科学通报 2026 年 第 71 卷 第 31 期: 7118 ~ 7129
香山科学会议专栏 评 述
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS
第Y10次学术讨论会·单细胞蛋白生物制造战略需求与技术挑战

酶定向进化技术在单细胞蛋白生产中的研究进展

张颜伊[1,2], 汪路杰[1,2], 程峰[1,2*], 薛亚平[1,2]

1. 浙江工业大学浙江省生物有机合成重点实验室, 杭州 310014
2. 绿色化学合成与转化技术全国重点实验室, 湖州 313200
* 联系人, E-mail: fengcheng@zjut.edu.cn

2025-04-06 收稿, 2025-07-10 修回, 2025-08-08 接受, 2025-08-08 网络版发表
国家自然科学基金(22222811)和浙江省属高校基本科研业务费项目(RF-C)资助

摘要 单细胞蛋白(single cell protein, SCP)作为一种环境友好型替代蛋白, 具有蛋白质含量高、用途广泛等优势, 但生物制造SCP过程中仍面临底物转化效率低、关键代谢酶稳定性差及SCP营养组成失衡等瓶颈. 酶定向进化技术通过迭代创新, 形成了以结构/序列理性设计、机器学习辅助和自动化高通量筛选为核心的第二代方法, 显著提升了SCP生产关键酶的改造效率. 本文系统总结了第二代定向进化方法和策略, 并着重介绍了该技术在SCP生产中的突破性应用. 特别在提升底物转化效率方面, 通过对木聚糖酶和光合碳固定酶等合成酶的改造, 有效提升了木质纤维素及一碳化合物的转化率; 在保障生物制造过程稳定性方面, 增强脂肪酶和蛋白酶的热稳定性与pH耐受性; 同时, 针对营养组成平衡, 优化氨基酸合成酶活性是关键策略; 在改善终端产品性能上, 改造脂肪酶使SCP饲料的脂肪水解率提高50%, 显著提升了其作为饲料添加剂的价值. 展望未来, 人工智能、合成生物学与绿色制造的深度融合, 将有力推动SCP的生产形成智能化、绿色化的先进制造模式.

关键词 定向进化, 单细胞蛋白, 机器学习, 可持续蛋白资源, 生物制造

全球人口增长与食品需求激增, 推动了对可持续蛋白质来源的迫切需求(图1). 单细胞蛋白(single cell protein, SCP)凭借其环境友好性(如低土地占用、碳减排)和高效生物转化能力(以细菌、真菌、微藻为生产菌), 成为替代传统动物蛋白的关键解决方案. 然而, SCP从实验室迈向工业化生产仍面临三重技术瓶颈: (1) 底物转化效率低下, 微生物在高浓度木质纤维素/C1气体(如CO_2、甲醇)条件下代谢受限; (2) 关键代谢酶的工业适配性不强, 目标酶的热/pH敏感性导致发酵稳定性差, 产物回收率低[1]; (3) SCP的营养组成失衡, 天然菌株蛋白质中必需氨基酸(如赖氨酸、蛋氨酸)含量不足.

为突破上述瓶颈, 酶定向进化技术通过迭代创新, 已从随机诱变演进为第二代智能策略: 融合结构/序列理性设计(如combined active-site saturation test, CAST-ing)、机器学习辅助预测(如evolutionary scale modeling-2, ESM-2)与自动化高通量筛选(如微流控平台), 显著提升酶工程效率(如KnowVolution可以将筛选规模压缩至<2000克隆)[2].

本综述将系统解构该技术在SCP生产中的全链条应用. 首先剖析SCP生产菌株(细菌/真菌/微藻)的酶应用瓶颈与进化需求; 进而阐述第二代定向进化策略的设计原理与技术优势; 重点论证其在提升底物转化率、增强酶鲁棒性、优化营养品质及饲料性能中的突

引用格式: 张颜伊, 汪路杰, 程峰, 等. 酶定向进化技术在单细胞蛋白生产中的研究进展. 科学通报, 2026, 71: 7118–7129
Zhang Y-Y, Wang L-J, Cheng F, et al. Recent advances in directed evolution for single cell protein production (in Chinese). Chin Sci Bull, 2026, 71: 7118–7129, doi: 10.1360/CSB-2025-0443

© 2025《中国科学》杂志社

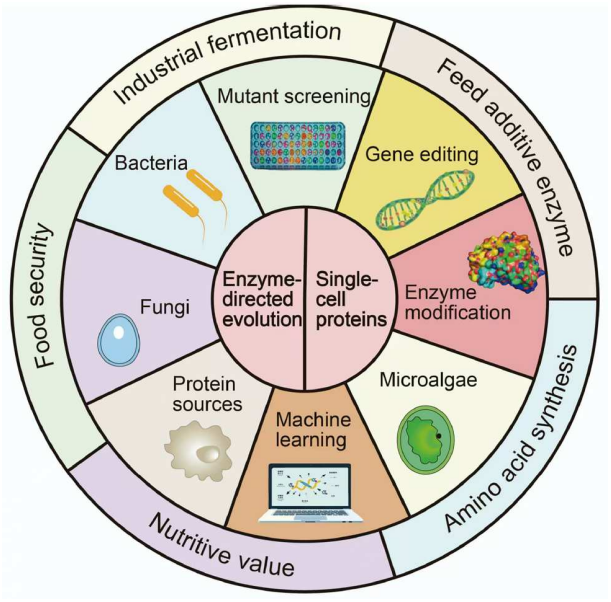


图 1 (网络版彩色)定向进化技术驱动单细胞蛋白生产. 本图概括SCP工业化生产的多维支撑体系. 第一, 基础要素(底层): 工业发酵平台、微生物资源(细菌/真菌/微藻); 第二, 核心目标(中层): 保障食品安全、开发新型蛋白源; 第三, 技术赋能(顶层): 机器学习优化酶设计、化学合成生物学强化细胞工厂(部分元素使用BioRender.com绘制)

Figure 1 (Color online) Directed evolution-driven single-cell protein roduction. This diagram summarizes the multidimensional support system for industrial-scale SCP production. Layer 1 (foundational elements): industrial fermentation platforms and microbial resources (bacteria/fungi/microalgae); Layer 2 (Core objectives): ensuring food security and developing novel protein sources; Layer 3 (Technological empowerment): machine learning-optimized enzyme design and chemical synthetic biology-enhanced cell factories (Elements sourced from BioRender.com)

破性案例; 最后展望人工智能驱动、绿色制造赋能的SCP智能生产范式. 通过上述框架, 旨在为SCP工业化提供可复制的酶工程解决方案, 推动可持续蛋白供应链变革.

1 单细胞蛋白: 菌种 生产和挑战

1.1 单细胞蛋白概述

SCP是指利用细菌、真菌、酵母和微藻等单细胞微生物, 通过发酵工农业废弃物(如木质纤维素)、城市生活垃圾、石油化工副产物或一碳化合物(CO_2、CO、CH_4、CH_3OH、甲酸盐)等底物[3]生产的高蛋白微生物质. 利用不同底物生产的SCP见表1. 其蛋白质含量通常高达干重的40%~80%[14], 富含必需氨基酸、维生素和矿物质, 是一种营养价值高、环境友好的替代蛋白资源. 相较于传统动植物蛋白, SCP生产具有低土地占用、碳减排潜力以及高效生物转化优势, 对于缓解全球蛋白质供需矛盾和实现可持续食品供应链至关重要[15].

