

发酵法生产 L-谷氨酰胺研究进展

汤亚杰, 张 伟, 李红梅, 李冬生, 吴思方

(湖北工业大学生物工程学院, 工业微生物湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430068)

摘要: L-谷氨酰胺(L-glutamine, L-Gln)是L-谷氨酸的 γ -羧基酰胺化的一种条件性必需氨基酸, 临床上主要用于治疗胃溃疡、缓解运动疲劳、调节免疫力、增强脑神经机能以及辅助治疗癌症等, 是一种极有发展前途的新药。发酵法已成为目前生产L-Gln最常用的方法, 但生产规模较小, 生产能力远不能满足市场需求。本文对发酵法生产L-Gln的关键技术环节(如菌种选育、发酵工艺和分离纯化)的研究进展进行综述, 并详细阐述L-Gln生物合成代谢调控和新型过滤及其耦联技术在下游分离纯化过程中的应用。

关键词: L-谷氨酰胺; 发酵法; 菌种选育; 代谢工程; 发酵工艺优化; 分离纯化

Advance on Production of L-Glutamine by Microbial Fermentation

TANG Ya-jie, ZHANG Wei, LI Hong-mei, LI Dong-sheng, WU Si-fang

(Hubei Provincial Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Bioengineering,
Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: L-glutamine (hereafter referred to as L-Gln) is a acylation- γ -carboxy-glutamic acid, which is in the part of protein structure and is the nitrogen source of biomaterial containing nitrogen. L-Gln plays key role in the cure of gastritis and stomach intestine ulcer, relieving of tiredness, regulating immunity, adjusting cerebral nerves and curing cancer. L-Gln at the market is mainly produced through the fermentation process of microbes. This paper briefly reviewed the advanced development of key fermentation technologies, such as the breeding of producing strain, fermentation processes optimization, separation and purification in down-stream process, especially biosynthetic metabolic engineering, new filtration and coupling technology.

Key words L-glutamine fermentation method breeding of producing strain metabolic engineering fermentation process optimization separation and purification

中图分类号: R977.4 Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0499-05

L-谷氨酰胺(L-glutamine, L-Gln)是L-谷氨酸的 γ -羧基酰胺化的一种条件性必需氨基酸(图1), 相对分子质量146.15, 熔点185℃(分解), 晶体呈白色斜方或粉末状, 结晶状态下稳定, 无臭, 稍有甜味, 溶于水(水溶液呈酸性), 等电点5.65, 几乎不溶于乙醇和乙醚。L-Gln属中性氨基酸, 在偏酸、偏碱及较高温度下易分解成谷氨酸或环化为吡咯烷酮二羧酸。



图1 L-谷氨酰胺分子结构

Fig.1 Molecular structure of L-glutamine

L-Gln是人体血液中浓度最高(500~900 $\mu\text{mol/L}$)的游离氨基酸, 所占比例高达61%。L-Gln在肾脏是肾小管泌氨作用的主要氮源, 在肝脏是糖异生和尿素合成的原料, 在神经组织又是神经递质的前体物质, 在血液中有暂时解除氨毒的作用, 现已普遍认为L-Gln是一种“条件性必需”氨基酸。

L-Gln主要生理功能如下:

治疗胃溃疡^[1]。因外源L-Gln能促使胆汁分泌和正常排粪, 故L-Gln已用于临床治疗腹部溃疡、节段性回肠炎和过敏性肠炎。如日本寿制药株式会社生产的“麦滋林”, 为L-Gln/莫磺酸钠颗粒剂, 该胃药制剂现已进入我国市场。

收稿日期: 2007-03-07

基金项目: 人事部留学人员科技活动择优资助优秀类项目; 教育部留学回国人员科研启动基金项目;

湖北省“楚天学者”奖励计划项目; 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队资助项目(T200608);

武汉市青年科技晨光计划项目(20065004116-31); 湖北工业大学科学技术基金重大项目(306.18002);

