

施天元, 曹国强. 基因工程表达甜味蛋白的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 453–459. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020262

SHI Tianyuan, CAO Guoqiang. Research Progress in Gene Engineering Expression of Sweet Proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 453–459. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020262

· 专题综述 ·

基因工程表达甜味蛋白的研究进展

施天元*, 曹国强

(黑龙江省金象生化有限责任公司, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:甜味蛋白作为一种天然甜味剂, 热量低, 甜度大, 食用安全。但其由于受到原材料生长条件还有保质期等诸多限制, 导致其生产成本较高。基因工程表达生产甜味蛋白可以提高其稳定性, 扩大生产规模, 降低其生产成本, 并且更有针对性的改良其性能。但在应用基因工程生产甜味蛋白的研究中, 也遇到了很多问题, 包括甜味蛋白无法正确折叠及缺乏翻译后修饰导致的甜味丧失, 还有因非植物提取导致的缺少食品安全认证, 无法得到大众认可等。本文首次系统地分析了基因工程在生产甜味蛋白的应用及相关热点问题, 为未来基因工程改造甜味蛋白提供理论资料。

关键词:基因工程改造, 甜味蛋白, 天然甜味剂, 稳定性, 产量

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)02-0453-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020262



本文网刊:

Research Progress in Gene Engineering Expression of Sweet Proteins

SHI Tianyuan*, CAO Guoqiang

(Heilongjiang Jinxiang Biochemical Company, Harbin 150040, China)

Abstract: Sweet protein as a kind of natural sweeteners, has low calories, high sweetness, and safety to eat. However, due to the raw material growth conditions, short expiry date and other restrictions, resulted high production costs. Gene engineering expression and production of sweet protein can improve its stability, contribute to expand the production scale, reduces production costs, and improve its performance more specifically. However, the research of applying genetic engineering to produce sweet protein, encountered many problems, including the loss of sweet taste due to improper folding and lack of post-translational modification, and the lack of food safety certification due to non-plant extraction, which cannot be recognized by the public. This paper systematically analyzes the application of genetic engineering in sweet protein production and related hot issues for the first time, and provides theoretical data for the future genetic engineering transformation of sweet protein.

Key words: gene engineering modification; sweet protein; natural sweetener; stability; production

甜味蛋白作为一种由植物提取的蛋白质, 具有甜度大、热量低、安全无毒等特点, 早在上世纪就受到了广泛的关注^[1-2]。甜味蛋白是一类拥有巨大潜力的天然甜味剂, 可作为蔗糖替代物, 它们热量低, 功能活性好, 经胃蛋白酶消化可成为必需氨基酸, 具有营养价值^[3], 但由于最初的植物提取存在原料产地限制、提取成本高等问题, 限制了其大规模的生产和使用^[2,4], 利用基因工程异源表达甜味蛋白引起了科学家们的兴趣。

目前, 甜味蛋白的基因工程改造主要应用于增强甜味蛋白的稳定性、增加甜度、提高产量、降低成

本等^[5]。但同时, 基因工程表达生产甜味蛋白尚存在较多困难与挑战。如蛋白翻译后修饰的提取工艺复杂, 成本高, 价格无法与市场上的人工合成甜味剂相竞争。利用细菌、真菌为原料生产的甜味蛋白很难被大众接受应用于食品等^[6]。基因工程生产的甜味蛋白具有传统植物原料提取生产无法比拟的优点, 包括更高的产率、更低的理论成本和更有针对性的改造, 代糖食品已成为新趋势^[7], 但是甜味蛋白作为已发现的最甜的物质, 现仍未被广泛应用。本文首次系统的分析了基因工程在生产甜味蛋白中的优势、应用及相关热点问题, 为未来基因工程改造甜味蛋白提

收稿日期: 2022-02-28

作者简介/通信作者*: 施天元 (1989-), 女, 硕士, 研究方向: 基因工程与微生物代谢工程, E-mail: shity3@xiangyu.cn。

供理论资料。

1 甜味蛋白的种类及理化性质

1.1 索马甜

索马甜又称奇异果甜蛋白、沙马汀,见表1。最初提取自一种来自西非的植物(*Thaumatococcus daniellii*)。甜度是蔗糖的3000倍。据报道,索马甜家族至少存在五种常见的高甜度的索马甜蛋白成员,包括两种天然高含量的蛋白产物索马甜I和索马甜II,还有三种微量的蛋白产物索马甜a,索马甜b和索马甜c。尽管有些肽环有差异^[8],但所有的蛋白都具有相同的分子量大小22 kDa,和相同的等电点pH12^[9]。索马甜I和索马甜II蛋白都含有207个氨基酸,之间存在五个氨基酸位点的差异,分别是N46K、S63R、K67R、R76Q和N113D^[10]。索马甜蛋白含有16个半胱氨酸形成8个二硫键^[11]。

