

甜味蛋白 monellin 高甜度、强热稳定性突变体的分子构建及性质研究

刘毅, 卢尚阳, 王语晴, 刘波*

(齐鲁工业大学(山东省科学院)食品科学与工程学院 济南 250353)

摘要 本文采用 PCR 技术对单链 monellin (MNEI) 进行定向突变, 将构建好的重组质粒 pET15b-MNEI 双位点突变体转化到大肠杆菌 BL21-codonPlus(DE3)-RIL 中进行异源蛋白质的重组表达。通过镍柱亲和层析和分子筛收集纯化后的目的蛋白, 使用蒸馏水在截留分子质量为 3.5 ku 的透析袋中进行蛋白透析, 将透析得到的目的蛋白采用双盲法感官品评测定甜味阈值, 蛋白突变体的二级结构和热稳定性采用圆二色谱仪测定。结果表明: 成功构建了该蛋白 3 个双位点突变体 E2M/E50N、E2Q/E50N 及 E2A/E50N, 其中突变体 E2Q/E50N 成功表达与纯化。与野生型 MNEI 对照相比, 测得的突变体 E2Q/E50N 的甜味阈值为 0.64 $\mu\text{g/mL}$, 甜度提升近 1 倍; T_m 值为 78 $^{\circ}\text{C}$, 热稳定性提高 4 $^{\circ}\text{C}$ 。以上研究结果可为甜味蛋白 monellin 在食品、饮料和医药行业的生产与应用提供技术参考。

关键词 甜味蛋白; monellin; 二级结构; 基因突变; 甜味阈值; 热稳定性

文章编号 1009-7848(2024)08-0053-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.005

甜味蛋白是一类具有甜味的蛋白类生物大分子。到目前为止, 从自然界不同种类的热带植物中分离纯化出 8 种甜味蛋白, 分别是 monellin、brazzein、thaumatin、mabinlin、pentadin、curculin、miraculin 和 neoculin^[1]。其中甜味蛋白 monellin、thaumatin、brazzein 的相对甜度较高, 为研究报道较多的 3 种甜味蛋白^[2]。另外, 甜味蛋白 mabinlin、pentadin 和 curculin 的相对甜度较低, 而 miraculin、neoculin 和 curculin 具有将酸味调节成甜味的功能^[3]。甜味蛋白质与分布于人体味蕾细胞膜上的一种 G 蛋白偶联受体-甜味受体 T1R2/T1R3 相互作用, 进而引发甜味感觉^[4]。相比于其它天然甜味剂和人工合成甜味剂, 甜味蛋白具有天然、低或零热量以及营养性的等特点, 有望作为目前市场上普遍使用的甜味剂的替代品应用于食品、饮料、药品等行业^[5-6]。此外, 对于一些肥胖和患有糖尿病的人群, 甜味蛋白也可作为一种天然、健康的糖类替代品使用, 从而达到减糖的效果^[7-9]。迄今, 包括我国在内的许多国家已批准甜味蛋白质 thaumatin

等在食品工业中的应用^[1]。

甜味蛋白 monellin 是在 1969 年从一种西非植物应乐果 (*Dioscoreophyllum cumminsii*) 的果实和叶片中分离纯化得到的蛋白类生物大分子^[10-11]。研究表明, monellin 甜度是同质量蔗糖甜度的 3 000 倍左右^[12]。此外, monellin (蛋白分子质量为 10.7 ku) 由 2 个不同的亚基 A 和 B 组成, 其中 A 链和 B 链分别包含 44 个和 50 个氨基酸^[13]。当 2 个亚基单独存在时没有甜味。由于 monellin 2 个亚基以非共价键连接, 因此其热稳定性较差, 当加热到 50 $^{\circ}\text{C}$ 时分解成 2 条链, 从而失去甜味^[14]。1989 年, Kim 等^[15]通过基因工程手段在 2 条链之间添加了连接二肽 Gly-Phe, 使得甜味蛋白 monellin 的稳定性明显提高, 而其甜味没有变化, 并将该单链 monellin 命名为 MNEI。天然 monellin 和 MNEI 的空间结构已被成功解析, 在溶液状态下两者结构非常相似, 它们都是由 5 条反向平行的 β -折叠半包裹 1 条 α -螺旋组成 (PDB: 4MON 和 2O9U)^[16-19]。

虽然甜味蛋白 MNEI 具有很高的甜味, 但是从植物中提取成本较高, 且在高温和极端 pH 值条件下稳定性较低, 因此限制了其在食品、饮料和医药行业中的推广应用^[20]。通过基因突变和蛋白质工程技术, 提升甜味蛋白 MNEI 的甜度和热稳

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31970935); 山东省自然科学基金项目(ZR2020KC035)

