

编者按：在当前国际局势下，建立自主可控、安全的产业链，正在成为全球经济重塑的重要内容。在中国，产业链安全的基础是国家的粮食安全，在依靠 18 亿亩耕地确保国家粮食安全的基础上，今年两会期间习近平总书记提出了要树立大食物观的概念，向植物、动物、微生物要热量，要蛋白。从粮食安全到蛋白质热量的供给，从原料到营养物质，大食物观的提出，立足国内现有资源的深度开发，为确保产业链的自主可控提出多元化发展路径。

科技界数十年来以藏粮于食为目标形成的科研积累和新资源食品法规标准的逐步完善，已经构建起支撑大食物观落地的软实力，食品产业即将迈进大规模、大业态、大市场、大龙头、大集成的大时代。

基于未来食品发展现状及发展方向，本期特约专栏邀请来自江南大学、东北农业大学、深圳大学、华中农业大学的院士、专家、学者，从微生物、植物、昆虫等角度寻找可持续的蛋白来源，探寻未来食品科技研发的重要方向。

(本期特约专栏得到创新蛋白产业联合会的支持)

微生物替代蛋白生物制造：进展与展望

刘延峰^{1,2}，邓梦婷^{1,2}，陈坚^{1,2*}

¹江南大学未来食品科学中心 江苏无锡 214122

²江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏无锡 214122

摘要 食物蛋白是人类最重要的营养素。然而，现有的蛋白质获取大量依赖于养殖业，存在环境污染较严重、土地占用和水耗较多的问题，难以满足人口持续增长和生活水平不断提升带来的对蛋白质需求的增长。微生物蛋白可利用更少的资源产出更多的蛋白质来源，具有制造效率高并且二氧化碳排放少的优势。作为重要的替代蛋白，微生物蛋白的高效制造和规模化应用是实现可持续蛋白供给的重要途径。本文首先分析微生物蛋白对可持续蛋白供给的重要作用；其次，总结微生物蛋白生物制造进展；最后，对微生物蛋白重点研究方向进行展望。微生物蛋白高效生物制造技术的开发和规模化应用将为解决蛋白质资源重大问题提供重要支撑。

关键词 微生物替代蛋白；未来食品；食品合成生物学

文章编号 1009-7848(2022)06-0001-05 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.06.001

1 微生物替代蛋白为可持续蛋白供给提供重要支撑

食物蛋白是人类最重要的营养素，具有构成和修补人体组织，构成酶、抗体和激素，运输各类物质，调节体液平衡，维持神经系统功能和提供能量等作用。作为人体生理、生化的重要组成部分，蛋白质是生命活动的主要承担者^[1]。摄入蛋白质的质量和数量直接影响人类健康^[2-3]。根据《中国居民膳食营养素摄入量》中提出的建议，成年男性蛋白质摄入量应为 65 g/d，女性蛋白质摄入量为 55 g/d。对于某些人群，包括运动员、老年人和孕妇，研究

表明，由于蛋白质对身体的积极作用，最佳的每日蛋白质摄入量应该高于普通人群的推荐量^[4]。预计 2050 年世界人口将达到 90 亿，食品蛋白需求增量为 30% 至 50%，达到 2.65 亿 t(联合国粮食及农业组织，FAO，<https://www.fao.org/news/story/en/item/35571/icode/>)。然而，现有的蛋白质获取大量依赖于养殖业，存在环境污染较严重、土地占用和水耗较多的问题，面临难以满足人口持续增长和生活水平不断提升对蛋白质需求增长的巨大压力。传统蛋白质生产方式不仅无法满足人类未来生活需求，而且难以达到环境友好和资源节约。大规模、低成本、可持续的蛋白质生产方式亟需创新和发展。

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

收稿日期：2022-06-24

基金项目：国家自然科学基金项目(32021005)