湖北省自然科学基金青年杰出人才资助项目(2006ABB034)

作者简介: 汤亚杰(1973-), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物化工。E-mail: yajietang@hotmail.com

缓解运动综合症或运动疲劳^[2]。L-Gln可以调节蛋白质合成,抑制蛋白质降解、糖原合成、细胞生长,激活免疫,提高生长激素水平。让成年人喝下一瓶含有2g L-Gln的饮料,90min内,其血液样品中生长激素最高可增长430%。目前已大量用于治疗运动员的运动综合症和高强度劳动或运动后的疲劳恢复。

调节机体免疫力^[3-4]。外源L-Gln会刺激免疫球蛋白分泌,促进免疫系统重建,如:烧伤、艾滋病、关节炎等免疫系统的恢复。

增强脑神经机能^[5]。L-Gln可被用作中枢神经抑制剂,在大脑中被转化成谷氨酸,与葡萄糖一起参与脑代谢,以平衡脑内电流脉冲,有利于人脑的清醒和情绪稳定,是少数几种能克服血脑屏障和参与大脑化学反应的物质之一,被称为“大脑燃料”。

L-Gln在癌症治疗上的潜在价值^[6],减少癌症治疗中化疗和放疗的副作用。

1 L-谷氨酰胺的生产方法

由于L-Gln重要的生理功能和临床治疗作用,如何实现L-Gln的工业化生产越来越受到关注。L-Gln的生产方法主要有化学合成法、酶促合成法和发酵法。

1.1 化学合成法

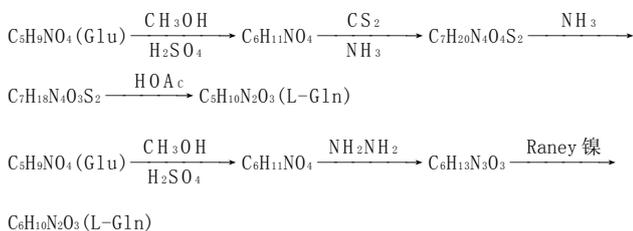


图2 化学法合成L-Gln流程图

Fig.2 Chemical synthetic pathway for production of L-Gln

主要有如图2所示两种化学合成法生产L-Gln:

由化学合成法流程图可见,两种方法均采用浓硫酸作为必需的催化剂,反应条件苛刻、反应步骤多、收率低。第二种方法虽有所改进,但仍很复杂,且要求使用催化剂Raney镍,对工艺条件提出了新的要求。化学合成法使用的化学试剂在产品中会有不同程度的残留,L-Gln作为一种药或功能食品,对纯度有较高的要求,而且大量化学试剂的使用会造成环境污染,从而限制了产品质量及使用范围。

1.2 酶促合成法

酶促合成法生产L-Gln是以 NH_4^+ 及谷氨酸作原料,



图3 酶法合成L-Gln流程图

Fig.3 L-Gln produced by enzyme catalysis

经L-Gln合成酶(GS)催化而成,如图3所示。

与化学合成法相比,酶促合成法反应步骤相对简单,其中三磷酸腺苷(ATP)是必需的。ATP价格昂贵,同时酶促反应底物 NH_4^+ 、副产品二磷酸腺苷(ADP)都明显抑制L-Gln的生成,因此该生产方法不能满足大规模工业化生产的需要。

1.3 发酵法

发酵法是目前最常用的L-Gln生产方法,具有原料来源广泛、生产成本低、产品质量可控、产物单一等优点,适宜于大规模工业化生产。1961年,Tsunoda等^[7]首先发现,除了谷氨酸以外,在谷氨酸发酵液中还有L-Gln;1963年,Oshima等^[8]通过改变谷氨酸微球菌的发酵条件使谷氨酸发酵转向L-Gln发酵;七十年代,Nakanishi等^[9-11]进一步证实了,改变发酵条件可以使谷氨酸产生菌从谷氨酸发酵转向L-Gln发酵。八十年代后,我国在实验室小试或中试规模中进行了L-Gln发酵法生产,但是L-Gln产量低^[12-13],至今未能进行大规模工业化生产。

