

# 甜味蛋白质基因工程与分子改性研究进展

卢尚阳<sup>1#</sup>, 常诗瑜<sup>2#</sup>, 王语晴<sup>1</sup>, 刘波<sup>1\*</sup>

1 齐鲁工业大学(山东省科学院) 食品科学与工程学院, 山东 济南 250353

2 中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266101

卢尚阳, 常诗瑜, 王语晴, 刘波. 甜味蛋白质基因工程与分子改性研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 559-573.

LU Shangyang, CHANG Shiyu, WANG Yuqing, LIU Bo. Advances in genetic engineering and molecular modification of sweet-tasting proteins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 559-573.

**摘要:** 甜味蛋白质由于具有高甜味、低热量、安全无毒等特点, 因此在食品与饮料等领域有较强的应用价值。到目前为止, 已从天然植物中获得 8 种天然甜味蛋白。本文对这 8 种甜味蛋白的甜味性质及其甜味产生的分子机制进行了介绍, 并重点阐述了莫内林(monellin)、植物甜蛋白(brazzein)和索马甜(thaumatin)这 3 种代表性甜味蛋白的基因工程、异源表达与分子改性进展, 对其在不同宿主内的表达产率及甜味性质进行了总结分析, 并对甜味蛋白的研究、应用和产业化发展进行了展望, 为新型蛋白类甜味剂的研究与开发提供了借鉴与参考。

**关键词:** 甜味蛋白质; 基因工程; 异源表达; 分子改性; 甜味受体

## Advances in genetic engineering and molecular modification of sweet-tasting proteins

LU Shangyang<sup>1#</sup>, CHANG Shiyu<sup>2#</sup>, WANG Yuqing<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1\*</sup>

1 School of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, Shandong, China

2 Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

**Abstract:** Sweet-tasting proteins demonstrate application potential in foods and beverages due to their high sweetness, low calorie, and non-toxicity. So far, eight natural sweet-tasting proteins have been obtained from natural plants. This paper briefs the sweetness properties of the eight proteins and the molecular mechanism of the sweetness, reviews the progress in the genetic engineering, heterologous expression, and molecular modification of three

资助项目: 国家自然科学基金(31970935)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970935).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: ertrdfgg@qlu.edu.cn

Received: 2024-02-19; Accepted: 2024-05-27; Published online: 2024-06-07

representative sweet-tasting proteins (monellin, brazzein, and thaumatin), and summarizes their expression yields in different hosts and sweetness properties. Lastly, this paper prospects the research, application, and industrial development of sweet-tasting proteins. This review provides a reference for further research and development of new proteinaceous sweeteners.

**Keywords:** sweet-tasting protein; genetic engineering; heterologous expression; molecular modification; sweet taste receptor

甜味蛋白质是一类具有超强甜味的大分子蛋白类甜味剂,最初发现于非洲热带植物的果实中。相对于目前食品中常用的蔗糖、糖精钠、甜菊糖苷等甜味剂,甜味蛋白质具有空间体积大、结构复杂、相对分子量高、甜味强度高(可达同质量蔗糖甜度的2 000–3 000倍以上)等特点<sup>[1]</sup>。现代社会人们对于蔗糖、葡萄糖等糖类甜味剂的过度消费和依赖导致了糖尿病、肥胖症和牙齿疾病患病率升高,而对阿斯巴甜、糖精钠、三氯蔗糖等化学合成甜味剂的使用也同样会对人体健康产生潜在风险。甜味蛋白质由于具有天然、安全、绿色、富含营养(氨基酸)等特点,被认为是未来有望替代蔗糖的最有潜力的新型甜味剂之一<sup>[2]</sup>。

迄今已发现的甜味蛋白质主要有8种,分别为非洲奇果蛋白(miraculin)、莫内林(monellin)、索马甜(thaumatin)、马槟榔甜蛋白(mabinlin)、倍他丁(pentadin)、仙茅甜蛋白 I(curculin)、仙茅甜蛋白 II (neoculin)和植物甜蛋白(brazzein)<sup>[3-10]</sup>。其中,非洲奇果蛋白与仙茅甜蛋白 I 这2种蛋白自身无甜味但具有甜味调节功能,它们能将酸味觉变为甜味(一般将其也归类为甜味蛋白质);植物甜蛋白、莫内林、马槟榔甜蛋白、索马甜和倍他丁5种甜味蛋白本身有甜味;而仙茅甜蛋白 II 蛋白兼具上述两类蛋白质的甜味特性。

虽然甜味蛋白质被认为是未来极具潜力的“代糖型”甜味剂,但是至今尚未实现其在食品与饮料等行业中的较大规模商业化使用,其

主要制约因素有2点:(1)甜味蛋白质从植物组织中提取成本高而产量少,造成其价格居高不下(每kg达数千元以上);(2)大部分甜味蛋白质具有一定的后余味,且对高温的耐受性和稳定性较差,从而造成运输、保藏等环节的困难<sup>[11]</sup>。因此,利用分子改造(突变体)与基因工程的方法,对甜味蛋白质进行分子改性和异源表达,是提高其产量与应用性能的有效途径<sup>[12]</sup>。本文综述了甜味蛋白质及其突变体在真菌、细菌以及植物等宿主中的基因工程与重组表达,并对未来甜味蛋白质的研究与应用进行了展望。

## 1 甜味蛋白质概述

自第一种甜味蛋白质——非洲奇果蛋白被发现后,已有数种甜味蛋白质被纯化鉴定,但仅有少数几种应用于食品等行业。例如,目前仅有莫内林和索马甜在欧美一些国家被批准商业化使用,我国也将索马甜(又称祝马丁)列为可安全使用的食品添加剂<sup>[13]</sup>。在甜味蛋白质结构与功能关系、分子改性等基础研究领域,由于蛋白质的甜味性质差异、基因工程以及异源表达的实验难度等原因,目前的研究主要集中于莫内林、植物甜蛋白、索马甜这3种甜味蛋白质。

### 1.1 莫内林

莫内林最初分离自非洲热带植物应乐果(*Dioscoreophyllum cumminsii* Diels)的果实中,其甜味强度约为同质量蔗糖甜度的3 000倍<sup>[13]</sup>。天然的莫内林蛋白由分别含有44个氨基酸和50个氨基酸的2条肽链以非共价键组成,其分

子量约为 13 000 Da<sup>[7]</sup>。通过在该蛋白 2 条链之间插入 2 个氨基酸残基 Gly-Phe 构建单链莫内林蛋白(single-chain monellin, MNEI), 可提高其热稳定性<sup>[13]</sup>。此外, 利用 X 射线衍射与核磁共振等方法, 天然莫内林(PDB 登录号: 4MON)及其单链蛋白(PDB 登录号: 2O9U)的三维结构均已被解析, 二者均具有由 5 个片段组成的  $\beta$  折叠包裹于一个  $\alpha$  螺旋的折叠方式<sup>[13-14]</sup>。

## 1.2 植物甜蛋白

植物甜蛋白来源于西非植物忘忧果(*Pentadiplandra brazzeana* Baillon)的果实, 是迄今发现的氨基酸数目最少(54 个)、分子量最小(约 6 500 Da)、热稳定性最高的甜味蛋白质; 根据其 N 末端是否含有焦谷氨酸残基(pyroglutamic acid, pGlu), 可将其分成 2 种形式, 其中, 缺少 pGlu 形式(*des*-pGlu)的植物甜蛋白的甜度是同质量蔗糖的约 2 000 倍<sup>[3]</sup>。该甜味蛋白质的空间结构已被解析(PDB 登录号: 4HE7), 其折叠形式为 1 个短的  $\alpha$  螺旋和 3 个反平行片段组成的  $\beta$  折叠<sup>[6]</sup>。此外, 该蛋白质结构的一个显著特征是分子内存在 8 个半胱氨酸形成的 4 个二硫键, 从而提高了其稳定性<sup>[13]</sup>。