作者简介：刘延峰(1987—)，男，博士，研究员

通信作者：陈坚 E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

植物、动物、微生物要热量,要蛋白”。针对可持续、健康地满足全球日益增长的蛋白质需求,寻找可持续发展的蛋白来源是有效、可行的解决办法,是未来食品科技研发的重要方向。替代蛋白(Alternative protein)通过对环境影响较小的蛋白来源进行蛋白生产,以替代现有的蛋白质来源。替代蛋白主要包括植物蛋白、藻类蛋白、昆虫蛋白和微生物蛋白等。其中,微生物蛋白是利用可再生生物质原料等为底物,通过在发酵罐中培养微生物的方式制造蛋白,能够利用更少的资源产出更多的蛋白质来源,具有制造效率高并且二氧化碳排放少的优势^[5]。据测算,微生物蛋白合成效率是养殖方式获取蛋白效率的上千倍,如果到2050年用真菌蛋白替代全球20%的牛肉消费,能够减少每年56%的森林砍伐和相关二氧化碳排放^[6]。

高效微生物蛋白制造一方面可以保障蛋白供给数量,保障国家发展和食物安全;另一方面,通过微生物制造获得高品质蛋白能够保障蛋白供给质量,满足人民美好生活的需求。高品质蛋白主要体现在营养与功能性质方面,包括蛋白氨基酸组成与人体氨基酸模式相接近,蛋白性质能够提升食品的感官品质,并且调控食品及组分在制备、加工、储存和销售过程的物理特性。建立基于微生物蛋白高效生物制造的食品蛋白资源供给体系,对于保障国家食品蛋白供给安全,助力国家“碳达峰”和“碳中和”达成,具有十分重要的战略地位。

2 微生物替代蛋白生物制造进展

2.1 微生物菌体蛋白

通过对微生物进行培养,能够获得大量微生物细胞,进一步对微生物细胞进行加工,能够获得微生物菌体蛋白。微生物细胞中,来源于镰孢霉(*Fusarium venenatum*)的真菌蛋白(Mycoprotein)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的酵母蛋白(Yeast protein)是两种代表性微生物菌体蛋白。

来源于镰孢霉的真菌蛋白具有胞质富含蛋白,菌丝体富含纤维,细胞膜富含不饱和脂肪酸的特点。1984年,英国批准其作为食品,目前已有真菌蛋白的替代蛋白产品上市。它具有以下优势:真菌蛋白的蛋白消化率评分与牛肉糜、豌豆蛋白、昆虫蛋白、大豆蛋白相近,甚至更高;生产1 kg真菌

蛋白的碳排放量仅为肉类的10%,而且所需水用量和耕地面积显著降低;在促进肌肉生长和降低胆固醇水平方面具有潜在积极作用^[7]。然而,霉菌发酵培养工艺控制和组织化加工工艺复杂是其劣势。

来源于酿酒酵母的酵母蛋白具有富含蛋白质,长期应用于食品加工,风味被广泛接受的特点。我国将酵母列为“其它食品”,属于食品的一种。它的优势是:酵母蛋白含有全部必需氨基酸,属于全价蛋白,营养丰富,能够满足人体营养的需求;发酵工艺成熟,制造效率高,适合于规模化制造,所需水用量和耕地面积显著降低;酵母蛋白无致敏成分,适合人群广泛;无豆腥味,并且风味上能够丰富肉味。然而,其在蛋白成纤、持水等质构和组织特性方面需要进行调控,工艺较复杂。

目前各类菌体蛋白各有优、缺点,在生产成本、颜色气味、质构加工等方面需根据各自特性有针对性地进行处理。例如,来源于镰孢霉的真菌蛋白底物谱广泛,制造成本低并且质构与真肉相仿;酵母蛋白制造过程的菌体培养主要是以糖类为底物,成本较低,蛋白加工后几乎无特殊气味,易于加工处理。为了进一步提升菌体蛋白制造数量与质量,扩展菌体蛋白应用,主要从以下4个方面开展工作:1)建立可用于生产优质蛋白的菌种资源库;2)设计和改造微生物,使其成为优质蛋白的细胞工厂;3)研创微生物高效生物转化蛋白关键核心技术;4)通过食品组分的重组加工,开发合成蛋白产品。

