

• 核心技术创新 •

孙媛霞 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员。长期从事食品生物合成技术研究，重点聚焦蛋白质工程与糖工程领域研发，开发了一系列新型糖酶并建立低热量功能糖绿色生物转化合成关键技术。天津市女科技工作者协会副会长，全国三八红旗手。主持多项国家级、省部级科技攻关任务，在 *Nature Communication*、*ACS Catalysis* 等杂志发表论文 100 余篇，授权专利 20 余项，获省部级科技进步奖、产学研创新发展突出贡献奖等 5 项。



未来食品的低碳生物制造

李德茂^{1,2}，童胜^{1,2}，曾艳^{1,2}，杨建刚^{1,2}，齐显尼^{1,2}，王钦宏^{1,2}，孙媛霞^{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

李德茂，童胜，曾艳，杨建刚，齐显尼，王钦宏，孙媛霞. 未来食品的低碳生物制造. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4311-4328.

LI DM, TONG S, ZENG Y, YANG JG, QI XN, WANG QH, SUN YX. Low carbon biomanufacturing for future food. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4311-4328.

摘要：受到人口增长过快、社会经济发展水平不平衡、人口老龄化和不健康饮食方式等影响，人类面临着食品和营养缺乏、部分人群中营养相关疾病高发等问题。同时，社会低碳发展的需求呼唤一种可持续的食物供给模式。因此，既能满足消费者口感和营养需求，又是绿色可持续食物供给模式的技术，例如功能糖、人造肉等未来食品技术，受到了广泛的关注。近年，新兴的生物制造技术及产品得到了迅猛发展，将会支撑形成绿色、低碳的未来食品产业，引发传统生产模式的深刻变革，是新兴生物经济的重大战略发展方向。本文聚焦于未来食品——功能糖、微生物蛋白及人造肉等关键辅配料的生物制造技术研究，追踪其在细胞工厂构建、工业环境下菌种测试与过程优化和衍生产品开发等研究的最新进展，展望未来的发展趋势，旨在为微生物制造未来食品的产业提供指导。

关键词：未来食品；低碳生物制造；功能糖；微生物蛋白；人造肉；细胞工厂

Received: July 27, 2022; **Accepted:** October 3, 2022

Supported by: Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Action (TSBICIP-KJGG-004)

Corresponding author: SUN Yuanxia. E-mail: sun_yx@tib.cas.cn

基金项目：天津市合成生物提升行动计划 (TSBICIP-KJGG-004)

Low carbon biomanufacturing for future food

LI Demao^{1,2}, TONG Sheng^{1,2}, ZENG Yan^{1,2}, YANG Jiangang^{1,2}, QI Xianni^{1,2},
WANG Qinhong^{1,2}, SUN Yuanxia^{1,2}

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

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

Abstract: Affected by the rapid population growth, the unbalanced level of social and economic development, the aging population and unhealthy eating patterns, we are facing problems such as lack of food and nutrition, and the high incidence of nutrition related diseases. At the same time, the demand for low-carbon development calls for a sustainable food supply model. Therefore, technologies that meet the taste and nutritional needs of consumers, and serve as a green and sustainable food supply model, such as functional sugar, alternative meat and other future food technologies, have attracted increasing attention. The rapidly developed emerging biomanufacturing technology and its products will support the development of a green and low-carbon future food industry and trigger profound changes in the traditional production mode. Collectively, this represents a major strategic development direction of the emerging bioeconomy. This review summarizes the biomanufacturing technology of functional sugars, microbial proteins and key auxiliary ingredients of alternative meat. We discuss the latest progress in cell factory construction, strain evaluation and process optimization in industrial environment and derived product development. Moreover, future development trend was prospected, with the aim to facilitate industrial development of biomanufacturing of future food.

Keywords: future food; low carbon bio-manufacturing; functional sugar; microbial protein; alternative meat; cell factory

随着生活水平的不断提高,我国对肉类的需求越来越多,猪肉年产自1980年的1 205万t增长到了2021年的8 887万t,而且2021年我国累计肉类进口量达到938万t。肉类需求的增加推动了畜禽养殖产业的快速发展,从而导致玉米、大豆等饲用饲料用粮的需求居高不下。2020年和2021年我国分别进口大豆10 032.7万t和9 651万t,80%用于了畜禽业饲料产品。弥补大豆的进口需额外增加2.4亿hm²耕地,这样会导致我国其他粮食的短缺和温室气体的持续排放。同时,受到社会经济发展水平不平衡、人口老龄化和不健康饮食方式等影响,我们仍然面临着营养缺乏、部分人群中营养相关疾病

高发等问题。在过去的40年里,全球超重和肥胖的患病率几乎增加了2倍,是21世纪最严重的未得到解决的公共卫生挑战之一^[1-2]。因此,日益增长的人口数量对粮食需求的增加和社会低碳发展的需求呼唤一种可持续的食物供给模式。既能满足消费者口感需求又不额外增加热量的功能性食品,例如低卡路里与低升糖指数的功能糖、功能性蛋白等,受到了广泛的关注。

科学研究发现过量摄入蔗糖和果葡糖浆,会加重肝脏负担,引发肥胖、糖尿病、中风、心血管病、老年痴呆等疾病风险^[3-4],为此,全球多个国家发起“减糖”倡议,征收糖税。为满足人们对食品甜味及益生等功能的需求,功能

性“代糖”产品在人们日常生活中扮演越来越重要的角色。依赖天然提取或者化学催化的低热量糖与糖醇制备方法,存在效率低、成本高、难以满足市场需求等问题。随着工业生物技术的发展,近年来,通过微生物发酵和生物转化技术制备功能糖备受关注,并在很多领域取得较好的研究进展,部分产品已经实现产业化应用。

微生物蛋白及其蛋白肉具有高蛋白含量、高消化吸收率、富含膳食纤维与微量营养素、较低的饱和脂肪与胆固醇含量等优点,具有降低肥胖风险、保持骨骼肌量等优势。这是一种全新的、颠覆性的、高效的、无污染的肉类生产方式,可以不通过动物养殖来生产肉类,既节省了大量土地、粮食和水资源,又可以减少温室气体排放,是实现“双碳”目标的重要途径,也是一种绿色可持续的肉类供应新模式。

随着基因编辑、代谢工程等技术的发展,合成生物技术进入了快速发展的阶段。一方面,合成生物技术能够利用微生物生产大宗的食品原料,例如蛋白质、脂肪等物质,可以用于生产人造肉、人工奶和人工脂肪等产品,重塑传统的食物生产模式,实现食物的绿色可持续供给;另一方面,合成生物技术可以生产出人体不能合成的功能性物质,包括阿洛酮糖等功能糖。因此合成生物技术的出现,对于人类食品的低碳、可持续供应、人类营养需求等具有重要的作用。本文将追踪未来食品功能糖和微生物蛋白及其人造肉关键辅配料的菌种构建、工业环境下菌种测试与过程优化和衍生产品的开发等研究的最新进展,展望未来发展趋势,为微生物制造未来食品的产业提供支撑。

1 功能糖生物制造技术

功能糖是一类具有不能被人体肠胃消化吸收且具有甜味或促进益生菌生长等特殊功效的

碳水化合物,主要包括功能性稀少糖、功能性寡糖、功能性糖醇、功能性淀粉等。这些糖可以作为功能性食品添加剂或蔗糖的替代原料,满足糖尿病、肥胖等特殊人群的需求。目前其生物合成技术主要有酶法催化转化技术和微生物发酵法技术(图1)。随着基因组测序技术、生物信息技术、蛋白质工程技术的发展,越来越多的酶催化剂和细胞工厂被开发出来,使得功能糖的制造技术近年来取得了很大进展,基于此,本文综述了该部分相关新技术和新成果。

1.1 酶催化技术制备功能糖

1.1.1 功能性稀少糖

稀少糖作为自然界中含量非常少的一类单糖及其衍生物,甜度为蔗糖的70%–90%,具有与蔗糖相似的加工性能,可作为新一代理想的蔗糖替代品^[5]。以阿洛酮糖、塔格糖为代表的稀少糖已被很多国家批准为食品原料。笔者团队长期开展生物转化制备稀少糖研究,采用数据库挖掘技术,获得了L-阿拉伯糖异构酶^[6]、D-阿洛酮糖-3-差向异构酶(D-allulose-3-epimerase, DAE)等酶催化元件,其中来源于瘤胃菌(*Ruminococcus* sp.)的DAE序列^[7]具有自主知识产权,以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)为底盘菌株,开发了食品安全的糖酶表达系统,采用同工酶串联组合表达策略,实现多个不同催化特性DAE在同一宿主菌株中的高效集成表达^[8],DAE酶活性超过100 U/mL;基于DAE开展了蔗糖糖蜜、菊粉、枣汁等资源的高附加值利用转化,获得了阿果糖浆等多个富含阿洛酮糖的产品,提升了产品的应用价值,相关技术转化为企业带来良好经济效益。