## 1.3 索马甜

索马甜蛋白来源于热带植物西非竹芋(*Thaumatococcus daniellii* Benth)的果实, 包含 207 个氨基酸, 分子量约为 22 000 Da, 其甜度约为同质量蔗糖的 1 600 倍; 该蛋白质氨基酸序列存在个别的变异位点, 据此可将其分为 2 种主要形式 I 和 II 以及 3 种次要形式 a, b, c; 其中, 索马甜蛋白 I 形式分子内包含 8 个二硫键, 其空间结构(PDB 登录号: 3AL7 与 2VHK)由 3 个结构域组成: 一个由 11 个  $\beta$  折叠片段组成的三明治结构、一个较大的二硫键富集区域以及一个小的二硫键区域<sup>[9]</sup>。索马甜蛋白已被包括我国在内的多个国家批准使用<sup>[13]</sup>。

## 1.4 其他甜味蛋白质

马槟榔甜蛋白、仙茅甜蛋白 II 以及倍他丁是其他 3 种自身具有甜味的蛋白。值得一提的是, 马槟榔甜蛋白来源于我国云南省天然植物马槟榔(*Capparis masaikai* Lev1)的种子, 甜度约为同质量蔗糖的 100 倍, 且具有较好的热稳定性; 与索马甜类似, 该甜味蛋白具有 5 种同工蛋白, 其中马槟榔甜蛋白 II 的结构已被解析(PDB 登录号: 2DS2)<sup>[15]</sup>。但是, 关于该蛋白质分子改性的研究较少, 仅有马槟榔甜蛋白 II 在大肠杆菌和食品级乳酸菌中表达的报道<sup>[16]</sup>。

仙茅甜蛋白 I 由日本科学家山下春幸从马来西亚的无茎草本植物宽叶仙茅(*Curculigo latifolia*)的果实中分离得到, 为 2 个具有 114 氨基酸组成的亚基构成的同源二聚体, 分子量为 14 600 Da, 具有明显的甜味调节功能<sup>[17]</sup>。关于该蛋白质的研究报道主要集中在其异构形式(异源二聚体, 仙茅甜蛋白 II)与其甜味性质(甜味感知和甜味调节功能)的关系<sup>[18]</sup>。

甜味蛋白质倍他丁的来源与植物甜蛋白相同, 甜度约为同质量蔗糖的 500 倍<sup>[19]</sup>, 但截至目前关于该蛋白质的研究报道较少。

甜味蛋白质的来源、甜度、分子量及其分子改性等信息总结于表 1。

## 2 甜味蛋白质呈现甜味的分子机制

前期研究表明, 甜味觉由位于口腔味蕾细胞膜上的 G 蛋白偶联受体——甜味受体 Tas1R2/Tas1R3 所介导, 各种甜味分子通过与受体结合从而激活受体, 进而触发细胞内一系列信号转导过程(如与受体偶联的 G 蛋白的激活、磷脂酶  $\beta 2$  活化、钙离子的释放等), 从而产生甜味感觉<sup>[56]</sup>。其中, 甜味分子如何与受体相互作用并激活受体, 是引发甜味感知的决定性步骤<sup>[56]</sup>。

表 1 各种甜味蛋白质及其性质

Table 1 Various sweet-tasting proteins and their properties

Sweet-tasting proteins	Source	Sweetness (times than sucrose)	Molecular weight (Da)	Structure (PDB number)	Stability	Mutants with improved sweetness	References
Monellin (natural and single-chain monellin)	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>	3 000	13 000	2O9U, 4MON	Loss of activity after 6 h at 65 °C	E2N, E2M, E2K, C41A, E50N, E50M, E50K, Y65R, Q28K/C41S/Y65R, E23Q/Q28K/C41S/Y65R	[3,7,14, 20-35]
Brazzein ( <i>des</i> -pGlu type)	<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	2 000	6 500	4HE7, 1BRZ	Keep activity after 4 h at 80 °C	D29K, D29N, H31A, H31R, D40K, E41A, E41K, E41R, D50K, E53R, H31R/E36D, H31R/E41, E36D/E41A, H31R/E36D/E41A	[1,3,6,8,10, 36-47]
Thaumatococcosin (I and II types)	<i>Thaumatococcus daniellii</i>	1 600	22 200	3AL7, 2VHK	Keep activity after 4 h at 100 °C	D21N	[9,48-54]
Mabinlin (II type)	<i>Capparis masakakai</i>	100	12 400	2DS2	Keep activity after 48 h at 80 °C	Nr	[5,15-16]
Curculin (I type)	<i>Curculigo latifolia</i>	Change sour to sweet taste	14 600	2DPF	Keep activity <50 °C	Nr	[17-18]
Miraculin	<i>Richadella dulcifica</i>	Change sour to sweet taste	24 600	Nr	Keep activity <50 °C	Nr	[55]
Neoculin (curculin II)	<i>Curculigo latifolia</i>	500, change sour to sweet taste	12 500	2D04	Nr	Nr	[17-18]
Pentadin	<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	500	12 000	Nr	Nr	Nr	[19]

Nr: No data reported.

迄今为止,许多小分子天然甜味剂与化学合成甜味剂(如蔗糖、糖精、阿斯巴甜、甜蜜素等)与甜味受体结合的方式已经阐明<sup>[56]</sup>。然而,尚不清楚对于具有较大空间体积与分子量的甜味蛋白质如何与受体结合并激活受体。Masuda等<sup>[48]</sup>基于甜味蛋白质的结构分析、分子模拟以及突变体性质研究,提出了甜味蛋白质与甜味受体相互作用的“楔形物模型”,即甜味蛋白质通过长距离信号转导,结合于甜味受体 2 个异源单体 Tas1R2 和 Tas1R3 细胞膜外区域组成的口袋,而甜味蛋白质表面氨基酸所带的正电荷

与受体表面氨基酸所带的负电荷之间的静电互补是二者相互作用的结构基础(图 1)。然而,由于甜味受体与甜味蛋白结合的复合体的空间结构尚未阐明,上述模型仍需进行进一步的实验验证。

值得关注的是,近年来随着冷冻电镜与人工智能技术的快速发展,甜味受体的结构解析领域也有了较大进展,从而为深入研究甜味蛋白质与甜味受体的相互作用机理提供了借鉴。例如,谷歌 AlphaFold 已预测了人甜味受体 Tas1R2/Tas1R3 的空间结构。此外,通过 X 射

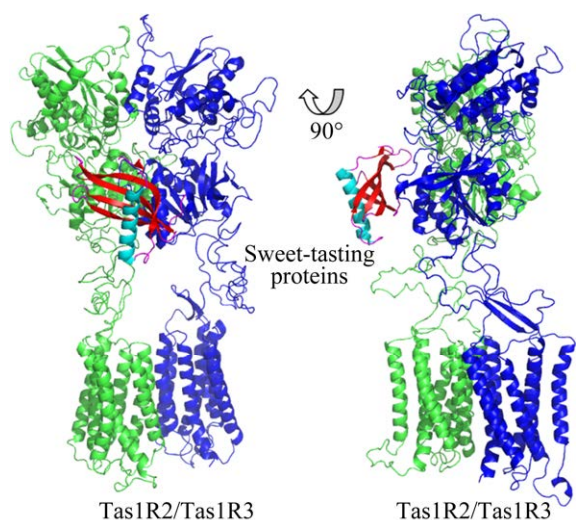


图 1 甜味蛋白质与甜味受体 Tas1R2/Tas1R3 结合及相互作用示意图

Figure 1 Schematic diagram of binding and interaction between sweet-tasting protein and sweet taste receptor Tas1R2/Tas1R3.

