



微生物蛋白制造的发展趋势与挑战

王国坤^{1,2,3*}, 蔺玉萍^{1,2}, 王钦宏^{1,2,3}, 吴信^{1,2*}, 印遇龙^{1,2*}, 马延和^{1,2*}

1. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308;

2. 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308;

3. 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

* 联系人, E-mail: wanggk@tib.cas.cn; wuxin@tib.cas.cn; yinyulong@isa.ac.cn; ma_yh@tib.cas.cn

2023-01-05 收稿, 2023-03-17 修回, 2023-03-20 接受, 2023-03-21 网络版发表

国家重点研发计划(2021YFD1301002)、国家自然科学基金(32270085)和天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-CXRC-041, TSBICIP-KJGG-012)资助

摘要 蛋白质的稳定供应是保障人民健康和国家安全的重要基础之一, 作为传统农业种植生产模式的补充或彻底替代方案, 微生物蛋白制造能够通过高时空生产效率、不依赖耕地的车间制造方式, 生产供应蛋白质原料. 本文描述了发展微生物蛋白的需求, 综述了微生物蛋白制造的发展, 介绍了主要的生产菌株, 并以3种大宗原料类型食品工业与农业副产物、能源化工品、二氧化碳及其衍生富能化合物为主线, 阐述了主要的微生物蛋白生产路线, 分析了不同生产路线的优势与不足, 系统梳理了现阶段微生物蛋白制造规模小、生产成本高的主要原因. 最后, 本文描述了未来的挑战及相应的建议策略. 预期随着原料、菌株、装备与工艺等多环节技术水平的协同提升, 微生物蛋白制造有望缓解乃至彻底解决蛋白质资源短缺的重大难题.

关键词 生产路线, 木质纤维素, 能源化工品, 菌株定制, 发酵工艺

1 发展微生物蛋白的现实需求

蛋白质是生命活动的主要承担者, 是人体的必需营养素之一, 也是保证人民追求美好生活的物质基础. 蛋白质的主要供给形式包括豆类、谷类等植物性蛋白, 以及肉蛋奶等动物性蛋白. 世界范围内蛋白质的需求量将急剧上升, 随着人口增长和消费水平的提高, 预计到2050年, 肉类供应要增加2亿吨以上, 总量达到4.7亿吨^[1]. 动物性蛋白的养殖生产及植物性蛋白食品的加工, 需要投入海量的大豆、谷物等蛋白质原料, 因此蛋白质原料的稳定供应与产量增长是保障蛋白质供给的基石.

然而, 我国蛋白质原料短缺的问题极为严峻. 大豆这一首要的蛋白质原料, 我国对外依存度常年高于

80%, 年进口量约1亿吨(图1(a)), 导致食品、养殖等重要行业极易受到价格波动的冲击(图1(b)), 严重威胁着我国的粮食安全与经济健康发展. 现阶段主要的蛋白质原料是植物源蛋白质原料, 通过传统农业种植生产获得, 而这种生产方式的产量规模受制于可耕种土地面积. 我国人均可耕种土地面积不足1.5亩(1亩=666.67 m²), 生产资料的客观不足, 造成我国难以通过农业种植生产模式满足蛋白质原料需求, 发展快速高效地生产多类型高质蛋白质的方法非常必要.

习近平总书记在2022年“两会”期间指出, “要树立大食物观”, “发展生物科技、生物产业, 向植物、动物、微生物要热量, 要蛋白”. 利用微生物发酵的方法合成微生物单细胞菌体蛋白(下文简称微生物蛋白), 能够替代传统农业种植, 以车间制造的方式生产并供给

引用格式: 王国坤, 蔺玉萍, 王钦宏, 等. 微生物蛋白制造的发展趋势与挑战. 科学通报, 2023, 68: 2779–2789

Wang G K, Lin Y P, Wang Q H, et al. Microbial protein manufacturing: The developing trend and challenge (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 2779–2789, doi: 10.1360/TB-2023-0013

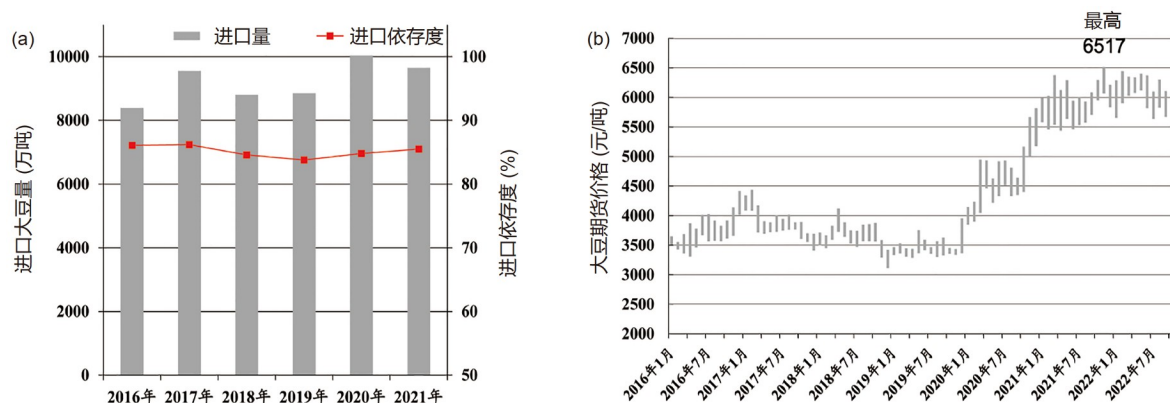


图1 (网络版彩色)2016~2022年,我国大豆进口量和对外依存度(a)以及大豆价格的变化(b)。数据收集自公开信息,所示大豆期货价格为豆一2301 (A0)期货数据

Figure 1 (Color online) The imported soybean amount, the dependence on the imported soybean (a), and the soybean prices (b) in China from 2016 to 2022. The data were collected from public information, and the shown prices were for soybean futures (No. 1 Soybean, 2301 (A0))