1.2 莫乃灵

莫乃灵是一种存在于西非植物(*Discorephyllum cumminisii*)中的甜味蛋白,见表1。甜度较高,是蔗糖的3000倍。天然莫乃灵由94个氨基酸组成,含有一个半胱氨酸,不存在二硫键^[11],其分子量为10.7 kDa^[4,12]。包含两个非共价连接的多肽链链A和链B分别包括44个氨基酸和50个氨基酸。单独的链A和链B都不具有甜味,见表1^[13]。莫乃灵的二级结构包含一个反向平行的 β -折叠和一个17个残基的 α -螺旋^[12]。因为莫乃灵A链和B链通过弱共价键链接,导致其热稳定性较低^[14]。MNEI是莫乃灵的单链衍生物,具有相似的甜度^[15],相比于莫乃灵,具有更强的热稳定性^[16]。

1.3 马宾灵

马宾灵,也叫马槟榔甜蛋白,是从亚热带植物(*Capparis masakai*)种子中分离得到的,见表1。马宾灵的甜度是蔗糖的100倍。马宾灵是由A链和B链组成的二聚体,A链由33个氨基酸组成,B链

由72个氨基酸组成。共有四种同分异构体,1、3、4型均不能稳定存在,只有2型是热稳定的,2型马宾灵蛋白也是目前有报道的研究最多的马宾灵蛋白^[6,17],其甜味能在80℃条件下保持至少2h^[2,4]。马宾灵的分子量为12.4 kDa^[4]。2型马宾灵前体含有155个氨基酸残基,包含一个20个氨基酸的信号肽、一个15个氨基酸的N端扩展序列、一个14个氨基酸的A链和B链之间的连接多肽和一个C端的扩展氨基酸^[18]。马宾灵在已知的六种甜味植物蛋白中表现出最显著的热稳定性和耐酸性^[19]。

1.4 布拉齐因

布拉齐因,也叫布那珍甜蛋白,存在于一种西非常绿灌木(*Pentadiplandra brazzeana*)的红浆果中^[20],见表1。布拉齐因具有很高的溶解性,在pH大幅度变化和高温情况下都很稳定^[21]。布拉齐因比2%的蔗糖溶液甜2000倍,比10%的蔗糖溶液甜500倍。它的味道更像蔗糖而不是索马甜^[22]。它的甜度在80℃4.5h条件下也不会被破坏^[23]。布拉齐因由54个氨基酸组成,分子量为6473 Da^[24]。果实中还存在一种微量的布拉齐因蛋白,由53个氨基酸残基组成,甜度是主要成分的两倍^[22]。结构区别为主要存在形式在氨基末端有焦谷氨酸,而微量形式在氨基末端缺少焦谷氨酸^[25]。布拉齐因的二级结构包含一个 α -螺旋(残基21~29)和三个反向平行的 β -折叠(链I,残基5~7;链II,残基44~50;链III,残基34~39)。四个二硫键相互交联成次级结构^[26]。潘塔亭(pentadin)也是一种甜味蛋白^[27],但有人认为它只是布拉齐因的二聚体形式^[22,27]。潘塔亭由54个氨基酸组成,甜度为蔗糖的500倍。潘塔亭的甜味很容易丧失^[2]。

1.5 库克灵

库克灵,也叫仙茅甜蛋白,存在于马来西亚的一种植物(*Curculingo latifolia*)中,见表1^[28]。甜度是蔗糖的550倍。其分子量24.9 kDa,由114个氨基

表1 不同甜味蛋白特性对比

Table 1 Comparison characteristics of different sweet proteins

甜味蛋白	天然来源	地理分布	变体	甜度	分子量	氨基酸长度	活性形式	热稳定性
索马甜 (thaumatin)	<i>Thaumatococcus daniellii</i>	西非	I, II, a, b, c*	蔗糖的3000倍	22 kDa	207	单体	120℃稳定
莫乃灵 (monellin)	<i>Discorephyllum cumminisii</i>	西非	莫乃灵; MNEI	蔗糖的3000倍	10.7 kDa	94	二聚体(A+B)	莫乃灵热稳定性较低; 单链衍生物MNEI具有 更强稳定性
马宾灵 (mabinlin)	<i>Capparis masakai</i>	亚热带植物	1, 2, 3, 4型	蔗糖的100倍	12.4 kDa	155	二聚体(A+B)	1、3、4型均不能稳定存在,只有 2型是热稳定的,其甜味能在 80℃条件下保持至少2h
布拉齐因 (brazzein)	<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	西非	布拉齐因; 潘塔亭#	2%的蔗糖溶液甜 2000倍; 10%的蔗糖溶液甜 500倍	6473 Da	54	单体;二聚体	布拉齐因在pH大幅度变化和 高温情况下都很稳定
库克灵 (curculin)	<i>Curculingo latifolia</i>	马来西亚	—	蔗糖的550倍	24.9 kDa	114	二聚体	不稳定
神秘果素 (miraculin)	<i>Synepalum dulcificum</i>	西非	—	本身不具有甜味, 具有矫味作用	28 kDa	191	四聚体	风味活性易丧失