本文对发酵法生产L-Gln的关键技术环节(如菌种选育、发酵工艺和分离纯化)的研究进展进行综述,并详细阐述L-Gln生物合成代谢调控和新型过滤及其耦联技术在下游分离纯化过程中的应用。

2 发酵法生产L-谷氨酰胺

2.1 菌种选育

L-Gln生产菌种主要来自谷氨酸生产菌,如棒杆菌(*Corynebacterium* sp.)^[9-11]、短杆菌(*Brevibacterium* sp.)^[7,14]、微球菌(*Micrococcus* sp.)^[8]。此外,还有非谷氨酸生产菌,如产黄菌(*Flavobacterium rigense*)的一些变异菌种^[15-18]。

目前,L-Gln生产菌种的选育主要采用传统的随机诱变结合定向筛选的方法,随机诱变包括化学诱变、物理诱变和物理化学复合诱变等,常用的诱变剂和诱变因素有硫酸二乙酯、亚硝基胍、 γ -射线、紫外线等;定向筛选包括对氨基苯甲酸的结构类似物磺胺胍的抗性突变筛选、L-Gln结构类似物抗性突变筛选、高 NH_4^+ 浓度抗性突变筛选等。此外,随着人们对L-Gln生产菌株遗传特性的研究,通过基因工程的手段改造生产菌种提高L-Gln的生产能力,有可能从根本上解决L-Gln生产能力低的难题。

Yamada等^[16,18]以非谷氨酸生产菌产黄菌属(*Flavobacterium rigense*)FERM-P no. 3556为起始菌种,通过紫外诱变获得了一株青霉素抗性突变株FERM-P no. 3628,L-Gln生产能力由10g/L提高到25g/L。

湖北工业大学吴思方等^[19,24]采用 γ -射线-硫酸二乙酯- γ -射线进行复合诱变,磺胺胍抗性筛选得到一株高产

菌株 SH77, L-Gln 平均生产能力由 8.2g/L 提高到 55.3g/L。

孙智杰等^[20]在谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*) ATCC 14067 中表达增强摄氧的透明颤菌血红蛋白基因(*Vitreoscilla hemoglobin gene, vgb*), 以此提高细胞的摄氧能力及能量的供给水平, 结果在溶氧浓度只有 5% 的条件下, 重组菌比野生菌细胞干重提高了 1.2 倍, 达到了 54.1g/L, 谷氨酸的生产能力提高了 6.5 倍, 达到了 9.56g/L, L-Gln 的生产能力提高了 1.4 倍, 达到了 5.51g/L。

Usdin 等^[21]从丙酮丁醇梭杆菌(*Clostridium acetobutylicum*) P262 中克隆 L-Gln 合成酶的编码基因, 构建 pHZ200 重组质粒, 导入 *E. coli* ET8051 中进行克隆表达, 并研究了 L-Gln 合成酶的表达调控, 结果发现 L-Gln 合成酶不受腺嘌呤共价修饰调控, 重组菌的生长速度是野生菌的 1.7 倍; Yamamoto 等^[22]从腐臭假单胞菌(*Pseudomonas taetrolens*) 中克隆谷氨酰胺合成酶基因 Y-30, 导入大肠杆菌中进行克隆表达, 其表达量是 *Pseudomonas taetrolens* 中的 30 倍。上述基础工作, 为构建工程菌大规模工业化生产 L-Gln 奠定了一定基础。