尽管以单糖底物的转化策略在阿洛酮糖等稀少糖制备方面应用广泛,但是该方法基于异构转化反应,存在热力学平衡问题,产物往往

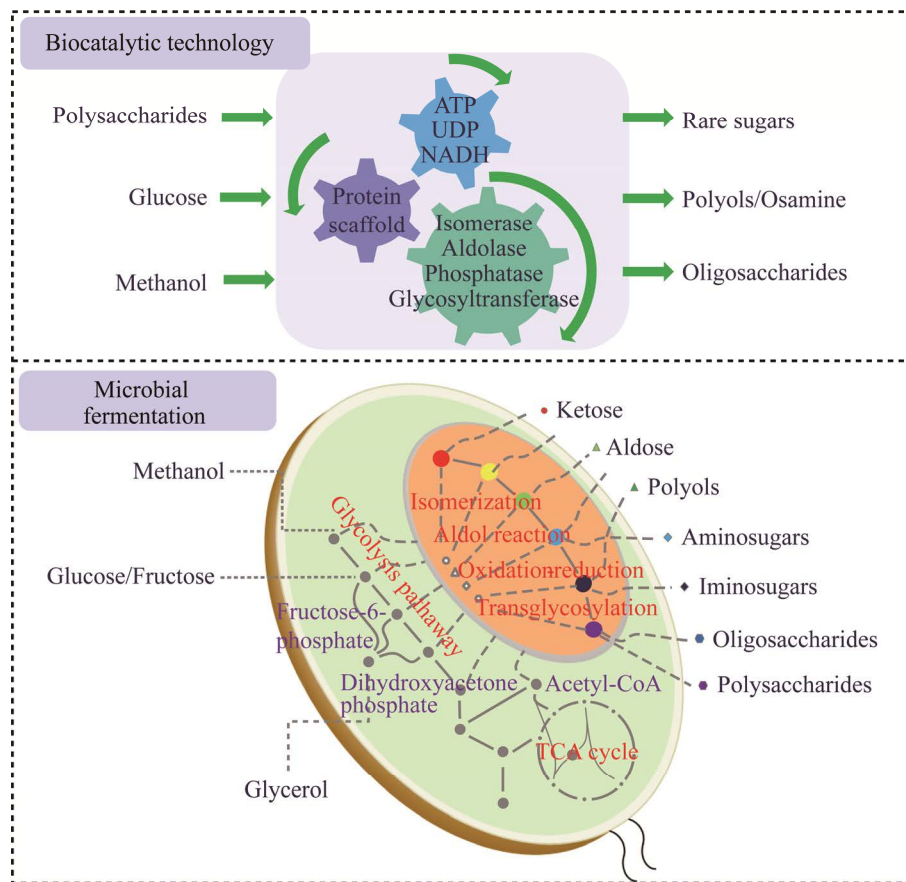


图 1 功能糖的生物合成技术路线

Figure 1 Biosynthesis technology route of functional sugars.

是混合物，从而增加了分离成本和设备投资。近年来，研究发现构建基于磷酸化和去磷酸化反应的热力学驱动路线，为稀少糖的制备提供了新的研究策略^[9]。该合成策略中磷酸酶催化的脱磷酸反应步骤是实现热力学驱动的关键，然而自然界中的磷酸酶往往具有宽泛的特异性，导致路线中目标产物转化率偏低，围绕磷酸酶底物特异性这一难题，笔者团队基于蛋白结构的酶分子设计与改造技术，成功改变磷酸酶底物宽泛性，使其专一性地聚焦到特定底物，从而获得了对甘露糖 6-磷酸、果糖 6-磷酸等特异性强的磷酸酶突变体，底物特异性偏转超过 12 000 倍^[10]；基于磷酸酶元件构建了热力学驱

动的多酶级联催化反应体系，实现转化淀粉、蔗糖等廉价原料制备目标产品，转化率达到 93%–96%，打破了单糖转化中的反应平衡问题，也为高纯度果糖和甘露糖的生物制备提供了基础。除此之外，中国科学院天津工业生物技术研究所（以下简称“天津工业生物所”）游淳团队通过构建热力学驱动反应，实现转化淀粉、蔗糖等廉价原料制备阿洛酮糖^[11]、肌醇^[12]等产品，均获得较高转化率。

单糖化合物往往具有多个手性中心，如何快速获得某一特定构象的化合物，制备结构多样性的单糖组分库，也是需要解决的问题，为了应对这一挑战，笔者团队建立了基于羟醛缩

合反应的稀少糖制备体系,挖掘了不同物种来源的醛缩酶元件,实现转化合成C4-C7多种单糖、脱氧糖、支链酮糖等化合物^[13-15],丰富了稀少糖产物库,为药物筛选及功能评价奠定了良好基础。

1.1.2 功能寡糖及其衍生物

功能寡糖是低聚合度的糖类物质,制备方法包括多糖水解、酶促转苷、异构等反应过程,其中多糖水解是主要制备手段^[16]。海洋生物资源如褐藻、红藻等富含多糖,是天然寡糖制备的关键原料。笔者团队从海洋环境中获得一株具有降解褐藻胶能力的微生物^[17],挖掘表征了一个新型耐碱性的双功能褐藻胶裂解酶,对褐藻胶中的多聚甘露糖醛酸 (polyM) 和多聚古罗糖醛酸 (polyG) 均具有较高水解活性,能够彻底降解褐藻胶,主产物为褐藻二糖、三糖和四糖,并进一步通过蛋白结构域改造,显著提高了该酶的酶活及热稳定性,进一步构建高效分泌表达褐藻胶裂解酶的 *B. subtilis* 菌株,吨级发酵液中上清液酶活高达 50 000 U/mL 以上,在国内外已有报道中位于前列^[18-19]。联合南宁汉和生物科技股份有限公司,开发建立多酶组合联用高浓度底物投料技术,实现大型藻多糖快速脱胶降黏,有效破壁促进海藻天然活性成分的释放,定向降解获得聚合度可控的活性寡糖,有效成分提取效率达到 95% 以上。开发含褐藻寡糖的植物调节剂,具有促生长与抗逆作用,实现“减肥减药”,同时达到作物增产增效作用,具有良好的社会与经济效益。该团队从海洋微生物中挖掘得到新型的琼胶酶 AgaA 和 AgaB,发现 AgaA 是一种热稳性高的内切型琼胶酶,具有较强降解琼脂多糖生成低聚琼寡糖作用;而 AgaB 是一种外切型琼胶酶,具有极高的底物特异性,生成产物为聚合度均一的新琼二糖^[20]。在此基础上,建立了双酶偶联降解

琼脂生产新琼二糖工艺,在 60 °C 条件下对高浓度的琼脂底物进行脱胶液化,然后对产物聚合度进行均一化处理,获得新琼二糖的纯度达 90% 以上,原料转化率接近 94%,为绿色、高效制备新琼寡糖提供新策略。

酶促水解方法获得的寡糖组分往往是多个聚合度的混合物,需要复杂的分离纯化工艺。近年,针对功能寡糖合成新方法开发,多个研究团队取得重要进展。Tian 等设计了一条功能寡糖合成的技术路线^[21],并在体外构建了多酶级联反应系统,以廉价的蔗糖为原料,实现了肌醇半乳糖苷、棉子糖和水苏糖 3 种功能寡糖合成;提出分步级联策略,解决了多酶反应系统中酶稳定性差等问题,提高了棉子糖的产量;通过多步级联与循环转化反应,实现了肌醇半乳糖苷、棉子糖和水苏糖的产量分别达到 42、129 和 41 g/L (表 1),为半乳糖基寡糖的生物制备提供借鉴,打破传统依赖水解获得水苏糖的制备方式。除此之外,游淳研究员团队设计了将廉价底物淀粉和葡萄糖一步转化为昆布二糖的体外多酶催化系统^[9,22];该体系包括 α -葡聚糖磷酸化酶 (α -glucan phosphorylase, α -GP)、昆布二糖磷酸化酶 (laminaribiose phosphorylase, LBP)、异淀粉酶 (isoamylase, IA) 和 4-葡聚糖转移酶 (4-glucanotransferase, 4-GT),通过反应体系优化,昆布二糖的产率进一步提高至 91.9%;进一步实现合成纤维二糖、海藻糖、槐糖等各种功能性二糖,具有较好的应用潜力。

功能糖苷为一个或者数个单糖组分与其他含羟基分子形成的聚合物,包括萜类皂苷、黄酮皂苷、多元醇功能糖苷等化合物。典型代表甘油葡萄糖苷是非洲“不死草”的关键活性物质,具有保湿、抗衰老、促进细胞增殖等功效,在食品和化妆品领域具有较高应用价值。