注:“*”为索马甜,a,b,c为三种微量单体;“#”潘塔亭甜度为蔗糖的500倍,并且甜味很容易丧失^[2,4]

酸组成。库克灵是一种由两个基础亚基组成的同源二聚体^[10]。库克灵不稳定,在 50 ℃ 及以上温度活性降低^[2]。库克灵也是一种矫味蛋白,能够使酸味物质变甜^[7]。甜味在口腔内可维持几分钟;甜味在口腔内消失后若喝水,又会恢复,并可维持 5 min 左右^[27]。Neoculin 与库克灵具有相似的甜度,甜度大约是蔗糖的 500 倍^[29]。与库克灵的区别是 Neoculin 是一种由一个酸性亚基(NAS)和一个基础亚基(NBS)组成的异源二聚体。

1.6 神秘果素

神秘果素,也叫奇果蛋白,存在于一种热带西非灌木(*Synepalum dulcificum*)的果实中,见表 1。神秘果素本身不具有甜味,但可以使酸味或苦味物质尝起来具有甜味^[30],包括盐酸、草酸、乳酸、甲酸、醋酸、柠檬酸等。增甜效果取决于酸的酸度和 pH^[31]。浓度为 4×10^{-7} mol/L 时神秘果素即能被感知,其甜度相当于 0.4 mol/L 的蔗糖溶液^[32]。在 1988 年,Theerasilp 和 Kurihara 成功地分离出纯化的神秘果素甜味蛋白,并测定其分子量为 28 kDa。神秘果素是一个具有 191 个氨基酸的单链多肽,具有两个通过二硫键交联的糖基化位点, N42 和 N186^[30]。

2 利用基因工程生产甜味蛋白的优势

2.1 甜度方面

利用玉米表达系统生产甜味蛋白布拉齐因,表达量高,纯化出的玉米布拉齐因蛋白甜度高达蔗糖的 1200 倍^[33]。而另一方面,天然索马甜引起甜味感觉浓度的浓度为 50 nmol/L^[2,34]。通过基因工程改造,最甜的索马甜突变体 D21N, 31 nmol/L 浓度就能引起味觉^[34]。MNEI 两个双突变体 E50N/Y65R 和 E2N/E50N 均表现出比单突变体 E50N 更高的甜度^[35]。用大肠杆菌表达的 Neoculin 不仅能诱发甜味反应,而且能在水或柠檬酸存在情况下进行矫味^[29]。

2.2 蛋白活性方面

神秘果素在室温收获后的 2~3 h 内,风味活性就会丧失^[36]。因此,神秘果素的天然来源是有限的。人们利用外源的大肠杆菌、酵母菌、米曲霉和植物等宿主,一直在尝试利用基因工程技术生产神秘果素,利用转基因生菜,成功表达了具有甜味活性的重组神秘果素蛋白,以生菜为宿主表达神秘果素蛋白不仅解决了神秘果素易丧失风味的问题,而且由于其食品来源消除了人们对其安全性的担心^[37]。利用带有 KEX₂ 剪切位点的 α -淀粉酶分别与两个蛋白亚基融合,可成功获得与天然 Neoculin 具有同样活性的重组 Neoculin^[27]。布拉齐因需要四个二硫键才能激活产生强烈的甜味,而利用毕赤酵母获得的布拉齐因的不仅具有活性且在产量方面具有优势^[21]。

2.3 蛋白表达量与转化率方面

酵母,主要为毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),在产量方面由于其

为真核微生物,在合成和分泌方式上具有优势。索马甜用合成 DNA 在酿酒酵母中生产,表达水平可达 140 mg/L。毕赤酵母生产索马甜产量也可达到 70 mg/L^[18]。在毕赤酵母中共表达索马甜与分子伴侣使产量至少提高了两倍^[38]。另外,乳酸乳球菌也可用于表达索马甜^[2]。莫乃灵可以除了可用毕赤酵母和酿酒酵母表达外,还可以用产假丝酵母(*Candida utilis*)表达^[39]。利用产假丝酵母生产的莫乃灵产量甚至可以超过天然提取的莫乃灵^[6]。索马甜在米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、娄地青霉(*Penicillium roquefortii*)、黑曲霉变种(*Aspergillus. niger* var. *awamori*)中均能成功表达^[40-41]。在酸性蛋白酶缺陷的黑曲霉变种中, *gdhA* 启动子诱导和适宜的 N 源 C 源条件下,索马甜的产量可达 105 mg/L^[40]。同样的宿主中过表达 *pdiA* 基因,产量可达 150 mg/L^[41]。