2.2 微生物合成乳蛋白

近年来,随着食品合成生物学的快速发展,大量的细胞工厂被设计和构建用于高效合成重要的食品成分和食品功能因子,包括乳铁蛋白和母乳寡糖等^[8-13]。乳蛋白是天然奶的主要成分,具有高营养,易吸收,增强免疫力,抗氧化等特性,是非常重要的蛋白资源。与传统牛奶的生产工艺相比,应用合成生物学生产乳蛋白具有以下优势:1)通过在生物反应器中合成乳蛋白,避免传统养殖生产方式造成的环境污染以及乳蛋白的抗生素和激素污染;2)生产乳蛋白的微生物细胞工厂可使用廉价的培养基进行发酵,原料有葡萄糖、大豆蛋白胨、玉米糖浆、尿素和无机盐,成本相对较低^[14];3)

微生物发酵的优点是周期短,发酵不受环境和天气的影响。

通过合成生物学技术已实现利用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)等微生物来合成乳蛋白。完美日公司(<https://www.perfectdayfoods.com/learn-more/#background>)对乳蛋白表达及人造奶的生产进行了研究,核心技术包括将牛奶蛋白的 DNA 序列导入酵母细胞,通过发酵生产酪蛋白和乳清蛋白。进一步将牛奶蛋白、水和其它成分进行混合,生产乳制品替代品。虽然利用微生物发酵法合成乳蛋白在国内起步相对较晚,但是近年来也已取得显著进展。在乳蛋白的表达方面,已实现利用大肠杆菌成功表达牛奶中 7 种主要蛋白(α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、白蛋白)的异源表达且未被降解^[15],为后续乳蛋白高效表达奠定了基础。利用毕赤酵母实现了人来源 α -乳白蛋白分泌表达,产量达到 56.3 mg/L^[16]。

乳铁蛋白是重要乳蛋白,具有抑制肠道致病菌等生理功能,应用领域广泛。牛乳铁蛋白是一种低浓度的抗菌剂和免疫调节剂,在牛奶中含量很低^[17-19]。建立细胞工厂进行生物合成是实现乳铁蛋白合成的有效策略。目前研究中,已实现红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)成功表达牛乳铁蛋白 C 叶和 N 叶^[20]。Isui 等^[21]采用硫氧还蛋白(Trx)和乳铁蛋白作为转录融合蛋白的共表达策略,在大肠杆菌中表达和纯化重组牛乳铁蛋白,蛋白的质量浓度达到 15.3 mg/L,纯度为 90.3%。此外,RbLf 对大肠杆菌 BL21(DE3)和 Mach1-T1 菌株的生长抑制率分别为 87.7%和 79.8%^[21]。通过对密码子使用的优化和强启动子 AOX1 的筛选,牛乳铁蛋白在毕赤酵母中得到高效表达。经诱导、裂解、纯化后分批发酵,最终 RbLf 表达量为 3.5 g/L。作为食品安全级菌株,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是食品蛋白表达的理想宿主。研究人员通过启动子优化和密码子工程,在枯草杆菌 168 中表达牛乳铁蛋白^[22]。经硫酸铵沉淀、Ni-NTA 亲和层析、Superdex 200 层析 3 步纯化,乳铁蛋白的得率为 16.5 mg/L,纯度为 93.6%。最终,研究人员验证了对大肠杆菌 JM109、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylo-*

coccus aureus)的预期抗菌活性。

2.3 微生物合成卵清蛋白

鸡蛋来源的蛋白是优质蛋白和重要的食品蛋白资源。其中,卵清蛋白是一种典型的球状蛋白,占蛋清中总蛋白的 54%,相对分子质量为 42.7 ku,等电点为 4.5。卵清蛋白包含 386 个氨基酸残基,由单个二硫键和 4 个游离巯基形成稳定的直径为 3 nm 的球状三维结构,由于卵清蛋白纯化制备容易,且结构表征学研究完善,因此作为模式蛋白被广泛应用于蛋白质构象、生化性质等研究。

基于食品合成生物学构建的细胞工厂,为卵清蛋白制造提供了新途径。在已开展的研究中,多种微生物被用来合成卵清蛋白^[23]。以大肠杆菌作为表达宿主细胞,通过基因工程实现了合成和分泌完整的鸡卵清蛋白^[24]。近期研究中,研究人员证明了卵清蛋白在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中合成和正确折叠^[25-27]。虽然微生物合成的卵清蛋白没有翻译后修饰,但是它仍表现出与天然鸡蛋卵清蛋白相似的抗原性和生物活性。此外,相关食品生物技术公司也致力于包括卵清蛋白等鸡蛋来源蛋白的微生物生产,在多种微生物(如酿酒酵母和枯草芽孢杆菌)中生产两种或两种以上蛋清蛋白的组合。