线衍射以及近年来发展迅速的冷冻电镜技术, 已获得青鳉鱼(medaka fish)甜味受体的胞外结构域以及果蝇(drosophila)、家蚕(silkworm)甜味受体的三级结构<sup>[57-59]</sup>。相信随着理论与技术的不断发展, 对于人类甜味蛋白质与甜味受体的相互作用机制的认识与理解会愈加深入, 从而最终揭示甜味蛋白质甜味感知的分子起源。

### 3 甜味蛋白质分子改性

甜味蛋白质分子改性是通过蛋白质工程与定点突变技术, 改变其部分氨基酸序列, 从而优化其甜味强度与稳定性等性质, 扩大其应用范围并提高应用价值。目前, 对于甜味蛋白质甜味强度的优化策略主要基于上述“楔形物模型”, 即通过改变甜味蛋白表明氨基酸的电荷属性, 从而影响其与甜味受体的相互作用及甜味性质<sup>[60]</sup>。下文分别对在分子改性方面研究报道较多的 3 种代表性甜味蛋白质莫内林、植物甜蛋白、索马甜进行介绍。

#### 3.1 莫内林分子改性

莫内林因其甜味口感优良、易于异源表达等原因, 是目前进行分子设计改造较多的甜味蛋白质之一<sup>[14]</sup>。基于莫内林和人甜味受体 Tas1R2/Tas1R3 结合的“楔形物模型”, 研究者对天然或单链莫内林蛋白进行了分子设计改造, 即将其表面的带负电荷或中性氨基酸残基(如 D、E、Y 等)变为带正电荷氨基酸(如 H、R、K 等), 从而增加其与甜味受体表面带负电荷氨基酸的结合能力, 进而增强受体的激活程度并提高甜味强度<sup>[60]</sup>。

意大利学者将单链莫内林蛋白表面的 Y65 残基突变为带正电荷的氨基酸 R, 发现其甜味度是未突变野生型蛋白的 1.6 倍<sup>[20]</sup>。本课题组将其 N 末端 E2 残基分别突变为 N、M、K 后, 其甜味阈值(测试者能够品尝到该蛋白甜味的最低浓度)从 1.10  $\mu\text{g/mL}$  下降至 0.31–0.35  $\mu\text{g/mL}$ , 即甜味强度提高了 3 倍左右<sup>[21]</sup>。本课题组进一步将位于该蛋白柔性环(flexible loop)区域的 E50 残基分别突变为 N、M、K 后, 其甜味强度提高了 2.5 倍左右<sup>[22]</sup>。这说明消除莫内林蛋白表面的带负电荷氨基酸或者增强带正电荷氨基酸, 可显著提高其甜味。此外, 国外有学者构建的该蛋白质的 2 个多重突变体 Q28K/C41S/Y65R 和 E23Q/Q28K/C41S/Y65R 的甜味强度相比于野生型蛋白, 分别提高了约 1.5 倍和 2.5 倍<sup>[23]</sup>。以上研究结果表明, 消除甜味蛋白质表面特定的带负电荷残基或增加正电荷残基比重能够显著提高其甜味强度。

#### 3.2 植物甜蛋白分子改性

由于植物甜蛋白分子量小、结构相对简单, 研究人员已构建数个该蛋白质的突变体并对其甜味性质进行了评价。结果表明, 与莫内林类似, 植物甜味蛋白分子表面的带电荷氨基酸对其甜味性质具有重要影响, 如突变体 D29K、

D29N、H31A、E41R、E41A、D50K、E53R 等的甜味强度为突变前野生型蛋白的 2 倍左右<sup>[36-38]</sup>, 而 H31R、D40K、E41K 突变体的甜味度可达野生型蛋白的 3 倍<sup>[39]</sup>。此外, 韩国学者构建了该蛋白质的 3 种双重突变体 H31R/E36D、H31R/E41A 以及 E36D/E41A, 发现其甜度均高于野生型蛋白和单突变体 H31R、E36D 和 E41A, 其中前 2 种双重突变体的甜味强度可达野生型蛋白的 6 倍以上。进一步基于这 3 个位点的三重突变体 H31R/E36D/E41A 的甜度可提高至野生型蛋白约 12 倍<sup>[40]</sup>。据此, 研究人员认为这 3 个氨基酸位点对于 brazzein 的甜味具有协同组合效应, 并提出甜味蛋白质对于甜味受体的结合存在多点结合模式(multiple sites binding mode)<sup>[40-41]</sup>。

基于分子突变结果(包括导致甜味度下降的突变位点), 可将决定植物甜蛋白甜味度的关键氨基酸分为 3 个区域: 39-44 位氨基酸组成的环区域; N 末端和 C 末端及其附近的 E36 残基和环区域; 9-19 位残基组成的环区域<sup>[42]</sup>。植物甜蛋白大部分突变体结果符合“楔形物模型”, 即甜味蛋白质结构表面的带电荷氨基酸对于其甜味具有重要影响<sup>[61]</sup>。此外, 对于突变体性质和结构的分析表明, 甜味蛋白质具有柔性构象的环区域氨基酸的改变往往对于其甜味具有明显的作用, 说明位于柔性环区域的氨基酸可能因其构象的可塑性, 更有利于其与受体的结合和相互作用, 从而激活受体<sup>[60]</sup>。

### 3.3 索马甜蛋白分子改性

对索马甜蛋白的序列分析以及酶联免疫吸附实验结果表明, 2 个弹性的环区域 K19-R29 以及 C77-P84 可能是决定其甜味性质的关键区域<sup>[49]</sup>。该甜味蛋白质因已经商品化且异源表达程序繁琐, 故对其分子突变改性的研究相对较少, 迄今仅发现一种索马甜蛋白甜味明显增强

的突变体 D21N, 其甜味强度约为野生型蛋白甜度的 1.6 倍<sup>[50]</sup>。此外, 对索马甜蛋白分子表面的带正电荷氨基酸如 K49、K67、K106、K137 与 R82 等的突变可显著导致其甜味度的下降, 说明这些氨基酸参与了该蛋白质和甜味受体的相互作用, 符合“楔形物模型”对于甜味蛋白质甜味产生机制的解释<sup>[62-63]</sup>。

对于索马甜蛋白分子改性的另一个重要进展是对其关键基团的化学修饰。例如, 将其分子内的 4 个赖氨酸乙酰化后, 其甜味完全丧失<sup>[64]</sup>; 将天冬氨酸酰胺化后, 其甜味度提高, 味觉延迟并有后味; 而将甲硫氨酸烷基化后, 其甜味更像蔗糖<sup>[13]</sup>。此外, 索马甜蛋白的另外一个特性是与其他食品添加剂具有明显的复配效果, 如日本生产的一种食品“San Sweet T-100”即是通过添加丙氨酸、食用酸等来缩短索马甜蛋白的甜味持续时间, 并可提高其甜味强度<sup>[13]</sup>。

以上结果说明用“楔形物模型”即甜味蛋白质与受体之间的电荷互补性(charge complementarity)解释甜味蛋白质甜味产生的机制具有一定的合理性<sup>[61]</sup>。但需要指出的是, 大量突变体实验表明, 并非所有甜味蛋白质表面的带电荷氨基酸的改变均能影响其甜味, 如莫内林蛋白某些位点的负电荷残基 E22、E23 与 E48 变为带正电荷或中性氨基酸后, 其甜味强度并未增加, 说明甜味蛋白质与受体结合的界面具有“非均一性”, 即决定其甜味性质的仅为部分关键氨基酸残基<sup>[65]</sup>。另一方面, 由于甜味蛋白质和甜味受体的具体结合位点及方式尚不清楚, 因此, 目前所采用的突变策略仍存在一定的盲目性。为了更好地提高突变效率, 利用近年来发展迅速的人工智能与计算机模拟甜味蛋白质和甜味受体的相互作用, 进行大规模突变体的筛选, 并结合甜味感官评价和甜味受体细胞学水平功能分析对甜味蛋白质突变体的性质进行研究, 可

能会获得更有价值的实验结果。

## 4 甜味蛋白质的稳定性

大部分甜味蛋白质的热稳定性普遍较差,例如天然的莫内林蛋白在 50 °C 即活性下降,增加了运输、储藏及灭菌处理的难度,限制了其大规模广泛应用<sup>[13,66]</sup>。植物甜蛋白和索马甜蛋白因其分子内含有数个二硫键而具有较高的热稳定性,故针对甜味蛋白质稳定性的分子改性多集中于莫内林蛋白。