在番茄植株中表达并纯化出了与天然蛋白甜味相同的索马甜 II,重组的索马甜 II 与天然索马甜 II 的口感特征没有明显区别且具有加工生产发面的优势^[42]。转基因的番茄也是最适合生产重组神秘果素的宿主,以幼苗子叶为外植体的农杆菌介导转化方案中,番茄转化效率超过 40%^[43]。

3 基因工程表达生产甜味蛋白遇到的困难及解决办法

3.1 甜味缺失

甜味蛋白最重要的是甜味。但 1982 年, Luppó 等^[10]第一次在大肠杆菌中表达出的索马甜蛋白是没有甜味的。究其原因,主要是由于蛋白质折叠不当或缺乏必要的翻译后的修饰,因而不能引起甜味反应^[6,44]。人们利用外源的大肠杆菌、酵母菌、米曲霉和植物等宿主,一直在尝试利用基因工程技术生产神秘果素。但异源生产的神秘果素有的丧失了甜味,有的甜味活性很低^[18,37,45]。用大肠杆菌表达的库克灵(NBS-NBS)或库克灵 2(NAS-NAS)两种同源二聚体都不具有甜味,也没有矫味作用。2000 年在前人基础上,通过氧化还原性谷胱甘肽系统对重组蛋白进行复性处理,生产出了具有与天然索马甜相似甜味的甜味蛋白索马甜^[46-47]。利用转基因植物作为宿主可实现具有甜味活性的神秘果素的生产^[30]。MNEI 是一种高效的饮料甜味剂,但在半固态食品中使用可能会降低它的甜味,已证实对其进行点突变可以解决这类问题^[34,48]。

3.2 成本高

植物提取甜味蛋白由于原料限制存在成本高的问题,限制了其大规模的应用^[3,19]。2020 年, Park 等^[49]以胡萝卜(*Daucus carota* L.)愈伤组织为材料,氧化应激诱导 SWPA2 启动子驱动各种应激处理下神秘果素基因的表达,采用气升式生物反应器进行了重组神秘果素的大规模生产研究,为将来利用转基因胡萝卜愈伤组织量产神秘果素打下基础。此外,利用 CaMV35S 启动子过表达编码甜味蛋白基因的转基因

因土豆、生菜、黄瓜、草莓等也获得了成功^[18]。部分重组甜味蛋白如莫乃灵仍处于研究阶段,也存在生产成本高,在产量和价格上与市场上的人工合成甜味剂相比具有较大差距的问题^[1]。利用生物技术生产植物甜味蛋白和矫味蛋白必须达到一定的单产水平才能与天然产品竞争^[6]。原核宿主相比植物表达具有操作流程简单、生长周期短等优点,但是原核宿主表达也存在纯化过程繁琐,纯化工艺复杂,纯化成本高的问题,而且部分甜味蛋白无法正确折叠,产生甜味^[49]。于是人们开展了转基因植物组织和真菌表达平台生产甜味蛋白的研究。开发的细胞培养流程简化了纯化过程,提高了蛋白质产量,节约了成本。利用烟草毛状根培养物成功表达并分泌了甜味蛋白索马甜 I^[50]。

3.3 稳定性差

莫乃灵 A 链和 B 链通过弱共价键链接,热稳定性较低^[14]。基因工程提高部分甜味蛋白如莫乃灵的热稳定性也是需要解决的问题^[1]。MNEI 与莫乃灵具有相似的甜度^[51],克隆相对简单,可导入许多宿主微生物中生产应用于食品饮料工业^[14]。也可以利用转基因植物,固相多肽合成等方式生产^[18]。相比于莫乃灵,MNEI 具有更强的热稳定性,因此也有着更广泛的应用。现阶段主要用 MNEI 替代莫乃灵,同时 MNEI 也被认为是最有前途的甜味蛋白之一^[18]。

3.4 安全性

利用基因工程技术生产出的重组蛋白的安全性需经过严格的生物学活性检验^[52]。前期人们在大肠杆菌和酵母中表达了重组甜味蛋白,虽然也进行了小鼠的毒理学验证,但是并未得到所有人的认可,相当一部分人还是不能接受尤其是在大肠杆菌中表达的甜味蛋白应用于食品^[6,53-54]。为甜味蛋白寻找更多被认可的安全表达宿主也是甜味蛋白开发面临的重要问题之一。还有,利用重组技术生产的植物甜味蛋白或矫味蛋白必须获得权威性食品安全检验机构的认证,例如美国的 FDA 和欧盟的食品安全审查机构的认可。食品安全认证也是生产食品级甜味蛋白需要攻克的关键问题^[6]。由于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)属于常见的肠道定殖菌,几百年来一直被奶酪制造工业使用,因此用它生产的 MNEI 被大多数人认为是安全的可食用甜味蛋白^[54]。目前,索马甜和莫乃灵已通过毒理学试验和安全试验,经相关批准用于食物和饲料的增甜剂或调味剂^[52,54]。