蛋白质原料。该生产方式相较于传统农业种植具有多重优势: (1) 微生物蛋白发酵生产无须占用耕地, 能够解除我国耕地资源紧张对蛋白质原料生产的天然限制; (2) 该路线时空生产效率比传统农业种植高千倍; (3) 生产方式鲁棒性强, 不受季节及气候影响, 蛋白成分与质量更为稳定可控, 可实现特定功能蛋白的精准制造^[2]; (4) 环境友好, 无须使用化肥与杀虫剂。生产的微生物蛋白含有必需氨基酸、维生素和微量元素等, 不含植物源抗营养因子和致敏蛋白, 且营养功能明显优于大豆蛋白等植物源蛋白质原料^[3~5]。发展微生物蛋白车间制造, 有助于蛋白质原料的稳定生产、缓解耕地资源紧张对食品原料生产的限制、稳定供应链, 保障人民营养健康和国家繁荣稳定。

2 不同种类微生物在蛋白生产中的应用分析

微藻、细菌、酵母及丝状真菌等微生物具有不同的细胞组成、生理性状与能量需求, 决定了它们在微生物蛋白合成方面的应用各有不同。

微藻能进行产氧性光合作用, 通过光反应和暗反应(卡尔文循环)的协同, 利用光能固定二氧化碳支持菌体生长。不同种属微藻的菌体组成差别较大, 一些藻株能够积累较高含量的不饱和脂肪酸和类胡萝卜素等小分子高附加值化合物, 而一些藻株则能高效积累蛋白质, 比如小球藻属的菌株蛋白含量高达70%^[6,7], 有潜力成为优质的微生物蛋白原料, 应用于食品原料与畜禽水产养殖饲料(表1)。然而微藻作为蛋白原料的应用目前还比较有限, 一些关键的技术难题亟待解决, 包括高

密度光养的过程优化和放大、为提高营养物质的释放而进行的破除细胞壁(以多糖为主要成分的刚性厚壁组织)的工艺优化等。

在作为微生物蛋白生产菌株方面, 细菌具有多项优势: 蛋白含量(高达菌体干重的80%^[8])较高, 细胞结构简单, 生长速度较快。除了兼具这些共性优势外, 一部分细菌菌株还具有特殊的代谢能力。比如, 天然甲基营养型细菌能够同化甲烷、二氧化碳等温室气体或甲醇等液体一碳原料, 合成菌体蛋白, 赋予了以天然甲基营养型细菌为基础的蛋白质原料生产路线“碳利用”功能和绿色减碳属性^[9]。然而, 细菌蛋白的生产和应用也存在一些现实问题, 如发酵过程易受噬菌体污染、细菌蛋白的适口性较差、存在内毒素风险等。

酵母菌是严格的异养微生物, 能够利用多种底物原料合成菌体蛋白。酵母菌在食品生产过程的应用非常广泛, 在食品^[10]和饲料(中国饲料原料目录)等应用中具有普遍认可的安全性。酵母菌的蛋白质含量普遍在30%~55%^[11], 也含有丰富的微量元素(维生素等), 并且细胞壁多糖可以提高机体免疫力。现阶段酵母蛋白主要通过以体量较小的糖蜜原料为底物发酵获得, 或者取自生物乙醇和啤酒发酵后的菌体。总之, 酵母蛋白可以作为优良的微生物蛋白在食品与饲料中安全应用, 而限制其大规模应用的难题主要包括如何拓展酵母菌对大规模低成本原料的利用、如何提高菌体蛋白含量等。

丝状真菌是一类由有隔菌丝组成的微生物。镰刀脉胞霉(*Fusarium venenatum*)菌丝缠绕可产生仿真肉质

表1 不同微生物蛋白的比较

Table 1 The characteristics of various microbial proteins

微生物蛋白来源	蛋白含量 ^{a)}	代表性菌株	优点	缺点
微藻	40%~70%	<i>Chlorella</i> sp.	光合固碳、自养生长; 合成不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、虾青素等	难以放大培养; 细胞壁限制营养物质释放
细菌	35%~80%	<i>Methylococcus capsulatus</i> ; <i>Cupravidus nectar</i>	高蛋白含量; 可光合自养或化能自养; 可利用二氧化碳、甲烷、甲醇等一碳原料	气体底物混合问题; 难以获得高密度细胞; 适口性差
酵母	30%~55%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Candida utilis</i> ; <i>Yarrowia lipolytica</i>	能利用多种原料; 应用历史悠久、安全性高; 微量营养元素、维生素等含量高	蛋白含量偏低
丝状真菌	10%~50%	<i>Fusarium venenatum</i> ; <i>Paecilomyces varioti</i>	丝状菌产生的肉质纤维口感	蛋白含量偏低; 生长速度慢

a) 蛋白含量数据整理自公开文献数据, 展示的区间涵盖了各种微生物的普遍蛋白含量

纤维口感, 是食品微生物肉(Quorn™)的主要成分。该微生物产品的生产过程包括以淀粉糖为原料的镰刀脉胞霉菌连续发酵培养、热处理降低RNA含量、菌体与鸡蛋白蛋白的黏合加工处理^[12]。利用丝状真菌的菌丝性质模拟肉质纤维这一概念在肉类替代品的开发中得到推广, 产生了诸如Nature's Fynd、Mycorena等初创公司。相对于丝状真菌在食品领域的成功应用, 其在动物饲料中作为蛋白质原料组分的应用还极为有限, 主要原因是生产原料成本高, 同时菌体生长速度慢(倍增时间显著长于细菌)也会造成生产效率偏低。

3 微生物蛋白生产路线

应用不同种类微生物进行发酵培养, 进而转化底物原料合成微生物菌体, 是微生物蛋白的基础生产方式。其中, 用于微生物培养的原料的成本与可用规模, 是决定微生物蛋白生产与应用可行性的重要因素。淀粉糖是最为重要的微生物发酵原料之一, 然而其生产供应以农业种植为基础, 以淀粉糖作为蛋白质生产原料, 无法彻底摆脱对耕地的依赖。人们也对其他大宗原料的应用进行了长期不断的探索。我们以3种大宗原料类型食品工业与农业副产物、能源化工品、二氧化碳及其衍生富能化合物为主线, 介绍主要的微生物蛋白生产路线(图2), 并分析各自的优势与不足(表2)。

3.1 以食品工业与农业副产物为原料的生产路线

3.1.1 以食品生产和消费后副产物为原料的生产路线

食品生产、加工与消费过程会产生营养丰富的副产物和有机废弃物, 可作为原料支持菌体的合成。粮食、果蔬和乳制品等加工过程产生的副产物, 如玉米浆、酒糟、乳清和糖蜜等, 残留了不同水平的碳源和氮源, 可被微生物进一步转化利用, 升级为营养价值更