Nidetzky 团队在生物转化法合成甘油葡萄糖苷方面开展大量研究工作, 成功实现采用蔗糖磷酸化酶催化蔗糖和甘油合成甘油葡萄糖苷^[23-24]。然而, 由于蔗糖磷酸化酶区域选择性差, 导致采用该路线获得的目标产品大都为 α -1-/ α -2-甘油葡萄糖苷的混合物, 获得单一的 α -2-甘油葡萄糖苷产品需要复杂的纯化过程。为解决这一问题, 笔者团队采用磷酸化和转苷反应偶联的生物转化策略^[25], 构建了“一锅”双酶反应体系, 成功实现转化蔗糖和甘油合成了构型单一的 α -2-甘油葡萄糖苷产品, 进一步优化反应条件, 目标产物得率提升至 90% 以上, 产物浓度超过 400 g/L (表 1), 为目前报道最高水平, 该合成技术具有区域选择性高、产物构型专一及得率高等优势, 为甘油葡萄糖苷的高效生物制备提供借鉴。

1.1.3 淀粉合成

近年来, 功能性淀粉作为膳食纤维在食品加工领域应用潜力越来越大, 其中包括直链淀粉和高支化淀粉。淀粉蔗糖酶 (amylsucrase, ASase) 的发现与表征为直链淀粉的生物制备提供了可能, 该酶以蔗糖为原料, 通过果糖和葡萄糖 α -1,2 糖苷键断裂所产生的能量完成葡萄糖的重排, 从而合成富含 α -1,4 糖苷键的直链淀粉。江南大学沐万孟团队在该酶研究方面取得重要进展, 但采用该酶合成直链淀粉会产生大量副产物果糖, 同时由于 ASase 同时存在异构和水解活性, 导致最终反应体系中会生成部分葡萄糖、松二糖和海藻酮糖^[26]。针对直链淀粉合成, Qi 等开发了多酶级联催化技术以蔗糖为原料合成直链淀粉^[27], 该催化体系包含蔗糖磷酸化酶和葡聚糖磷酸化酶, 前者催化蔗糖合成葡萄糖-1-磷酸 (glucose-1-phosphate, G1P), 后者则催化 G1P 转移至寡糖链引物上, 实现糖链延伸制备直链淀粉, 该路线同样面临诸多挑

战, 例如副产物果糖生成、寡糖链添加、反应平衡等问题。

酶促淀粉改性制备高支化淀粉也是近年来淀粉加工领域的重要研究方向, 其中糖原分支酶是实现天然淀粉支链提升的关键酶, Zhang 等挖掘多个 GH13 和 GH57 家族糖原分支酶, 表征了催化性质, 分析其结构与功能特性, 实现淀粉分支度从 4% 提升至 14%, 大大增加淀粉可溶性和营养价值^[28-29]。

1.2 微生物发酵技术

长期以来微生物发酵法是获得功能糖的一种重要方式, 与生物催化技术相比, 微生物发酵技术可利用胞内的氧化还原系统, 辅因子调控系统等, 合成一些糖醇类、糖胺类、寡糖及多糖类产物。典型的案例是微生物发酵法合成赤藓糖醇, 多年来研究人员通过诱变筛选获得了高产赤藓糖醇的解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 菌株^[30], 产量超过 200 g/L (表 1), 糖醇转化率超过 0.6 g/g, 目前全国采用发酵法合成赤藓糖醇规模已超过 40 万 t。除了赤藓糖醇, 很多多糖天然合成菌株也同样被开发应用, 例如链球菌 (*Streptococcus* sp.) 作为工业化制备高分子量的透明质酸菌株, 已被广泛使用。近年, 随着合成生物学、系统生物学等技术的发展, 已有很多研究着眼于突破天然微生物菌株合成效率低的瓶颈, 创建新型细胞工厂合成更多结构复杂、功能多样的功能糖化合物, 其底物代谢利用范围从传统的 C6 葡萄糖扩展至更为廉价的 C1 甲醇、C3 甘油等原料。

1.2.1 L-稀少糖及支链酮糖

自然界中单糖组分大都是 D-型糖, L-型糖作为稀少糖具有更为优异的生理功效, 传统 L-型糖的制备方法依赖于提取或多步单糖转化反应, 合成效率低。笔者团队提出采用羟醛缩合方法重构手性中心合成 L-型糖的研究思路,

考虑到羟醛缩合反应 L-型受体醛稀有且不稳定,以 *C. glutamicum* 为出发菌,设计创建了以甘油为唯一底物合成 L-型稀少糖的新途径,通过优化磷酸二羟丙酮 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP) 供体合成模块、L-甘油醛受体合成模块,利用具有底物特异性的醛缩酶催化羟醛缩合反应,获得了合成 L-型稀少糖谷氨酸棒杆菌工程菌株;进一步结合丙糖磷酸异构酶的调控与发酵条件优化,高效合成了 L-果糖 (20.8 g/L) 和 L-塔格糖 (10.3 g/L) 等 4 种稀少糖^[31]。该研究中的合成稀少糖的模块化组装策略,对利用甘油生物合成高附加值化合物具有重要借鉴意义。除此之外,该研究团队在转化 C1 原料合成 L-山梨糖和 L-赤藓酮糖等方面取得突破,尤其是建立了全细胞催化合成赤藓酮糖转化工艺路线,底物耐受性达 3 mol/L,赤藓酮糖产率达 126 g/(L·h) (表 1),是目前报道的最高水平^[32]。

除了 L-稀少糖,该团队采用类似的思路还构建微生物细胞工厂成功合成了支链酮糖 (dendroketo),该化合物也属于稀少糖的一种,经化学脱水反应可高效制备 4-羟甲基糠醛 (4-hydroxymethylfurfural formaldehyde, 4-HMF),应用于制备重要医药中间体斑蝥素,合成 2,4-二甲基呋喃 (2,4-dimethylfuran, 2,4-DMF) 以及 C9-C15 支链烷烃等液体燃料。该团队发现来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 L-鼠李树胶糖-1-磷酸醛缩酶 (L-rhamnulose-1-phosphate aldolase) 具有催化酮与酮之间羟醛缩合的功能,随后针对该酶的新功能进行分子动力学模拟和解析,揭示了该酶催化机制;构建了体外多酶级联催化体系,实现转化利用甲醛制备支链酮糖,其转化率达到 86%;同时,以谷氨酸棒杆菌为出发菌株,构建细胞工厂,利用葡萄糖或者甘油合成支链酮糖的产量达到 36.3 g/L

(表 1)^[33],促进了 C1、C3 和 C6 等廉价资源在精细化学品和能源化合物绿色生物制造领域的应用。

1.2.2 N-乙酰葡萄糖胺及唾液酸

乙酰氨基葡萄糖 (acetylglucosamine, GlcNAc) 已广泛应用于医药、食品、化妆品等行业,微生物发酵法合成 N-乙酰葡萄糖胺是近年来通过合成生物学和代谢工程技术构建细胞工厂合成功能糖及其衍生物的一个典型案例。江南大学刘龙团队在该研究方面做了比较系统的研究工作,其细胞工厂构建过程包括合成途径中关键酶基因表达水平时空调控,葡萄糖转运和磷酸化激活,中心碳代谢以及多糖合成途径中代谢通量抑制,副产物合成途径失活,呼吸链调控及微生物形态调控等策略,成功在 *C. glutamicum* 中将 GlcNAc 产量提高至 117 g/L (表 1)^[34]。在此基础上,该团队还构建了唾液酸细胞工厂,构建了 3 条合成途径,分别为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖 2-异构酶和葡糖胺-6-磷酸 N-乙酰转移酶 1 (glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase, Gna1) 组成的 AGE 途径; Gna1 和 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸 2-异构酶 (N-acetyl glucosamine-6-phosphate 2-isomerase, NanE) 组成的 NanE 途径;以及由 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖 2-表异构酶 (UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase, NeuC) 为核心的 NeuC 途径。进一步比较了上述 3 条路线的合成效率,并对路线进行了整合,获得了高产菌株,在 5 L 发酵罐中分批补料发酵,产量达到 30.1 g/L (表 1),是目前使用葡萄糖作为唯一碳源的最高产量^[35]。

1.2.3 人乳寡糖

人乳寡糖 (human milk oligosaccharides, HMO) 是存在于人乳中一类由 2-10 个单糖组成的寡糖,是人乳中第三大固体成分。HMO 作为益生元不会被婴儿胃肠道中的消化酶水解,

却可以促进肠道内的有益微生物的增殖,具有维持肠黏膜屏障和抵御病原微生物侵袭等功效。目前已经鉴定的人乳寡糖种类超过 200 余种,其中含量较高的包括 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-fucosyllactose, 2'-FL)、3'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖 (lacto-N-tetraose, LNT) 以及乳糖-N-新四糖 (lacto-N-neotetraose, LNnT)^[36]。近年来,江南大学沐万孟团队围绕发酵法合成上述 4 种人乳寡糖开展了大量研究。以 2'-FL 为例,目前,2'-FL 的合成改造策略主要围绕在以下方面,增加供体 GDP-岩藻糖的合成量,GDP-岩藻糖可以通过两种途径合成,即补救途径和从头合成途径。在补救途径中,使用具有 L-岩藻糖激酶和 GDP-岩藻糖焦磷酸化酶的双功能酶,实现将岩藻糖转化为 GDP-岩藻糖,同时为了维持胞内 GDP-岩藻糖较高含量,敲除掉岩藻糖分解代谢途径;相比之下,从头合成途径更具优势,以廉价的葡萄糖为碳源,合成途径涉及 5 个基因,将胞内积累的果糖-6-磷酸 (fructose 6-phosphate, F6P) 转化为 GDP-岩藻糖。此外,通过过表达乳糖透过酶基因 *lacY* 强化细胞摄入乳糖的能力,敲除内源 β -半乳糖苷酶基因 *lacZ* 削弱宿主分解乳糖的代谢途径提高乳糖的利