1.2 主要生产微生物及其关键挑战

多种微生物被用于SCP生产, 主要包括细菌、真菌(酵母、丝状真菌)和微藻等(表2). 不同来源的SCP在营养组成、底物利用和环境适应性上各具特点, 但也面临共性的挑战, 尤其是与关键酶功能缺陷相关的限制.

1.2.1 微藻单细胞蛋白

经过研究[17,18]微藻蛋白质含量较高(占总重量的60%~70%), 必需氨基酸(如亮氨酸、精氨酸和赖氨酸)丰富, 并含高价值不饱和脂肪酸(包括人体必需的EPA和DHA)[19]. 其核心挑战在于光合碳捕获效率(依赖1,5-二磷酸核酮糖羧化酶等酶)有待提升; 坚韧的细胞壁需要高效裂解酶, 增加了蛋白提取的复杂性和成本.

1.2.2 细菌单细胞蛋白

细菌蛋白质含量范围广(30%~80%干重), 生长迅速. 部分菌种如紫色非硫菌(*purple non-sulfur bacteria*, PNSB)兼具废水处理与蛋白生产潜力[20,21]. 其核心挑战在于核酸含量普遍偏高(大于8%干重), 存在安全风险(如肾结石), 需调控核酸酶活性; 部分菌种可能产生有毒次级代谢产物[22].

1.2.3 真菌单细胞蛋白

真菌酵母虽然蛋白质含量处于中等水平(30%~50%), 但安全性高, 获得了“公认安全”(generally recognized as safe, GRAS)认证, 可利用多种碳源(包括甲醇), 富含维生素. 必需氨基酸(如组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸)含量常优于植物蛋白. 其核心挑战在于蛋氨酸含量通常偏低, 需优化相关合成酶活性. 丝状真菌蛋白质含量高(40%~60%干重), 氨基酸平衡优异[蛋白质消化率校正氨基酸评分(protein digestibility-corrected amino acid score, PDCAAS)接近完美的1分], 富含膳食纤维(β-葡聚糖)[19]. 其核心挑战在于传统依赖玉米葡萄糖, 转向利用更可持续但更复杂的木质纤维素废弃物底物, 需要高效降解酶(纤维素酶、木聚糖酶)[23~25].

1.3 SCP生产的酶应用瓶颈与定向进化需求

尽管细菌、真菌和微藻在SCP生产中展现出独特

表 1 利用不同生产原料生产SCP

Table 1 SCP production using different feedstocks

生产原料	生产菌种	蛋白含量	应用	效果	文献来源
公羊角	蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*）NRRL B–*B*–3711、枯草芽孢杆菌*NRRLNRSNRS–744*、大肠杆菌	66%、68%、71%	–	所生产的蛋白质含有反刍动物饲料所必需的所有氨基酸; 减少环境污染	[4]
棉秆	产朊假丝酵母*ACCC20060*	最高SCP浓度为5.74 g/L	–	–	[5]
马铃薯淀粉加工废水	酵母菌共培养(产朊假丝酵母、白地霉和热带假丝酵母, 其体积比为9:5:1)	单细胞蛋白产量为3.06 g/L	实现了高水平有机物去除和SCP生产的同时进行, 有望成为石油开采废水处理的替代技术	化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)去除率为56.9%	[6]
乳胶胶片废水	沼泽红球藻P1	65%	有效地处理废水, 生产成本低, SCP作为副产品	–	[7]
大豆船体	枯草芽孢杆菌*MR 10*和*TK 8*	–	潜在的饲料成分, 特别是对单胃动物	–	[8]
大豆废水	紫色非硫细菌(野生菌球形红细菌Z 08)	52%	Z 08处理大豆废水为零级反应, 10 d后COD去除率达96%	–	[9]
甲烷	甲烷氧化细菌(荚膜甲基球菌)	–	作为太平洋白虾(*Penaeus vannamei*)饮食中鱼粉的替代品	虾的最终体重随着SCP水平的增加而增加, 最高可达200 g/kg (三分之二的鱼粉替代品)	[10]
富含硫化物的沼气	甲烷氧化细菌与硫氧化细菌	高达挥发性悬浮固体(volatile suspended solids, VSS)的73%±5%	–	–	[11]
污泥厌氧消化产生的沼气和污水	混合甲烷氧化菌(以甲基单胞菌为主的野生甲基单胞菌和嗜甲基菌)	干重占细胞干重(dry cell weight, DCW)的41%	作为部分替代大豆和鱼粉供应动物饲料中的蛋白质	–	[12]
餐厨垃圾	解脂耶氏酵母	蛋白质含量显著增加到38.8%±0.2%(w/w)	食物垃圾的资源化	生物干式处理的COD去除率为85.5%±0.7%	[13]

表 2 不同菌种SCP的含量及优缺点

Table 2 SCP production, advantages, and limitations of different microbial strains

来源	蛋白质含量(w/w)	优点	缺点	参考文献
微藻	60%~70%	高蛋白质含量, 可在富含有机物的流出液上生长	需要人造光, 细胞膜耐药, 提取蛋白质成本高	[16]
细菌	30%~80%	蛋白质含量可观	存在可食性问题	[17]
原生生物	10%~20%	无明显优点	蛋白质含量低	[17]
酵母	30%~50%	中等蛋白质含量, 富含维生素和微量营养素, 可使用多种原料, 安全性高	蛋白质含量不及微藻	[16]

优势(如微藻的高蛋白含量、真菌的广谱底物利用性), 其工业化进程仍受关键酶功能缺陷制约. 首先, 底物转化效率低下源于限速酶的天然局限性: 细菌与真菌的碳源同化酶如甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, Mdh)和纤维素酶EG 5C-1对工农业废弃底物(木质纤维素/C1气体)的催化效率不足(细菌K_m>20 mmol/L, 真菌k_{cat}<50/s), 导致底物积累与生物量产率降低[1,26]; 其次, 营养品质失衡与氨基酸合成通路缺陷直接相关——细菌核酸酶活性过高引发安全风险(核酸占比>8%[11]), 真菌与微藻的必需氨基酸合成酶(如苏氨酸脱氢酶、甲硫氨酸合成酶)活性不足, 致使SCP氨基酸评分(PDCAAS)低于动物蛋白标准[27,28]; 最后, 工业适应性薄弱表现为环境敏感酶的失活: 微藻细胞壁裂解酶在机械剪切下活性衰减>40%, 真菌分泌蛋白酶在pH波动或高温发酵中稳定性差(半衰期<2 h), 显著降低蛋白回收率[1,25]. 为突破上述瓶颈, 定向进化技术通过理性改造靶向酶(如增强Mdh底物亲和力、重构氨基酸合成酶动力学、稳定蛋白酶折叠构象), 已成为提升SCP生产

效能不可替代的策略[2,29,30].

2 面向SCP酶应用瓶颈的定向进化策略

2.1 定向进化: 从随机筛选到智能设计

定向进化通过模拟自然进化过程是改造酶功能以突破生物制造瓶颈(如SCP生产)的核心技术. 传统方法依赖易错PCR(error-prone PCR)等随机诱变构建文库, 结合微孔板筛选(通量通常1000~2000克隆), 虽取得诸多成功, 但在应对SCP等复杂系统时面临显著局限: 随机低突变率导致文库覆盖度有限, 难以充分探索巨大序列空间; 筛选通量不足易遗漏有益突变; 宿主细胞异质性可能导致约30%有益突变未被传统批量筛选捕获; 积累的多个突变(通常6~12个氨基酸替换)可能包含有害效应, 且难以获得分子层面的理解[31~35]. 这些挑战催生了更高效、更智能的第二代定向进化策略.