高的蛋白质产品^[3,13,14]。这一生产路线可以将这些原本废弃的副产物转化成新的蛋白质资源, 是加速发展循环生物经济的重要途径之一。

以食品加工副产物为原料的蛋白质生产路线使用的微生物以丝状真菌、酵母以及蘑菇菌丝体为主, 发酵形式包括固态发酵和液态深层发酵^[3,14]。德国Mushlabs公司以食品工业的副产物等为原料, 利用蘑菇菌丝体进行液态深层发酵, 生产富含蛋白质和膳食纤维素的菌体, 蛋白含量达到54%~58%, 技术水平已达到中试规模^[15]。美国Atlast Food公司以食品级植物来源的副产物为原料, 利用蘑菇菌丝体进行固态发酵, 蛋白含量达到54%~58%, 已生产出替代培根的产品原型^[16]。

在消费环节被丢弃或处理后的餐厨有机废弃物含有较为丰富的营养物质, 是较好的微生物培养原料。利用酸水解黄瓜皮和橘子皮得到的水解液培养酿酒酵母, 获得的菌体蛋白含量为17.47%, 在水解液基础上添加葡萄糖, 可以将蛋白含量提高到60.31%^[17]。以酸处理虾壳后释放的葡糖胺为原料, 培养酿酒酵母, 在分批培养条件下, 获得菌体的得率达到0.58 g/g葡糖胺, 最大比生长速率为0.23 h⁻¹^[18]。

3.1.2 以木质纤维素类农业副产物为原料的生产路线

以木质纤维素为主要成分的秸秆、玉米芯和甘蔗渣等农业副产物体量庞大, 主要组分包含30%~50%的纤维素、20%~40%的半纤维素和10%~30%的木质素^[19,20]。全球每年产生数十亿吨的木质纤维素类生物质, 是地球上最丰富的可再生碳源。我国每年农作物秸秆产量近10亿吨, 可作为底物原料生产微生物蛋白。原料的利用包括两种方式: (1) 以固体材料直接应用于固态发酵和深层发酵; (2) 通过预处理及酶解获得可发酵性五碳和六碳糖, 然后应用到深层发酵。

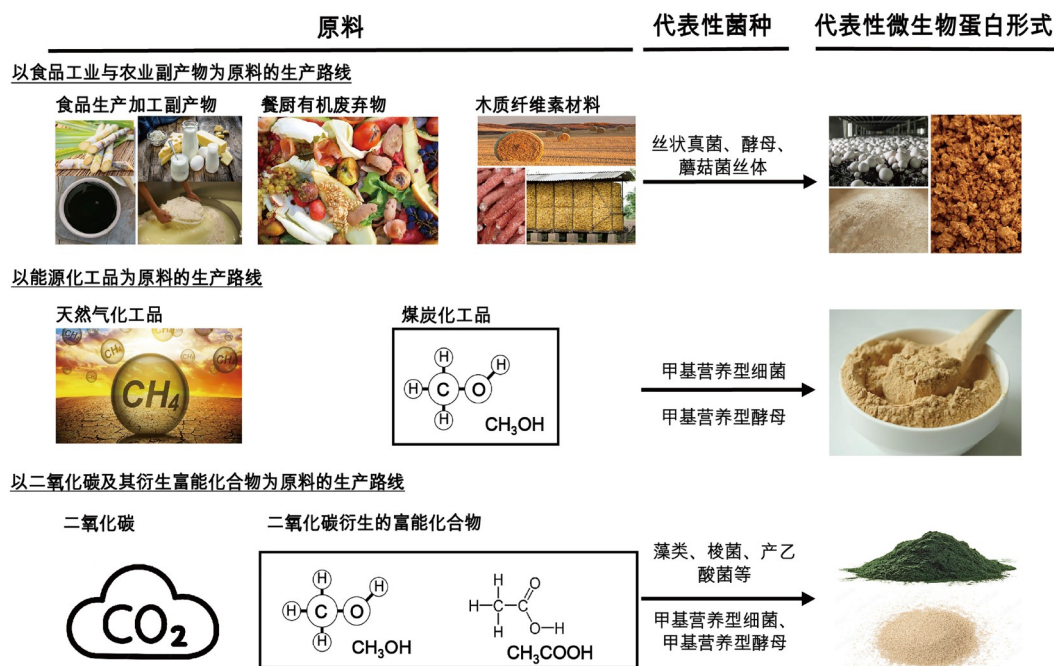


图 2 (网络版彩色)本文重点介绍的3条微生物蛋白生产路线

Figure 2 (Color online) The three production routes for microbial protein production highlighted in this work

表 2 应用于微生物蛋白生产的三类主要原料的优势与不足

Table 2 The pros and cons of three typical feedstock applied for microbial protein production

原料类别	应用优势	不足之处
食品工业与农业副产物	营养物质丰富多样, 易于利用; 适配的微生物菌株选择面广; 可用原料体量大	应用出口多样, 挤压其在微生物蛋白生产中的应用; 具体种类供应体量较小; 来源分散, 收集有难度, 品质难控制; 一些种类能量密度偏低, 需补充使用其他原料
能源化工品	来源渠道集中, 易于规模化生产和收储; 品质控制有保证; 可供应体量大	化石资源不可再生, 无法持续稳定供应; 适配的微生物菌株选择面窄; 能源化工品的开发与生产过程污染环境
二氧化碳及其衍生富能化合物	二氧化碳原料可再生, 生产过程绿色可持续; 可规模化生产, 品质易控; 有望用于减碳固碳	生产成本高, 生产技术需要进一步改进; 适配的微生物菌株选择面窄

以木质纤维素固体材料为原料的蛋白生产路线,应用出口主要在饲用领域。秸秆青贮、氨化和微贮等传统固态技术相对成熟,应用较多,但粗蛋白含量通常低于15%^[21-23],而且粗纤维多,导致适口性差、消化率低。为了进一步提高秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的原位降解程度,增加秸秆发酵后的蛋白质含量,改善饲用效果,科研人员围绕复合微生物发酵技术和木质纤维素降解酶的应用开展了较多研究。利用菌酶协同多菌发酵技术,秸秆发酵饲料的粗蛋白含量可以提升到18%~28%,并改善了适口性及饲料利用率^[24,25]。当在基料中添加自身粗蛋白含量较高的杂粕类原料进行混合底物发酵时,粗蛋白含量最高可以达到44%。总氨