2.2 发酵工艺

2.2.1 培养基

Nabe 等^[16]研究了 NH_4^+ 浓度和延胡索酸对产黄菌属(*Flavobacterium rigense*) 生产 L-Gln 的影响, 结果发现延胡索酸是 L-Gln 生产的关键影响因子; 高浓度 NH_4^+ (0.9%~1.6%) 有利于 L-Gln 的生产, 但是当 NH_4^+ 浓度大于 1.8% 时又会抑制 L-Gln 的生产; 最终得出当 NH_4^+ 浓度为 0.9%~1.6%、延胡索酸浓度为 5.5% 时, L-Gln 生物合成达到最大值 25g/L。

Anderson 等^[23]考察了 NaCl 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 生产 L-Gln 的影响, 结果发现添加 5.8% 的 NaCl, L-Gln 的含量提高了 2800%, 达到 161.82nmol/mg 干细胞; 添加 10% NaCl, L-Gln 的含量提高了 3400%, 达到 195.71nmol/mg 干细胞。

湖北工业大学吴思方等^[24]研究了氮源种类和浓度、金属离子、 CaCO_3 等对 L-Gln 生产的影响, 得出最佳发酵培养基为: 葡萄糖 16%、氯化铵 4%、玉米浆 0.5%、磷酸氢二钾 0.05%、磷酸二氢钾 0.05%、硫酸镁 0.05%、尿素 1.4%、硫酸亚铁 0.5mg/100ml、硫酸锰 2.5mg/100ml、硫酸锌 0.5mg/100ml、VB₁ 0.1mg/100ml, 结果使菌株 SH77 的 L-Gln 生产能力平均达 53.0g/L, 最高达 56.2g/L, 这是目前文献报道的最高产量。

2.2.2 发酵控制方式

因为 L-Gln 生物合成是在谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS) 催化下进行的, 所以发酵法生产 L-Gln 的关键在于调控 GS 酶活性。

陈奎发等^[25]为了解决高浓度铵盐阻遏 GS 酶表达与 L-

Gln 合成需要过量铵之间的矛盾, 在谷氨酸棒杆菌突变株 NS61 中利用 GS 酶的表达特性, 设计了在线氮饥饿处理的发酵过程; 在限制初始氮源浓度的条件下, 菌体在生长后期自然进入氮饥饿状态, GS 酶表达量增加, 此后再提供充足的铵盐, 提高 L-Gln 的合成能力, 结果使 L-Gln 的产量提高了 69%, 达到 11.5g/L, 菌体内谷氨酰胺合成酶活性提高了 2 倍以上。李春等^[26]提出了原位氮饥饿与铵盐梯度补加协同调控策略, 提高了谷氨酰胺的产量, 最高产量可达 2.19%, 比原位氮饥饿工艺提高了近 72%, 比未经过氮饥饿处理的旧工艺提高了近 200%, 达到 19.7g/L。

2.3 生物合成代谢调控

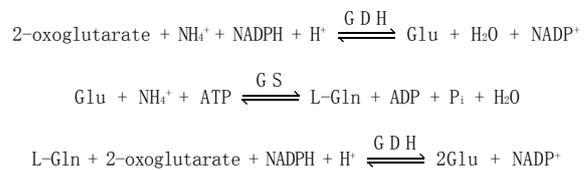


图4 L-Gln 发酵生产相关的生物反应及其关键酶

Fig.4 Related reaction and key enzyme for production of L-Gln

L-Gln 生物合成是以谷氨酸(glutamate)和 NH_4^+ 为底物, 在谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS) 的催化下合成的。L-Gln 生物合成在细胞内是一个动态平衡的过程, 除了受到谷氨酰胺合成酶(GS) 调控外, 还受到谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)、谷氨酸合酶(glutamate synthase, GOGAT) 的调控(图4)^[27]。因此, 代谢调控生物合成 L-Gln, 须建立一套协同调控策略, 促进谷氨酰胺合成酶(GS) 活性, 抑制谷氨酸合酶(GOGAT) 活性, 抑制 L-Gln 的降解, 从而过量合成 L-Gln。