天然的甜味蛋白质莫内林由 2 个亚基(A 链和 B 链)构成,将以非共价键(氢键和疏水作用)结合的 A 链和 B 链通过共价键连接起来,构建单链蛋白,其热稳定性由 50 °C 提高到 65 °C (蛋白质开始变性的温度),说明甜味蛋白质分子内氨基酸之间的连接方式及其作用力对于其热稳定性具有重要影响<sup>[67]</sup>。研究结果表明,将单链甜味蛋白质莫内林分子内部带负电荷谷氨酸残基 E23 分别突变为不带电荷的 A、L、F、W 等氨基酸后,其热稳定性提高约 10 °C,表明蛋白质内部疏水区域关键残基的离子化状态与热稳定性密切相关<sup>[21,68]</sup>。此外,Leone 等<sup>[23]</sup>构建了甜味蛋白莫内林四重突变体 E23Q/Q28K/C41S/Y65R,其热稳定性进一步提高达到 77.8 °C ( $T_m$  值)。结构解析表明,E23Q 突变导致该残基构象改变,并与 Y29 和 G30 形成新的氢键,进而触发突变的 K28 残基侧链与 N90 残基形成氢键,形成一个相对稳定和封闭的氢键网络,从而提高其稳定性<sup>[23]</sup>。这说明甜味蛋白质分子内关键残基之间的相互作用力组织方式对于热稳定性具有重要影响<sup>[60]</sup>。

植物甜蛋白的热稳定性明显高于莫内林,达到 80 °C,结构分析表明,在该蛋白分子内含有 8 个半胱氨酸构成的 4 个二硫键,对于维持其热稳定性起关键作用<sup>[39]</sup>。因此,增加甜味蛋

白质莫内林分子内二硫键的数目,可能是将来提高其热稳定性的关键策略之一<sup>[24]</sup>。另外,甜味蛋白质索马甜的甜味在高温环境与酸性条件下能够保持,但在 pH 大于 7 时丧失<sup>[69]</sup>。研究表明,蛋白质的柔性与其热稳定性显著相关,并且在加热条件下该蛋白质的稳定性受溶剂中的成分(如烷基没食子酸)及含量影响<sup>[70]</sup>。

甜味蛋白质的稳定性是目前制约其在食品与饮料等行业中广泛应用的关键问题。虽然部分甜味蛋白质已经在 70–80 °C 具有热稳定性,但距离其在食品工业应用的要求仍有一定差距<sup>[71]</sup>。如能将部分甜味蛋白的热稳定性提高到接近 100 °C,则其应用范围会显著增加。因此,阐明影响甜味蛋白质热稳定性的分子机制,并通过分子改性进一步提高其热稳定性,是目前甜味蛋白质研究领域重要而亟待解决的研究课题。另外,目前提高甜味蛋白质稳定性的方法和策略尚显单一,仅是通过对其结构分析从而进行局部突变,将来可尝试多种分子改造与修饰方法结合起来以提高其稳定性,如多聚化、烷基化、乙酰化或偶联配体蛋白等。最后,需要指出的是,必须同时兼顾甜味蛋白质甜味度的优化和稳定性的提高,才能提供满足市场需求的新型甜味蛋白质产品。

## 5 甜味蛋白质的异源表达

甜味蛋白质因其优越的甜味性质与应用潜力而受到学术界和产业界的广泛关注,迄今为止已有数种甜味蛋白质分别在细菌、真菌、植物以及动物细胞中进行异源表达。总体来说,由于载体、宿主、诱导表达条件等各种因素的差异,甜味蛋白质的重组表达产量也存在较大差异。下文分别对主要甜味蛋白质的异源表达进行介绍。

### 5.1 莫内林重组表达

Chen 等<sup>[25]</sup>与 Aghera 等<sup>[26]</sup>分别构建了包含



莫内林编码基因的 pET-22b 和 pET-DUET 质粒, 并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)中表达, 其产量分别达到 43 mg/g 细胞干重(dry cell weight, DCW)与 40 mg/L。Chen 等<sup>[27]</sup>进一步利用大肠杆菌-酵母穿梭质粒 pYESMTA 和 GAL1 启动子及  $\alpha$  信号肽表达系统, 将单链莫内林蛋白在酿酒酵母中成功表达, 产量达到 410 mg/L, 但没有评价其甜味强度。Liu 等<sup>[28]</sup>也在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中成功表达了该重组蛋白, 其产量达到 675 mg/L, 但未检测到重组蛋白的甜味。此外, Chen 等<sup>[29]</sup>利用构建重组质粒 pHPC, 在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中表达了该甜味蛋白质, 其产量达到 290 mg/L, 但重组蛋白的甜味品质未见报道。日本科学家 Kondo 等<sup>[30]</sup>在食品级产朊假丝酵母(*Candida utilis*)表达了莫内林重组蛋白, 产量为 70 mg/g DCW, 且其甜味强度与从植物中提取的天然甜味蛋白质相比未发生明显变化。Leone 等<sup>[31]</sup>利用乙酸作为碳源底物, 在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中表达单链重组莫内林蛋白, 产量达到 180 mg/L。近年来, 有研究人员尝试将莫内林在黑曲霉(*Aspergillus niger*)中表达, 产量仅为 0.284 mg/L<sup>[32]</sup>。

本课题组根据大肠杆菌密码子偏好性, 对单链莫内林的编码基因进行优化, 在大肠杆菌 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 中表达该甜味蛋白, 并发现了甜味强度增强的突变体 C41A<sup>[33]</sup>。进一步通过对该蛋白编码基因的分子改造, 成功地在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中表达了甜味增强的突变体 E2N<sup>[34]</sup>。但是, 以上结果均未达到具有市场竞争力的甜味蛋白质 1 g/L 的异源表达产量<sup>[13,35]</sup>。因此, 利用基因工程等方法, 进一步提高甜味蛋白质莫内林的微生物异源表达产量, 对于促进该甜味蛋白质的广泛应用及产业化具有重要的意义。

## 5.2 植物甜蛋白重组表达

Berlec 等<sup>[43]</sup>按照大肠杆菌的密码子偏好性分别构建了包含标签序列和野生型植物甜蛋白编码基因的 pET-28a 质粒, 并在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中经 IPTG 诱导表达, 产量分别为 10 mg/L 和 35 mg/L; 随后进行感官分析评价, 得到纯化后的植物甜蛋白重组蛋白的甜度约是同质量蔗糖的 1 000 倍<sup>[43]</sup>。此外, Berlec 等<sup>[43]</sup>还构建了含有植物甜蛋白基因的 pMSP3456 质粒, 并在乳酸菌(*Lactococcus lactis*)中通过乳酸链球菌素(nisin)诱导进行表达, 但产率很低, 通过考马斯亮蓝染色无法检测, 只能通过 his6 抗体进行免疫印迹检测重组蛋白的存在。赵红玲等<sup>[44]</sup>构建了含有植物甜蛋白编码基因的 pPIC9K 穿梭质粒, 并将其转化到毕赤酵母(*P. pastoris*)GS115 中, 通过 IPTG 诱导表达, 目的蛋白产量达到 385 mg/L。此外, 韩国科学家 Jo 等<sup>[45]</sup>构建了含有植物甜蛋白基因的 pKLAC2 质粒, 并在乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)感受态细胞 GG799 中表达, 纯化后的重组蛋白产量约为 104 mg/L, 其甜度约为同质量蔗糖的 2 130 倍。另外, Lu 等<sup>[46]</sup>分别将野生型植物甜蛋白和三重突变(H31R/E36D/E41A)后的植物甜蛋白在转基因小鼠(*Mus musculus*)乳汁中进行乳腺特异性表达, 其中后者的产量达到 332 mg/L, 并通过甜度强度评价测得其甜度约为同质量蔗糖的 10 000 倍, 为同条件表达的野生型植物甜蛋白甜度的 8 倍。本课题组优化了植物甜蛋白的编码基因并在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)表达了该甜味蛋白, 并发现突变体 E9K 的甜度相比于野生型大幅提高, 约为野生型蛋白甜度的 1.5 倍<sup>[47]</sup>。由此推测, D50 位置可能是甜味蛋白与蛋白受体作用的关键位点, 它是引发甜味的必要氨基酸并可能与甜味受体的重要结构域结合<sup>[47]</sup>。