基酸含量最高到16%,粗纤维含量最低到16%,有效提高了其营养价值^[26]。

木质纤维素类生物质经过物理化学预处理和纤维素酶水解后, 可以获得葡萄糖、木糖和阿拉伯糖等组成的可发酵性糖混合物, 然后应用到丝状真菌或酵母的深层发酵。Pihlajaniemi等人^[27]对牧草青贮进行气爆和氨泡等预处理以及纤维素酶解, 获得水解液以培养丝状真菌宛氏拟青霉(*Paecilomyces variotii*), 可将51%的水解液糖分转化为细胞干物质, 其中51%是蛋白成分。以*P. variotii*菌株为基础的真菌蛋白Pekilo生产工艺, 也是芬兰初创公司eniferBio的主要技术基础。美国Arbimom公司采用的菌种是产假假丝酵母(*Candida uti-*

lis), 以木屑为原料, 将经预处理和酶解后获得的混合糖转化为酵母单细胞蛋白SylPro[®], 蛋白含量达到60%以上, 目前水平已达到7天15吨的连续发酵, 可以用作水产养殖的饲用蛋白, 并将进一步开发成可食用蛋白^[16]. 相比于淀粉糖原料, 以木质纤维素为原料的蛋白生产路线, 对耕地的依赖程度更小, 且不存在与人争粮的问题, 该蛋白质生产路线也正成为英国Quron Foods公司(目前生产方式以淀粉糖为原料)的转型目标^[28].

综上, 食品工业与农业副产物总存量较为庞大, 经处理后能够提供丰富的营养物质, 是可用于微生物蛋白合成的优质原料(表2). 然而这些副产物已有较为成熟的应用渠道, 如麸皮、牧草等原料均可直接作为饲料组分加以应用, 严重压缩了工农业副产物在生产微生物蛋白方面的应用空间. 另外, 食品工业与农业副产物种类繁多, 存在具体种类(如糖蜜等较为适宜发酵的原料)的供应体量较小, 难与蛋白质需求体量相匹配的问题; 来源分散, 收集有难度, 品质难以保持统一, 且一些原料能量密度偏低, 也加大了其作为微生物蛋白生产原料的难度.

3.2 以能源化工品为原料的生产路线

3.2.1 以天然气化工品为原料的生产路线

天然气是一种储量丰富的化石能源, 全球储量近200万亿立方米. 其中的主要成分甲烷是一种高能气体, 以甲烷作为原料合成微生物蛋白的设想在19世纪60年代末就已经被提出^[29], Bewersdorff和Dostálek^[30]率先以甲烷为原料培养从土壤中分离的细菌混合物, 在连续培养条件下获得了最高的生产速率0.15 g/(L h), 甲烷与氧气的消耗比例为1:1.7, 菌体蛋白质的含量为71%. 壳牌公司利用共生的微生物混合物, 可以完全消耗甲烷, 菌体生产速率最高可达8 g/(L h)^[31].

气体原料应用于液体发酵过程存在物质传递的限制, 直接限制了高密度的菌体合成; 甲烷是危险气体, 生产工厂需配置防爆装置, 这方面的投入又推高了生产成本. 因为这些问题的存在, 早期的微生物蛋白开发机构(壳牌、Imperial Chemical Industries (ICI)等)放弃了以甲烷为原料的生产路线. 随着降低温室效应和增加蛋白质供给两方面需求的发展, 再度催生了如Unibio、Calysta、String Bio等初创公司, 开发利用甲基营养型微生物同化甲烷, 合成微生物蛋白. 其中, 针对气体传质问题, Unibio公司开发了U形培养反应器, 增大甲烷在发酵装置中的存留时间, 显著提高了甲烷的利

用效率, 通过技术创新逐步提升以甲烷为原料生产微生物蛋白路线的经济可行性.

3.2.2 以煤炭化工品为原料的生产路线

煤炭是目前全球储量(1.07万亿吨)最为丰富的能源资源, 可经水煤气转变成甲醇等液体原料. 这些极性液体原料可以与水混溶, 相比气体原料, 它们在发酵过程中物质传递效率明显更高, 而且不需要特殊的发酵装置, 可以直接利用现有发酵设备进行生产.

以甲醇为原料合成菌体蛋白的研究始于19世纪80年代, 主要集中在甲基营养型菌群^[32]或菌株^[33]的筛选与评价、生产工艺优化等方面. 比较有代表性的工作有: Phillips Petroleum公司曾经在供给纯氧的发酵条件下培养毕赤巴斯德酵母(*Komagataella pastoris*), 以大于10 g/(L h)的菌体生产速率, 获得了大约130 g/L的干菌体^[34]; ICI公司开发了连续发酵工艺培养甲基营养型细菌, 采取在发酵罐不同区域同时补料的策略提高底物与细胞的混合效率, 可以达到最大比生长速率0.2 h⁻¹^[35]. 然而, 基于上述技术开发的“Pruteen”产品, 其成本无法与大豆蛋白竞争, 并未大规模生产. 近年来, Knipbio公司遗传改造甲基营养型细菌合成类胡萝卜素和牛磺酸, 进行微生物蛋白的高值化, 利用得到的改造菌株, 以甲醇为原料, 生产了比肩鱼粉这一高品质饲用蛋白原料的微生物蛋白Knipbio Meal, 并获得了美国食品与药品管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)的安全认可.

能源化工品能量密度高, 储量丰富, 且供应主体少量集中, 易于控制品质并进行规模化生产, 是较好的可用于微生物蛋白生产的原料(表2). 然而, 该生产路线也存在如气体传质、原料毒性、原料不可持续供应且价格不低等问题, 其中一些问题可通过技术创新进行一定程度的缓解, 而可获取的能源化工品的成本以及菌株对原料的转化效率与速率则是决定这条生产路线经济性的关键.

3.3 以二氧化碳及其衍生富能化合物为原料的生产路线

二氧化碳是主要的温室气体, 以二氧化碳及其衍生富能化合物为原料的生产路线, 有望助力实现二氧化碳的固定封存与蛋白质的负碳合成, 生产过程的碳足迹相较于大豆(1 kg CO₂eq/kg)、牛肉(60 kg CO₂eq/kg)等高蛋白食品原料, 具有显著优势.

