



理性调控甲醇定向生物合成酵母单细胞蛋白的新策略

罗会颖, 姚斌*

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100093

* 联系人, E-mail: binyao@caas.cn

收稿日期: 2024-03-19; 接受日期: 2024-05-16; 网络版发表日期: 2024-07-04

人均土地资源相对不足是中国的基本国情, 依靠现有的可耕种土地资源难以解决全部的农产品和食品的需求, 导致粮食进口依赖度逐年增高, 严重威胁着中国食品供给和粮食安全. 蛋白是粮食的核心组成部分. 最新的海关数据显示, 作为重要饲用蛋白原料的大豆, 2023年的进口量已达到9941万吨, 其中的2/3用于饲料. 逐年增加的大豆进口依存度, 严重威胁了中国饲料业的发展与战略性安全. 因此, 寻求新的蛋白质资源来代替大豆等作物蛋白已迫在眉睫.

当前, 微生物替代蛋白是全球最火热的食品和饲料创新领域, 即通过细菌、酵母、丝状真菌等微生物发酵获得能够替代传统植物蛋白的单细胞菌体蛋白^[1]. 自20世纪80年代开始, 全球的研究者们围绕不同碳源的单细胞蛋白生产开展了大量工作, 包括以葡萄糖/糖蜜等传统原料为碳源生产的单细胞蛋白^[2]、利用制造业产生的废液发酵生产的单细胞蛋白^[3]以及利用甲烷^[4]和甲醇^[5]等一碳原料生产的单细胞蛋白等. 目前, 国内菌体蛋白的生产大多以依赖种植且成本较高的可食用的糖基碳源为原料, 无法支撑规模化发展, 使得微生物蛋白创制缺乏相应的碳源, 菌体蛋白产业遭遇发展瓶颈. 例如甘蔗作为最主要的糖料作物, 中国对外依存度已达600万吨/年. 因此, 挖掘并创制不与粮争地的低值

原料来源的微生物蛋白是解决菌体蛋白产业发展瓶颈的必经之路, 对应对粮食危机具有重要的战略意义.

甲醇可由二氧化碳加氢大量制备, 间接减排二氧化碳, 因此被认为是“液态阳光”战略的理想能量储存载体. 近年来, 随着合成生物学技术的不断发展及其应用领域的扩大, 以甲醇为碳源, 利用微生物转化单细胞蛋白的技术逐渐受到关注. 目前, 中国甲醇市场规模居世界第一, 产能已达8000万吨/年, 呈现过剩趋势^[6]. 相较于其他一碳原料, 中国甲醇产量稳定, 价格低廉, 以甲醇为碳源生产单细胞蛋白是中国当前最具工业化前景的单细胞蛋白生产方式(图1)^[7]. 实现以甲醇为碳源的单细胞蛋白的规模化生产对缓解中国蛋白资源短缺、保障国家粮食安全具有重要意义^[8].

毕赤酵母具有天然的甲醇代谢途径, 最初被用于以甲醇为碳源的单细胞蛋白生产^[9], 由于成本较高, 这种方式变得不经济. 如何实现毕赤酵母以甲醇为碳源更为高效合成菌体蛋白, 是目前研究人员关注的研究热点之一. 在甲醇代谢过程中, 首先被氧化为甲醛, 一部分甲醛进入异化途径并进一步被氧化为二氧化碳和水, 另一部分甲醛进入同化途径并经单磷酸木糖途径进入中心代谢, 促进菌体的生长代谢. 然而甲醇代谢途径复杂, 进入异化途径的比例难以调控, 并且甲醇

引用格式: 罗会颖, 姚斌. 理性调控甲醇定向生物合成酵母单细胞蛋白的新策略. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1488–1490

Luo H, Yao B. A new strategy for efficient biosynthesis of yeast single-cell proteins by rational regulation of methanol utilization (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2024, 54: 1488–1490, doi: [10.1360/SSV-2024-0070](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0070)