用率;进一步表达来源于 *E. coli* 的糖外排转运蛋白 SetA 促进 2'-FL 向胞外分泌,进一步提高 2'-FL 的胞外比例,通过代谢调控和优化,该团队成功实现 2'-FL 生产浓度达到 79.2 g/L^[37]。除了 *E. coli*,酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、*C. glutamicum* 和 *B. subtilis* 均有作为底盘被开发合成 2'-FL 的报道,江南大学刘龙团队以 *B. subtilis* 为宿主菌,开发适用于 *B. subtilis* 温度敏感性调控元件调控 2'-FL 合成途径中关键基因表达水平,借助代谢通量限制,显著提升了 2'-FL 产量,目前产量达到 88.3 g/L (表 1)^[38]。

1.3 协同生物催化和微生物发酵构建杂合体系

生物催化技术和微生物发酵技术在功能糖制备方面各有优势和缺点,如何实现二者优势互补,构建杂合转化体系,制备高附加值化合物也是近年来关注的一个方向。孙媛媛团队结合体外多酶催化和微生物发酵优势,协同体内和体外催化转化体系,设计构建了一条“淀粉-甘露糖-甘露寡糖”生物转化合成的新技术路线^[39]。首先,设计了热力学驱动路线,体外实现转化淀粉合成甘露糖,其产量超过 75 g/L,转化率可达 81%。微生物合成复杂化合物如寡糖和多

表 1 部分产品的生产方式、菌株及产量汇总

Table 1 Summary of the strains, processes, and titers of several functional sugars

Process	Substrate	Product	Host strain	Titer (g/L)	References
Enzymatic transformation technology	Fructose	Allulose	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	150	[8]
	Sucrose	Raffinose/Stachyose	<i>Escherichia coli</i>	129/41	[21]
Microbial fermentation technology	Sucrose	Glycerol glucoside	<i>E. coli</i>	400	[25]
	Glucose	Erythritol	<i>Yarrowia lipolytica</i>	>200	[30]
	Glucose	L-fructose/L-tagatose	<i>C. glutamicum</i>	20.8/10.3	[31]
	Dihydroxyacetone, formaldehyde	Erythrulose	<i>E. coli</i>	250	[32]
	Glucose	Branched ketose	<i>C. glutamicum</i>	36.3	[33]
	Glucose	N-acetylglucosamine	<i>C. glutamicum</i>	117.0	[34]
	Glucose	Sialic acid	<i>Bacillus subtilis</i>	30.1	[35]
	Glucose	2'-FL	<i>E. coli</i>	79.2	[37]
Sucrose	2'-FL	<i>B. subtilis</i>	88.3	[38]	

糖, 需要依赖于体内的氧化系统和糖苷转移系统, 因此, 进一步在 *C. glutamicum* 中构建了基于甘露糖原料合成甘露寡糖和甘露糖甘油酸合成功能路线, 通过代谢工程改造提升了合成效率; 通过级联组合体外和体内系统, 首次实现转化淀粉低成本制备非天然甘露寡糖, 同时也为其他功能寡糖的制备提供借鉴。

2 微生物蛋白、辅配料的生物制造及其人造肉技术

微生物蛋白肉主要是采用发酵的方法来生产肉的主要原料: 蛋白质、色素、风味和胶黏剂物质, 并经过复配和成型等技术生产。天津工业生物所研究团队联合开发了微生物蛋白、呈色、呈味等细胞工厂, 并实现了微生物蛋白肉的规模化制造 (图 2)。针对以上进展, 分类介绍如下。

2.1 微生物蛋白

针对蛋白需求的日益增长和传统蛋白供给的不足, 急需构建一种新的蛋白供给模式以保障肉类食品的营养价值、安全性和可持续性。当前, 用于发酵生产微生物蛋白的主要工业菌种包括细菌、藻类、酵母和丝状真菌。常见的细菌包括乙醇梭菌、紫光合细菌和氢氧化细菌,

它们可以将二氧化碳等气体转化为蛋白^[40-41]。这类蛋白主要用于水产养殖, 目前在食品领域应用较少^[40]。藻类用于发酵生产微生物蛋白的消费历史悠久, 主要培养的种类有 7 种, 其中螺旋藻的生产应用最为成功, 是目前生产微藻蛋白的主要菌株。但是由于藻类生长速度慢、密度低等问题, 至今主要进行小规模蛋白生产^[42-43]。酵母菌生长速度快, 细胞密度大, 所需生产设备简单, 是生产微生物蛋白相对理想的菌株。然而, 低细胞壁消化率和高核酸含量在一定程度上制约了酵母发酵蛋白的进一步开发^[40]。镰刀菌 (*Fusarium*) 是得到广泛应用的发酵生产微生物蛋白的丝状真菌, 其生产的菌丝蛋白相比酵母、细菌等单细胞蛋白更加味美, 并且具有类似肉质的组织结构, 同时其含有的丰富可食性粗纤维有助于人肠胃消化, 是一种能够满足于现代人营养需求的肉类代用品^[44]。

威尼斯镰刀菌 A3/5 (*F. venenatum* A3/5) 是从 3 000 多株真菌中筛选到的可用于发酵生产菌丝蛋白的丝状真菌, 其最早由英国 ICI 和 Rank Hovis McDougall (RHM) 合资企业进行商业开发, 并于 1985 年被英国农业、渔业和食品部批准为菌丝蛋白 Quorn 作为食品出售^[45]。Quorn 的产品种类十分丰富, 包括整切肉类、

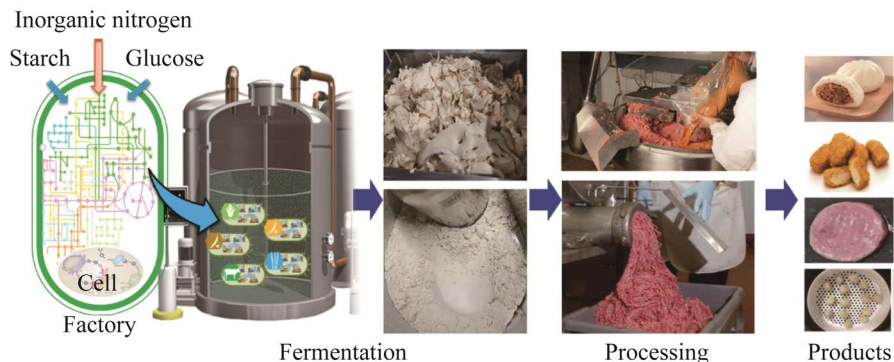


图 2 微生物蛋白肉的制造路线

Figure 2 Manufacturing of alternative meat made of microbial protein.

肉糜类、海鲜类等 79 种产品, 目前已在包括英国、美国、澳大利亚在内的全球 18 个国家或地区上市^[46]。当前, 除了老牌的 Quorn 外, Enough (原 3F Bio)、Mycorena、Nature's Fynd 等都在近两年获得了融资, 其研发产品迅速成为除了植物肉和细胞培养肉外另一个代替蛋白的绝佳选择^[46]。

为了获得具有自主知识产权的丝状真菌菌株, 天津工业生物所科研人员从天津市滨海新区小麦地的根际土壤中分离鉴定到一株高蛋白含量的菌株, 命名为威尼斯镰刀菌 TB01 (*F. venenatum* TB01), 并对该菌株完成了全基因组测序及序列组装。经过长期积累, 目前成功建立了菌丝蛋白连续发酵技术工艺, 实现了 10 批次的连续发酵; 基于氧传递系数相似和 pH 调控技术建立了吨级规模发酵技术工艺, 形成了高活力丝状真菌种子制备技术、高产蛋白培养基和发酵条件、高产蛋白连续发酵和菌丝收集技术、丝状真菌规模化放大技术。同时, 针对该菌株建立了高效的原生质体转化体系, 并挖掘了不同表达强度的内源启动子 P_{FvgpdA} 、 P_{FvglA} 及 P_{Fvtef} ^[47]。在此基础上, 通过筛选高效内源 Pol III 类启动子, 并结合 AMA1 复制子基础的 Cas9 表达载体来消除 Cas9 对菌株的毒性, 建立可以同时实现双基因编辑的高效 CRISPR/Cas9 编辑系统^[48]。这些体系的建立为后期分析改良该菌株奠定了基础。未来, 为了解决微生物蛋白存在的转化效率低、生产速率慢、成本高等问题, 将通过转录组、蛋白组和代谢组等组学技术, 解析蛋白、多糖和油脂代谢途径与代谢调控机理, 挖掘酶功能、底物转化与胞内总蛋白平衡之间的协调机制, 阐明微生物碳氮底物协同代谢的机理与调控机制; 通过基于高精度代谢网络模型的计算模拟与重构, 实现胞内的代谢流和能量流分布精确模拟, 挖掘蛋白合成过程中的关键