由于二氧化碳的化学惰性, 生物转化二氧化碳过

程需要其他形式的能量输入,除光驱固碳外,以氢气、甲醇和乙酸(可由二氧化碳衍生合成)等为代表的富能化合物,也能够为微生物提供固碳所需能量.在有氧条件下,以氢气和氧气作为电子供体和受体,氢氧化菌能够同化二氧化碳高效合成菌体;而在无氧条件下,只有大约20%的碳用来合成菌体,剩余部分生成还原性产物,如乙酸和乙醇.以氢氧化菌合成微生物蛋白的路线被芬兰Solar Foods、美国Deep Branch等多家初创公司采用(表3),氢气来源于电解水产生.首钢郎泽公司利用诱变乙醇梭菌菌种,通过厌氧发酵处理富含二氧化碳、一氧化碳和氢气的廉价钢厂尾气,在生产主产物乙醇的同时,实现了一氧化碳到菌体蛋白的转化,并形成了万吨级的生产能力.

甲醇、乙酸等液体原料可由二氧化碳经化学转化、电化学催化或生物电催化获得,这些液体碳源可与水无限混溶,作为发酵原料,能够避免气体底物(二氧化碳与氢气)在液体发酵时的传质限制.以二氧化碳衍生的甲醇为原料生产微生物蛋白,与煤化工甲醇(见3.2.2节)无异.由微生物电催化(氢氧化细菌无氧发酵)

或电化学催化而获得的乙酸,可被酵母菌同化利用合成菌体,酵母菌体的碳转化率达到25%,其中蛋白含量为40%~50%^[36,37].

二氧化碳是免费甚至负价的碳源原料,结合绿氢、风电、光电等可再生能源技术,能够绿色可持续地合成二氧化碳衍生富能化合物,作为原料来生产微生物蛋白(表2).然而,该生产路线也存在原料生产成本低、适配微生物菌株选择面窄、能量转化效率低和速度慢等问题.

4 挑战与展望

微生物蛋白营养组成丰富,相对大豆蛋白不存在致敏原,是极佳的蛋白质原料.然而,目前落地应用的产品为数不多,如微生物肉(QuornTM)、调味用或强化动物生长性能的酵母粉(安琪)等.真正作为蛋白质原料的应用不多,主要体现在酿酒或生物乙醇等发酵生产过程的菌体副产物在动物养殖中的应用.然而,我国发酵行业的微生物菌体年产量不超过300万t,不足以填补巨量的蛋白质资源缺口.制约微生物蛋白大规模生产

表 3 微生物蛋白的代表性生产路线与研发机构^{a)}

Table 3 The representative routes and the associated organizations for microbial protein production

菌株	底物	产品	公司/机构
藻类	<i>Chlorella</i> sp.	二氧化碳+光	BlueBio Tech
甲基营养型细菌	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	甲醇	Pruteen ^{b)}
甲基营养型细菌	<i>Methylococcus capsulatus</i>	甲烷	UniProtein
甲基营养型细菌	<i>Methylococcus capsulatus</i>	甲烷	FeedKind
甲基营养型细菌		甲烷	String Pro
甲基营养型细菌	<i>Methylobacterium extorquens</i>	甲醇	KnipBio Meal ^{c)}
氢氧化细菌	<i>Xanthobacter</i>	二氧化碳+氢气	Solein
氢氧化细菌	<i>Cupravidus nectar</i>	二氧化碳+氢气	Novomeal
氢氧化细菌		二氧化碳+氢气	Kiverdi
氢氧化细菌		二氧化碳+氢气	Proton
酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		LysCell
酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	玉米(淀粉糖)	NexPro
酵母	<i>Candida utilis</i>	木材	Syipro
酵母	<i>Yarrowia lipolytica</i>	烷烃	British Petroleum
酵母	<i>Yarrowia lipolytica</i>		Yarrowia Equinox
酵母菌	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	乙酸	University of Tübingen; University of Delaware和University of California
丝状真菌	<i>Fusarium venenatum</i>	淀粉糖	Quorn
丝状真菌	<i>Paecilomyces varioti</i>	生物炼制废弃物	eniferBio

a) 表中信息均收集自公开信息,包括公司网站内容、新闻报道、文献等; b) 不再继续生产; c) 第一个经FDA认证GRAS(generally recognized as safe)的在微生物蛋白中应用的遗传改造菌株,菌株可以合成类胡萝卜素

应用的根本问题在于生产成本过高,主要表现为生产原料成本高、微生物菌株转化原料的效率低和速度慢(由此进一步增加了原料投入和能耗),以及生产过程能耗过高等方面。这些问题可从发酵原料收制储、高版本菌株定制及智能发酵工艺等角度进行破解。

4.1 建立并完善发酵原料的收集、制备、储存体系

低值原料的规模难以满足蛋白质生产体量,而可收集大宗原料的处理与生产成本偏高。以二氧化碳及其衍生富能化合物为例,我国全流程钢铁企业每年产生的富含碳素和能量(主要成分为一氧化碳、二氧化碳和氢气)的工业尾气,即使全部用以转化,对应的蛋白当量也不足1000万t,因此,从易规模化获取的工业尾气甚至低浓度二氧化碳气源如空气中收集二氧化碳,势在必行。

物理化学吸收法是捕集二氧化碳的成熟手段,较为广泛地应用于处理点源污染产生的二氧化碳浓度较高(10%)的工业尾气,而将其应用于处理低浓度二氧化碳气源时,成本则更高。发展适宜不同二氧化碳浓度的碳捕集技术,开发高效稳定、环境适应性强的二氧化碳吸收剂与释放工艺^[38],是降低二氧化碳规模化收集成本的关键。

氢气、甲醇等能量载体的制备成本过高,是制约以二氧化碳及其衍生富能化合物为原料生产蛋白路线的另一重要因素,这主要取决于光电等绿色能源与催化剂相对较高的成本价格、偏低的能量转化效率等因素^[39]。能源供应的主要成本集中在传输和储藏,在光电资源较为丰富的地区(如我国西部地区)实施能量载体化合物的制备,可大幅降低在绿色能源上的投入。另外,创制成本低廉、高效稳定的化学或生物催化剂,建立节能新工艺,提高绿色能源向能量载体化合物的转化效率,也是降低氢气、甲醇等能量载体制备成本的必要内容^[39,40]。