3.5 大规模生产受限

尽管在一些生物体中成功地表达了重组索马甜蛋白,但一直缺少大规模的生物生产设施存在。植物的价格,生长周期,种植密度在大规模生产中均需要考虑。此外,由于气象因素,产品产量和质量方面可能存在大量的批内差异,这也是使用田间种植的植物材料进行这一应用所关注的问题之一。这些变化反过来会导致关键设施性能参数的不一致。2021 年

Kelada 等^[55]提出了初步的工艺设计,工艺模拟和经济分析,将利用多种农产品生产重组索马甜蛋白。未来预计将采用分子手段每年量产 50 公吨索马甜 II。

另外,酵母是最具工业意义的真核微生物,由于其可用性,主要应用于生物生产,其具有良好的遗传和生理背景,遗传操作简单,生长迅速,具有翻译后修饰和细胞外分泌的能力。这样的平台使其成为表达甜味蛋白的理想系统。因此,利用微生物如丝状真菌、酵母等对酶的高水平分泌和重组蛋白的大规模生产有一定的好处^[2]。

4 基因工程生产甜味蛋白技术的应用

4.1 索马甜的生产应用

索马甜作为一种最有发展、最经济且最可控的甜味蛋白,早在 2011 年开始作为甜味剂加入口香糖中改良口感,并在 2014 年大量应用^[56]。关于索马甜的工业量产研究可追溯到 30 年前,可以应用多种转基因植物包括马铃薯、黄瓜、番茄、梨、草莓生产,也可以利用多种细菌和真菌生产^[18,39,40-41]。利用大肠杆菌宿主表达索马甜,成功获得了具有甜味活性的蛋白质^[4,18]。2012 年的研究表明,经索马甜产量比较实验验证,烟草毛状根或许可以成为索马甜的最佳生产平台^[50]。至 2019 年,索马甜的生产仍主要依赖于毕赤酵母,但其生产模式与提纯工艺仍在不断优化中^[2]。

4.2 莫乃灵的生产应用

莫乃灵也是美国食品和药物管理局(FDA)批准的“公认安全的”(GRAS)食品添加剂^[7]。莫乃灵由于高温不耐受和 pH 条件的限制^[12],其研究一直处于瓶颈状态。对其进行基因工程改造可提高其稳定性和表达水平,降低其生产成本^[57],改良口感,提高产量^[47,58]。最初利用基因工程表达的重组莫乃灵蛋白需要生长在含有甲醇的培养基上^[59]。在 2016 年,分子生物学研究表明莫乃灵的 N 端序列决定了其在酵母菌株中表达的蛋白甜度,成功在毕赤酵母系统中表达了不需要甲醇诱导的莫乃灵蛋白,此项研究表明莫乃灵的量产不再是遥不可及^[59]。Jia 等^[60]通过有效调控甲醇代谢模式和提高能量利用效率,提高了毕赤酵母中低细胞浓度条件诱导的莫乃灵产量。应用 Trp 启动子或 T7 lac 启动子在大肠杆菌中表达莫乃灵或 MNEI 蛋白,表达水平高达 45%^[10,14]。2015 年,用乙酸作为碳源工业化生产 MNEI 在理论上已完全具备条件,并且产量可达 177 mg/L^[61]。2018 年,该实验室又通过生产乳制品废液中的乳糖为底物,开发了一种工艺简单,适合工业规模应用,并且生长参数易于控制的 MNEI 生产流程^[54]。除此之外,烟草叶绿体也可以作为稳定的植物表达平台来生产三种 MNEI 蛋白突变体,它们具有更好的口感、更高的稳定性和产量^[58]。

4.3 其他甜味蛋白的生产应用

不仅仅是索马甜与莫乃灵,其他甜味蛋白通过基因工程的改造工作也已经在不断推进。2004 年

Lamphear 等^[33]在玉米宿主中表达了布拉齐因蛋白,因含布拉齐因的玉米胚芽粉可直接应用于食品,使这种高甜度的甜味蛋白未来在食品工业中的作用得到看好,并且使用可食用植物作为宿主的优势在于可以降低纯化成本^[32]。美国的 BioResources International 公司也利用传统的栽培技术种植 *R.dulifera*, 并利用重组宿主表达生产神秘果素。作为合作研究,日本的 Asahi DenkaKogyo 公司和日本物理学和化学研究所正在将库克灵表达于转基因植物和大肠杆菌。而布拉奇因作为甜度最大的甜味蛋白,也拥有着极大的潜力,近年来被广泛研究。通过基因工程改造后的布拉奇因甜度比野生型提高近 50%^[5]。乳酸克鲁维酵母表达系统生产的布拉奇因产量可达 107 mg/L^[62]。经优化发酵工艺、净化程序后的布拉奇因可以用作食品、医药和生物技术领域的甜味添加剂^[23],在食品工业中具有广阔的应用前景。