2.2 高效第二代定向进化策略

为克服传统方法的低效性, 第二代策略融合结构生物学、生物信息学和计算模拟, 实现理性设计与小规模智能文库构建, 大幅降低筛选负担, 同时深化对酶功能的理解. 以下策略在解决SCP酶应用瓶颈中展现突出优势.

2.2.1 CASTing (组合活性位点饱和实验)

CASTing基于酶晶体结构或同源模型, 精准锁定底物结合口袋附近的关键氨基酸残基, 并对这些残基进行组合饱和突变(通常使用基于QuikChange的定点饱和突变技术), 构建聚焦文库. 其优势在于直接靶向影响底物识别与催化的核心区域, 显著提高获得高活性、高特异性变体的概率. 适用于提升底物转化效率, 例如, 改造脂肪酶结合口袋残基可提高其对工农业废弃油脂或特定脂肪酸的水解活性[36].

2.2.2 FRESCO(通过计算库策略得到的快速酶稳定的框架)

FRESCO结合计算工具(Rosetta和FoldX计算折叠自由能变化ΔΔG, 分子动力学MD模拟分析构象稳定性)预测能显著提高热稳定性($\Delta\Delta G^{Fold}$<–5 kJ/mol)的氨基酸替换位点. 经过计算机辅助筛选排除不合理突变(如破坏疏水核心、形成不利氢键), 构建极小规模智能库(通常仅需筛选数十至数百克隆). 其优势在于利用极低筛选成本直接获得分子水平稳定性提升的理解. 典型案例仅筛选64个柠檬烯环氧化物水解酶(LEH)突变体即获得T_m增加了25°C的变体[37]. 可核心应用于解决工业适应性薄弱, 如通过高效设计耐高温的蛋白酶(适应发酵罐高温环境)、耐pH波动的脂肪酶(适应饲料制粒或胃酸条件)以及抗机械剪切的微藻细胞壁裂解酶, 显著延长酶的操作寿命, 保障发酵稳定性和产物回收率.

2.2.3 KnowVolution(知识获得型定向进化策略)

KnowVolution是知识获得型定向进化策略, 其包含四个阶段, 旨在高效优化酶功能. 阶段I (热点定位): 小规模随机诱变筛选(约20个变体)定位2~3个关键区域/约12个潜在位点; 阶段II (饱和分析): 对上述位点进行饱和突变, 筛选验证有效性(通常仅2~3个位点有效), 分析突变氨基酸的化学特性(电荷、疏水性), 确定4~6个关键替换位点; 阶段III (结构模拟): 利用3D模型分析突变组合对结构的影响(空间邻近效应、氢键网络等), 设计最优组合方案; 阶段IV (组合优化): 通过定点突变或多位点饱和突变(如OmniChange)合成组合基因, 进行小规模高效筛选(约2000克隆). 该策略十分高效, 筛选规模显著低于传统方法, 但效果却等同或优于传统大规模筛选, 且普适性强, 已成功应用于100多种酶, 是解决SCP生产中三大瓶颈的核心策略, 可系统优化底物转化酶(阶段I/II定位催化/底物结合热点)、增强稳定性(阶段III设计稳定化元素)、改造氨基酸合成酶(阶段III/IV设计变构位点或优化动力学), 为SCP酶工程提供高效可复制的路径[38].

2.3 机器学习辅助蛋白质定向进化

近年来, 机器学习(machine learning, ML)技术正深刻变革定向进化范式, 为高效解决SCP酶工程挑战提供强大引擎. 通过构建序列-功能的映射模型, ML不仅显著提高了突变体筛选的准确性, 更通过降维、特征提取与主动学习等手段, 大幅压缩了搜索空间, 实现了“预测驱动”的智能化筛选. 这有效解决了传统方法在多目标优化(活性、稳定性、选择性)、复杂突变间协同/拮抗效应以及探索高阶组合突变时的低效难题.

进一步地, 预训练蛋白质语言模型打破了对结构信息和标注数据的依赖, 可零样本评估突变对酶稳定性和功能的影响, 为酶库设计与全局搜索提供了新范式. 研究团队发现, ESM-2在预测葡萄糖异构酶活性时, 其零样本预测性能(Spearman ρ=0.68)已接近需要1000个标记数据的监督模型. 其通过预训练数十亿天然蛋白序列, 自动捕捉序列-结构-功能的深层关联. 具备“零

样本预测”能力, 无需靶酶特定实验数据即可评估突变对稳定性或功能的影响[39]. 另外ProtGPT2(protein generative pre-trained transformer 2)可生成符合自然规则的多样性序列, 为智能库设计提供新起点.

此外, 涌现了诸多智能优化策略. 主动学习(active learning, AL)策略允许ML模型在实验过程中不断学习, 从实验数据中获取反馈并动态调整搜索策略, 提高突变体筛选的精度[40,41]. MODIFY算法(multi-objective diversity-informed fitness yield algorithm)为平衡酶适应性和多样性提供了新的思路. MODIFY算法基于机器学习模型预测最适合的酶变体, 并引入多样性增强机制, 确保突变体库在优化过程中能够保持足够的多样性, 从而避免过早地收敛到局部最优解. 在SCP生产中, 该算法可优化解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)的脂肪酶底物谱, 使其同时高效分解餐厨废油中的多种三酰甘油(triacylglycerol), 尤其是含十六至二十碳脂肪酸链(C16~C20)的组分, 使SCP脂质转化率从58%提升至82%[42~45]. 此外, 结合3D卷积图网络、共进化分析、分子动力学模拟等, 捕捉远程残基互作和构象变化, 突破传统定量构效关系局限, 实现更精准的稳定性(如ΔΔG-Meta多尺度模型)和构象动态预测.

ML辅助进化是突破SCP酶工程挑战的前沿高效手段, 不仅可预测影响木聚糖酶热稳定性或1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, Rubisco)羧化效率的关键突变, 还可以设计耐高温/宽pH的蛋白酶或脂肪酶, 优化氨基酸合成酶(如甲硫氨酸合成酶)的活性或变构调控, 提升必需氨基酸产量以及平衡酶特性(如脂肪酶底物亲和力与耐盐性), 适应特定SCP生产工艺(如海水培养基).

2.4 定向进化策略的比较与选择

不同定向进化策略在效率、所需资源和适用范围上存在差异(表3). 传统定向进化筛选通量低、成本高且难以获得分子理解. 第二代策略(CASTing, FRESCO, KnowVolution) 通过理性设计、计算辅助和智能文库构建, 以显著降低的筛选量(CASTing: 500~5000; FRESCO: <200; KnowVolution: 2000~10000)实现性能提升, 并深化机制认知. 其中, KnowVolution因其系统化的知识获取流程和普适高效性, 成为解决复杂SCP酶工程问题(如多特性协同优化)的理想选择. 机器学习辅助进化代表了当前发展趋势, 能处理更复杂的优化任务和巨大序列空间, 是未来加速SCP酶催化剂开发的核心驱动力.

3 定向进化在SCP生产中的应用

针对前面中提及的酶应用瓶颈, 本文以SCP关键酶的定向进化为核心, 结合工业化生产适用菌种, 阐述定向进化在单细胞蛋白优化中的可参考策略, 主要包括: (1) 提高关键酶的活性与底物的转化效率[46]; (2) 增强单细胞生产的关键酶在高密度培养时的稳定性[47]; (3) 增强单细胞蛋白的产量和品质[48,49]; (4) 改善单细胞蛋白产品添加物(脂肪酶)的性能[5].