3 未来微生物替代蛋白制造重点研究方向

为了进一步提升微生物蛋白制造效率,提升微生物蛋白的品质,实现微生物蛋白低成本和大规模生产,微生物蛋白相关研究需从以下 4 个方面进一步加强:

1) 高效构建蛋白生产的细胞工厂 基于元件挖掘、途径调控、系统优化等策略,建立芽孢杆菌、酵母、霉菌等蛋白生产的高效细胞工厂。

2) 提升细胞生产蛋白效率 解决目标蛋白在不同细胞中高效合成与分泌问题;精准调控与优化细胞代谢与细胞组分,提升蛋白产量;设计与重构代谢模块,提高底物碳氮利用效率和能量代谢效率,提升蛋白得率;开展适应性进化与超高通量筛选相结合,获得生长速率提升的菌株,提升蛋白生产强度。

3) 蛋白质资源的低成本和大规模生产 在解决表达系统的抗逆性与稳定性的基础上,建立目标蛋白高效、大规模、低成本生产的关键核心技

术体系;筛选、挖掘抗逆元件,改善表达系统稳定性;通过功能蛋白高效表达系统进行功能模块间作用机制解析和挖掘;借助发酵工程优势平台,实现功能蛋白大规模、低成本生产,最终实现特定目标蛋白的大规模、低成本生产,建立食品领域蛋白生产的完整技术体系。

4) 蛋白功能解析与特定蛋白生产 在确定未来食品中特定功能蛋白的组成和重大需求基础上,解析其发挥特定功能的核心结构,创新功能蛋白理性设计体系,设计并建立具有特定新功能蛋白的普适性新方法和新技术,获得决定特定功能的核心结构及分子折叠基础,揭示决定特定功能的构效关系及作用机理;特定功能蛋白需求的理性定向设计以获得性能提升的蛋白资源;解析和发现决定蛋白功能的新分子机制,开发设计和强化蛋白特定功能的普适性方法,以获得一系列特定功能得到显著提升的目标蛋白。

4 结语

综上所述,传统蛋白质生产方式不仅无法满足人类未来生活需求,而且难以达到环境友好和资源节约,大规模、低成本、可持续的蛋白质生产方式亟需创新和发展。采用微生物蛋白等替代动物蛋白是食品和生物产业的必然方向。针对微生物替代蛋白生物制造,必须加强蛋白细胞工厂构建、蛋白合成效率提升和蛋白功能调控等技术的开发和应用,解决蛋白质资源等重大问题,抢占世界食品和生物的科技前沿和产业高地,造福人类。

参 考 文 献

- [1] REZAEI R, WU Z, HOU Y. Amino acids and mammary gland development: nutritional implications for milk production and neonatal growth[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7: 20.
- [2] ELMADFA I, MEYER A L. Animal proteins as important contributors to a healthy human diet[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2017, 5(1): 111-131.
- [3] WU G, IMHOFF-KUNSCH B, GIRARD A W. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development[J]. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2012, 26(s1): 4-26.
- [4] BAUER J, BIOLO G, CEDERHOLM T. Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: a position paper from the PROT-AGE Study Group[J]. *Journal of the American Medical Directors Association*, 2013, 14(8): 542-559.
- [5] JÄRVIÖ N, PARVIAINEN T, MALJANEN N L. Ovalbumin production using *Trichoderma reesei* culture and low-carbon energy could mitigate the environmental impacts of chicken-egg-derived ovalbumin[J]. *Nature Food*, 2021, 2: 1005-1013.
- [6] HUMPENÖDER F, BODIRSKY B L, WEINDL I. Projected environmental benefits of replacing beef with microbial protein[J]. *Nature*, 2022, 605: 90-96.
- [7] WIEBE M G. Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2002, 58(4): 421-427.
- [8] DENG J Y, GU L Y, CHEN T C. Engineering the substrate transport and cofactor regeneration systems for enhancing 2'-fucosyllactose synthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2418-2427.
- [9] YU S, LIU J J, YUN E J. Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 101.
- [10] HUANG D, YANG K X, LIU J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3'-fucosyllactose through modular pathway enhancement [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 23-38.
- [11] MARTINEZ J L, LIU L F, PETRANOVIC D. Engineering the oxygen sensing regulation results in an enhanced recombinant human hemoglobin production by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(1): 181-188.
- [12] LIU L F, MARTINEZ J L, LIU Z H. Balanced globin protein expression and heme biosynthesis improve production of human hemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 21: 9-16.
- [13] DROUILLARD S, MINE T, KAJIWARA H. Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6, 6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engi-