氢气、甲醇等能量载体化合物是易燃易爆品,这些原料的储存需要使用防爆材料,对实施现场的配置要求更高,势必增加硬件投入成本。通过优化组织流程,提高原料-产品-应用端的流动性,可适当降低储存装置的投入,从而提高生产路线的经济性。

4.2 高版本菌株定制

菌株是合成微生物蛋白质的核心,决定了原料的转化过程与转化产物,对应了关乎微生物蛋白合成经

济性的两个重要参数:(1)蛋白转化效率和速率;(2)蛋白产物的品质,而定制高版本微生物菌株,是改善上述关键参数的有效途径。

4.2.1 提高原料向微生物蛋白的转化效率和速率

早期微生物蛋白生产菌株的选育,主要基于对天然微生物菌株的筛选。从工业化应用的评价标准来看,天然微生物菌株在物质能量转化上并不完美,如存在溢流代谢、一些关键生化反应的代谢酶依赖高耗能辅因子等。ICI公司曾进行精准遗传改造,利用大肠杆菌的谷氨酸脱氢酶替换甲基营养型细菌*Methylophilus methylotrophus*的谷氨酸合成酶,因为这一改变,合成一分子谷氨酸可以节省一分子三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),相应的改造菌株产率显著提高^[41]。

从细胞全局水平重塑微生物定向合成蛋白的碳能节约型代谢网络,创建高版本菌株,是提高微生物蛋白生产经济性的一个关键点。可通过提高菌种利用二氧化碳、甲醇、乙酸等含碳化合物的效率和速率,增强碳素向蛋白的定向合成等方式实现。随着近年来合成生物学领域的快速发展,菌株的定向改造策略和基因编辑工具的开发日益成熟,人们已能够从全基因组尺度对生命体进行系统重编程^[42-44],已创建了人工甲基营养型微生物^[45,46],通过重编程光驱二氧化碳捕获系统再造了大肠杆菌,以超理论产率水平高效合成大宗化学品^[47],并实现了完全由二氧化碳转化合成的人工大肠杆菌的设计改造^[48]。随着氢氧化菌、甲基营养型微生物、木质纤维素降解菌等非模式生物基因编辑工具的不断完善^[49,50],人工智能辅助的数字细胞设计技术的日渐成熟,人们有希望从菌株水平上,解决原料向微生物蛋白转化效率低和速度慢的问题。

4.2.2 微生物蛋白高质和高值化

针对特定应用需求,对微生物菌株进行高质和高值化改造,拓展其应用场景,也是增加微生物蛋白应用经济性的途径之一。提高菌体蛋白含量,优化氨基酸组成及引入锌硒等功能性成分以满足食品及饲料的营养要求,提高微生物蛋白的易降解吸收性质,降低菌体核酸含量,提高适口性等工作均较为必要,有助于提高微生物蛋白的综合利用效率。

改造微生物蛋白菌株同步联合生产其他高价值化学品和蛋白,能提高总体产品价值,大幅改善微生物蛋白生产的经济性。啤酒、生物乙醇发酵后的酵母菌体的应用是这一策略的一个重要体现,而表达饲料用酶^[51]、营养蛋白^[52]、膳食补充剂^[53,54]等的微生物菌株,

均已展现出在功能性蛋白原料方面的应用潜力。与此同时,遗传改造菌株的安全性也开始得到FDA GRAS的认可(如Knipbio Meal产品)。

4.3 新型生物反应器及系统发酵工艺

保证发酵性能的基础之一是细胞在生物反应器体系中与底物充分接触并加以利用。液体深层发酵是使用最为广泛的微生物蛋白生产方式,在发酵生产过程中,可以较好地混匀水溶性底物,如葡萄糖、甲醇、无机盐等,而对于水溶性极差的木质纤维素等固体原料或二氧化碳、氢气等气体原料,传质限制问题则极为关键。针对这些问题,设计新型生物反应器,增加原料在反应体系中的分布范围与存留时间,可增强细胞对底物的利用效率。例如,Unibio公司开发的U形培养反应器,通过增大气体底物甲烷在发酵装置中的驻留时间,提高了气体底物的利用效率。

微生物蛋白质合成过程能量消耗高,只有在有氧条件下才能满足能量供应,以保证较高的蛋白合成效率,而微生物菌体密度过高时,势必产生氧气限制的问题。针对这些问题,发展适宜微生物蛋白生产的系统发

酵工艺,替代传统发酵行业常规采用的补料发酵方式,解除该发酵方式中势必造成的高浓度菌体氧供应不足的问题。连续发酵工艺能够长时间连续运行,且能够较好地维持菌株合成蛋白的最佳状态,将蛋白的生产效率最大化,已成为Unibio、Marlow Foods等微生物蛋白生产企业的优选生产方式。

5 总结

微生物蛋白制造是一种以不依赖耕地的形式供给高品质蛋白原料的方案,现阶段仍存在生产规模小、生产成本高等关键问题。以上问题可从原料、菌株、设备与工艺3个方面入手破解,可以预见,菌株的定向改造和配套的发酵工艺开发会极大地推进微生物蛋白的发展和应用。

随着技术和装备的发展,预期以工农业副产物、能源化工品、二氧化碳等为原料制造微生物蛋白的成本可逐渐降低,由此生物制造路线产生的微生物蛋白,可分阶段替代鱼粉和糖蜜酵母蛋白等高品质蛋白(>1万元/吨)或豆粕蛋白等大宗蛋白原料(约4500元/吨),缓解乃至彻底解决我国蛋白质资源短缺的重大难题。