3.1 提升底物利用与转化效率

为实现工艺的经济性与可持续性, SCP生产中通常会采用葡萄糖、木糖、甘油及甲醇等多种廉价碳源. 然而, 由于关键代谢通路中的限速酶(如己糖激酶、磷酸果糖激酶、甲醇脱氢酶等)对底物的天然亲和力较低且催化速率不足, 碳源利用率难以达到最大化, 这进

表 3 知识驱动的蛋白质工程策略比较

Table 3 comparison of knowledge-driven protein engineering strategies

策略	需求[a)]	适用性	潜在有益位点的识别方法	替换位点的确定方法	有益替换的组合方法	筛选克隆数
传统定向进化	无	广泛适用	随机突变	–	选定最佳变体作为下一轮亲本	1000~15000
CASTing	结构模型	结合口袋局部特性	聚焦突变(活性位点)	定点饱和突变	定点突变	500~5000
FRESCO	结构模型+分子动力学模拟	热稳定性优化	基于自由能(ΔΔG)计算和分子动力学筛选	定点突变	定点突变	约500
ProSAR	序列-活性数据集	广泛适用	随机突变+聚焦突变	ProSAR统计分析	半合成基因重组	60000
KnowVolution	结构（含AI模型）	广泛适用	随机突变	定点饱和突变	定点突变或OmniChange	2000~10000
MORPHING	结构（含AI模型）	广泛适用	随机突变	定点饱和突变	定点突变	500

a) 除表达系统和筛选系统外所需的额外条件; 部分内容参考文献[38]

一步限制了菌体产量及最终蛋白收率. 在此背景下, 研究者们通过将随机突变与基于B-factor的半理性设计相结合, 针对底物结合与催化位点的氨基酸残基实施饱和突变, 并辅以高通量筛选技术, 成功获得了多个既具备高亲和力又兼顾高催化速率的酶变体, 显著突破了底物转化效率的瓶颈[25].

首先, 以GH11木聚糖酶Xyn11为例, 研究者通过易错PCR构建了随机突变库, 并结合蛋白晶体结构中B-factor信息, 针对底物结合口袋周围的关键氨基酸残基进行饱和定点突变. 最终筛选获得的一款突变体, 在70°C条件下的半衰期由野生型的0.5 min提升至410 min, 既满足了高温发酵条件下持续降解木聚糖底物的需求, 又显著提升了底物降解速率, 为纤维素水解液作为碳源在SCP生产中的快速转化提供了可靠支撑[50,51]. 这一工作不仅验证了B-factor指导下的残基选择策略在提高酶热稳定性方面的有效性, 也为后续在高温催化环境中兼顾稳定性与活性的酶设计提供了可复制的范式.

在C1底物甲醇同化通路改造方面, 中性pH条件下天然细菌Mdh的活性较低, 对SCP生产构成了显著制约. 针对该难题, 研究者将甲醛生物传感器与高通量筛选技术相结合: 首先利用基于Pfrm-gfp的生物传感器监测Mdh催化甲醇生成的甲醛浓度, 借助流式细胞术进行首轮快速富集; 随后通过Nash试剂定量甲醛产量, 对候选突变体进行精筛. 最终, T153P单点突变体的k_{cat}/K_m较野生型提高6.5倍, K_m降至9.8 mmol/L, 使工业甲醇同化通路的底物转化效率大幅提升[52]. 该研究展现了“FACS快筛+Nash精筛”并行策略在C1酶定向进化中比活力和亲和力优化的独特优势, 为其他底物传感筛选体系的构建提供了技术参考.

秸秆基生物质(straw-based biomass, SBB)作为丰富的非食用农作物副产品, 蕴含大量纤维素, 却常因未得到有效利用而造成环境污染和资源浪费. 然而, 其纤维素水解液正是单细胞蛋白菌株理想的低成本碳源. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)因其高蛋白含量、对多种氮源及高溶解氧条件的良好适应性以及在厌氧条件下高效乳酸生产能力, 成为SCP生产的优选宿主之一[50]. 在此背景下, Wu等人[53]针对该菌株分泌的GH5家族内切葡聚糖酶EG 5C-1展开定向进化研究. 研究团队通过共进化残基分析, 锁定了远离催化中心却可能通过整体构象变化影响活性的关键位点, 随后采用迭代饱和突变(iterative saturation mutagenesis, ISM)筛选, 获得了K51T/L93T双突变体. 该突变体对羧甲基纤维素的比活性由4170 U/μmol提升至5678 U/μmol, 对微晶纤维素的活性亦由320 U/μmol增加至521 U/μmol; 分子动力学模拟进一步揭示, 突变体通过缩窄活性位点裂隙, 提高了底物亲和力并优化了过渡态稳定性, 从而实现了K_m降低与k_{cat}/K_m增加的双重收益. 这一成果不仅提升了EG 5C-1在SBB转化中的工业应用价值, 也为酶在SCP生产中高效利用木质纤维素提供了新的设计思路.

在光合C1底物固定的研究中, 类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)通过光合作用将CO_2与核酮糖-1,5-二磷酸(ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP)转化为3-磷酸甘油酸, 这一过程是其SCP生产中关键的碳固化步骤. Zhou等人[54]利用改良的Rubisco依赖筛选系统(rubisco-dependent E. coli selection system 3, RDE3), 在大肠杆菌中构建多点随机突变文库, 并结合磷酸核酮糖激酶(phosphoribulokinase)依赖性生长筛选, 对突变体进行高通量评价. 最终获得的YZ1突变体(V11L、K83Q、R252L、Y345F), 其羧化速率(k_{cat}^{n})较野生型提升27%, 羧化效率(k_{cat}^{n}/K_m)提高17%, 而CO_2/O_2选择性保持稳定. 后续分子动力学分析表明, 这些突变通过调整Rubisco大亚基的二级结构动态, 优化了RuBP的结合构象及过渡态稳定化, 从而加速了CO_2固定并促进菌株生长, 为光合底物在SCP生产中的高效应用提供了分子基础.

上述案例中, 从GH11木聚糖酶和 β-1,4内切葡聚糖酶的高温稳定化改造, 到甲醛传感器与Nash法耦合的Mdh筛选, 再到Rubisco的光合底物固定优化, 均展示了多层次、多策略融合的定向进化路径. 通过随机突变与半理性设计相结合, 结合生长偶联或传感筛选平台, 研究者不仅实现了酶底物谱的拓宽和稳定性提升, 更在底物转化率方面取得了定量化的显著增益. 未来, 随着人工智能驱动的蛋白质设计模型(如基于温度的语言模型)与单细胞组学技术的融合, “虚拟预测-高通量筛选-代谢网络重构”的闭环定向进化流程将进一步加速高性能酶催化剂的开发, 为单细胞蛋白生产打造更高效、更绿色、更可持续的生物制造新格局.

3.2 增强酶与生产菌株的鲁棒性

在SCP工业化生产中, 关键代谢酶(如纤维素酶、木聚糖酶、甲醇脱氢酶)面临高温、pH波动、高溶解氧等严苛发酵环境的挑战, 其稳定性不足已成为制约生产效率的核心瓶颈. 这些胁迫条件极易引发酶失活,

进而阻碍菌体生长与蛋白持续合成. 为提升酶与生产菌株的鲁棒性(即在动态胁迫下维持功能稳定的能力), 定向进化技术通过理性设计结合高通量筛选, 成功开发出具有优异环境适应性的酶变体, 为SCP规模化生产提供了关键技术支撑.