瓶颈代谢物、瓶颈反应; 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术实现对多个基因表达进行协同精准调控, 优化微生物合成物质流和能量流合理分配, 提升菌体蛋白的产量、转化率和生产强度, 设计构建高效转化碳水化合物的高产蛋白细胞工厂 (图 3)。

2.2 呈色物质

色香味形是人们评价食品感官质量的重要因素, 其中色泽能刺激消费者购买欲。原料肉中的色素蛋白质主要是肌红蛋白 (myoglobin, Mb) 和血红蛋白 (haemoglobin, Hb), 一般情况下肌红蛋白约占 70%–90%^[49]。人们很自然地就会想到可以通过添加富含血红素且结构稳定的血红蛋白来模拟真实肉制品的颜色。然而利用化学试剂萃取或酶解法从动物血液及植物组织中获取血红素及血红素蛋白的方法, 不仅耗时耗力、污染环境且产物纯度低, 无法大规模应用于人造肉制品的生产^[50]。为此, 国内外已经开展了针对血红素及血红素相关蛋白的生物合成研究。

在早期的研究中, 首先合成的是人血红蛋白。Natarajan 等利用大肠杆菌成功合成了具有生理功能的人源血红蛋白^[51]。Liu 等首次在酿酒酵母中通过血红素合成途径的强化来促进重组人血红蛋白的合成, 在过表达 HEM3 获得最高的卟啉水平的基础上, 通过平衡 α 及 β 珠蛋白基因的表达^[52], 获得的重组活性血红蛋白占提取的总可溶性蛋白的 4%; 在后续敲除 HAP1 转录因子后, 最终合成了占胞内可溶性总蛋白含量 7% 的人源血红蛋白^[53]。除了人源血红蛋白外, 美国 Impossible Foods 公司开发了一种商业巴斯德毕赤酵母菌株, 并为其申请了专利。Fraser 等^[54]将血红素途径相关基因置于甲醇诱导的 AOX1 启动子的调控下, 以供应大量的血红素辅因子, 并在毕赤酵母基因组内整合大豆

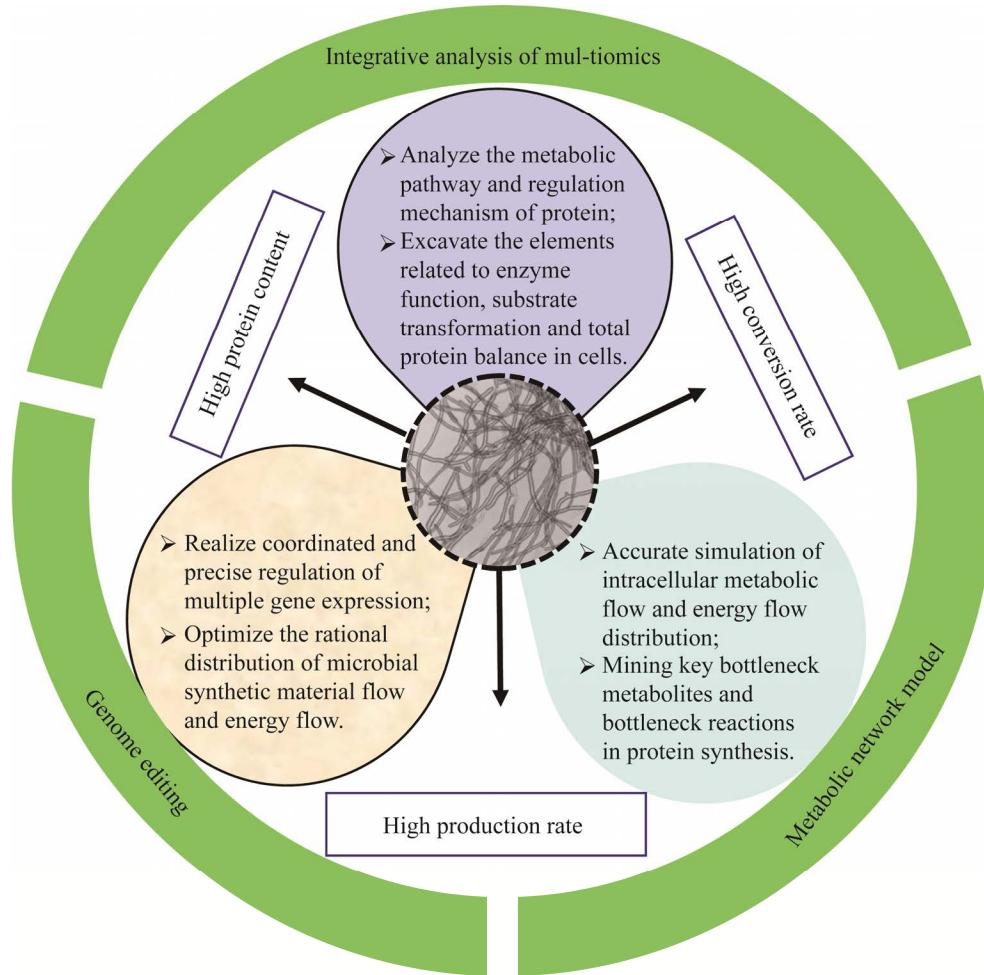


图3 微生物蛋白生物制造技术

Figure 3 Biomanufacturing technology of microbial protein.

血红蛋白 c2 基因, 通过高密度发酵成功表达了大豆血红蛋白, 该成分为 Impossible Burger 人造肉关键成分之一, 目前已进入商品化生产。

2.3 呈味物质

含硫氨基酸是在热处理过程中对食品风味影响较大的一类氨基酸, 它们单独存在时的热分解产物, 除了硫化氢、氨、乙醛、半胱氨酸等物质之外, 还会生成噻唑类、噻吩类及许多含硫化合物, 它们大多数是挥发性的强烈嗅感物质, 许多是熟肉香气重要组分。主要包括 L-甲硫氨酸、胱氨酸和半胱氨酸。

目前, 甲硫氨酸主要通过化学合成的方法进行生产。随着能源和环境危机的日益严峻, 利用环境友好的微生物发酵法合成 L-甲硫氨酸的研究越来越受到关注。O-乙酰高丝氨酸 (acetyl high serine, OAH) 是 L-甲硫氨酸合成的重要前体, 能够在乙酰高丝氨酸硫解酶的作用下直接与甲硫醇反应生成 L-甲硫氨酸。在该工艺中, 通过发酵法合成 OAH 是制约 L-甲硫氨酸生产和降低成本的关键因素之一。天津工业生物所刘君与江会锋两个团队合作, 通过结合代谢工程和蛋白质工程的方法, 系统地改造大

肠杆菌, 实现了 OAH 的高效合成。在研究中, 首先比较了两种不同来源的高丝氨酸乙酰转移酶 MetX, 然后通过敲除竞争和消耗途径基因 (*metA*、*metB* 和 *thrB*) 并过表达合成途径基因 (*thrA*、*metxlm*), 实现了 OAH 的积累, 其产量达到 1.68 g/L。为了进一步提高 OAH 的生产, 该研究采用多种代谢工程策略对工程菌株进行进一步改造, 包括: 敲除赖氨酸竞争途径基因 *lysA*; 利用启动子工程调控 *ppc* 表达以增强草酰乙酸的供给; 比较不同来源的天冬氨酸激酶, 促进前体天冬氨酸的合成等, 使 OAH 的产量提高至 4.69 g/L。然而, 中间代谢产物高丝氨酸的大量积累说明其下游途径关键酶高丝氨酸乙酰转移酶 MetXlm 的催化能力是不足的。为了解决这一问题, 该研究分别采用基于进化保守性和基于结构信息的蛋白质工程策略对 MetXlm 进行改造, 获得的突变体酶活比野生型提高了 12.15 倍并受到更少的反馈抑制。通过优化表达 MetXlm 突变体, 使工程菌株 OAH 产量达到 7.37 g/L。随后该研究通过过表达胞内乙酰 CoA 合成途径, 调控胞内 NADPH 的合成, 进一步提高 OAH 的合成能力。最终获得的工程菌株 OAH-7 在 7.5 L 发酵罐中经 60 h 发酵能够生产 62.7 g/L 的 OAH^[55]。

由于 L-半胱氨酸复杂的代谢途径和严谨的调控作用, 通过微生物发酵法生产 L-半胱氨酸的产量和得率较低, 无法满足工业化生产需求。刘君团队以谷氨酸棒杆菌为宿主细胞, 探究了 L-半胱氨酸合成瓶颈, 构建了高效的 L-半胱氨酸合成细胞工厂。该研究首先通过敲除半胱氨酸脱巯基酶和过表达自身的丝氨酸乙酰转移酶 (serine acetyltransferase, CysE), 实现了 L-半胱氨酸的积累。然后通过多种代谢工程策略进一步提高 L-半胱氨酸的合成, 包括增强关键酶 CysE 的表达强度; 比较多个异源的 CysE, 寻

