技术的 L-谷氨酸生产菌种的创新升级也已经逐步展开。

2.1.1 L-谷氨酸工业菌种的演变

由于谷氨酸棒杆菌最初只能在生物素限制、添加吐温-40 或青霉素等条件下生产 L-谷氨酸,因此谷氨酸棒杆菌细胞表面结构与 L-谷氨酸生物合成的关系首先被关注。研究表明上述诱导条件下细胞表面结构成分的合成受阻,导致细胞膜通透性提高,进而促使 L-谷氨酸快

速分泌^[6-7]。早期的 L-谷氨酸工业菌种主要通过传统的生物素“亚适量”工艺或者添加表面活性剂的“强制性”工艺实现 L-谷氨酸的高效生产,然而过低的生物素含量或者外源限制因素的引入降低了发酵中后期菌体的活力,也限制了菌株性能的进一步发挥。

近年来,温度敏感型菌种和工艺逐步在 L-谷氨酸的发酵生产中推广运用。温度敏感型菌株中部分关键基因的突变导致菌株在高温条件下细胞壁合成受限,降低了细胞外膜的刚性,促使 L-谷氨酸快速分泌^[8-11]。由于该菌株不仅能够耐受生物素,而且能利用淀粉粗原料和糖蜜发酵生产 L-谷氨酸,使得 L-谷氨酸的生产不再受限于传统的生物素“亚适量”工艺或者添加表面活性剂的“强制性”工艺。同时,温度敏感型菌株发酵后期升温不仅有助于菌株性能的最大化释放,而且对于发酵过程中的节能减排至关重要,因此,温度敏感型菌株和工艺的应用为 L-谷氨酸发酵工业带来了技术革新,并促进了 L-谷氨酸清洁生产工艺的深入研究^[12]。

2.1.2 L-谷氨酸高产机制的研究

现有 L-谷氨酸生产菌株主要通过多轮诱变筛选获得,高产机制复杂,对其功能机制的解析有助于开发更高水平的工业菌种。

在 L-谷氨酸分泌方面,尽管细胞表面结构的变化可以影响 L-谷氨酸的生产,但这并不是诱导 L-谷氨酸合成和分泌的主要因素。已有研究证明谷氨酸棒杆菌机械敏感通道蛋白 MscCG 是主要的 L-谷氨酸外排蛋白,在生物素亚适量或者添加表面活性剂等诱导成分的条件下,细胞膜的张力发生变化,可以激活机械敏感通道蛋白 MscCG,从而导致 L-谷氨酸外排(图 1)^[13]。目前已经发现 MscCG 的多种突变体都可以促使菌株组成型分泌 L-谷氨酸,在菌株 Z188 等 L-谷氨酸生产菌株中还鉴定了另外一种