### 5.3 索马甜蛋白重组表达

鉴于索马甜蛋白已被批准在食品与生物工程等领域应用,该甜味蛋白已在细菌、真菌及植物中进行多种异源表达尝试。例如,Edens等<sup>[51]</sup>早在1982年便构建了含有索马甜蛋白基因并分别具有2个lacuv5调控子和1个*E. coli*色氨酸调控子的2种质粒pUR201和pUR301,并通过细菌特有核糖体结合位点进行翻译,在大肠杆菌中实现表达。后来,Masuda等<sup>[52]</sup>构建了含有索马甜编码基因的pPIC9K质粒,并在毕赤酵母(*P. pastoris*)中完成表达,表达量约为25 mg/L,并测得其在人体内的甜味阈值在50 nmol/L左右。使用毕赤酵母表达系统进行诱变研究不仅为感官分析提供了足够数量的样品,而且对理解索马甜蛋白的甜味感知机理也具有重要意义。孔建强等<sup>[53]</sup>利用基因工程技术,将分别克隆在2个不同载体上的索马甜蛋白基因连接成一条完整的cDNA,并将该cDNA克隆至载体pBI121,通过冻融法导入农杆菌,再转入烟草植株(*Nicotiana tabacum* L.),虽然在成熟烟草植株中检测到甜味蛋白目的基因,但并没有在转基因烟草中检测到表达的甜味蛋白。此外,国外还有将索马甜蛋白基因通过植物穿梭载体和农杆菌质粒在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中表达的报道<sup>[54]</sup>。

### 5.4 其他甜味蛋白质重组表达

中国科学家已将我国特有的马槟榔蛋白 II 在大肠杆菌和食品级乳酸乳球菌(*L. lactis*)中表达,他们将纯化的马槟榔蛋白 II 的 B 链进行包涵体复性,得到的甜味蛋白的甜味约为同质量蔗糖的100倍<sup>[16]</sup>。但是,该甜味蛋白的热稳定性较差<sup>[15-16]</sup>。此外,研究人员将甜味调节蛋白非洲奇果蛋白的基因导入米曲霉(*Aspergillus oryzae*)中,得到了具有甜味调节性质的目的蛋

白,产量为2 mg/L<sup>[55]</sup>。仙茅甜蛋白 I 和 II 也已在大肠杆菌中进行重组表达纯化,但该研究主要针对其结构与功能关系,并未涉及表达产量等方面<sup>[18]</sup>。除此之外,对于其他甜味蛋白的重组表达报道较少。表2总结了文献报道的各种甜味蛋白质在不同宿主内的重组表达结果。

甜味蛋白质的异源表达是当前食品和生物工程领域的研究热点,已在细菌、真菌、植物等多个宿主中尝试。利用微生物生产的甜味蛋白具有价格及产量上的优势,但其产品的安全性仍是亟待考虑并解决的问题,如某些微生物代谢的次生产物可能对人体具有潜在的危害。鉴于此,有研究人员提出食品安全级的解脂亚罗酵母(*Yarrowia lipolytica*)和马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)可能是更优越的表达宿主,但尚有待于进一步的实验验证<sup>[92]</sup>。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,前期研究中已获得部分性能优良的甜味蛋白,具有广阔的发展前景<sup>[13]</sup>。然而,甜味蛋白质在动物组织或器官(如动物细胞培养反应器等)中的表达却较少,仅有一种甜味蛋白质在小鼠中表达的报道<sup>[46]</sup>,期待更多的研究人员在此领域开展进一步的探索。

此外,关于甜味蛋白质的专利也日益增多,极大地促进了其商品化与产业化进程。例如,在专利数据库(<https://patents.qizhidao.com/>)分别以“monellin”“brazzein”“thaumatin”为关键词检索全球相关已授权专利,可分别得到1 115、602、2 424个结果,而以“甜蛋白”为关键词搜索可得到17 316个结果。近年来,许多国外企业将甜味蛋白质作为新兴产业发展产品进行研发,如以色列 Amai Proteins、美国 Joywell Foods、Sweegen、英国 Magellan Life Sciences 公司、美

表 2 甜味蛋白质在不同宿主中的异源表达

Table 2 Heterogeneous expression of sweet-tasting proteins in different hosts

Sweet-tasting proteins	<i>E. coli</i>	<i>B. Subtilis</i>	<i>L. lactis</i> / <i>K. lactis</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>C. utilis</i>	<i>A. Niger</i> / <i>A. oryzae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. tuberosum</i> / <i>S. lycopersicon</i>	<i>N. tabacum</i> / <i>Zea mays</i> / <i>Lactuca sativa</i>	<i>M. musculus</i>
Monellin	43 mg/g <sup>[25]</sup> 40 mg/L <sup>[26]</sup> 180 mg/L <sup>[31]</sup>	290 mg/L <sup>[29]</sup>	27 mg/g <sup>[72]</sup>	150 mg/L <sup>[34]</sup> 44 mg/L <sup>[73]</sup>	70 mg/g <sup>[30]</sup>	0.284 mg/L <sup>[32]</sup>	410 mg/L <sup>[27]</sup> 675 mg/L <sup>[28]</sup>	23.9 µg/g <sup>[74]</sup>	65–160 µg/g FW (Fresh weight) <sup>[75]</sup> 537.5 µg/g <sup>[78]</sup>	332 mg/L <sup>[46]</sup>
Brazzein	10 mg/L <sup>[43]</sup> 35 mg/L <sup>[43]</sup>		450 mg/L <sup>[76]</sup> 165 mg/L <sup>[77]</sup> 104 mg/L <sup>[45]</sup>	385 mg/L <sup>[44]</sup>			Nr <sup>[1]</sup>			
Thaumatococin	40 mg/L <sup>[79]</sup>	1 mg/L <sup>[80]</sup>	Nr <sup>[81]</sup>	25 mg/L <sup>[52]</sup>		5–7 mg/L <sup>[82]</sup> 50 µg/L <sup>[83]</sup>	140 mg/L <sup>[84]</sup>	Nr <sup>[70]</sup>	Nr <sup>[53]</sup>	
Mabinlin	59.1 mg/L <sup>[16]</sup>		2.72 mg/L <sup>[16]</sup>							
Curculin	Nr <sup>[18]</sup>									
Miraculin	Nr <sup>[85]</sup>					2 mg/L <sup>[55]</sup>	1.5 mg/L <sup>[86]</sup> 2 mg/L <sup>[87]</sup>	102.5 µg/g <sup>[88]</sup> 287 µg/g <sup>[89]</sup>	43.5 µg/g <sup>[90]</sup>	
Neoculin						2 mg/L <sup>[91]</sup>				

Nr: No data reported in the heterogeneous expression experiments. Blanks indicate no heterogeneous expression experiments performed. “/g” refers to DCW (dry cell weight) unless otherwise specified.