5 结语与展望

目前关于甜味蛋白的研究主要集中在甜味活性的保持,降低生产成本,提高产量,生产工艺的优化等方面。研究人员希望能够找到一种认可度高、高甜度、价格便宜、甜味特性好、性质稳定的甜味蛋白。利用可食用的植物组织生产甜味蛋白在安全性上具有一定优势,易于被大众接受。利用微生物生产的甜味蛋白具有价格上的优势。而无论是利用植物组织生产还是微生物生产,应用基因工程改造都能令其具有更高的甜度和更好的稳定性。

2016 年,重组蛋白市场全球价值 3.472 亿美元。根据 2018 年 consistent Market Insights 公司提供的信息,2017~2025 年全球重组蛋白市场复合年增长率预计为 6.2%^[2]。甜味蛋白具有甜度高,热量低,安全,且不会把非天然的代谢产物引入体内的优点。随着人们健康意识的增强,甜味蛋白未来将长期向好。我国目前减糖市场还属于起步探索阶段,作为功能糖和高倍甜味剂原料的主产国,国内企业发展减糖类产品具有较大的原料优势。制糖企业可参考国际减糖产品发展趋势及甜味剂的应用情况提前布局减糖市场^[7]。随着部分甜味蛋白被发达国家批准应用,未来甜味蛋白的国际需求将持续增大,关于甜味蛋白的研究也将越来越多。

甜味蛋白的研究方向一直集中在降低成本、提高转化率、提高稳定性、扩大高活性甜味蛋白的生产规模上。未来,继续提高甜度,降低生产成本将是主流方向。此外,为克服原材料的季节性,通过基因工程手段对植物甜味蛋白基因进行克隆,再导入微生物细胞表达,最后利用工业发酵法来大规模生产或将成为未来生产甜味蛋白的主流模式;另外,纯化方式的优化也是一大难点。在应用方面,未来也将使用多种甜味剂复合产品改良食品口感。同时,随着科技的进步,甜味蛋白的研究也将向更为微观,更为精细发展,现已开展对甜味蛋白活性位点的研究,也就是说,生

物工程技术和计算机技术设计相结合改良甜味蛋白也将成为趋势。

参考文献

- [1] 赵萌, 蔡成固, 刘波. 甜味蛋白 Monellin 及其基因工程[J]. 中国调味品, 2018, 43(7): 178-181. [ZHAO M, CAI C G, LIU B. Sweet protein monellin and its genetic engineering[J]. China Condiment, 2018, 43(7): 178-181.]
- [2] JEWEL A J, SIMEN A, PHILIPPE N, et al. Bioproduction of the recombinant sweet protein thaumatin: Current state of the art and perspectives[J]. Frontiers in Microbiology, 2019(10): 695.
- [3] 张泽生, 李雨蒙, 孙明哲, 等. 天然甜味蛋白索马甜的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2018(5): 186-189. [ZHANG Z S, LI Y M, SUN M Z, et al. Research progress of natural sweet protein thaumatin[J]. China Food Additives, 2018(5): 186-189.]
- [4] I FAUS. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 53(2): 145-151.
- [5] LIU B, JIANG H, WANG H Y, et al. Removal of the N-terminal methionine improves the sweetness of the recombinant expressed sweet-tasting protein brazzein and its mutants in *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 45(3): e13354.
- [6] 汪开治. 植物甜味蛋白和矫味蛋白生物技术研究开发现状和前景[J]. 生物技术通报, 2000(5): 43-46. [WANG K Z. Present situation and prospect of plant sweet protein and flavorful protein biotechnology[J]. Biotechnology Bulletin, 2000(5): 43-46.]
- [7] 陆婉瑶, 王健, 孟庆佳等. 减糖产品现状与发展趋势分析[J]. 甘蔗糖业, 2020, 49(4): 83-91. [LU W Y, WANG J, MENG Q J, et al. Analysis of current situation and development trend of sugar reduction products[J]. Sugarcane and Cane sugar, 2020, 49(4): 83-91.]
- [8] T-PING K, JOHN D, AARON G, et al. Structures of three crystal forms of the sweet protein thaumatin[J]. Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography, 1994(50): 813-825.
- [9] 毛建民. 甜味蛋白 (thumatin) 及其基因工程[J]. 周口师专学报, 1997, 14(4): 52-54. [MAO J M. Sweet protein (thumatin) and its genetic engineering[J]. Journal of Zhoukou Teachers College, 1997, 14(4): 52-54.]
- [10] LUPPO E, LAMMERT H, ROB K, et al. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*[J]. Gene, 1982, 18: 1-12.
- [11] SVETLANA A, MAURIZIO Z. Production and characterization of cross-reactive monoclonal antibodies to sweet proteins[J]. Life Sciences, 1994, 55(15), pp: 1187-1192.
- [12] LIU Q L, LI L, LIU T M, et al. Modification of the sweetness and stability of sweet-tasting protein monellin by gene mutation and protein engineering[J]. Bio Med Research International, 2016, pp: 3647173.
- [13] MUTHARASU G, SERVA P M. Identification of novel sweet protein for nutritional applications[J]. Bioinformation, 2011, 7(3): 112-114.
- [14] CHEN Z J, CAI H, LU F P, et al. High-level expression of a