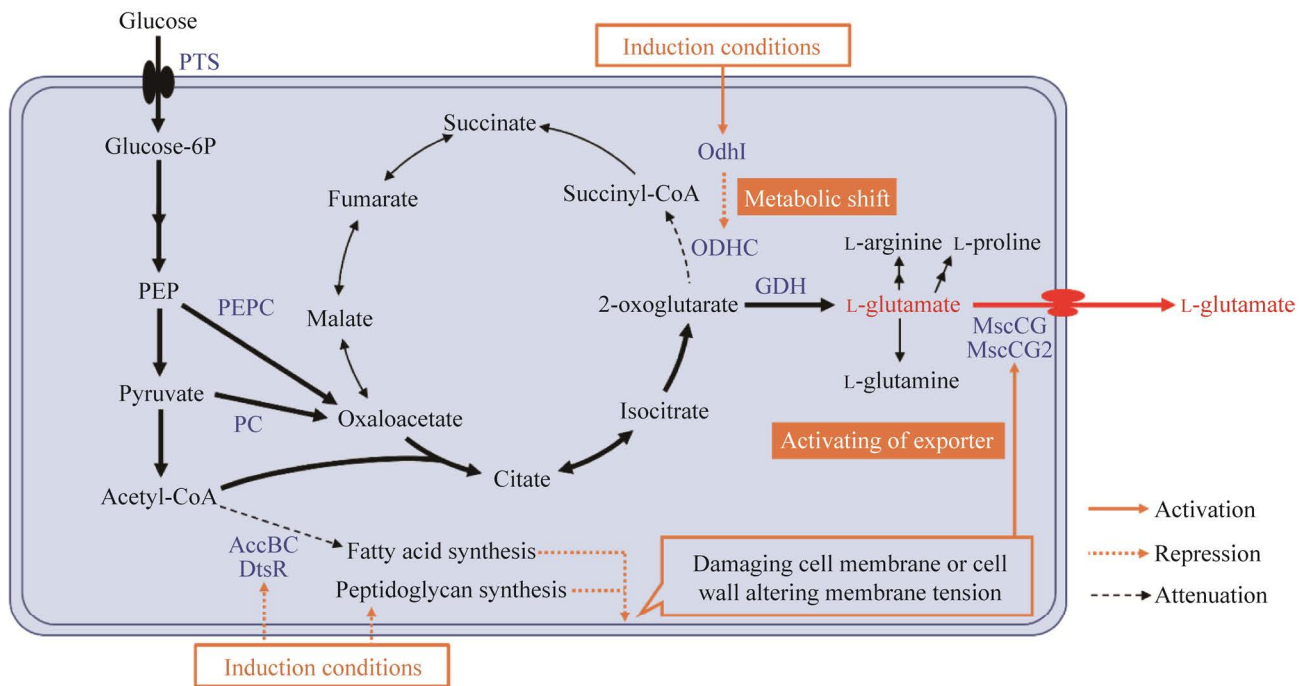


图 1 L-谷氨酸的高产机制

Figure 1 Overview of L-glutamate production mechanism in *C. glutamicum*.

机械敏感通道蛋白 MscCG2，为新型 L-谷氨酸菌种的开发提供了重要的改造靶点^[14-16]。

在 L-谷氨酸合成代谢方面，谷氨酸棒杆菌中 L-谷氨酸的合成主要通过谷氨酸脱氢酶，以 NADPH 为辅酶，催化 α -酮戊二酸和铵根离子合成 L-谷氨酸，其代谢层面的调控主要涉及糖酵解、三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 以及 L-谷氨酸下游途径代谢流的重新分配。在生物素亚适量等条件诱导的 L-谷氨酸合成过程中， α -酮戊二酸脱氢酶复合体 (2-oxoglutarate dehydrogenase complex, ODHC) 的活性会显著降低，引发代谢流向 L-谷氨酸的合成通路，因此 ODHC 也成为了代谢工程改造提升 L-谷氨酸产量的关键靶点^[17-19]。同时，新型调控蛋白 OdhI 也被鉴定参与 ODHC 的调控，对生物素亚适量等诱导条件下 L-谷氨酸的生物合成至关重要 (图 1)^[20-21]。L-谷氨酸的大量合成会导致 TCA 循环通量下降，因此四碳

回补途径也是维持 L-谷氨酸的高效合成的关键步骤^[22-23]。此外，由于 L-谷氨酸是谷氨酸家族氨基酸合成的前体，其下游代谢的调控也会影响菌株的生长和 L-谷氨酸合成的平衡^[24]。上述代谢调控的关键靶点已经广泛用于改造创建新型 L-谷氨酸菌种^[25]，随着系统生物技术的快速发展，未来新技术推动的 L-谷氨酸高产机制也将为基于合成生物技术的 L-谷氨酸菌种的升级改造提供更多新的改造靶点。

2.1.3 合成生物学在 L-谷氨酸菌种创制中的应用

合成生物技术的快速发展为 L-谷氨酸菌种的创新与升级提供了强大的工具支持^[26]。在谷氨酸棒杆菌底盘改造技术方面，中国科学院天津工业生物技术研究所突破了谷氨酸棒杆菌基因组编辑的技术瓶颈，开发了国际领先的基于 CRISPR/Cas9 的高效基因组编辑技术工具包，实现了基因组规模的精准敲除、插入、失活和