2.3.1 生物合成途径中关键酶的调控

Tesch 等^[28]在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 中研究了 NH_4^+ 浓度对 GDH、GS、GOGAT 活性的影响, 结果发现 NH_4^+ 浓度从 1mmol/L 增加至 90mmol/L 时, GDH 活性维持在 1.3U/mg 蛋白, 没有发生变化, 但当 NH_4^+ 浓度大于 10mmol/L 时, GS、GOGAT 活性小于 1mmol/L 的 10%, 即分别低于 110U/mg 蛋白、42U/mg 蛋白; 并且发现谷氨酸脱氢酶酶促反应是谷氨酸棒杆菌摄取 NH_4^+ 的第一步反应。此研究结果为梯度补氮生产 L-Gln 提供了理论基础。

Schulz 等^[29]考察了碳源和氮源对谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032 中 GS 和 GOGAT 活性的影响, 结果发现在碳源充足、氮源缺乏的条件下, GS 和 GOGAT 活性分别提高了 5 倍和 7 倍; 在碳源和氮源都缺乏的情况下 GS 活性下降了 3 倍,

GOGAT 活性没有受到影响, 并且发现葡萄糖的添加能够诱导 GS 活性。此结果不仅证明了氮源对 GS 和 GOGAT 活性的影响, 同时也证明了碳源可以调控 GS 和 GOGAT 的活性。

2.3.2 代谢调控藕联

L-Gln 生物合成是一个耗能过程, 合成一分子 L-Gln 需要一分子 ATP、一分子 NH_4^+ 和一分子谷氨酸。通过葡萄糖 EMP 途径和 TCA 循环产生的 ATP, 为 L-Gln 生物合成提供能量, L-Gln 生物合成副产物焦磷酸又为葡萄糖产生 ATP 提供磷酸根离子, 此 ATP 生产与 L-Gln 生物合成的藕联技术充分利用细胞产生的 ATP 以及 L-Gln 的副产物焦磷酸, 将能最大程度地提高 L-Gln 产量, 并节约能量。

Wakisaka 等^[30]研究了 ATP 产生与 L-Gln 生物合成的藕联调控策略(如图 5), 通过酵母细胞发酵产生 ATP, 为 L-Gln 合成酶(GS)反应合成 L-Gln 提供过量 ATP, 使 L-Gln 产量由 19g/L 提高到 54g/L。

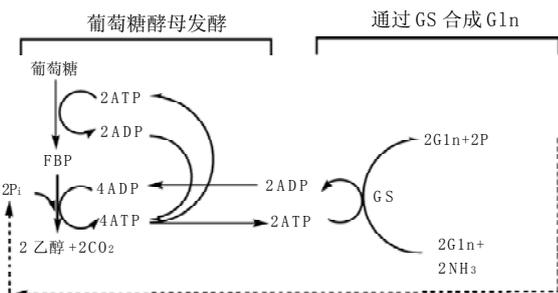


图 5 L-Gln 发酵生产与酵母细胞中能量代谢藕联

Fig.5 Scheme of glutamine production by fermentation coupled with energy transfer

2.4 分离纯化

L-Gln 发酵过程中的主要副产物是谷氨酸, 而 L-Gln 和谷氨酸两者分子结构和化学性质相近、分离困难, 并且 L-Gln 不稳定, 分离过程中在酸性条件下容易转化成谷氨酸。国外 80 年代报道 L-Gln 提取收率为 30%, 近来有专利报道实验室提取收率达 70% 以上^[31]。

2.4.1 L-Gln 经典提取方法

L-Gln 经典提取方法有浓缩结晶法、冰析法和双柱法(阴阳离子交换树脂组合法)。用离子交换法分离提取 L-Gln, 可将发酵液调至酸性, 在酸性条件下使 L-Gln 成为阳离子, 用强酸性阳离子交换树脂吸附; 也可将发酵液调至中性附近, 使其成为阴离子, 用强碱性阴离子交换树脂进行交换吸附; 还可以将阳离子和阴离子交替使用。