在提升酶的热稳定性鲁棒性方面, 针对高温导致的酶失活问题, 研究者采用易错PCR构建木聚糖酶随机突变库, 结合高通量筛选获得突变体Xyn372. 该变体在70.5°C下的半衰期(290 min)较野生型(30 min)提升近10倍. 为突破性能极限, 进一步通过B因子分析(量化蛋白质柔性)锁定关键位点, 设计双突变体Xyn375 (T2C/Q7P). 分子动力学模拟显示, 新形成的氢键网络增强局部刚性, 使其半衰期进一步提高至410 min(较Xyn372提升41%), 熔解温度(T_m)上升5.2°C, 且催化活性未损失. 此案例验证了“随机突变→理性优化”策略对热胁迫鲁棒性的提升效能[55]. Meng等人[56]通过适应性实验室进化(adaptive laboratory evolution, ALE)对巴斯德毕赤酵母进行了多项改造, 提高了其对33°C高温的耐受性. 并且通过CRISPR-Cas9基因编辑技术敲除PAS_chr4_0305基因以减弱细胞壁合成, 发现细胞壁厚度的减少还提高了蛋白含量. 通过ALE对乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)进行改造, 显著提高了其在高温和氧化应激条件下的生长能力和抗逆性, 并提升生物量[47]. 此外, 脂肪酶的热稳定性优化也取得显著进展, 通过易错PCR筛选获得组合突变体P184C/M243C/L218P, 其T_m较野生型提高8°C(达68°C), 确保其在饲料制粒或高温发酵环境中保持高活性[29]. 该脂肪酶变体在饲料添加剂性能优化中的应用见3.4节.

在增强pH适应鲁棒性方面, 为应对发酵过程pH剧烈波动, 研究者通过易错PCR与pH梯度筛选获得木聚糖酶突变体Xyn-A, 其最适pH范围从4.5拓宽至2.0~5.0. 为实现极端酸性条件下的高效催化, 基于结构分析靶向催化裂隙带电残基簇, 构建组合突变体Xyn-B. 其在pH 2.0时的比活性提升12倍, 关键突变Y28F使pH 3.0下的k_{cat}/K_m值提高8.7倍. 分子模拟证实, 突变重构氢键网络并稳定静电势, 显著缓解质子化抑制. 该策略为酶在动态pH环境中的功能鲁棒性提供了优化路径[24].

在协同提升多胁迫鲁棒性方面, 高密度发酵中溶解氧波动与机械剪切力会协同破坏酶结构. 研究者采用半理性共进化设计(co-evolutionary consensus stability analysis), 在纤维素降解酶(如木聚糖酶/内切葡聚糖酶)中引入盐桥、二硫键及强化氢键. 所得变体在双重胁迫(pH 9~10, 80~90°C)下仍保持高活性, 大幅延长发酵罐中的操作寿命. 此成果证明, 通过定向进化整合多类稳定化元素, 可系统性增强酶在复合工业环境中的鲁棒性[23,57].

3.3 优化SCP产量与品质

优化SCP的产量与品质需从两方面突破: 一是提升目标蛋白的表达量与可溶性, 二是改善营养组成(尤其是必需氨基酸的平衡), 而定向进化技术是实现这一目标的核心手段.

目标蛋白的高效表达及可溶性直接影响SCP的产量与纯化成本, 可通过定向进化技术, 从翻译起始与蛋白折叠两个层面进行优化: 对核糖体结合位点和mRNA二级结构进行饱和突变, 结合伴侣蛋白(如DnaK–DnaJ–GrpE、GroEL–GroES)的共进化筛选, 获得了在高密度培养中表现出更高翻译效率和折叠可溶性的变体, 为SCP中异源蛋白的高效表达提供了支撑[58]; 对关键NADPH再生酶如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)进行定向进化, 显著提升其耐热性与活性稳定性, 保证了电子供体的持续再生, 为目标蛋白的折叠与功能化提供了充足能量[59].

天然微生物蛋白常存在必需氨基酸(如赖氨酸、蛋氨酸、亮氨酸等)含量不足或比例失衡的问题, 限制了其在饲料及食品领域的应用. 通过定向进化改造氨基酸合成通路的关键酶, 可精准提升目标氨基酸的产量. 亮氨酸作为一种必需氨基酸, 不仅对菌体的生长发育必不可少, 还能提升单细胞蛋白产品的营养价值, 苏氨酸脱氢酶的脱氨反应是亮氨酸家族合成酶途径中的一个限速步骤, 通过对此酶的改造提高其催化活性可以提高亮氨酸和异亮氨酸的合成速率. Wu等人[28]利用基于分子动力学模拟的变构预测方法(molecular dynamics-based allosteric prediction method), 筛选出关键突变位点, 构建的P441L突变体使大肠杆菌中亮氨酸产量提升400%(达 19.3 mg/L), 异亮氨酸产量提高5%. 并且, 借助AlphaFold2所提供的高精度酶结构模型, 能够识别影响底物亲和性与催化转换率的“热点”残基, 进而通过高通量筛选平台得到在发酵条件下稳定表达并富集必需氨基酸的高效变体[56,60]. 这一策略不仅提升了SCP的营养价值, 也为后续的蛋白质功能改造与营养强化提供了可重复的技术路径. Meng等人[56]通过ALE对巴斯德毕赤酵母进行的改造最终达到了63.37 g/L DCW的生物质产量, 蛋白含量为0.506 g/g DCW(显著高于大豆、

鱼、肉、奶), 并且是必需氨基酸(甲硫氨酸、赖氨酸)的良好来源.

3.4 改善饲料添加剂性能

脂肪酶在SCP生产中具有双重价值: 既是提升底物预处理效率的关键酶, 也是优化饲料性能的重要添加剂. 其通过催化油脂水解分离长链脂肪酸与甘油, 可减少发酵基质中油脂乳化不良导致的传质阻碍; 作为饲料添加剂时, 还能提高SCP菌体对碳源的利用率, 优化发酵残渣营养结构——经定向进化增强的脂肪酶可使SCP饲料的脂肪水解率提升近50%, 生成更多易吸收的短链或中链脂肪酸, 进而改善动物肠道菌群平衡, 提高饲料转化率与免疫耐受性[61].

定向进化技术显著提升了脂肪酶的催化性能与应用潜力. Cen等人[49]突破传统认知, 通过定向进化改造南极假丝酵母(*Candida antarctica*)脂肪酶B(*Candida antarctica* lipase B), 将其Ser-His-Asp催化三联体转变为Cys-His-Asp, 并结合ISM引入W104V、A281Y等关键突变, 最终获得的变体QW4对4-硝基苯甲酸酯的k_{cat}/K_m较野生型提升40倍, 证实了定向进化在突破酶催化活性限制中的价值. 此外, Yan等人[44]通过工程化解脂耶氏酵母实现了脂肪酶与SCP的协同生产, 利用废弃食用油、甘蔗蜜等低成本原料, 在10升发酵规模下分别获得980、3075 U/mL的脂肪酶活性及17.9、39 g/L的SCP产量. 该酵母及脂肪酶在模拟胃肠环境中表现出良好的酸碱稳定性与耐热性, 可高效水解脂肪以提升饲料营养利用率, 为SCP饲料的工业化生产提供了经济可行的方案.

因此, 脂肪酶的定向进化不仅强化了其在SCP生产中的催化效能, 更通过优化催化效率、稳定性及底物特异性, 显著提升了饲料添加剂的性能, 为增强SCP产品的营养价值、改善动物消化吸收效率奠定了技术基础.

4 技术融合与未来展望: SCP生产的智能化与绿色化

4.1 多技术协同驱动定向进化升级

高通量微流控筛选、自动化实验平台及人工智能/机器学习(AI/ML)技术的深度融合, 推动酶定向进化从“试错式”向“预测驱动式”跃迁.