碱基编辑^[27-34]。其中利用基于 CRISPR 的单碱基快速碱基编辑技术 MACBETH (multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method) 对 L-谷氨酸合成途径关键基因进行了编辑测试, 确认了有利于 L-谷氨酸合成的突变位点^[32]。研究所还创新开发了基于 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的多基因表达调控技术, 对 L-谷氨酸代谢通路多基因进行了快速表达调控, 获得了有利于产物合成的新型改造策略^[35]。上述育种技术的开发为 L-谷氨酸新菌种的开发提供了重要的技术支持, 随着 L-谷氨酸高产机制的不断解析以及工业合成生物技术的不断发展, 未来通过从头设计和构建, 获得人工的 L-谷氨酸生产菌株, 有望成为进一步提升 L-谷氨酸菌种技术水平的新策略。

2.2 L-谷氨酸生产工艺研究

目前, L-谷氨酸普遍采用的是分批补料发酵工艺。常规的发酵培养基中含有玉米浆、豆粕水解液和糖蜜等复杂原料, 导致发酵液黏稠、传质差, 前期营养过剩反而抑制菌体活力, 造成发酵过程稳定性差、产物提取困难。为解决上述问题, 天津科技大学对 L-谷氨酸发酵工艺控制进行了持续优化。首先, 采用全营养流加策略弥补菌体因生长代谢而消耗的营养物质, 解决 L-谷氨酸发酵前期营养过剩、后期菌体活力不足和产酸能力下降等问题^[36]。其次, 采用生物氮素 (含有丰富的氨基酸、蛋白质及小分子肽等) 对发酵培养基中的玉米浆和豆粕水解液等氮源进行替代, 开发了 L-谷氨酸清洁发酵工艺, 提升了菌种发酵性能^[37]。最后, 将发酵罐与陶瓷膜相偶联, 开发了膜偶联间歇透析发酵工艺, 实现发酵过程中发酵液的透析排出和新鲜培养基的添加, 解除了高浓度 L-谷氨酸的反馈调节作用及有毒害副产物的抑制作用, 促使 L-谷氨酸代谢流增加, 发酵周期

和糖酸转化率明显提升, 同时, 发酵液的质量也得到了明显改善, 简化了发酵过程控制及后续产物的分离提取^[38]。

3 L-谷氨酸生产关键技术创新和应用

3.1 L-谷氨酸生产关键技术的创新开发

鉴于产业发展的需要, 阜丰集团前期重点引进和开展了 L-谷氨酸环保型高产酸菌株工艺的开发, 有助于企业在竞争中获得更大的生存空间。为了进一步提升企业的市场竞争力, 实现 L-谷氨酸高效绿色生物制造, 阜丰集团与中国科学院天津工业生物技术研究所合作, 开展了温敏型 L-谷氨酸生产菌种的提升改造工作。中国科学院天津工业生物技术研究所相继突破了谷氨酸棒杆菌系统生物学分析、高通量筛选等先进育种技术的瓶颈, 发展了适用于谷氨酸棒杆菌工业菌株的比较基因组、转录组和蛋白组等多组学分析方法^[39-40], 大幅提升了高产机制解析及代谢瓶颈诊断能力; 同时建立了基于新型诱变和孔板发酵及检测的自动化高通量筛选技术, 比传统育种技术中摇瓶筛选的效率提高了 1 000 倍以上^[41]; 通过对工业菌种的系统分析和高通量筛选进化, 获得了新一代 L-谷氨酸生产菌株, 在其他生产指标没有明显差异的基础上, 影响 L-谷氨酸生产成本的关键技术指标——糖酸转化率较出发菌株显著提升, 并形成了多项自有专利技术。

在发酵工艺方面, 阜丰集团联合天津科技大学, 针对 L-谷氨酸新菌种开发了发酵精准控制工艺。通过近红外光谱学和偏最小二乘 (partial least squares, PLS) 方法对发酵过程进行预测模拟, 结合发酵过程的代谢流定量分析, 建立了膜偶联间歇透析和超声辅助细胞转型的发酵新工艺, 实现了 L-谷氨酸发酵的多尺度精准控制, 在 780 kL 发酵罐中 L-谷氨酸产酸