国农业合作社 Ocean Spray 等。另外, Roquette 和 Brain 生物技术公司已联合开展规模化生产植物甜蛋白, 并计划在短期内推向市场。

## 6 总结与展望

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<sup>[93-94]</sup>。另一方面, 为促进具有上述性能的甜味蛋白质规模化生产并走向市场, 进一步拓展甜味蛋白质的应用范围也是一个值得关注的课题, 除在食品、饮料等行业中的应用外, 其在营养学、医学、农业科学、材料学等领域也具有较大的应用潜力。此外, 除对现有已知的甜味蛋白质进行性质优化和应用开发外, 自然界中可能还有某些尚未发现的甜味蛋白质存在于某些天然野生植物的果实等器官或其他生物体中, 也有待于进一步地发掘与利用。例如, 在家禽蛋清和人体多种组织中分布广泛并含量丰富的一种胞壁质酶溶菌酶(lysozyme)也具有较高的甜度(约为蔗糖的 700 倍), 并能有效抑菌, 已广泛应用于生物工程、食品与医学等领域<sup>[95-96]</sup>。未来甜味蛋白质研究与应用的发展需要学术界与产业界的共同努力, 并依靠多学科如食品科学、生物化学、生物工程、生理学、神经科学和健康医学等的协同合作, 促进甜味蛋白质作为一种可靠的“代糖型”甜味剂走向市场, 促进人类饮食安全、营养与健康水平的提高<sup>[11,13,60]</sup>。

## REFERENCES

- [1] KAZEMI-NASAB A, SHAHPURI A. Expression of brazzein, a small sweet-tasting protein in *Saccharomyces cerevisiae*: an introduction for production of sweet yeasts[J]. Protein and Peptide Letters, 2020, 27(10): 945-952.
- [2] FREEMAN EL, WARD R, MURPHY MM, WANG TN, RYDER J. Comprehensive safety assessment of serendipity berry sweet protein produced from *Komagataella phaffii*[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2024, 147: 105562.
- [3] NOVIK TS, KOVESHNIKOVA EI, KOTLOBAY AA, SYCHEVA LP, KUROCHKINA KG, AVERINA OA, BELOPOLSKAYA MV, SERGIEV PV, DONTSOVA OA, LAZAREV VN, MAEV IV, KOSTYAEVA MG, EREMEEV AV, CHUKINA SI, LAGARKOVA MA. Sweet-tasting natural proteins brazzein and monellin: safe sugar substitutes for the food industry[J]. Foods, 2023, 12(22): 4065.
- [4] FARAG MA, REZK MM, HAMDY ELASHAL M, EL-ARABY M, KHALIFA SAM, EL-SEEDI HR. An updated multifaceted overview of sweet proteins and dipeptides as sugar substitutes; the chemistry, health benefits, gut interactions, and safety[J]. Food Research International, 2022, 162(Pt A): 111853.
- [5] LIU X, MAEDA S, HU Z, AIUCHI T, NAKAYA K, KURIHARA Y. Purification, complete amino acid sequence and structural characterization of the heat-stable sweet protein, Mabinlin II[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 211(1/2): 281-287.
- [6] NICHOLAS CHUA B, GUO WM, TENG WONG H, SIAK-WEI OW D, LENG HO P, KOH W, KOAY A, WONG FT. A sweeter future: using protein language models for exploring sweeter brazzein homologs[J]. Food Chemistry, 2023, 426: 136580.
- [7] LUCIGNANO R, SPADACCINI R, MERLINO A, AMI D, NATALELLO A, FERRARO G, PICONE D. Structural insights and aggregation propensity of a super-stable monellin mutant: a new potential building block for protein-based nanostructured materials[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 254(Pt 1): 127775.
- [8] ASSADI-PORTER FM, ACETI DJ, CHENG H, MARKLEY JL. 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.
- [9] MASUDA T, SUZUKI M, YAMASAKI M, MIKAMI B. Subatomic structure of orthorhombic thaumatin at 0.89 Å reveals that highly flexible conformations are crucial for thaumatin sweetness[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 703: 149601.
- [10] MING D, HELLEKANT G. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B[J]. FEBS Letters, 1994, 355(1): 106-108.
- [11] 郑建仙. 高效甜味剂[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009.
- [12] ZHENG JX. Intense Sweeteners[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009 (in Chinese).
- [13] TANG N, LIU JC, CHENG YQ. Potential improvement of the thermal stability of sweet-tasting proteins by structural calculations[J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128750.
- [14] 刘波. 甜味分子与甜味觉: 甜味化合物的结构、功能

- 及其作用机制[M]. 北京: 科学出版社, 2019.
- LIU B. Sweetening Molecules and Sweetness Perception: Structure, Function and Mechanism of Sweetening Compounds[M]. Beijing: Science Press, 2019 (in Chinese).
- [14] DELFI M, EMENDATO A, LEONE S, LAMPITELLA EA, PORCARO P, CARDINALE G, PETRACCONE L, PICONE D. A super stable mutant of the plant protein monellin endowed with enhanced sweetness[J]. *Life*, 2021, 11(3): 236.
- [15] LI DF, JIANG PH, ZHU DY, HU YL, MAX M, WANG DC. Crystal structure of Mabinlin II: a novel structural type of sweet proteins and the main structural basis for its sweetness[J]. *Journal of Structural Biology*, 2008, 162(1): 50-62.
- [16] GU WL, XIA QY, YAO J, FU SP, GUO JC, HU XW. 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.
- [17] YAMASHITA H, AKABANE T, KURIHARA Y. Activity and stability of a new sweet protein with taste-modifying action, curculin[J]. *Chemical Senses*, 1995, 20(2): 239-243.
- [18] KURIMOTO E, SUZUKI M, AMEMIYA E, YAMAGUCHI Y, NIRASAWA S, SHIMBA N, XU NC, KASHIWAGI T, KAWAI M, SUZUKI EI, KATO K. Curculin exhibits sweet-tasting and taste-modifying activities through its distinct molecular surfaces[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(46): 33252-33256.
- [19] van der WEL H, LARSON G, HLADIK A, HLADIK CM, HELLEKANT G, GLASER D. Isolation and characterization of pentadin, the sweet principle of *Pentadiplandra brazzeana* Baillon[J]. *Chemical Senses*, 1989, 14(1): 75-79.
- [20] REGA MF, Di MONACO R, LEONE S, DONNARUMMA F, SPADACCINI R, CAVELLA S, PICONE D. Design of sweet protein based sweeteners: hints from structure-function relationships[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 1179-1186.
- [21] ZHENG WW, YANG L, CAI CG, NI JF, LIU B. Expression, purification and characterization of a novel double-sites mutant of the single-chain sweet-tasting protein monellin (MNEI) with both improved sweetness and stability[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 143: 52-56.
- [22] YANG L, ZHU KK, YU HF, ZHANG XL, LIU B. 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.
- [23] LEONE S, PICA A, MERLINO A, SANNINO F, TEMUSSI PA, PICONE D. Sweeter and stronger: enhancing sweetness and stability of the single chain monellin MNEI through molecular design[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34045.
- [24] DITTLI SM, RAO HY, TONELLI M, QUIJADA J, MARKLEY JL, MAX M, ASSADI-PORTER F, MAILLET E. Structural role of the terminal disulfide bond in the sweetness of brazzein[J]. *Chemical Senses*, 2011, 36(9): 821-830.
- [25] CHEN ZJ, CAI H, LU FP, DU LX. High-level expression of a synthetic gene encoding a sweet protein, monellin, in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(22): 1745-1749.
- [26] AGHERA N, UDGAONKAR JB. Heterologous expression, purification and characterization of heterodimeric monellin[J]. *Protein Expression and Purification*, 2011, 76(2): 248-253.
- [27] CHEN ZJ, LI ZY, YU N, YAN LL. Expression and secretion of a single-chain sweet protein, monellin, in *Saccharomyces cerevisiae* by an  $\alpha$ -factor signal peptide[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(4): 721-725.
- [28] LIU J, YAN DZ, ZHAO SJ. Expression of monellin in a food-grade delivery system in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(13): 2646-2651.
- [29] CHEN ZJ, HENG C, LI ZY, LIANG XL, SHANGGUAN XC. Expression and secretion of a single-chain sweet protein monellin in *Bacillus subtilis* by *sacB* promoter and signal peptide[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(6): 1377-1381.
- [30] KONDO K, MIURA Y, SONE H, KOBAYASHI K, LIJIMA H. High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*[J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 453-457.
- [31] LEONE S, SANNINO F, TUTINO ML, PARRILLI E, PICONE D. 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.
- [32] LI K, ZHENG JW, YU LY, WANG B, PAN L. Exploration of the strategy for improving the expression of heterologous sweet protein monellin in *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(5): 528.
- [33] LIU QL, LI L, YANG L, LIU TM, CAI CG, LIU B. Modification of the sweetness and stability of sweet-tasting protein monellin by gene mutation and protein engineering[J]. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 3647173.
- [34] CAI CG, LI L, LU N, ZHENG WW, YANG L, LIU B. 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.
- [35] GRAMAZIO S, TRAUTH J, BEZOLD F, ESSEN LO, TAXIS C, SPADACCINI R. Light-induced fermenter production of derivatives of the sweet protein monellin is maximized in prestationary *Saccharomyces cerevisiae* cultures[J]. *Biotechnology Journal*, 2022, 17(8): e2100676.
- [36] WALTERS DE, CRAGIN T, JIN ZY, RUMBLEY JN, HELLEKANT G. Design and evaluation of new analogs of the sweet protein brazzein[J]. *Chemical Senses*, 2009, 34(8): 679-683.
- [37] LIM JK, JANG JC, KONG JN, KIM MC, KONG KH. Importance of Glu53 in the C-terminal region of