找最优的候选者; 过表达 L-半胱氨酸合成酶增强合成通量; 比较多个异源的转运蛋白, 增强 L-半胱氨酸的转运能力以及提高前体丝氨酸的供给等策略。最终获得的工程菌株 CYS-19 能够积累 (947.9±46.5) mg/L L-半胱氨酸, 是目前报道的利用谷氨酸棒杆菌生产 L-半胱氨酸的最高水平^[56]。

2.4 质构改造关键酶

人造肉在复配出来后的初始状态为肉糜状, 肉质疏松, 口感不佳。谷氨酰胺转氨酶 (glutamine aminotransferase, TGase) 能够催化蛋白质中谷氨酰胺残基的 γ -酰胺基和赖氨酸的 ϵ -氨基之间进行酰胺基转移反应, 形成 ϵ -(γ -谷酰胺)-赖氨酸的异型肽键, 从而将小块肉类结合成大块, 形成肉类的致密结构, 提高人造肉的质构像真度。茂源链霉菌 (*Streptomyces mobaraensis*) TGase 是最早商业化的 TGase^[57-58]。随后, 大量的研究报道了在新菌种筛选^[59]、发酵优化、异源表达、酶的改性^[60-61]和应用^[62]等方面研究进展。目前报道的表达系统主要有链霉菌属^[63]、芽孢杆菌属^[64]、肠杆菌属^[65]、放线菌属和酿酒酵母^[66]等。江南大学未来食品科学中心刘松团队开展了一系列工作。为构建高效的 TGase 分子改造平台, 通过 N-端融合吸水链霉菌 TGase 酶原区、共表达活化蛋白酶和分子伴侣 (DnaK、DnaJ 和 GrpE)、分泌信号肽理性设计及细胞壁脂蛋白缺失, 首次实现了活性 TGase 在大肠杆菌中高效分泌表达 (1.99 U/mL)^[65]。基于该表达系统, 开发和应用了一系列酶理性改造方法, 使 *S. mobaraensis* TGase 热稳定性和催化活性得到显著提升^[67]。为提高 TGase 发酵水平, 构建了 *S. mobaraensis* 的高通量诱变选育策略, 并首次实现了对该菌株的基因编辑, 增加了酶基因的拷贝^[68], 得到了重组菌株 smY2019-3C, TGase 的产量进一步提高 103%, 产量达到 40 U/mL。

目前,该团队已经开发了基于 CRISPR-Cas 的 *S. mobaraensis* 基因编辑方法,并将多个耐热 TGase 基因整合表达于 *S. mobaraensis*,使该酶的发酵产量和应用性能均得到显著提升。

2.5 人造肉的复配与加工

目前,常见的人造肉的生产方法主要是挤压法和纺丝法。挤压法是蛋白经挤压、膨化等工序,加上各类食品添加剂来加工制造人造肉的方法。纺丝法是先将蛋白纺成类似于天然肉类质地、口感的肌肉纤维,后经过热合加工成类肉组织。

对蛋白基料、风味油脂与色素的混合定型加工是非常重要的 人造肉制造环节。其中,肉类纤维高仿真模拟直接决定着人造肉产品咀嚼口感,是备受 关注的人造肉定型加工工艺。高水分物料受到挤压定向流动经过设备模头时,会在高温、高压与高剪切等作用下发生质构重组,形成纤维组织化程度高、富有弹性和韧性、能够直接食用的模拟肉制品。因此,高水分挤压技术被认为是最具工业可行性的人造肉生产工艺^[69](图 4)。除 Beyond Meat 等国外品牌

外,以天津美康食品有限公司为代表的中国本土企业也陆续引入了高水分挤压技术及相关设备进行人造肉生产。

通过合成生物学技术生产的改性修饰食品用酶,可以助力成型技术与新型原料研发,推动高仿真质构的人造肉开发。不仅如此,食品用酶还可以提高人造肉的风味与食用安全性。转谷氨酰胺酶可以催化蛋白质谷氨酰胺残基侧链和赖氨酸残基侧链之间形成异肽键,其在高水分挤压工艺中的适量添加,会降低蛋白的 α -螺旋含量,增加 β -折叠含量,促进蛋白质分子伸展、聚集和交联,同时调节蛋白分子间的疏水作用、氢键和二硫键,提高蛋白凝胶三维结构的稳定性^[70]。如转谷氨酰胺酶催化豌豆蛋白果胶交联形成的扇贝类似物,硬度、弹性与咀嚼感与真实扇贝没有差别,微观结构也具有一定的相似性^[71]。

交叉领域创新技术 3D 食品打印将与人造肉制造技术相结合,在满足消费者对形状和营养的个性化需求方面具有巨大潜力^[72]。然而,3D 食品打印面临的难点问题是大 多数食品材料在打印后仍处于流动状态,在后续加工过程

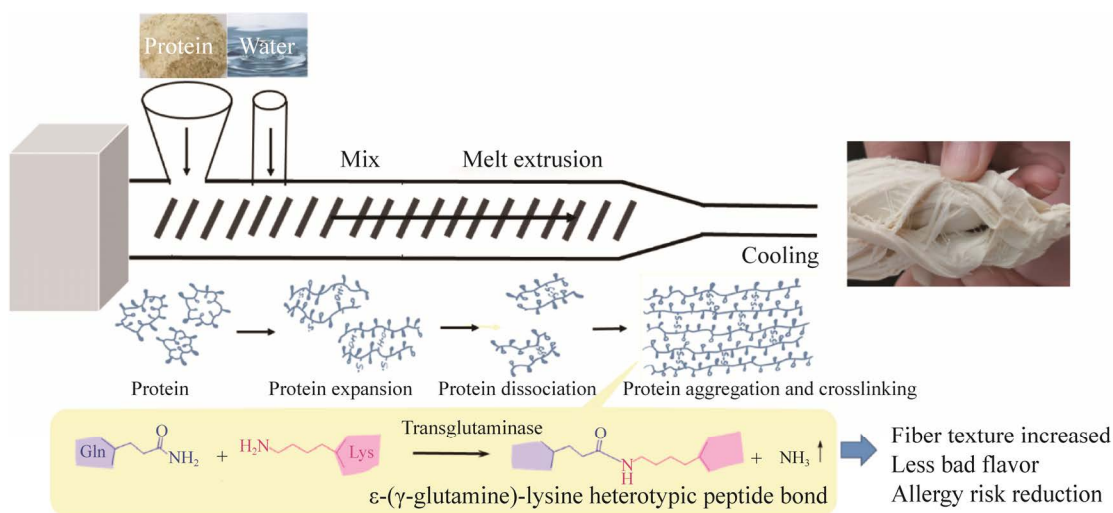


图 4 人造肉挤压工艺

Figure 4 Extrusion technology of alternative meat.

中会发生变形。转谷氨酰胺酶在人造肉 3D 打印加工中的应用,有利于具有一定强度的人造肉粘弹性系统形成,提高人造肉形状保真度和稳定性^[73]。漆酶可以通过单电子去除机制氧化苯酚官能团结构产生自由基,促使含有阿魏酸的果胶类黏合剂与含有酪氨酸的蛋白质进行自由基交联,形成结构性能更佳的多糖-蛋白凝胶网络。如使用甜菜果胶替代传统的人造肉黏合剂羧甲基纤维素,在漆酶作用下加工的人造汉堡肉饼成型性与黏合性能显著增加,持水/持油能力和胃肠道消化率有明显提高^[74]。如磷脂酶处理可以促使人造肉重要原料大豆分离蛋白中的异味物质前体磷脂含量明显降低^[75]。在高水分挤压与转谷氨酰胺酶联合的交联剪切作用下,人造植物蛋白肉原料豌豆蛋白的二级和三级结构发生显著改变,导致过敏原减少^[76]。

3 展望

未来食品的生物制造技术及其产品的迅猛发展,既可以有效解决持续增长的人口对食物的需求,又可以满足人类对高端营养和美好生活水平的追求,将会支撑形成绿色、低碳的新兴未来食品产业,引发传统生产模式的深刻变革,是人类文明可持续发展的重要保障,是新兴生物经济的重大战略发展方向。

尽管生物催化和微生物发酵技术在功能糖制备方面取得了较好的研究进展,但是仍有很多方面有待提升。首先,目前表征的很多酶催化剂,其催化效率、稳定性、耐受性等性能尚未达到工业化生产需求,迫切需要结合酶分子改造技术或者数据库挖矿技术获得适应大规模生产需求的工业酶制剂;其次,当前大部分研究聚焦酶催化性能本身,如何实现酶的高效制备,依然是制约生物催化转化的关键因素,迫切需要开发具有自主知识产权、高效、通用型