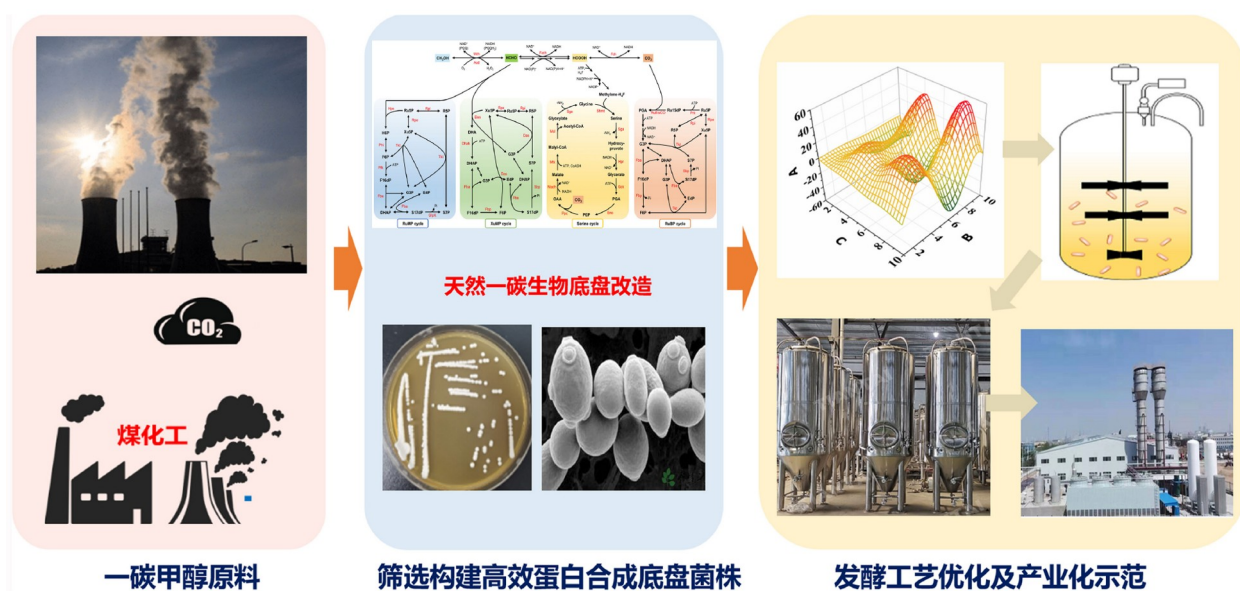


图 1 甲醇单细胞蛋白制备路线

Figure 1 Preparation route of single cell protein by methanol utilization

本身具有生物毒性, 造成的碳损失往往超过原料整体利用率的20%。无法实现甲醇代谢流高效定向转化为菌体蛋白, 是目前进一步降低以甲醇为碳源的单细胞蛋白生产成本的主要技术瓶颈。因此, 改造遗传背景清晰、工业应用广泛的模式菌株, 构建高效甲醇代谢工业菌株, 实现高效的甲醇生物转化, 具有重要的意义。

近日, 中国科学院天津工业生物技术研究所吴信团队先后在 *Microbial Cell Factories* 和 *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 上发表了题为“Economical production of *Pichia pastoris* single cell protein from methanol at industrial pilot scale”和“Deciphering cell wall sensors enabling the construction of robust *P. pastoris* for single-cell protein production”的研究文章^[10,11]。通过适应性进化策略获得了耐高温、高甲醇转化率的毕赤酵母菌株 HTX-33, 在 33°C 下生长的最大生物量是 30°C 培养条件下亲本菌株的 1.43 倍, 表明进化菌株具有更强的耐高温性能, 且甲醇利用效率得到提高。分析了毕赤酵母的甲醇代谢途径及关键节点, 发掘了响应高浓度甲醇的酵母细胞壁合成基因 PAS_chr4_0305, 作为调控甲醇代谢的关键靶点。进一步对酵母细胞基于细胞壁代谢扰动的生长调控机制进行了研究, 发现在敲除 PAS_chr4_0305 基因后, 细胞内