参考文献

- Wang G, Wu X, Yin Y. Synthetic biology-driven customization of functional feed resources. *Trends Biotechnol*, 2022, 40: 777–780
- Liu Y F, Deng M T, Chen J. Microbial alternative protein biomanufacturing: Advances and perspectives (in Chinese). *J Chin Instit Food Sci Technol*, 2022, 22: 1–5 [刘延峰, 邓梦婷, 陈坚. 微生物替代蛋白生物制造: 进展与展望. *中国食品学报*, 2022, 22: 1–5]
- Ritala A, Häkkinen S T, Toivari M, et al. Single cell protein—State-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2009
- Czech A, Smolczyk A, Ognik K, et al. Nutritional value of *Yarrowia lipolytica* yeast and its effect on growth performance indicators in piglets. *Ann Anim Sci*, 2016, 16: 1091–1100
- Jiang Z, Wei S, Wang Z, et al. Effects of different forms of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, intestinal development, and systemic immunity in early-weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol*, 2015, 6: 1–8
- Wells M L, Potin P, Craigie J S, et al. Algae as nutritional and functional food sources: Revisiting our understanding. *J Appl Phycol*, 2017, 29: 949–982
- Bito T, Okumura E, Fujishima M, et al. Potential of *Chlorella* as a dietary supplement to promote human health. *Nutrients*, 2020, 12: 2524
- Anupama, Ravindra P. Value-added food: Ingle cell protein. *Biotechnol Adv*, 2000, 18: 459–479
- Sakarika M, Ganigué R, Rabaey K. Methylotrophs: From C1 compounds to food. *Curr Opin Biotechnol*, 2022, 75: 102685
- Turck D, Castenmiller J, de Henauw S, et al. Safety of *Yarrowia lipolytica* yeast biomass as a novel food pursuant to regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J*, 2019, 17: 5594
- Jach M E, Serefko A, Ziaja M, et al. Yeast protein as an easily accessible food source. *Metabolites*, 2022, 12: 63
- Whittaker J A, Johnson R I, Finnigan T J, et al. The biotechnology of Quorn mycoprotein: Past, present and future challenges. In: Nevalainen H, ed. *Grand Challenges in Fungal Biotechnology*. Cham: Springer, 2020
- Schultz N, Chang L, Hauck A, et al. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 69: 515–520
- Karimi S, Mahboobi Soofiani N, Mahboubi A, et al. Use of organic wastes and industrial by-products to produce filamentous fungi with potential as aqua-feed ingredients. *Sustainability*, 2018, 10: 3296

- 15 Thibault G, Alejandro D M D, Guido A, et al. Production of fungal biomass. WIPO Patent, WO2022136708A1, 2022-06-30
- 16 Banks M, Johnson R, Giver L, et al. Industrial production of microbial protein products. *Curr Opin Biotechnol*, 2022, 75: 102707
- 17 Mondal A K, Sengupta S, Bhowal J, et al. Utilization of fruit wastes in producing single cell protein. *Int J Environ Sci Technol*, 2012, 1: 430–438
- 18 Ferrer J, Paez G, Marmol Z, et al. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Bioresour Technol*, 1996, 57: 55–60
- 19 Liu Y, Tang Y, Gao H, et al. Challenges and future perspectives of promising biotechnologies for lignocellulosic biorefinery. *Molecules*, 2021, 26: 5411
- 20 Sperandio G B, Ferreira Filho E X. Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2019, 142: 109–123
- 21 Li N Y, Wu J, Yang Z J, et al. Effects of different treatments on nutritional composition of microbiological storage (in Chinese). *Zhejiang J Anim Sci Vet Med*, 2020, 45: 6 [李乃勇, 吴静, 杨支吉, 等. 不同处理对微贮饲料营养成分的影响. *浙江畜牧兽医*, 2020, 45: 6]
- 22 Liu Q, Sun Q Z, Xu L J, et al. Quality comparison of whole corn silage and cornstalk silage (in Chinese). *Sichuan J Anim Sci Vet Med*, 2018, 45: 24 [柳茜, 孙启忠, 徐丽君, 等. 全株玉米青贮和玉米秸秆青贮的品质比较. *四川畜牧兽医*, 2018, 45: 24]
- 23 Zhang X W, Hao L Z, Wang W B, et al. Comparative study on nutritional value on wheat straw by different combinations of ammoniation and microbiological storage (in Chinese). *Heilongjiang J Anim Sci Vet Med*, 2013, (5): 71–73 [张晓卫, 郝力壮, 王万邦, 等. 不同组合氨化和微贮小麦秸秆营养价值的比较研究. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, (5): 71–73]
- 24 Wei D Y, Wang D H, Gao J. A type of fermented straw feed and its production method (in Chinese). PRC Patent, CN114190475A, 2022-03-18 [魏大勇, 王德辉, 高晶. 一种秸秆发酵饲料及其生产方法. 中国专利, CN114190475A, 2022-03-18]
- 25 Gao L, Wu X, Jia W D. An efficient and low-cost pretreatment of biomass materials combined with solid-state fermentation method and its application in the production of single-cell protein feed (in Chinese). PRC Patent, CN113729110A, 2021-12-03 [高乐, 吴信, 贾文娣. 一种生物质材料高效低成本预处理结合固态发酵方法及在单细胞蛋白饲料生产中的应用. 中国专利, CN113729110A, 2021-12-03]
- 26 Sun Q, Chen J Z. A method of producing high-quality biological feed by multi-strain fermentation (in Chinese). PRC Patent, CN109497266A, 2019-03-22 [孙倩, 陈甲子. 一种多菌种复合发酵生产优质生物饲料的方法. 中国专利, CN109497266A, 2019-03-22]
- 27 Pihlajaniemi V, Ellilä S, Poikkimäki S, et al. Comparison of pretreatments and cost-optimization of enzymatic hydrolysis for production of single cell protein from grass silage fibre. *Bioresour Technol Rep*, 2020, 9: 100357
- 28 Upcraft T, Johnson R, Finnigan T, et al. Protein from renewable resources: Mycoprotein production from agricultural residues. *Green Chem*, 2020, 48: 985–990
- 29 Matels R I, Tannenbaum S E. Single-cell protein. *Econ Bot*, 1968, 22: 42–50
- 30 Bewersdorff M, Dostálek M. The use of methane for production of bacterial protein. *Biotechnol Bioeng*, 1971, 13: 49–62
- 31 Harrison D E. Making protein from methane. *Chem Technol*, 1976, 6: 570–574
- 32 Snedecor B, Cooney C L. Thermophilic mixed culture of bacteria utilizing methanol for growth. *Appl Microbiol*, 1974, 27: 1112–1117
- 33 Levine D W, Cooney C L. Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. *Appl Microbiol*, 1973, 26: 982–990
- 34 Johnson E A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—The ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 503–517
- 35 Senior P J, Windass J. The ICI single cell protein process. *Biotechnol Lett*, 1980, 2: 205–210
- 36 Molitor B, Mishra A, Angenent L T. Power-to-protein: Converting renewable electric power and carbon dioxide into single cell protein with a two-stage bioprocess. *Energy Environ Sci*, 2019, 12: 3515–3521
- 37 Hann E C, Overa S, Harland-Dunaway M, et al. A hybrid inorganic-biological artificial photosynthesis system for energy-efficient food production. *Nat Food*, 2022, 3: 461–471
- 38 Rahimi M, Khurram A, Hatton T A, et al. Electrochemical carbon capture processes for mitigation of CO₂ emissions. *Chem Soc Rev*, 2022, 51: 8676–8695
- 39 Battaglia P, Buffo G, Ferrero D, et al. Methanol synthesis through CO₂ capture and hydrogenation: Thermal integration, energy performance and techno-economic assessment. *J CO₂ Util*, 2021, 44: 101407
- 40 Atsbha T A, Yoon T, Seongho P, et al. A review on the catalytic conversion of CO₂ using H₂ for synthesis of CO, methanol, and hydrocarbons. *J CO₂ Util*, 2021, 44: 101413
- 41 Windass J D, Worsey M J, Pioli E M, et al. Improved conversion of methanol to single-cell protein by *Methylophilus methylotrophus*. *Nature*, 1980, 287: 396–401
- 42 Wang G, Huang M, Nielsen J. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 48: 77–84
- 43 Wang G, Björk S M, Huang M, et al. RNAi expression tuning, microfluidic screening, and genome recombineering for improved protein production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 9324–9332
- 44 Cao M, Tran V G, Zhao H. Unlocking nature's biosynthetic potential by directed genome evolution. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 66: 95–104