- brazzein, a sweet-tasting protein[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(9): 3202-3206.
- [38] JIN ZY, DANILOVA V, ASSADI-PORTER FM, MARKLEY JL, HELLEKANT G. Monkey electrophysiological and human psychophysical responses to mutants of the sweet protein brazzein: delineating brazzein sweetness[J]. *Chemical Senses*, 2003, 28(6): 491-498.
- [39] SINGARAPU KK, TONELLI M, MARKLEY JL, ASSADI-PORTER FM. Structure-function relationships of brazzein variants with altered interactions with the human sweet taste receptor[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2016, 25(3): 711-719.
- [40] LEE JW, CHA JE, JO HJ, KONG KH. Multiple mutations of the critical amino acid residues for the sweetness of the sweet-tasting protein, brazzein[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2/3): 1370-1373.
- [41] ASSADI-PORTER FM, MAILLET EL, RADEK JT, QUIJADA J, MARKLEY JL, MAX M. Key amino acid residues involved in multi-point binding interactions between brazzein, a sweet protein, and the T1R2-T1R3 human sweet receptor[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 398(4): 584-599.
- [42] JIN ZY, DANILOVA V, ASSADI-PORTER FM, ACETI DJ, MARKLEY JL, HELLEKANT G. Critical regions for the sweetness of brazzein[J]. *FEBS Letters*, 2003, 544(1/2/3): 33-37.
- [43] BERLEC A, JEVNIKAR Z, MAJHENIČ AČ, ROGELJ I, ŠTRUKELJ B. Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(1): 158-165.
- [44] 赵红玲, 陈劲春. 利用毕赤酵母表达植物甜蛋白(brazzein)的初步研究[J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2005, 32(2): 14-16, 20.  
ZHAO HL, CHEN JC. Secret expression of plant sweet-tasting protein brazzein in yeast *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology*, 2005, 32(2): 14-16, 20 (in Chinese).
- [45] JO HJ, NOH JS, KONG KH. Efficient secretory expression of the sweet-tasting protein brazzein in the yeast *Kluyveromyces fragilis*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2013, 90(2): 84-89.
- [46] LU R, LI XM, HU J, ZHANG Y, WANG YC, JIN L. Expression of a triple mutational des-pGlu brazzein in transgenic mouse milk[J]. *FEBS Open Bio*, 2022, 12(7): 1336-1343.
- [47] LIU B, JIANG H, WANG HY, YANG L. 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*, 2021, 45(3): e13354.
- [48] MASUDA T, OKUBO K, MURATA K, MIKAMI B, SUGAHARA M, SUZUKI M, TEMUSSI PA, TANI F. Subatomic structure of hyper-sweet thaumatin D21N mutant reveals the importance of flexible conformations for enhanced sweetness[J]. *Biochimie*, 2019, 157: 57-63.
- [49] SLOOTSTRA JW, de GEUS P, HAAS H, VERRIPS CT, MELOEN RH. Possible active site of the sweet-tasting protein thaumatin[J]. *Chemical Senses*, 1995, 20(5): 535-543.
- [50] MASUDA T, OHTA K, OJIRO N, MURATA K, MIKAMI B, TANI F, TEMUSSI PA, KITABATAKE N. A hypersweet protein: removal of the specific negative charge at Asp21 enhances thaumatin sweetness[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20255.
- [51] EDENS L, HESLINGA L, KLOK R, LEDEBOER AM, MAAT J, TOONEN MY, VISSER C, VERRIPS CT. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1982, 18(1): 1-12.
- [52] MASUDA T, TAMAKI S, KANEKO R, WADA R, FUJITA Y, MEHTA A, KITABATAKE N. Cloning, expression and characterization of recombinant sweet-protein thaumatin II using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(7): 761-769.
- [53] 孔建强, 赵琦, 杨奇志, 潘宁, 王振莲. 甜味蛋白 *thaumatin* 基因转入烟草的研究[J]. *西北植物学报*, 2004, 24(12): 2243-2249.  
KONG JQ, ZHAO Q, YANG QZ, PAN N, WANG ZL. Introduction of sweet-tasting protein *thaumatin* gene into tobacco through *Agrobacterium*-mediated system[J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2004, 24(12): 2243-2249 (in Chinese).
- [54] WITTY M. Preprothaumatin II is processed to biological activity in *Solanum tuberosum*[J]. *Biotechnology Letters*, 1990, 12(2): 131-136.
- [55] ITO K, ASAKURA T, MORITA Y, NAKAJIMA KI, KOIZUMI A, SHIMIZU-IBUKA A, MASUDA K, ISHIGURO M, TERADA T, MARUYAMA JI, KITAMOTO K, MISAKA T, ABE K. Microbial production of sensory-active miraculin[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 360(2): 407-411.
- [56] ZHAO XZ, LIU M, CUI M, LIU B. Multiple interaction modes between saccharin and sweet taste receptors determine a species-dependent response to saccharin[J]. *FEBS Open Bio*, 2022, 12(2): 494-499.
- [57] NUEMKET N, YASUI N, KUSAKABE Y, NOMURA Y, ATSUMI N, AKIYAMA S, NANGO E, KATO Y, KANEKO MK, TAKAGI J, HOSOTANI M, YAMASHITA A. Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15530.
- [58] GOMES JV, SINGH-BHAGANIA S, CENCI M, CHACON CORDON C, SINGH M, BUTTERWICK JA. The molecular basis of sugar detection by an insect taste receptor[J]. *Nature*, 2024, 629(8010): 228-234.
- [59] MA DM, HU MQ, YANG XT, LIU Q, YE F, CAI WJ, WANG Y, XU XM, CHANG SH, WANG RY, YANG W, YE S, SU NN, FAN MR, XU HX, GUO JT. Structural basis for sugar perception by *Drosophila* gustatory receptors[J]. *Science*, 2024, 383(6685): eadj2609.
- [60] ZHAO XZ, WANG CR, ZHENG Y, LIU B. New insight into the structure-activity relationship of