2.4.2 L-Gln 分离纯化的最新进展

新型过滤技术、过滤与离子交换藕联技术及相关设备的开发应用, 使 L-Gln 分离提取收率、纯度得到了大幅度提高, 并最终分离纯化出了符合药用标准的 L-Gln。

Li 等^[32]采用 NTR7450 纳膜分离纯化培养液中 L-Gln, 考察了跨膜压力、培养液 pH、培养液浓度对 L-Gln 分离纯化收率的影响, 结果发现 pH 是影响 L-Gln 分离纯化的最主要因素, 当发酵液 pH 为 7.0 时, 谷氨酸浓度为 1% 时, 纳滤膜分离 L-Gln 的提取总收率可达到 65% 以上。

Hong 等^[33]在不调节 pH 的条件下, 使用新型多层聚合电解质纳膜(PSS/PAH)7, 根据氨基酸分子大小选择性过滤氨基酸混合液中的 L-Gln, 结果发现使用该纳膜在 $4.8 \times 10^5 \text{Pa}$ 压力, $1.3 \text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{d}$ 流量下, L-Gln 对甘氨酸的选择度达到 50。

Shen 等^[34]提出了电渗析脱盐与单阴离子交换柱相耦合技术, 提取发酵液中 L-Gln。结果发现将发酵液 pH 调节到 L-Gln 等电点附近, 通过电渗析将其中的无机盐脱除 95% 左右时, 仍然能保证 L-Gln 收率达到 76%, 电流效率为 85%。该工艺在保证 L-Gln 高收率的条件下, 大幅度地减少了树脂用量, 有效地解决了 L-Gln 在强碱和强酸环境中的转化问题。

3 市场分析

微生物发酵法是 L-Gln 的主要生产方法, 生产国主要是日本, 韩国也有少量生产。1977 年日本用发酵法生产 L-Gln 的年产量达 100t, 1979 年上升到 500t, 1990 年则上升到 1200t, 并有逐年递增的趋势。全世界 L-Gln 生产量逐年递增, 在 1986 年为 900t, 1990 年为 1800t, 目前年产量约为 10000t。我国已有不少企业研究 L-Gln 发酵生产工艺, 但只是在实验室小试或中试规模中生产 L-Gln。由于发酵法生产 L-Gln 国外仅日本等几个国家生产, 所以国际市场对我国 L-Gln 出口需求迫切, 预计年出口量将迅速达到 1000t。

对于我们这样一个 13 亿人口的大国, L-Gln 等药用氨基酸需求量很大, 有巨大的潜在市场, 目前我国药用 L-Gln 依靠进口且价格昂贵。预计国内 L-Gln 需求可达 5000 吨/年, 现在国际市场上 L-Gln 价格大约 100 万元左右/吨, L-Gln 的生产成本大约为谷氨酸的 3~4 倍, 产值达到 50 亿人民币, 利税可达到 1 亿人民币。因此, 发酵法大规模生产 L-Gln 将满足国内的市场需求, 推动我国氨基酸发酵工业的发展, 同时, 产品还可出口创汇进入国际市场。

4 总结与展望

为提高发酵法生产 L-Gln 产量, 国内外学者进行了大量研究工作: 吴思方等^[28]采用随机诱变定向筛选的育种技术, 并对发酵工艺进行了优化, 使 L-Gln 产量达到 56.2g/L, 这是目前文献报道 L-Gln 产量的最高值; Wakisaka^[26]对 L-Gln 生物合成特性及其调控机制进行了深入研究, 建立了相关的藕联发酵策略, 使 L-Gln 生物合

成量由 19 g/L 提高到 54g/L; 曹竹安等^[29-30]采用在线氮饥饿和在线氮饥饿与梯度补氮的协同调控策略能显著提高 L-Gln 产量, 使 L-Gln 产量比未经过氮饥饿处理的提高了 200%, 达到 19.7 g/L; 新型分离纯化工艺和设备, 如纳膜过滤、电渗析以及电渗析与离子树脂的耦合工艺^[32-34], 使 L-Gln 的提取收率达到 70% 以上。