ISM可靶向关键位点构建智能文库, 再结合微滴高通量筛选系统, 将单轮筛选通量提升至10^7~10^9, 同时借助自动化克隆与荧光/发光报告体系令每一轮进化的周期进化周期缩短60%. FRET/荧光素酶动态代谢传感器可在发酵过程中实时监测底物、中间产物及能量水平, 将多维度的代谢信息纳入筛选指标, 进一步提升定向改造的精度与效率. 人工智能与机器学习为酶定向改造提供了数据驱动的智能工具: 蛋白语言模型(如ESM-2)可零样本预测突变对酶活性和稳定性的影响, 为文库设计提供候选位点; 主动学习与贝叶斯优化通过实验结果反馈动态调整突变组合, 实现“实验–建模–优化”闭环加速; 预训练模型与共演化统计结合, 能在多位点文库中平衡活性、稳定性等多维度指标, 避免局部最优. 云端数字孪生平台则融合分子、细胞及反应器数据, 实现工厂级性能预测与路径规划, 为SCP生产工艺优化提供系统化方案.

4.2 代谢-酶学协同优化细胞工厂

在SCP大规模生产中, 仅依靠单纯的酶改造难以兼顾底物通量、能量平衡与细胞稳态. 将定向改造与代谢工程相结合, 可通过敲除竞争路径/过表达限速酶, 增强碳氮通量重构代谢网络, 使得酿酒酵母SCP产率提升20%; 通过改造电子载体与转运蛋白, 平衡辅因子循环(如NADPH再生), 强化能量供应; 通过在高效底盘菌中定向进化关键酶(如蛋白酶耐热突变体), 实现50°C发酵环境下产量稳定提升10%.

4.3 废弃物资源化与碳中和

在环境友好型生产方面, SCP可通过微生物利用农业废弃物、木质纤维素、工业废气等低成本碳氮底物进行发酵, 形成废弃物减量与蛋白高效合成的双赢格局. 以一碳底物(如甲醇、二氧化碳)为原料的SCP生产体系, 不仅缩减了对传统耕地及水资源的依赖, 还能将固定碳转化为可食用蛋白; 通过生物转化温室气体(甲烷、CO_2)生产SCP, 则实现了温室气体减排与蛋白增产的协同效应, 同时进一步降低了生产成本, 打造碳中和闭环工艺. 当生物电化学技术加入这一路径时, SCP生产与废水处理可实现耦合, 通过电生化驱动酶改造开发的高效转化通路, 将工业有机废水转化为微藻或酵母蛋白, 推动清洁生产与循环经济的深度融合.

4.4 应用场景多元化拓展

SCP的多样化应用正不断拓展, 并与酶改造技术相

互促进. 在人类食品领域, SCP作为可持续蛋白来源, 可替代传统动物蛋白, 用于植物基肉、功能饮料等多种产品; 在水产养殖中, 微藻蛋白与酵母蛋白已被证实能提高饲料转化率和养殖成活率, 推动生态高效养殖; 在动物饲料工业, SCP可替代部分鱼粉和豆粕, 减轻对海洋资源和大规模大豆种植的压力, 并有助于降低抗生素使用量与环境负荷. 医药及生物材料领域, 也正利用定向改造技术开发能够高效合成结构蛋白、抗体片段或功能性肽的微生物工厂, 用于药物递送、组织工程与疫苗生产.

镰刀菌是生产单细胞蛋白的理想菌种, 对多种廉价和可再生碳源具有高效利用能力, 比如葡萄糖, 木糖和纤维二糖, 农业废弃物水解液等, 在发酵过程中, 碳源转化率高达50%~60%, 表现优于传统发酵菌株[27,62]. 在近期举办的第三届中国合成生物学及生物制造年会上, 有公司介绍其在真菌蛋白产业化方面有了新的突破, 其自主研发的镰刀菌丝状真菌蛋白获得了美国GRAS认证, 目前正在推进万吨级真菌蛋白规模化工厂的设计和建设.

4.5 智能化制造平台展望

随着技术的不断进步, SCP生产路径演变为多学科交叉融合的智能平台. 在合成生物学的基因电路设计中, 可实现对底物浓度、pH、溶氧水平等环境变量的实时感知与蛋白产量按需调控; 在微流控3D培养系统中, 将单细胞蛋白生产与细胞行为分析结合, 为高通量筛选提供更精细的生理学表型; 利用脑—机接口或神经网络加速的自动化反应器, 可在分子层面自动设计和优化突变组合, 实现真正意义上的“自驱动”进化流程. 通过这条从分子到工厂的闭环智能制造体系, SCP产业在绿色、智能与可规模化道路上不断迈出坚实步伐, 成为弥补全球蛋白质供给缺口、推动生物经济可持续发展的关键引擎.

5 结论

酶定向进化技术经历了从依赖随机诱变的传统模式到融合结构生物学解析、机器学习预测和自动化高通量筛选的智能化工程范式的转变. 通过第二代技术策略(如KnowVolution、FRESCO等), 此技术显著提高了酶改造的效率, 在单细胞蛋白(SCP)生产中成功突破了多个核心瓶颈. 例如, 木聚糖酶和光合碳固定酶的改造, 分别提升了其热稳定性5.2°C和底物转化速率27%; 耐热脂肪酶的Tm值提高了8°C, 广泛适应pH变化的蛋白酶则显著增强了其环境适应性. 这些改造不仅优化了酶的催化活性, 也为工业化SCP生产提供了更强的酶稳定性和适应性. 此外, 代谢网络的优化通过调整限速酶的活性, 进一步提高了生产过程中的细胞适应性和产量. 例如, 酿酒酵母的SCP产率提高了20%. 这一代谢工程与酶定向进化的结合, 成功提升了微生物细胞工厂的生产效率和产品稳定性.

随着技术融合的深入, 人工智能和机器学习的应用为酶定向进化技术带来了革命性的进展. 特别是机器学习的引入, 使得酶库的筛选更加智能化和高效. 利用AI算法, 预测突变对酶活性和稳定性的影响大大提升了筛选精度和效率, 缩小了搜索空间, 使得酶工程的开发更加精确和高效. 针对氨基酸合成途径中的关键酶的定向改造, 通过提升特定酶的活性, 实现了SCP的营养成分优化, 从而为未来SCP在营养食品和饲料中的应用提供了更强的支持.

展望未来, AI驱动的智能筛选、合成生物学的动态调控以及废弃物资源化技术的广泛应用(如废水蛋白联产), SCP的生产正迈向一个智能化、绿色化的新模式. 新技术的深度融合, 不仅提升了定向进化的效率, 也为应对全球蛋白危机和推动生物经济的可持续发展提供了强有力的技术支撑.