- synthetic gene encoding a sweet protein, monellin, in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27: 1745–1749.
- [15] YANG L, ZHU K K, YU H F, et al. The flexible loop is a new sweetness determinant site of the sweet-tasting protein: Characterization of novel sweeter mutants of the single-chain monellin (MNEI)[J]. *Chemical senses*, 2019, 44(8): 607–614.
- [16] FEDERICA D, SERENA L, MASOUD D, et al. Probing structural changes during amyloid aggregation of the sweet protein MNEI[J]. *The FEBS Journal*, 2020, 287(13): 2808–2822.
- [17] SATORU N, YUTAKA M, KAZUYASU N, et al. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a heat-stable sweet protein, mabinlin II[J]. *Gene*, 1996, 181: 225–227.
- [18] TETSUYA M, NAOFUMI K. Developments in biotechnological production of sweet proteins[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102(5): 375–389.
- [19] GU W L, XIA Q Y, YAO J, et al. Recombinant expressions of sweet plant protein mabinlin II in *Escherichia coli* and food-grade *Lactococcus lactis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(4): 557–567.
- [20] AKRAM K N, AZAR S. *Saccharomyces cerevisiae* expression of brazzein, a small sweet-tasting protein in: An introduction for production of sweet yeasts[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2020, 27(10): 945–952.
- [21] FABRICE N, CHRISTINE B, NICOLAS P, et al. Comparison of different signal peptides for the efficient secretion of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Pichia pastoris*[J]. *Life*, 2021, 11(1): 46.
- [22] FARIBA M. ASSADI-PORTER, DAVID J, et al. Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 376(2): 252–258.
- [23] LEE H M, PARK S W, LEE S J, et al. Optimized production and quantification of the tryptophan-deficient sweet-tasting protein brazzein in *Kluyveromyces lactis*[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 49(8): 790–799.
- [24] DING M, GORAN H. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B[J]. *FEBS Letters*, 1994, 355: 106–108.
- [25] 郑伟伟, 赵萌, 刘波. 甜味蛋白 Brazzein 及其基因工程[J]. *中国调味品*, 2018, 43(3): 181–184. [ZHENG W W, ZHAO M, LIU B. Sweet protein brazzein and its genetic engineering[J]. *China Condiment*, 2018, 43(3): 181–184.]
- [26] NAGATA K, HONGO N, KAMEDA Y. The structure of brazzein, a sweet-tasting protein from the wild African plant *Pentadiplandra brazzeana*[J]. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 2013, 69: 642–647.
- [27] 张志国, 唐越, 孙晓燕, 等. 新型甜味剂——甜味蛋白[J]. *江苏调味副食品*, 2015(1): 9–12. [ZHANG Z G, TANG Y, SUN X Y, et al. A new sweetener——Sweet protein[J]. *Jiangsu Condiment and Subsidiary Food*, 2015(1): 9–12.]
- [28] YAMASHITA H, THEERASILP S, AIUCHI T, et al. Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein taste-modifying activity, curculin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(26): 15770–15775.
- [29] NAKAJIMA K, ASAKURA T, MARUYAMA J, et al. Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3716–3723.
- [30] GO I, RYOTA H, TAKAKO Y, et al. Safety assessment of miraculin using *in silico* and *in vitro* digestibility analyses[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 133: 110762.
- [31] KURIHARA K, BEIDLER L M. Mechanism of the action of tastemodifying protein[J]. *Nature*, 1969, 222: 1176–1178.
- [32] HIWASA T K, HIRAI T, KATO K, et al. From miracle fruit to transgenic tomato: mass production of the taste-modifying protein miraculin in transgenic plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(3): 513–525.
- [33] LAMPHEAR B J, BARKER D K, BROOKS C A, et al. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2004, 3(1): 103–114.
- [34] MASUDA T, KIGO S, MITSUMOTO M, et al. Positive charges on the surface of thaumatin are crucial for the multi-point interaction with the sweet receptor[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2018, 5: 10.
- [35] MASUDA T, OHTA K, MIKAMI B, et al. Atomic structure of the sweet-tasting protein thaumatin I at pH8.0 reveals the large disulfide-rich region in domain II to be sensitive to a pH change[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 419(1): 72–76.
- [36] GO I, RYOTA H, TAKAKO Y, et al. Differential sweetness of commercial sour liquids elicited by miracle fruit in healthy young adults[J]. *Food Science and Technology International*, 2012, 19(3): 243–249.
- [37] SUN H J, CUI M L, MA B, et al. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(2): 620–626.
- [38] ROBERT D H, HELENE L, SIMON H, et al. An improved process for the production of highly purified recombinant thaumatin tagged-variants[J]. *Food Chemistry*, 2017, 237: 825–832.
- [39] PEÑARRUBIA L, KIM R, GIOVANNONI J, et al. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants[J]. *Bio Technology*, 1992, 10: 561–564.
- [40] MORALEJO J, WATSON J, JEENES J, et al. A defined level of protein disulfide isomerase expression is required for optimal secretion of thaumatin by *Aspergillus awamori*[J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, 266: 246–253.
- [41] LOMBRAÑA M, MORALEJO J, PINTO R, et al. Modulation of *Aspergillus awamori* thaumatin secretion by modification of *bipA* gene expression[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 5145–5152.
- [42] FIRSOV A, SHALOIKO L, KOZLOV O, et al. Purification and characterization of recombinant supersweet protein thaumatin II from tomato fruit[J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 123: 1–5.
- [43] SUN H J, SAYAKA U, SHIN W, et al. A highly efficient