的酶表达系统,并开发高效的酶制备和固定化工艺;再次,与生物转化技术相比,微生物发酵技术具有制备复杂功能寡糖和多糖易放大生产优势,然而受限于对微生物代谢系统认知和代谢调控技术,生产效率和产物种类偏少,随着基因编辑等技术发展,调控元件可以更加广泛地动态调控细胞代谢,从而实现产物合成和细胞生长代谢适配。

美国和欧盟等发达国家已投入数亿美元资金用于支持微生物蛋白肉产业的研发。在产业推进方面,美国阔恩公司所开发的微生物蛋白肉产品已经在美国、英国等全球 18 个国家获得上市许可,仅英国一个分公司 2021 年的销售额即达到 2.254 亿美元。此外,ENOUGH、Mycorena、Nature's Fynd、Perfect day 等国外初创公司也在加速开发不同的微生物蛋白肉产品,部分产品已经上市。世界范围内微生物蛋白肉相关企业在 2019–2021 年的融资额呈线性增长,从 2019 年的 2.81 亿美元发展到了 2021 年的 9.85 亿美元,总融资额达到了 18.53 亿美元。而目前我国在微生物蛋白肉技术研究方面刚刚起步,相关细胞工厂及其蛋白肉的生产技术极度缺乏,已被国外形成包夹之势。因此,我国急需加快在微生物蛋白肉方面的布局,抢占战略制高点,解决我国的燃眉之急。未来,应重点发展设计、构建和选育高效微生物细胞工厂,重构物质流再分配,创新碳氮代谢与微生物蛋白合成技术路线和微生物蛋白肉智能化复配与成形等关键技术。

此外,针对生物制造未来食品产品,制定科学合理的市场准入、安全评价和规范化管理的政策法规,加快推动合成生物技术成果的产业化应用,已经成为我国生物制造产业发展、保障生物产业链安全、参与国际市场竞争的重要课题^[77]。

REFERENCES

- [1] Malik VS, Hu FB. The role of sugar-sweetened beverages in the global epidemics of obesity and chronic diseases. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18(4): 205-218.
- [2] GBD 2015 Obesity Collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med*, 2017, 377(1): 13-27.
- [3] Rasool S, Geetha T, Broderick TL, et al. High fat with high sucrose diet leads to obesity and induces myodegeneration. *Front Physiol*, 2018, 9: 1054.
- [4] Rippe JM, Angelopoulos TJ. Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know? *Adv Nutr*, 2013, 4(2): 236-245.
- [5] 柏玮, 朱玥明, 门燕, 等. 以 D-果糖为原料利用新型异构酶转化生产 D-阿洛糖. *生物工程学报*, 2012, 28(4): 457-465.
- Bai W, Zhu YM, Men Y, et al., Bioconversion of D-fructose to D-allose by novel isomerases. *Chin J Biotech*, 2012, 28(4): 457-465 (in Chinese).
- [6] Men Y, Zhu YM, Zhang LL, et al. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: cloning, overexpression and characterization of L-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. *Microbiol Res*, 2014, 169(2/3): 171-178.
- [7] Zhu YM, Men Y, Bai W, et al. Overexpression of D-psicose 3-epimerase from *Ruminococcus* sp. in *Escherichia coli* and its potential application in D-psicose production. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(10): 1901-1906.
- [8] Yang JG, Tian CY, Zhang T, et al. Development of food-grade expression system for D-allulose 3-epimerase preparation with tandem isoenzyme genes in *Corynebacterium glutamicum* and its application in conversion of cane molasses to D-allulose. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(4): 745-756.
- [9] Yang JG, Zhang T, Tian CY, et al. Multi-enzyme systems and recombinant cells for synthesis of valuable saccharides: advances and perspectives. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(7): 107406.
- [10] Tian CY, Yang JG, Liu C, et al. Engineering substrate specificity of HAD phosphatases and multienzyme systems development for the thermodynamic-driven manufacturing sugars. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3582.
- [11] Li YJ, Shi T, Han PP, et al. Thermodynamics-driven production of value-added D-allulose from inexpensive starch by an *in vitro* enzymatic synthetic biosystem. *ACS Catalysis*, 2021, 11(9): 5088-5099.
- [12] You C, Shi T, Li YJ, et al. An *in vitro* synthetic biology platform for the industrial biomanufacturing of myo-inositol from starch. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(8): 1855-1864.
- [13] Yang JG, Zhu YM, Li JT, et al. Biosynthesis of rare ketoses through constructing a recombination pathway in an engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(1): 168-180.
- [14] Yang JG, Li JT, Men Y, et al. Biosynthesis of L-sorbose and L-psicose based on C-C bond formation catalyzed by aldolases in an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(13): 4284-4294.
- [15] Li JT, Yang JG, Men Y, et al. Biosynthesis of 2-deoxysugars using whole-cell catalyst expressing 2-deoxy-d-ribose 5-phosphate aldolase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(19): 7963-7972.
- [16] 孙媛霞, 杨建刚, 田朝玉, 等. 功能寡糖绿色生物合成技术的研究进展. *生物产业技术*, 2019(4): 26-33.
- Sun YX, Yang JG, Tian CY, et al. Recent advance in biosynthesis of functional oligosaccharides. *Biotechnol Bus*, 2019(4): 26-33 (in Chinese).
- [17] Zhu Y, Chen P, Bao Y, et al. Complete genome sequence and transcriptomic analysis of a novel marine strain *Bacillus weihaiensis* reveals the mechanism of brown algae degradation. *Sci Reports*, 2016, 6(1): 38248.
- [18] Chen P, Zhu YM, Men Y, et al. Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Bacillus* sp. Alg07. *Mar Drugs*, 2018, 16(3): 86.
- [19] Yan JJ, Chen P, Zeng Y, et al. The characterization and modification of a novel bifunctional and robust alginate lyase derived from *Marinimicrobium* sp. H1. *Mar Drugs*, 2019, 17(10): 545.
- [20] Yan JJ, Chen P, Zeng Y, et al. Production of neoagarobiose from agar through a dual-enzyme and two-stage hydrolysis strategy. *Int J Biol Macromol*, 2020, 160: 288-295.
- [21] Tian CY, Yang JG, Zeng Y, et al. Biosynthesis of raffinose and stachyose from sucrose via an *in vitro* multienzyme system. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(2): e02306-e02318.
- [22] Sun SS, Wei XL, Zhou XG, et al. Construction of an artificial *in vitro* synthetic enzymatic platform for

- upgrading low-cost starch to value-added disaccharides. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(1): 302-314.
- [23] Schwaiger KN, Cserjan-Puschmann M, Striedner G, et al. Whole cell-based catalyst for enzymatic production of the osmolyte 2-O- α -glucosylglycerol. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 79.
- [24] Kruschitz A, Nidetzky B. Reactive extraction of fructose for efficient separation of sucrose-derived glucosides produced by enzymatic glycosylation. *Green Chem*, 2020, 22(15): 4985-4994.
- [25] Zhang T, Yang JG, Tian CY, et al. High-yield biosynthesis of glucosylglycerol through coupling phosphorolysis and transglycosylation reactions. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(51): 15249-15256.
- [26] Tian YQ, Xu W, Zhang WL, et al. Amylosucrase as a transglucosylation tool: from molecular features to bioengineering applications. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(5): 1540-1552.
- [27] Qi P, You C, Zhang YHP. One-pot enzymatic conversion of sucrose to synthetic amylose by using enzyme cascades. *ACS Catal*, 2014, 4(5): 1311-1317.
- [28] Zhang XW, Leemhuis H, Van Der Maarel MJEC. Synthesis of highly branched α -glucans with different structures using GH13 and GH57 glycogen branching enzymes. *Carbohydr Polym*, 2019, 216: 231-237.
- [29] Zhang XW, Leemhuis H, Van Der Maarel MJEC. Digestion kinetics of low, intermediate and highly branched maltodextrins produced from gelatinized starches with various microbial glycogen branching enzymes. *Carbohydr Polym*, 2020, 247: 116729.
- [30] Qiu XL, Gu Y, Du GC, et al. Conferring thermotolerant phenotype to wild-type *Yarrowia lipolytica* improves cell growth and erythritol production. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(8): 3117-3127.
- [31] Yang JG, Zhu YM, Men Y, et al. Pathway construction in *Corynebacterium glutamicum* and strain engineering to produce rare sugars from glycerol. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(50): 9497-9505.
- [32] Yang JG, Sun SS, Men Y, et al. Transformation of formaldehyde into functional sugars *via* multi-enzyme stepwise cascade catalysis. *Catal Sci Technol*, 2017, 7(16): 3459-3463.
- [33] Yang JG, Zhu YM, Qu G, et al. Biosynthesis of dendroketose from different carbon sources using *in vitro* and *in vivo* metabolic engineering strategies. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 290.
- [34] Deng C, Lv XQ, Li JH, et al. Synergistic improvement of N-acetylglucosamine production by engineering transcription factors and balancing redox cofactors. *Metab Eng*, 2021, 67: 330-346.
- [35] Zhang XL, Wang CY, Lv XQ, et al. Engineering of synthetic multiplexed pathways for high-level N-acetylneuraminic acid bioproduction. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(49): 14868-14877.
- [36] Bych K, Mikš MH, Johanson T, et al. Production of HMOs using microbial hosts—from cell engineering to large scale production. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 56: 130-137.
- [37] Wan L, Zhu YY, Chen G, et al. Efficient production of 2'-fucosyllactose from L-fucose *via* self-assembling multienzyme complexes in engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(10): 2488-2498.
- [38] Yu WW, Jin K, Wu YK, et al. A pathway independent multi-modular ordered control system based on thermosensors and CRISPRi improves bioproduction in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(11): 6587-6600.
- [39] Tian CY, Yang JG, Li YJ, et al. Artificially designed routes for the conversion of starch to value-added mannosyl compounds through coupling *in vitro* and *in vivo* metabolic engineering strategies. *Metab Eng*, 2020, 61: 215-224.
- [40] 舒芹, 李凯凯, 全拓, 等. 微生物蛋白作为优质替代蛋白资源的应用研究. *未来食品科学*, 2022, 2: 96-106.
- Shu Q, Li KK, Quan T, et al. Application of microbial proteins as high-quality alternative protein resources. *Future Food Sci*, 2022, 2: 96-106 (in Chinese).
- [41] Ritala A, Häkkinen ST, Toivari M, et al. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2009.
- [42] De Vree JH, Bosma R, Wieggers R, et al. Turbidostat operation of outdoor pilot-scale photobioreactors. *Algal Res*, 2016, 18: 198-208.
- [43] Pereira H, Páramo J, Silva J, et al. Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta) for CO₂ mitigation: from an agar plate to 100-m³ industrial photobioreactors. *Sci Reports*, 2018, 8: 5112.
- [44] 邢来君, 周与良. 真菌蛋白. *微生物学通报*, 1991, 18(3): 183-186, 159.
- Xing LJ, Zhou YL. Fungi protein. *Microbiol China*, 1991, 18(3): 183-186, 159 (in Chinese).
- [45] Ahmad MI, Farooq S, Alhamoud Y, et al. A review on mycoprotein: history, nutritional composition, production methods, and health benefits. *Trends Food*