率达到 230 g/L, 平均糖酸转化率 73%, 发酵周期 34 h, 达到了国际领先水平。在分离提取与废水处理工艺方面, 阜丰集团针对 L-谷氨酸提取分离过程高消耗及高污染等问题, 组合运用碟片分离偶联膜过滤, 创造性地将超声波技术应用于 L-谷氨酸转晶过程, 完善了 L-谷氨酸浓缩连续等电结晶工艺, 使 L-谷氨酸收率和纯度达到 90%和 99%以上, 副产物焦谷氨酸含量下降 50%以上, 与传统的等电离交分离工艺相比, 硫酸和液氨的消耗量分别降低了 44.1%和 31.0%, 蒸汽消耗降低 28.0%。开发了全封闭的 L-谷氨酸工业废水循环利用装置和技术, 一次、二次冷凝水及生产废水的分级利用率均达到 90%以上。利用高效微生物复合菌剂处理提取废水, 促使废水达到《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级 A 排放标准, 有效减少了环境污染物排放。

基于上述菌种和技术的创新开发, 阜丰集团在呼伦贝尔、呼和浩特和宝鸡这 3 个生产基地实现了新菌种的百万吨级工业化应用, 规模覆盖国内总产量的 40%, 在工业生产的产率和糖酸转化率、提取收率、玉米消耗、能耗和废水排放等方面展现出明显优势。

3.2 L-谷氨酸新菌种和生产技术的先进性

3.2.1 L-谷氨酸菌种性能的先进性

新型 L-谷氨酸菌种的优势主要体现在高产酸性、高转化率和较强的环境适应性。菌种的高产酸特性可以大幅提高发酵强度, 有效地降低生产投入的电、汽等动力能源的消耗, 使得当今能源紧张、原料价格高问题得以解决; 特别是企业的规模、产量效应方面, 发酵强度的大幅提高, 能够快速提升企业的产量规模, 加速企业的扩张。菌种的高转化率特性进一步凸显了主原料葡萄糖的成本优势, 随着农产品深加工技术和规模程度不断地提高, 粮食市场

的供不应求, 价格的不断上涨, 降低原料的消耗和成本, 成为必须面对和解决的首要问题, 高转化率即预示着原料成本的大幅降低。新菌种对于高生物素、高蛋白、高黏度等环境条件都有着较高的适应能力, 生产能够最大限度地培养基的调整和优化, 达到原辅料的多样化, 打破传统发酵生产原辅料的局限, 企业能够根据原料市场变化和自身特点, 灵活选用, 实现了原辅料成本的最低化。

3.2.2 L-谷氨酸生产新技术的先进性

根据 L-谷氨酸新菌种的发酵特点, 采用浓缩、高温、连续等电提取工艺, 优化确定最佳工艺条件, 提高了 L-谷氨酸收率和产品质量, 同时彻底取消了离交工艺, 改变味精工业废水性质, 使得味精废水产生量大大减少。提取工艺的更新, 有效降低了环保废水的处理难度, 具有较好的环境效益, 主要表现在以下 3 个方面: (1) 低消耗、低污染, 取消离交工艺节省液氨使用量, 降低硫酸消耗量, 同时高浓度废水减少 60%以上, 减轻环保压力。(2) 降低料液黏度不易糊罐, 利于 L-谷氨酸结晶。(3) 有效提高设备利用率并降低精制成本, 浓缩连续等电工艺采用连续化操作, 提取设备只有离交工艺的 1/3, 精制使用转晶中和液, 易脱色、过滤, 同时缩短结晶周期, 使精制各项消耗大幅度降低。

4 L-谷氨酸生产关键技术应用的产业化影响

L-谷氨酸是一种传统发酵产品, 产业规模大, 菌种生产水平高, 技术创新提升难度大。合成生物技术的快速发展为传统氨基酸菌种的升级改造提供了强大的工具支持。为实现 L-谷氨酸高效绿色生物制造的总体目标, 中国科学院天津工业生物技术研究所与阜丰集团合作, 以技术创新和集成为推动力, 在氨基酸工业菌