的海藻糖大量积累, 表明 PAS_chr4_0305 基因的去除可能激活了毕赤酵母的细胞壁传感器, 增强了酵母细胞对环境变化的适应, 促进了细胞的生长。在细胞壁传感器激活后, 细胞壁成分的重塑和海藻糖的积累都是对多种环境胁迫的响应。对 PAS_chr4_0305 菌株及野生株进行了转录水平分析, 与野生株相比, 在 HOG 途径中负责高渗透胁迫响应重要元件 Sho1 转录量出现明显上调, 而 Sho1 信号转导下游的 Rho GTP 酶 Ste50 与 pbs2 的转录同时下调, CWI 途径中观察到 Pbs2 和 Mkk1/2, Ptp2 和 Ptp3 下调, CWI 途径信号传递的核心丝裂原活化蛋白激酶 Slt2 上调, 而负责调控细胞壁合成的葡聚糖合成酶基因 FKS1 和 FKS2 分别上调了 2.8 和 1.7 倍。研究结果证实了细胞壁代谢引起的生长调控是通过 HOG 和 CWI 途径传导的, 增强了甲醇-蛋白代谢流的定向转化, 提高了碳氮协同转化效率并降低碳损失。

在甲醇中生长性能改善的毕赤酵母菌株, 其生产能力及方式在目前甲醇单细胞蛋白的制备路线中具有显著优势。如 Phillips Petroleum 公司可以实现大于 1g/L/h 的菌体生产速率, 获得大约 130 g/L 的干菌体, 但是其工艺依赖纯氧发酵条件, 能耗成本较高, 甲醇-蛋白非定向转化, 碳损失高。而毕赤酵母 HTX-33 菌体蛋白的干重和粗蛋白含量分别达到 120 g/L 和 67%, 甲醇转

化效率达到0.46 g DCW/g, 达到理论值的92%, 且仅需要常规通气, 大幅降低了生产成本. 据悉, 依托该技术已建成了万吨级集约化以甲醇为碳源的酵母单细胞蛋白工厂, 并已实现投产.

综上, 目前的研究借助基因组层面信号扰动调节毕赤酵母甲醇代谢流分布, 实现了以甲醇为碳源的单细胞蛋白的高效转化, 并揭示了基于细胞壁代谢调控

促进菌体蛋白生物合成的调节机制. 获得的毕赤酵母菌株及创建的菌株选育、蛋白生产技术体系, 为利用甲醇生物制造菌体蛋白提供了重要的高版本菌株及生产技术. 在后续的研究过程中, 理性调控甲醇定向生物合成单细胞蛋白新策略的普适性以及酵母单细胞蛋白的应用端的加强等内容尚可进一步加强, 真正推动蛋白原料生产向车间制造迈进.

参考文献

- 1 Ritala A, Hakkinen S T, Toivari M, et al. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2009
- 2 Aggelopoulos T, Katsieris K, Bekatorou A, et al. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chem*, 2014, 145: 710–716
- 3 Ren X, Wang J, Yu H, et al. Anaerobic and sequential aerobic production of high-titer ethanol and single cell protein from NaOH-pretreated corn stover by a genome shuffling-modified *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioresource Tech*, 2016, 218: 623–630
- 4 Petersen L A H, Villadsen J, Jørgensen S B, et al. Mixing and mass transfer in a pilot scale U-loop bioreactor. *Biotech Bioeng*, 2017, 114: 344–354
- 5 Johnson E A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 503–517
- 6 Gao J Q, Zhou Y J. Advances in methanol bio-transformation (in Chinese). *Synth Biol J*, 2020, 1: 158–173 [高教琪, 周雍进. 甲醇生物转化的机遇与挑战. *合成生物学*, 2020, 1: 158–73]
- 7 Chen X. Methanol as ‘Raw material’ for efficient protein production (in Chinese). *Science and Technology Daily*, 2024-01-02(006) [陈曦. 甲醇作“原料”高效产蛋白. *科技日报*, 2024, 2024-01-02(006)]
- 8 Bertau M, Offermanns H, Plass L, et al. Methanol: the Basic Chemical and Energy Feedstock of the Future. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014
- 9 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
- 10 Meng J, Liu S, Gao L, et al. Economical production of *Pichia pastoris* single cell protein from methanol at industrial pilot scale. *Microb Cell Fact*, 2023, 22: 198
- 11 Gao L, Meng J, Dai W, et al. Deciphering cell wall sensors enabling the construction of robust *P. pastoris* for single-cell protein production. *Biotechnol Biofuels*, 2023, 16: 178

A new strategy for efficient biosynthesis of yeast single-cell proteins by rational regulation of methanol utilization

LUO Huiying & YAO Bin

Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China

doi: 10.1360/SSV-2024-0070