- 45 Chen F Y H, Jung H W, Tsuei C Y, et al. Converting *Escherichia coli* to a synthetic methylotroph growing solely on methanol. *Cell*, 2020, 182: 933–946
- 46 Kim S, Lindner S N, Aslan S, et al. Growth of *E. coli* on formate and methanol via the reductive glycine pathway. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 538–545
- 47 Hu G, Li Z, Ma D, et al. Light-driven CO₂ sequestration in *Escherichia coli* to achieve theoretical yield of chemicals. *Nat Catal*, 2021, 4: 395–406
- 48 Gleizer S, Ben-Nissan R, Bar-On Y M, et al. Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂. *Cell*, 2019, 179: 1255–1263
- 49 Cai P, Duan X, Wu X, et al. Recombination machinery engineering facilitates metabolic engineering of the industrial yeast *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 7791–7805
- 50 Liew F E, Nogle R, Abdalla T, et al. Carbon-negative production of acetone and isopropanol by gas fermentation at industrial pilot scale. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 335–344
- 51 Yan J, Han B, Gui X, et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* to simultaneously produce lipase and single cell protein from agro-industrial wastes for feed. *Sci Rep*, 2018, 8: 758
- 52 Lim E H, Lam T J, Ding J L. Single-cell protein diet of a novel recombinant vitellogenin yeast enhances growth and survival of first-feeding tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. *J Nutr*, 2005, 135: 513–518
- 53 Xie D, Jackson E N, Zhu Q. Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: From fundamental research to commercial production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 1599–1610
- 54 Tlustý M, Rhyne A, Szczepak J T, et al. A transdisciplinary approach to the initial validation of a single cell protein as an alternative protein source for use in aquafeeds. *PeerJ*, 2017, 5: e3170

Summary for “微生物蛋白制造的发展趋势与挑战”

Microbial protein manufacturing: The developing trend and challenge

Guokun Wang^{1,2,3*}, Yuping Lin^{1,2}, Qinhong Wang^{1,2,3}, Xin Wu^{1,2*}, Yulong Yin^{1,2*} & Yanhe Ma^{1,2*}

¹ *Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China;*

² *National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China;*

³ *Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin 300308, China*

* Corresponding authors, E-mail: wanggk@tib.cas.cn; wuxin@tib.cas.cn; yinyulong@isa.ac.cn; ma_yh@tib.cas.cn

A stable food protein supply is vital to guarantee human health and national security. Food proteins are supplied as plant proteins such as beans and cereals, as well as animal proteins such as meat, milk, and eggs. It is expected that, with the increasing global population and the upgrading consumption mode, the meat demand will elevate by 200000000 to 470000000 t by 2050. The production of the above-mentioned protein foods requires a massive input of protein sources, which are mainly supplied as crop grains and produced through farming. The constant supply of such crop-derived protein sources is dramatically threatened by a set of factors, including limited arable land, long production duration, and global climate change. Microbial protein manufacturing can supply alternative protein resources with high spatiotemporal productivity and in an arable-land-independent mode, acting as a supportive or even alternative solution to traditional farming.

In the presented work, we summarized the progress in the field of microbial protein manufacturing, prospected the challenges to overcome, and proposed potential solutions. We first described the need to develop microbial proteins by emphasizing the advantage of the mode to produce microbial proteins and the premium characteristics of microbial protein products. We then introduced the typical strains primarily used for microbial protein manufacturing, including microalgae, bacteria, yeasts, and filamentous fungi. We also briefly described their biological traits and appropriate applications.

We further elaborated on the producing routes according to the three bulk feedstock used for microbial production: (1) the byproducts of food and agricultural industries, (2) energy chemicals derived from natural gas and coal, and (3) carbon oxide and its energy-rich derivatives. Moreover, we pointed out the pros and cons of each producing route and systematically analyzed the main factors restricting current microbial protein production to a small scale. We drew a conclusion that the main limiting factors are the less abundant feedstock amount (for example, molasses), the high cost of the overall production process, and others. We interpreted that the high cost of the overall production process is further caused by the high feedstock cost, the relatively low capacity of the producer strains (low yield and rate), and the incompatible fermentation process. We, therefore, proposed that, the above-mentioned issues can be potentially fixed by (1) globally optimizing the collection, generation, and storage of the fermentation feedstock, (2) continuously customizing robust strains that can produce high-quality microbial proteins in a more carbon-efficient and faster way, and (3) developing bioreactors and fermentation processes that are suitable to the given strain for microbial protein manufacturing.

We prospect that, with continuous and coordinated technological development regarding substrate, strain, equipment, and process, microbial protein may serve to meet our fast-growing demand for protein resources, enabling the constant production and supply of protein foods.

production route, lignocellulose, energy-rich chemical, strain customization, fermentation process

doi: [10.1360/TB-2023-0013](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0013)