种创制和绿色生产关键共性技术研发中取得重大突破,形成了适用于工业化生产的完整技术体系。新菌种和工艺的产业化应用,使阜丰集团生产技术指标、产品质量大幅度提高,稳居国内同行业首位,增强了集团味精出口能力,并促进了农产品深加工的快速发展。同时,推广以龙头企业和名牌产品为主导,使农产品通过先进技术转化增值,促进农业产业化发展,具有极大的示范和带动作用,促进了我国发酵行业的科技进步,使味精发酵工业生产技术水平显著提高,具有很高的经济、社会和环境效益。科研院所与龙头企业强强联合,不仅提升了传统产品生产技术的水平,解决了行业发展的瓶颈问题,也为其他传统发酵产品的技术革新提供了值得借鉴的成功范例。

REFERENCES

- [1] Kimura E. Metabolic engineering of glutamate production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2003, 79: 37-57.
- [2] Mika M, Hiroshi I, Eiji O, et al. L-glutamic acid-producing bacterium and method for producing L-glutamic acid: EP, 955368B1, 2009-12-09.
- [3] Yoshihiko H, Hiroshi I. An L-glutamic acid producing bacterium and a method for producing L-glutamic acid: EP, 2054500B1, 2016-11-23.
- [4] Hirasawa T, Kim J, Shirai T, et al. Molecular mechanisms and metabolic engineering of glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Subcell Biochem*, 2012, 64: 261-281.
- [5] Hirasawa T, Wachi M. Glutamate fermentation-2: mechanism of L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2017, 159: 57-72.
- [6] Nampoothiri KM, Hoischen C, Bathe B, et al. Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(1): 89-96.
- [7] Kimura E, Yagoshi C, Kawahara Y, et al. Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising DtsR and a biotin-containing subunit. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(7): 1274-1278.
- [8] Shi T, Fan XG, Wu YS, et al. Mutation of genes for cell membrane synthesis in *Corynebacterium glutamicum* causes temperature-sensitive trait and promotes L-glutamate excretion. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2020, 34(1): 38-47.
- [9] Shi T, Ma Q, Liu XQ, et al. Double deletion of *murA* and *murB* induced temperature sensitivity in *Corynebacterium glutamicum*. *Bioengineered*, 2019, 10(1): 561-573.
- [10] Levefaudes M, Patin D, De Sousa-d'Auria C, et al. Diaminopimelic acid amidation in Corynebacteriales: new insights into the role of LtsA in peptidoglycan modification. *J Biol Chem*, 2015, 290(21): 13079-13094.
- [11] Hirasawa T, Wachi M, Nagai K. A mutation in the *Corynebacterium glutamicum ltsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *J Bacteriol*, 2000, 182(10): 2696-2701.
- [12] 陈宁, 赵丽丽, 张克旭. L-谷氨酸温度敏感突变株的选育. *生物技术通讯*, 2002, 13(2): 152-154.
Chen N, Zhao LL, Zhang KX. Breeding of L-glutamic acid temperature-sensitive mutant. *Lett Biotechnol*, 2002, 13(2): 152-154 (in Chinese).
- [13] Nakayama Y. *Corynebacterium glutamicum* mechanosensing: from osmoregulation to L-glutamate secretion for the avian microbiota-gut-brain axis. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 201.
- [14] Nakamura J, Hirano S, Ito H, et al. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(14): 4491-4498.
- [15] Becker M, Krämer R. MscCG from *Corynebacterium glutamicum*: functional significance of the C-terminal domain. *Eur Biophys J*, 2015, 44(7): 577-588.
- [16] Wang Y, Cao GQ, Xu DY, et al. A novel *Corynebacterium glutamicum* L-glutamate exporter. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(6): e02691-17.
- [17] Asakura Y, Kimura E, Usuda Y, et al. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(4): 1308-1319.
- [18] Shimizu H, Tanaka H, Nakato A, et al. Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2003, 25(5): 291-298.
- [19] Kawahara Y, Takahashi-Fuke K, Shimizu E, et al.

- Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(7): 1109-1112.
- [20] Kim J, Hirasawa T, Saito M, et al. Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin- and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(1): 143-151.
- [21] Boulahya KA, Guedon E, Delaunay S, et al. OdhI dephosphorylation kinetics during different glutamate production processes involving *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(5): 1867-1874.
- [22] Sato H, Orishimo K, Shirai T, et al. Distinct roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(1): 51-58.
- [23] Shirai T, Fujimura K, Furusawa C, et al. Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis. *Microb Cell Fact*, 2007, 6: 19.
- [24] Li XF, Bao T, Osire T, et al. MarR-type transcription factor RosR regulates glutamate metabolism network and promotes accumulation of L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum* G01. *Bioresour Technol*, 2021, 342: 125945.
- [25] Wen JB, Bao J. Engineering *Corynebacterium glutamicum* triggers glutamic acid accumulation in biotin-rich corn stover hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 86.
- [26] 王钰, 郑平, 孙际宾. 谷氨酸棒杆菌的代谢工程使能技术研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1603-1618.
Wang Y, Zheng P, Sun JB. Recent advances in developing enabling technologies for *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1603-1618 (in Chinese).
- [27] Li MY, Chen JZ, Wang Y, et al. Efficient multiplex gene repression by CRISPR-dCpf1 in *Corynebacterium glutamicum*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 357.
- [28] Zhang K, Zhang ZH, Kang JN, et al. CRISPR/Cas13d-mediated microbial RNA knockdown. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 856.
- [29] Wang Y, Cheng HJ, Liu Y, et al. *In-situ* generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming via CRISPR-guided base editing. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 678.
- [30] Liu J, Liu MS, Shi T, et al. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an L-proline exporter for L-proline hyperproduction. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 891.
- [31] Wang Y, Liu Y, Li JW, et al. Expanding targeting scope, editing window, and base transition capability of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(11): 3016-3029.
- [32] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metab Eng*, 2018, 47: 200-210.
- [33] Liu J, Wang Y, Zheng P, et al. CRISPR/Cas9-mediated ssDNA recombineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Bio-protocol*, 2018, 8(19): e3038.
- [34] Liu J, Wang Y, Lu YJ, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 205.
- [35] Sun DH, Chen JZ, Wang Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* by synthetic small regulatory RNAs. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(2): 203-208.
- [36] 刘景阳, 刘云鹏, 徐庆阳. 谷氨酸全营养流加发酵新工艺. *食品与发酵工业*, 2021, 47(7): 14-20.
Liu JY, Liu YP, Xu QY. New technology of total nutrient feeding fermentation of glutamic acid. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(7): 14-20 (in Chinese).
- [37] 户红通, 徐达, 徐庆阳, 等. 谷氨酸清洁发酵工艺研究. *中国酿造*, 2018, 37(10): 51-56.
Hu HT, Xu D, Xu QY, et al. Study on clean fermentation process of glutamic acid. *China Brew*, 2018, 37(10): 51-56 (in Chinese)
- [38] 户红通, 徐达, 徐庆阳, 等. 谷氨酸发酵过程膜偶联间歇透析发酵工艺研究. *食品与发酵科技*, 2018, 54(1): 9-13, 23.
Hu HT, Xu D, Xu QY, et al. Study on membrane coupled intermittent dialysis fermentation process for glutamic acid fermentation. *Food Ferment Sci Technol*, 54(1): 9-13, 23 (in Chinese).
- [39] Wu Y, Li PP, Zheng P, et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium glutamicum* B253, a Chinese lysine-producing strain. *J Biotechnol*, 2015, 207: 10-11.
- [40] Zhang QQ, Zheng XM, Wang Y, et al. Comprehensive optimization of the metabolomic methodology for metabolite profiling of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(16): 7113-7121.
- [41] Sun X, Li QG, Wang Y, et al. Isoleucyl-tRNA synthetase mutant based whole-cell biosensor for high-throughput selection of isoleucine overproducers. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112783.

(本文责编 陈宏宇)