参考文献

1 Zhang L, Cui J N, Liu Z Y, et al. Research progress of single cell protein production technology and its application (in Chinese). Feed Res, 2022, 45: 146–152 [张乐, 崔金娜, 刘占英, 等. 单细胞蛋白生产技术及其应用研究进展. 饲料研究, 2022, 45: 146–152]

2 Wang Y, Xue P, Cao M, et al. Directed evolution: methodologies and applications. Chem Rev, 2021, 121: 12384–12444

3 He J, Xin J Y, Zhang W D, et al. Research progress on the application of single-cell protein in feed using one-carbon resources (in Chinese). Feed Ind, 2024, 45: 32–43 [贺姣, 辛嘉英, 张卫丹, 等. 利用一碳资源生产单细胞蛋白在饲料中的应用研究进展. 饲料工业, 2024, 45: 32–43]

4 Kurbanoglu E B, Algur O F. Single-cell protein production from ram horn hydrolysate by bacteria. Bioresource Tech, 2002, 85: 125–129

5 Zhong P, Chen P, Huo P, et al. Characterization of cotton stalk as a lignocellulosic feedstock for single-cell protein production. Bioresource Tech,

2025, 417: 131797
6 Tian Y, Li J, Meng J, et al. High-yield production of single-cell protein from starch processing wastewater using co-cultivation of yeasts. Bioresource Tech, 2023, 370: 128527
7 Kornochalert N, Kantachote D, Chaiprapat S, et al. Use of *Rhodopseudomonas palustris* P1 stimulated growth by fermented pineapple extract to treat latex rubber sheet wastewater to obtain single cell protein. Ann Microbiol, 2014, 64: 1021–1032
8 Wongputtisin P, Khanongnuch C, Kongbuntad W, et al. Use of *Bacillus subtilis* isolates from Tua-nao towards nutritional improvement of soya bean hull for monogastric feed application. Lett Appl Microbiol, 2014, 59: 328–333
9 He J, Zhang G, Lu H. Treatment of soybean wastewater by a wild strain *Rhodobacter sphaeroides* and to produce protein under natural conditions. Front Environ Sci Eng China, 2010, 4: 334–339
10 Felix N, Manikandan K, Uma A, et al. Evaluation of single cell protein on the growth performance, digestibility and immune gene expression of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Anim Feed Sci Tech, 2023, 296: 115549
11 Areniello M, Matassa S, Esposito G, et al. Microbial protein production from sulfide-rich biogas through an enrichment of methane- and sulfur-oxidizing bacteria. Bioresource Tech, 2023, 383: 129237
12 Zha X, Tsapekos P, Zhu X, et al. Bioconversion of wastewater to single cell protein by methanotrophic bacteria. Bioresource Tech, 2021, 320: 124351
13 Yang R, Chen Z, Hu P, et al. Two-stage fermentation enhanced single-cell protein production by Yarrowia lipolytica from food waste. Bioresource Tech, 2022, 361: 127677
14 Huang Z D, Zhang Q C, Li H H, et al. Research progress of bacterial protein as feed protein raw material (in Chinese). Feed Ind, 2023, 44: 16–21 [黄志东, 张翘楚, 李惠惠, 等. 菌体蛋白作为饲料蛋白原料的研究进展. 饲料工业, 2023, 44: 16–21]
15 Kong X X, Gao T T, Liu X C. Development and utilization of single-cell protein (in Chinese). Shandong J Anim Sci Vet Med, 2016, 37: 28–29 [孔祥霞, 高婷婷, 刘相春. 单细胞蛋白的开发与利用. 山东畜牧兽医, 2016, 37: 28–29]
16 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
17 Moran C A, Morlacchini M, Keegan J D, et al. The effect of dietary supplementation with *Aurantiochytrium limacinum* on lactating dairy cows in terms of animal health, productivity and milk composition. Anim Physiol Nutr, 2018, 102: 576–590
18 Becker E W. Microalgae for aquaculture: nutritional aspects. In: Richmond A, Hu Q, eds. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. 671–691
19 Ng Z Y, Kee P E, Abdullah R, et al. Conversion of lignocellulosic biomass waste into mycoprotein: current status and future directions for sustainable protein production. Biomass Conv Bioref, 2024, doi: 10.1007/s13399-024-06130-y
20 Lu H, Zhang G, Wan T, et al. Influences of light and oxygen conditions on photosynthetic bacteria macromolecule degradation: different metabolic pathways. Bioresource Tech, 2011, 102: 9503–9508
21 Wada O Z, Vincent A S, Mackey H R. Single-cell protein production from purple non-sulphur bacteria-based wastewater treatment. Rev Environ Sci Biotechnol, 2022, 21: 931–956
22 Alvarez-Lario B, Macarron-Vicente J. Uric acid and evolution. Rheumatology, 2010, 49: 2010–2015
23 Hegazy U M, El-Khonezy M I, Shokeer A, et al. Revealing of a novel xylose-binding site of *Geobacillus stearothermophilus* xylanase by directed evolution. J Biochem, 2019, 165: 177–184
24 Kim I J, Kim S R, Bornscheuer U T, et al. Engineering of GH11 xylanases for optimal pH shifting for industrial applications. Catalysts, 2023, 13: 1405
25 Xing H, Zou G, Liu C, et al. Improving the thermostability of a GH11 xylanase by directed evolution and rational design guided by B-factor analysis. Enzyme Microb Tech, 2021, 143: 109720
26 Yang J, Fan L, Cheng G, et al. Engineering of cofactor preference and catalytic activity of methanol dehydrogenase by growth-coupled directed evolution. Green Carbon, 2024, 2: 242–251
27 Ahlborn J, Stephan A, Meckel T, et al. Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source. Int J Recycl Org Waste Agricult, 2019, 8: 447–455
28 Wu M, Sun Y, Zhu M, et al. Molecular dynamics-based allosteric prediction method to design key residues in threonine dehydrogenase for amino-acid production. ACS Omega, 2021, 6: 10975–10983
29 Guan L, Gao Y, Li J, et al. Directed evolution of pseudomonas fluorescens lipase variants with improved thermostability using error-prone PCR. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 1034
30 Huang R, Chen H, Zhou W, et al. Engineering a thermostable highly active glucose 6-phosphate dehydrogenase and its application to hydrogen production *in vitro*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102: 3203–3215
31 Su Y D, Wu N F, Liu G A. Research on directed evolution of protein (in Chinese). Biotechnol Bull, 2009, 25: 43–47 [苏怡丹, 伍宁丰, 刘国安. 蛋白质定向进化技术的研究进展. 生物技术通报, 2009, 25: 43–47]
32 Chen K, Arnold F H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in