由于 L-Gln 具有重要的生理功能, 广泛应用于医药、食品和保健品行业, 市场需求日益增加, 但我国还没有实现 L-Gln 的大规模工业化生产。目前主要依靠进口, 限制了其广泛应用。虽然日本、韩国已经实现了发酵法生产 L-Gln 的产业化, 但是总体来说, 对整个 L-Gln 发酵过程放大和代谢调控的研究还相对较少, 对影响 L-Gln 产量、生产效率和中试放大等因素的探讨还不够深入, 因此, 应对以下几个方面的问题进行更为深入地研究: 发酵法生产 L-Gln 放大关键技术; L-Gln 生物合成代谢途径调控; 发酵过程耦合强化及集成; 高收率的精制提取方法。

参考文献:

- [1] REEDS P J, BURRIN D G. Glutamine and the bowel[J]. J Nutr, 2001, 131: 2505s-2508s.
- [2] RENNIE M J, AHMED A, EHOGLI S E O, et al. Glutamine metabolism and transport in skeletal muscle and heart and their clinical relevance [J]. J Nutr, 1996, 126: 1142S-1149S.
- [3] KARINCH A M, LIN C M, LIN C M, et al. Glutamine metabolism in sepsis and infection[J]. J Nutr, 2001, 131: 2535S-2538S.
- [4] NEWSHOLME P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection[J]. J Nutr, 2001, 131: 2515S-2522S.
- [5] NEU J. Glutamine in the fetus and critically III low birth weight neonate: metabolism and mechanism of action[J]. J Nutr, 2001, 131: 2585S-2589S.
- [6] MEDINA M A. Glutamine and cancer[J]. J Nutr, 2001, 131: 2539S-2542S.
- [7] TSUNODA T, TSUCHIYA T, OKADA H, et al. Studies on the accumulation of L-glutamine in L-glutamic acid fermentation. I. Confirmation and determination of L-glutamine[J]. Agric Chem Soc Jpn, 1961, 35: 269-274.
- [8] OSHIMA K, TANAKA K, KINOSHITA S. Studies on L-glutamic acid fermentation. The conversion of L-glutamic acid fermentation to L-glutamine fermentation[J]. Amino Acids, 1963(7): 73-77.
- [9] NAKANISHI T. Effects of inorganic ions, on the conversion of L-glutamic acid fermentation to L-glutamine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*[J]. J Ferment Technol, 1975, 53: 551-558.
- [10] NAKANISHI T. Roles of ammonium and chloride ions in the conversion of L-glutamic acid fermentation to L-glutamine and N-acetyl-L-glutamine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*[J]. J Ferment Technol, 1978, 56: 179-188.
- [11] NAKANISHI T, NAKAJIMA J, KANDA K. Conditions for conversion of L-glutamic acid fermentation by *Corynebacterium glutamicum* into L-glutamine production[J]. J Ferment Technol, 1975, 53: 543-550.
- [12] 汪世华, 王伟平, 吴思方. 发酵法 L-谷氨酰胺的研究进展[J]. 武汉工业学院学报, 2000(4): 17-20.
- [13] 刘利军, 赵瑾. L-谷氨酰胺研究进展[J]. 天津化工, 2003, 17(1): 17-20.
- [14] TSUNODA T, TSUCHIYA T, KINOSHITA K, et al. Studies on the accumulation of L-glutamine in glutamic acid fermentation. II. The mechanism of L-glutamine accumulation[J]. Agric Chem Soc Jpn, 1961, 35: 275-279.
- [15] NABE K, UJIMARU T, IZUO N, et al. Production of L-glutamine by apenicillin-resistant mutant of *Flavobacterium rigense*[J]. Appl Environ Microbiol, 1980, 40: 19-24.
- [16] NABE K, UJIMARU T, YAMADA S, et al. Influence of nutritional conditions on production of L-glutamine by *Flavobacterium rigense*[J]. Appl Environ Microbiol, 1981, 41: 159-163.