- sweet-tasting proteins: protein sector and its role for sweet properties[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 691368.
- [61] TEMUSSI PA. Determinants of sweetness in proteins: a topological approach[J]. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 2011, 24(6): 1033-1042.
- [62] OHTA K, MASUDA T, TANI F, KITABATAKE N. Introduction of a negative charge at Arg82 in thaumatin abolished responses to human T1R2-T1R3 sweet receptors[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 413(1): 41-45.
- [63] MASUDA T, KIGO S, MITSUMOTO M, OHTA K, SUZUKI M, MIKAMI B, KITABATAKE N, TANI F. 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.
- [64] van der WEL H, BEL WJ. Enzymatic properties of the sweet-tasting proteins thaumatin and monellin after partial reduction[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 104(2): 413-418.
- [65] ESPOSITO V, GALLUCCI R, PICONE D, SAVIANO G, TANCREDI T, TEMUSSI PA. The importance of electrostatic potential in the interaction of sweet proteins with the sweet taste receptor[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 360(2): 448-456.
- [66] LIU YM, XU JY, MA MX, YOU TJ, YE S, LIU S. Computational design towards a boiling-resistant single-chain sweet protein monellin[J]. *Food Chemistry*, 2024, 440: 138279.
- [67] KIM SH, KANG CH, KIM R, CHO JM, LEE YB, LEE TK. Redesigning a sweet protein: increased stability and renaturability[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1989, 2(8): 571-575.
- [68] LEE SB, KIM Y, LEE J, OH KJ, BYUN MO, JEONG MJ, BAE SC. Stable expression of the sweet protein monellin variant MNEI in tobacco chloroplasts[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2012, 6(4): 285-295.
- [69] MASUDA T, OKUBO K, BABA S, SUZUKI M, TANI F, YAMASAKI M, MIKAMI B. Structure of thaumatin under acidic conditions: structural insight into the conformations in lysine residues responsible for maintaining the sweetness after heat-treatment[J]. *Food Chemistry*, 2022, 389: 132996.
- [70] POMON B, ZHAO Y, LAI AL, LIN TT, FREED JH, ABBASPOURRAD A. Thermal degradation of thaumatin at low pH and its prevention using alkyl gallates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 139: 108544.
- [71] OHNUMA K, YAMASHITA A, YASUI N. Investigating the effect of substituting a single cysteine residue on the thermal stability of an engineered sweet protein, single-chain monellin[J]. *The Protein Journal*, 2023, 42(6): 698-708.
- [72] BOUMAIZA M, COLARUSSO A, PARRILLI E, GARCIA-FRUITÓS E, CASILLO A, ARÍS A, CORSARO MM, PICONE D, LEONE S, TUTINO ML. 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.
- [73] JIA LQ, TU TY, HUAI QQ, SUN JW, CHEN SS, LI X, SHI ZP, DING J. Enhancing monellin production by *Pichia pastoris* at low cell induction concentration via effectively regulating methanol metabolism patterns and energy utilization efficiency[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0184602.
- [74] PEÑARRUBIA L, KIM R, GIOVANNONI J, KIM SH, FISCHER RL. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants[J]. *Bio/Technology*, 1992, 10: 561-564.
- [75] CASTIGLIA D, LEONE S, TAMBURINO R, SANNINO L, FONDERICO J, MELCHIORRE C, CARPENTIERI A, GRILLO S, PICONE D, SCOTTI N. High-level production of single chain monellin mutants with enhanced sweetness and stability in tobacco chloroplasts[J]. *Planta*, 2018, 248(2): 465-476.
- [76] BERLEC A, TOMPA G, SLAPAR N, FONVIĆ UP, ROGELJ I, ŠTRUKELJ B. Optimization of fermentation conditions for the expression of sweet-tasting protein brazzein in *Lactococcus lactis*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46(2): 227-231.
- [77] BERLEC A, ŠTRUKELJ B. Large increase in brazzein expression achieved by changing the plasmid/strain combination of the NICE system in *Lactococcus lactis*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(6): 750-755.
- [78] LAMPHEAR BJ, BARKER DK, BROOKS CA, DELANEY DE, LANE JR, BEIFUSS K, LOVE R, THOMPSON K, MAYOR J, CLOUGH R, HARKEY R, POAGE M, DREES C, HORN ME, STREATFIELD SJ, NIKOLOV Z, WOODARD SL, HOOD EE, JILKA JM, HOWARD JA. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005, 3(1): 103-114.
- [79] DANIELL S. Refolding the sweet-tasting protein thaumatin II from insoluble inclusion bodies synthesised in *Escherichia coli*[J]. *Food Chemistry*, 2000, 71(1): 105-110.
- [80] ILLINGWORTH C, LARSON G, HELLEKANT G. Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology Letters*, 1988, 10(8): 587-592.
- [81] EDENS L, van der WEL H. Microbial synthesis of the sweet-tasting plant protein thaumatin[J]. *Trends in Biotechnology*, 1985, 3(3): 61-64.
- [82] FAUS I, del MORAL C, ADROER N, del RÍO JL, PATIÑO C, SISNIEGA H, CASAS C, BLADÉ J, RUBIO V. Secretion of the sweet-tasting protein thaumatin by recombinant strains of *Aspergillus niger* var. awamori[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49(4): 393-398.
- [83] HAHM YT, BATT CA. Expression and secretion of thaumatin from *Aspergillus oryzae*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(10): 2513-2520.
- [84] WEICKMANN JL. High Level Expression of Thaumatin in *Saccharomyces cerevisiae*[M]. Boca Raton, Florida, United States: CRC Press, *Thaumatin*, 1994: 151-169.
- [85] MATSUYAMA T, SATOH M, NAKATA R, AOYAMA

- T, INOUE H. Functional expression of miraculin, a taste-modifying protein in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biochemistry, 2009, 145(4): 445-450.
- [86] ITO K, SUGAWARA T, KOIZUMI A, NAKAJIMA KI, SHIMIZU-IBUKA A, SHIROISHI M, ASADA H, YURUGI-KOBAYASHI T, SHIMAMURA T, ASAKURA T, MISAKA T, IWATA S, KOBAYASHI T, ABE K. Cysteine-to-serine shuffling using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system improves protein secretion: case of a nonglycosylated mutant of miraculin, a taste-modifying protein[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(1): 103-107.
- [87] ITO K, SUGAWARA T, KOIZUMI A, NAKAJIMA KI, SHIMIZU-IBUKA A, SHIROISHI M, ASADA H, YURUGI-KOBAYASHI T, SHIMAMURA T, ASAKURA T, MASUDA K, ISHIGURO M, MISAKA T, IWATA S, KOBAYASHI T, ABE K. Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of miraculin[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1800(9): 986-992.
- [88] SUN HJ, KATAOKA H, YANO M, EZURA H. Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants[J]. Plant Biotechnology Journal, 2007, 5(6): 768-777.
- [89] HIWASA-TANASE K, NYARUBONA M, HIRAI T, KATO K, ICHIKAWA T, EZURA H. High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic miraculin gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(1): 113-124.
- [90] SUN HJ, CUI ML, MA B, EZURA H. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce[J]. FEBS Letters, 2006, 580(2): 620-626.
- [91] NAKAJIMA KI, ASAKURA T, MARUYAMA JI, MORITA Y, OIKE H, SHIMIZU-IBUKA A, MISAKA T, SORIMACHI H, ARAI S, KITAMOTO K, ABE K. 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.
- [92] BILAL M, JI LY, XU S, ZHANG Y, IQBAL HMN, CHENG HR. Bioprospecting and biotechnological insights into sweet-tasting proteins by microbial hosts-a review[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 9815-9828.
- [93] PARK SW, KANG BH, LEE HM, LEE SJ, KIM HS, CHOI HW, PARK TJ, KONG KH. Efficient brazzein production in yeast (*Kluyveromyces lactis*) using a chemically defined medium[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2021, 44(4): 913-925.
- [94] DUPUIS JH, CHEUNG LKY, NEWMAN L, DEE DR, YADA RY. Precision cellular agriculture: the future role of recombinantly expressed protein as food[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(2): 882-912.
- [95] ZHANG QQ, ZHAO Y, YAO Y, WU N, CHEN SP, XU LL, TU YG. Characteristics of hen egg white lysozyme, strategies to break through antibacterial limitation, and its application in food preservation: a review[J]. Food Research International, 2024, 181: 114114.
- [96] BERGAMO A, SAVA G. Lysozyme: a natural product with multiple and useful antiviral properties[J]. Molecules, 2024, 29(3): 652.