dimethylformamide. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 5618–5622
33 Lan Tee K, Schwaneberg U. Directed evolution of oxygenases: screening systems, success stories and challenges. Comb Chem High Throughput Screen, 2007, 10: 197–217
34 Pontrelli S, Chiu T Y, Lan E I, et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. Metab Eng, 2018, 50: 16–46
35 Amirifar L, Besanjideh M, Nasiri R, et al. Droplet-based microfluidics in biomedical applications. Biofabrication, 2022, 14: 022001
36 Reetz M T, Bocola M, Carballeira J D, et al. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. Angew Chem Int Ed, 2005, 44: 4192–4196
37 Wijma H J, Floor R J, Jekel P A, et al. Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization. Protein Eng Des Sel, 2014, 27: 49–58
38 Cheng F, Zhu L, Schwaneberg U. Directed evolution 2.0: improving and deciphering enzyme properties. Chem Commun, 2015, 51: 9760–9772
39 Rives A, Meier J, Sercu T, et al. Biological structure and function emerge from scaling unsupervised learning to 250 million protein sequences. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118: e2016239118
40 Yang J, Lal R G, Bowden J C, et al. Active learning-assisted directed evolution. Nat Commun, 2025, 16: 714
41 Wittmann B J, Yue Y, Arnold F H. Informed training set design enables efficient machine learning-assisted directed protein evolution. Cell Syst, 2021, 12: 1026–1045.e7
42 Ding K, Chin M, Zhao Y, et al. Machine learning-guided co-optimization of fitness and diversity facilitates combinatorial library design in enzyme engineering. Nat Commun, 2024, 15: 6392
43 Yang K K, Wu Z, Arnold F H. Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering. Nat Methods, 2019, 16: 687–694
44 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
45 Li Z, Deng Y, Yang G Y. Growth-coupled high throughput selection for directed enzyme evolution. Biotechnol Adv, 2023, 68: 108238
46 Wu L, Zhang X, Tang Z, et al. Low-protein diets decrease porcine nitrogen excretion but with restrictive effects on amino acid utilization. J Agric Food Chem, 2018, 66: 8262–8271
47 Feng H J, Mu W M, Zhang T, et al. Study on the high cell density culture of *Lactococcus lactis* (in Chinese). Sci Technol Food Ind, 2014, 35: 197–201 [冯慧杰, 沐万孟, 张涛, 等. 乳酸乳球菌的高密度发酵研究. 食品工业科技, 2014, 35: 197–201]
48 Salmon K A, Yang C R, Hatfield G W, et al. Biosynthesis and regulation of the branched-chain amino acids. EcoSal Plus, 2006, 2: 10.1128
49 Cen Y, Singh W, Arkin M, et al. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. Nat Commun, 2019, 10: 3198
50 Chen T, Brul S, Hugenholtz J. Exploring the potential of *Bacillus subtilis* as cell factory for food ingredients and special chemicals. Microb Cell Fact, 2023, 22: 200
51 Wu B, Zheng S, Pedroso M M, et al. Processivity and enzymatic mechanism of a multifunctional family 5 endoglucanase from *Bacillus subtilis* BS-5 with potential applications in the saccharification of cellulosic substrates. Biotechnol Biofuels, 2018, 11: 20
52 Qian J, Fan L, Yang J, et al. Directed evolution of a neutrophilic and mesophilic methanol dehydrogenase based on high-throughput and accurate measurement of formaldehyde. Synth Syst Biotechnol, 2023, 8: 386–395
53 Wu M, Lv K, Li J, et al. Coevolutionary analysis reveals a distal amino acid residue pair affecting the catalytic activity of GH5 processive endoglucanase from *Bacillus subtilis* BS-5. Biotech Bioeng, 2022, 119: 2105–2114
54 Zhou Y, Whitney S. Directed evolution of an improved rubisco, *in vitro* analyses to decipher fact from fiction. Int J Mol Sci, 2019, 20: 5019
55 Huang L, Zheng D, Zhao Y, et al. Improvement of the alkali stability of *Penicillium cyclopium* lipase by error-prone PCR. Electron J Biotechnol, 2019, 39: 91–97
56 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
57 Chen X, Li W, Ji P, et al. Engineering the conserved and noncatalytic residues of a thermostable β-1,4-endoglucanase to improve specific activity and thermostability. Sci Rep, 2018, 8: 2954
58 Jin L, Li L, Zhou L, et al. Improving expression of bovine lactoferrin N-lobe by promoter optimization and codon engineering in *Bacillus subtilis* and its antibacterial activity. J Agric Food Chem, 2019, 67: 9749–9756
59 Hua L, Qianqian B, Jianfeng Z, et al. Directed evolution engineering to improve activity of glucose dehydrogenase by increasing pocket hydrophobicity. Front Microbiol, 2022, 13: 1044226
60 Yu H, Ma S, Li Y, et al. Hot spots-making directed evolution easier. Biotechnol Adv, 2022, 56: 107926
61 Song L Y, Yang P L, Liu G H, et al. Research progress of single cell protein production and its application in feed (in Chinese). Chin J Animal Nutr, 2023, 35: 3537–3547 [宋荔烨, 杨培龙, 刘国华, 等. 单细胞蛋白的生产及其在饲料中的应用研究进展. 动物营养学报, 2023, 35: 3537–3547]
62 Upcraft T, Johnson R, Finnigan T, et al. Protein from renewable resources: mycoprotein production from agricultural residues. In: Pierucci S, Manenti F, Bozzano G L, et al., eds. Compute Aided Chem Eng. Vol 48. Amsterdam: Elsevier, 2020. 985–990

Summary for “酶定向进化技术在单细胞蛋白生产中的研究进展”

Recent advances in directed evolution for single cell protein production

Yan-Yi Zhang[1,2], Lu-Jie Wang[1,2], Feng Cheng[1,2*] & Ya-Ping Xue[1,2]

[1] *Key Laboratory of Biological Organic Synthesis in Zhejiang Province, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China*
[2] *State Key Laboratory of Green Chemical Synthesis and Transformation Technology, Huzhou 313200, China*
* Corresponding author, E-mail: fengcheng@zjut.edu.cn

Single-cell protein (SCP) constitutes an environmentally sustainable alternative protein source, characterized by its exceptionally high protein content (typically 40%−80% on a dry weight basis) and diverse industrial applications spanning aquaculture feed, functional food ingredients, and nutritional supplements. Despite these compelling advantages, industrial-scale SCP bioproduction continues to confront three persistent and interconnected challenges: suboptimal substrate conversion efficiency, particularly evident in lignocellulosic and gaseous carbon source utilization, operational instability of essential metabolic enzymes under rigorous bioreactor conditions (e.g., thermal/pH fluctuations), and nutritional imbalances in critical amino acid profiles (notably sulfur-containing and branched-chain amino acids). Resolving these multifaceted bottlenecks represents a fundamental prerequisite for establishing SCP’s commercial viability at an industrial scale.

The discipline of enzyme directed evolution has undergone profound methodological transformation, culminating in the establishment of a sophisticated second-generation paradigm. This framework strategically integrates computational structure/sequence-guided rational design (leveraging protein folding simulations and catalytic residue mapping), machine learning-assisted mutational prediction (utilizing fitness landscape models to prioritize beneficial mutations), and automated high-throughput screening platforms (employing microfluidics and robotics for rapid variant assessment). Collectively, this cohesive technological framework dramatically accelerates the precision engineering of enzymes pivotal to SCP biosynthesis, effectively overcoming the inherent limitations of earlier random mutagenesis techniques—such as low functional variant yields and excessive screening burdens—while establishing robust pipelines for enhancing engineering precision and experimental throughput.

The transformative impact of these advanced strategies manifests across four critical dimensions of SCP manufacturing value chains: Substrate conversion efficiency has been substantially augmented through targeted engineering of key synthetic enzymes including xylanases (for lignocellulose deconstruction) and photosynthetic carbon fixation enzymes (for C1 compound assimilation), leading to measurable improvements in biomass utilization rates. Concurrently, bioprocess stability has been reinforced through systematic enhancement of thermal resilience and pH tolerance in hydrolytic enzymes such as lipases and proteases, thereby ensuring consistent catalytic performance during extended industrial operations. Addressing nutritional imbalances necessitates strategic optimization of amino acid synthetase catalytic activity, a fundamental approach to rectify compositional deficiencies in essential nutrients. Furthermore, terminal product functionality has been significantly elevated via engineered lipase variants demonstrating up to 50% enhancement in fat hydrolysis rates within SCP-derived animal feeds, thereby substantially amplifying their commercial value as premium nutrition additives in livestock and aquaculture sectors.

Looking forward, the profound convergence of artificial intelligence (enabling predictive biocatalyst design and real-time bioprocess control), synthetic biology (facilitating modular metabolic pathway engineering), and green manufacturing principles (advancing circular economy through waste valorization) is poised to propel SCP production toward intelligent, zero-waste manufacturing paradigms. This synergistic technological integration promises autonomous process optimization, resource-efficient operations with minimal environmental footprints, and fully sustainable protein supply chains—collectively positioning SCP at the vanguard of global food system transformation initiatives and nutritional security initiatives in the coming decades.

directed evolution, single cell protein, machine learning, sustainable protein resources, biomanufacturing

doi: 10.1360/CSB-2025-0443