- neered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 [J]. *Carbohydrate Research*, 2010, 345(10): 1394–1399.
- [14] WANG S H, YANG T S, LIN S M. Expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression & Purification*, 2002, 25(1): 41–49.
- [15] 张齐, 崔金明, 蒙海林. 7种牛奶蛋白基因在大肠杆菌中的异源表达[J]. *集成技术*, 2016, 5(6): 79–84.
- ZHANG Q, CUI J M, MENG H L. Synthesis of seven milk proteins in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Integration Technology*, 2016, 5(6): 79–84.
- [16] DENG M T, LV X Q, LIU L. Efficient bioproduction of human milk alpha-lactalbumin in *Komagataella phaffii*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(8): 2664–2672.
- [17] VOGEL H J. Lactoferrin, a bird's eye view[J]. *Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 90(3): 233–244.
- [18] LATORRE D, PUDDU P, VALENTI P. Reciprocal interactions between lactoferrin and bacterial endotoxins and their role in the regulation of the immune response[J]. *Toxins*, 2010, 2(1): 54–68.
- [19] JENSSEN H, HANCOCK R E W. Antimicrobial properties of lactoferrin[J]. *Biochimie*, 2009, 91(1): 19–29.
- [20] KIM W S, SHIMAZAKI K I, TAMURA T. Expression of bovine lactoferrin C-lobe in *Rhodococcus erythropolis* and its purification and characterization [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(11): 2641–2645.
- [21] ISUI G M, JOSE S M, SIGIFREDO A G. Expression and characterization of recombinant bovine lactoferrin in *E. coli*[J]. *BioMetals*, 2013, 26(1): 113–122.
- [22] JIN L, LI L H, ZHOU L X. Improving expression of bovine lactoferrin N-Lobe by promoter optimization and codon engineering in *Bacillus subtilis* and its antibacterial activity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(35): 9749–9756.
- [23] GENG F, XIE Y X, WANG J Q. Large-scale purification of ovalbumin using polyethylene glycol precipitation and isoelectric precipitation[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(3): 1545–1550.
- [24] THOMAS H F, BARBARA J B. Chicken ovalbumin is synthesized and secreted by *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978, 75(12): 5936–5940.
- [25] LIU Y, SU A, TIAN R. Developing rapid growing *Bacillus subtilis* for improved biochemical and recombinant protein production[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, 11: e00141.
- [26] UPADHYAY V, SINGH A, PANDA A K. Purification of recombinant ovalbumin from inclusion bodies of *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 117: 52–58.
- [27] RUPA P, MINE Y. Immunological comparison of native and recombinant egg allergen, ovalbumin, expressed in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(22): 1917–1924.

Microbial Alternative Protein Biomanufacturing: Advances and Perspectives

Liu Yanfeng^{1,2}, Deng Mengting^{1,2}, Chen Jian^{1,2*}

(¹Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu)

Abstract Protein is one of the most important nutrients for human. However, husbandry-based protein supply faces up to severe environment pollution, extensive land use and freshwater withdrawals, which cannot meet the increase requirements of protein due to increasing population and improved living standard. Microbial protein can be quantitatively produced using less resource, which has high production efficiency and low carbon dioxide emission. As an important alternative protein, microbial protein manufacturing provides important approach for sustainable protein supply. In this work, we firstly discussed the importance of microbial protein manufacturing for sustainable protein supply. Next, advances of microbial protein manufacturing were systematically summarized. Finally, perspectives on important research direction of microbial protein manufacturing were discussed. Developing and applying highly efficient microbial protein manufacturing is of great importance for protein resources supply.

Keywords microbial alternative protein; future foods; food synthetic biology