- Sci Technol, 2022, 121(1): 14-29.
- [46] 谷孚. 新蛋白发酵行业报告: 发酵技术驱动中国未来食品发展. 2022.
Gu Fu. New protein fermentation industry report: fermentation technology drives China's future food development. 2022 (in Chinese).
- [47] Tong S, An KX, Zhou WY, et al. Establishment of high-efficiency screening system for gene deletion in *Fusarium venenatum* TB01. J Fungi, 2022, 8(2): 169.
- [48] Tong S, An KX, Chen WX, et al. Evasion of Cas9 toxicity to develop an efficient genome editing system and its application to increase ethanol yield in *Fusarium venenatum* TB01. Appl Microbiol Biotechnol, 2022.
- [49] 李秋燕, 朱文学. 食品添加剂在改善肉制品色泽中的应用. 肉类工业, 2009(1): 44-46.
Li QY, Zhu WX. Application of additive in improving color of meat products. Meat Ind, 2009(1): 44-46 (in Chinese).
- [50] 赵鑫锐, 张国强, 李雪良, 等. 人造肉大规模生产的商品化技术. 食品与发酵工业, 2019, 45(11): 248-253.
Zhao XR, Zhang GQ, Li XL, et al. Commercial production of artificial meat. Food Ferment Ind, 2019, 45(11): 248-253 (in Chinese).
- [51] Natarajan C, Jiang XB, Fago A, et al. Expression and purification of recombinant hemoglobin in *Escherichia coli*. PLoS One, 2011, 6(5): e20176.
- [52] Liu LF, Martinez JL, Liu ZH, et al. Balanced globin protein expression and heme biosynthesis improve production of human hemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng, 2014, 21: 9-16.
- [53] Martínez JL, Liu LF, Petranovic D, et al. Engineering the oxygen sensing regulation results in an enhanced recombinant human hemoglobin production by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng, 2015, 112(1): 181-188.
- [54] Fraser R, Brown, PO, Karr J, et al. Methods and compositions for affecting the flavor and aroma profile of consumables: US, 15/398479. 2017-01-04.
- [55] Wei L, Wang Q, Xu N, et al. Combining protein and metabolic engineering strategies for high-level production of O-acetylhomoserine in *Escherichia coli*. ACS Synth Biol, 2019, 8(5): 1153-1167.
- [56] Wei L, Wang H, Xu N, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-cysteine production. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(3): 1325-1338.
- [57] Ceresino EB, De Melo RR, Kuktaitė R, et al. Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. Food Chem, 2018, 241: 403-410.
- [58] Fuchsbauer HL. Approaching transglutaminase from *Streptomyces* bacteria over three decades. FEBS J, 2022, 289(16): 4680-4703.
- [59] Huang YM, Jin MF, Yan WJ, et al. A point mutant in the promoter of transglutaminase gene dramatically increased yield of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* TX1. Process Biochem, 2022, 112: 92-97.
- [60] 杜建辉, 刘松, 陆信曜, 等. 构建分子内二硫键提升谷氨酰胺转氨酶热稳定性. 食品与发酵工业, 2021, 47(15): 1-8.
Du JH, Liu S, Lu XY, et al. Improving thermostability of transglutaminase by introducing intramolecular disulfide bonds. Food Ferment Ind, 2021, 47(15): 1-8 (in Chinese).
- [61] Suzuki M, Date M, Kashiwagi T, et al. Rational design of a disulfide bridge increases the thermostability of microbial transglutaminase. Appl Microbiol Biotechnol, 2022, 106(12): 4553-4562.
- [62] Moreno HM, Pedrosa MM, Tovar CA, et al. Effect of microbial transglutaminase on the production of fish myofibrillar and vegetable protein-based products. Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology. Amsterdam: Elsevier, 2022: 427-436.
- [63] Fatima SW, Khare SK. Effect of key regulators in augmenting transcriptional expression of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis*. Bioresour Technol, 2021, 340: 125627.
- [64] Wang HB, Ji Y, Yuan ZT, et al. Insights into the mechanism on the high-temperature activity of transglutaminase from *Bacillus clausii* and its crosslinked mode at protein level. Biochem Eng J, 2022, 185: 108544.
- [65] Wang XL, Zhao BC, Du JH, et al. Active secretion of a thermostable transglutaminase variant in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact, 2022, 21(1): 74.
- [66] Hirono-Hara Y, Yui M, Hara KY. Active transglutaminase production from synthetic whey using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour Technol Rep, 2022, 19: 101154.
- [67] Wang XL, Du JH, Zhao BC, et al. Significantly improving the thermostability and catalytic efficiency of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase

- through combined rational design. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(50): 15268-15278.
- [68] Yin XQ, Li YY, Zhou JW, et al. Enhanced production of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis* through random mutagenesis and site-directed genetic modification. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(10): 3144-3153.
- [69] Zhang ZY, Zhang LJ, He SD, et al. High-moisture extrusion technology application in the processing of textured plant protein meat analogues: a review. *Food Rev Int*, 2022, DOI: 10.1080/87559129.201.2024223.
- [70] Zhang JC, Chen QL, Liu L, et al. High-moisture extrusion process of transglutaminase-modified peanut protein: effect of transglutaminase on the mechanics of the process forming a fibrous structure. *Food Hydrocoll*, 2021, 112: 106346.
- [71] Zhang ZY, Kobata K, Pham H, et al. Production of plant-based seafood: scallop analogs formed by enzymatic gelation of pea protein-pectin mixtures. *Foods*, 2022, 11(6): 851.
- [72] Ramachandraiah K. Potential development of sustainable 3D-printed meat analogues: a review. *Sustainability*, 2021, 13(2): 938.
- [73] Yu NN, Yang F, Gong H, et al. Gel & three-dimensional printing properties of sheep plasma protein-surimi induced by transglutaminase. *J Food Eng*, 2022, 323: 111006.
- [74] Sakai K, Sato Y, Okada M, et al. Improved functional properties of meat analogs by laccase catalyzed protein and pectin crosslinks. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 16631.
- [75] Zhu D, Damodaran S. Removal of off-flavour-causing precursors in soy protein by concurrent treatment with phospholipase A2 and cyclodextrins. *Food Chem*, 2018, 264: 319-325.
- [76] Faisal S, Zhang JC, Meng S, et al. Effect of high-moisture extrusion and addition of transglutaminase on major peanut allergens content extracted by three step sequential method. *Food Chem*, 2022, 385: 132569.
- [77] 李德茂, 曾艳, 周桔, 等. 生物制造食品原料市场准入政策比较及对我国的建议. *中国科学院院刊*, 2020, 35(8): 1041-1052.
- Li DM, Zeng Y, Zhou J, et al. Comparison of market access policies for foods and its raw materials made from biomanufacturing and suggestions for China. *Bull Chin Acad Sci*, 2020, 35(8): 1041-1052 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)