- [17] YAMADA S, NABE K, UJIMARU T, et al. Extracellular accumulation of a new amino acid, 0-2-hydroxypropylhomoserine, from L, 2-propanediol by *Flavobacterium rigense*[J]. Appl Environ Microbiol, 1978, 35: 1046-1051.
- [18] YAMADA S, NABE K, UJIMARU T, et al. L-Glutamine formation by *Flavobacterium rigense*[J]. Appl Environ Microbiol, 1979, 37: 1063-1066.
- [19] 汪世华, 白文钊, 吴思方, 等. L-谷氨酰胺高产菌株的定向选育及产酸条件的研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(6): 751-754.
- [20] 孙智杰, 梁楠, 李润东, 等. 利用透明颤菌血红蛋白基因在谷氨酸棒杆菌中的表达提高谷氨酸和谷氨酰胺的产量[J]. 北京理工大学学报, 2005, 25(2): 180-184.
- [21] USDIN K P, ZAPPE H, JONES D T, et al. Cloning, expression, and purification of glutamine synthetase from *Clostridium acetobutylicum*[J]. Appl Environ Microbiol, 1986, 52(3): 413-419.
- [22] YAMAMOTO S, WAKAYAMA M, TACHIKI T. Cloning and expressing of *Pseudomonas taetrolins* Y-30 gene encoding glutamine synthetase: an enzyme available for theanine production by coupled fermentation with energy transfer[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(2): 500-507.
- [23] ANDERSON C B, WITTER L D. Glutamine and proline accumulation by *Saphylococcus aureus* with reduction in water activity[J]. Appl Environ Microbiol, 1982, 43(6): 1501-1503.
- [24] 王伟平, 吴思方, 杨金树, 等. 谷氨酰胺代谢控制发酵工艺研究[J]. 食品科学, 2002, 23(4): 82-85.
- [25] 陈奎发, 杨艳, 曹竹安, 等. 在线氮饥饿处理对谷氨酰胺合成的促进作用[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(7): 20-23.
- [26] 李春, 刘雨磊, 曹竹安, 等. 原位氮饥饿发酵工艺中梯度补氮对谷氨酰胺合成酶的调控[J]. 化工学报, 2004, 55(1): 155-159.
- [27] MERRICK M J, EDWARDS R A. Nitrogen control in bacteria[J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 604-622.
- [28] TESCH M, EIKMANN B J, GRAAF A A, et al. Ammonia assimilation in *Corynebacterium glutamicum* and a glutamate dehydrogenase-deficient mutant[J]. Biotechnology Letters, 1998, 20(10): 953-957.
- [29] SCHULZ A A, COLLETT H J, REID S J. Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205: 361-367.
- [30] WAKISAKA S, OHSIMA Y, OGAWA M, et al. Characteristics and efficiency of glutamine production by coupling of a bacterial glutamine synthetase reaction with the alcoholic fermentation system of baker's yeast[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(8): 2952-2957.
- [31] MASASHI M, TOYOKAZU K, TETSUYA K, et al. Method of purifying L-glutamine[P], US patent: C07C227/00, 1990-10-30.
- [32] LI S L, LI C, CAO Z A, et al. Separation of L-glutamine from fermentation broth by nanofiltration[J]. Journal of Membrane Science, 2003, 222: 191-201.
- [33] HONG S U, BRUENING M L. Separation of amino acid mixtures using multilayer polyelectrolyte nanofiltration membranes[J]. Journal of Membrane Science, 2006, 280: 1-5.
- [34] SHEN J Y, DUAN J R, XING X H, et al. Demineralization of glutamine fermentation broth by electro dialysis[J]. Desalination, 2005, 172: 129-135.