transformation protocol for micro-tom, a model cultivar for tomato functional genomics[J]. *Plant Cell Physiology*, 2006, 47(3): 426–431.

[44] YUN C R, KONG J N, CHUNG J H, et al. Secretory production of the sweet-tasting protein, brazzein, in *Kluyveromyces lactis* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(32): 6312–6316.

[45] SUGAYA T, YANO M, SUN H J, et al. Transgenic strawberry expressing a taste-modifying protein, miraculin[J]. *Plant Biotechnology*, 2008, 25: 329–333.

[46] FAUS I, PATIÑO C, RÍOJ L, et al. Expression of a synthetic gene encoding the sweet-tasting protein thaumatin in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 229(1): 121–127.

[47] SARAH D, KENNETH H M, IGNACIO F, et al. Refolding the sweet-tasting protein thaumatin II from insoluble inclusion bodies synthesised in *Escherichia coli*[J]. *Food Chemistry*, 2000, 71: 105–110.

[48] MIELE N A, DI MONACO R, DELL'AMURA F, et al. A preliminary study on the application of natural sweet proteins in agar-based gels[J]. *Journal of Texture Studies*, 2017, 48(2): 103–113.

[49] PARK Y J, HAN J E, LEE H, et al. Large-scale production of recombinant miraculin protein in transgenic carrot callus suspension cultures using air-lift bioreactors[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 140.

[50] PHAM N B, SCHÄFER H, WINK M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures[J]. *Biotechnology Journal*, 2012, 7(4): 537–545.

[51] CANCELLIERE R, LEONE S, GATTO C, et al. Metabolic effects of the sweet protein mnei as a sweetener in drinking water. a pilot study of a high fat dietary regimen in a rodent model[J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2643.

[52] YOUNES M, AQUILINA G, CASTLE L, et al. Re-evaluation of thaumatin (E 957) as food additive[J]. *EFSA Journal*, 2021, 19(11): e06884.

[53] HAGIWARA A, YOSHINO H, SANO M, et al. Thirteen-

week feeding study of thaumatin (a natural proteinaceous sweetener), sterilized by electron beam irradiation, in Sprague-Dawley rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43(8): 1297–1302.

[54] BOUMAIZA M, COLARUSSO A, PARRILLI E, et al. Getting value from the waste: recombinant production of a sweet protein by *Lactococcus lactis* grown on cheese whey[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 126.

[55] KELADA K D, TUSÉ D, GLEBA Y, et al. Process simulation and techno-economic analysis of large-scale bioproduction of sweet protein thaumatin II[J]. *Foods*, 2021, 10: 4.

[56] TSCHANNEN M P, GLÜCK U, BIRCHER A J, et al. Thaumatin and gum arabic allergy in chewing gum factory workers[J]. *American Journal of Industrial Medicine*, 2017, 60(7): 664–669.

[57] SUNG H K, CHUI H K, ROSALIND K, et al. Redesigning a sweet protein: increased stability and renaturability[J]. *Protein Engineering*, 1989, 2(8): 571–575.

[58] DANIELA C, SERENA L, RACHELE T, et al. High-level production of single chain monellin mutants with enhanced sweetness and stability in tobacco chloroplasts[J]. *Planta*, 2018, 248(2): 465–476.

[59] CAI C, LI L, LU N, et al. Expression of a high sweetness and heat-resistant mutant of sweet-tasting protein, monellin, in *Pichia pastoris* with a constitutive GAPDH promoter and modified N-terminus[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(11): 1941–1946.

[60] JIA L Q, TU T Y, HUAI Q Q, et al. Correction: Enhancing monellin production by *Pichia pastoris* at low cell induction concentration via effectively regulating methanol metabolism patterns and energy utilization efficiency[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0201085.

[61] LEONE S, SANNINO F, TUTINO M L, et al. Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 106.

[62] PARK S W, KANG B H, LEE H M, et al. Efficient brazzein production in yeast (*Kluyveromyces lactis*) using a chemically defined medium[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(4): 913–925.