第一作者: 刘毅, 男, 硕士生

通信作者: 刘波 E-mail: ertrdfgg@qlu.edu.cn

定性,有利于该甜味蛋白的推广应用^[21-22]。前期研究中,作者及国外其它学者已成功构建甜味或热稳定性明显提高的甜味蛋白 MNEI 突变体 E2N、E23A、Y65R 与 E50N 等^[11]。本研究中,基于甜味蛋白 MNEI 结构与功能之间的关系以及前期研究成果,利用基因突变和蛋白质工程技术,对其进行分子设计改造,以期获得甜度好、性能优良的新型甜味蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Phanta Max 高保真 DNA 聚合酶、Trans5 α 感受态细胞、180 ku 预染蛋白标准物 Marker, 诺维赞生物技术有限公司; 大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3)-R-IL、pET15b 质粒, Novozymes 公司; Fast-Digest *Dpn*I, Thermo 公司; 质粒提取试剂盒 E.Z.N.A. Endo-free Plasmid DNA Mini Kit II, Omega 公司; Biowest 琼脂糖、蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂粉等生物试剂, 北京奥博星生物技术有限公司; SDS-PAGE 的配制试剂及缓冲液、透析袋(截留量 3.5 ku)、康宁 Costar3599 96 孔板, 碧云天生物技术有限公司; 氨苄青霉素 (amp)、氯霉素 (chl)、IPTG、牛血清白蛋白及考马斯亮蓝, 上海生工生物工程有限公司; Ni SepharoseTM High Performance, 美国丹纳赫公司。

1.2 仪器与设备

MICRO-17 高速台式离心机, 美国 Thermo 公司; TC-XP 型 PCR 扩增仪, 杭州博日公司; MC-24BCMGS 型海尔微波炉, 青岛海尔微波制品有限公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; ZF-8 型暗箱式紫外分析仪, 上海勤科分析仪器有限公司; SIM-F140 型制冰机, 美国西蒙公司; 恒温水浴锅, 上海树立仪器仪表有限公司; MCP-80TS-Y 型台式恒温摇床, 木木西里科技有限公司; TGL-16M 型高速冷冻离心机, 长沙湘仪离心机设备有限公司; JY92-II DN 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Infinite 200 系列多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 生物有限公司; Chirascan 圆二色谱仪, 英国 Applied Photophysics 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 MNEI 定向突变体的构建 MNEI 基因

(294 bp, NCBI 序列号: 1FA3_A) 由中美泰和生物技术有限公司合成, 然后利用限制酶酶切位点 *Nde* I 和 *Bam*H I, 将其克隆进载体 pET-15b 质粒中。突变体的引物设计由北京六合华大基因科技股份有限公司合成, 然后利用 PCR 突变扩增方法进行 MNEI 的定点突变^[23]。扩增后得到的 PCR 产物通过限制酶 *Dpn* I 进行酶切, 随后转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 用试剂盒提取质粒, 由 BioSune 技术(上海)有限公司进行突变体质粒序列的检测, 验证是否成功突变。双位点突变体 MNEI 的构建以单位点突变体的质粒为模板进行设计合成。

本试验中人工设计的野生型 single monellin (MNEI) 的重组序列为: MGSS HHHHHH SSG LVPRGS HMGWEIHDIGPFTQNLGKFAVDEENKI QYGRITFNKIVIRPCMKKTIYENEGFREIKGYEYQ LYVYASDKLFRADISEDYKTRGRKLLRFNGPVPP P, 该重组蛋白的分子质量大小约为 13.2 ku (通过在线多肽计算器 http://tools.vapthread.com/tools/public/index.php/index/index/index_advance.html 预测得出), 序列中标注双下划线处为野生型 MNEI 序列前面添加的组氨酸标签, 通过镍离子金属螯合亲和层析和分子筛层析可以将带有组氨酸标签的目的蛋白分离纯化。序列中标注下划线处为凝血酶酶切位点, 刘秋蕾^[24]通过凝血酶酶切试验验证了添加组氨酸标签的野生型 MNEI 与去除组氨酸标签的野生型 MNEI 相比, 甜度和热稳定性的测定结果一致。

1.3.2 蛋白的表达与纯化 将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21-codonPlus (DE3)-RIL 感受态细胞中, 涂布到含有 amp 和 chl 抗性的 LB 固体培养基平板上进行过夜培养, 之后挑选单菌落进行过夜培养, 将过夜培养的菌液按 1:100 的比例接种到含有 amp 和 chl 的 LB 液体培养基中进行扩大培养, OD_{600nm} 值达到 0.7 左右, 然后往培养基中添加终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达 (32 $^{\circ}$ C, 5 h), 使用高速冷冻离心机进行菌体的收集, 添加破壁缓冲液, 使用超声波细胞粉碎机进行菌体的破碎, 离心收集蛋白上清液, 将得到的蛋白上清液通过镍离子金属螯合亲和层析和分子筛层析纯化得到目的蛋白。目的蛋白的透析使用分子截留

大小为 3.5 ku 的透析袋进行,将得到的破碎后菌体和蛋白的混合溶液、总蛋白溶液、目的蛋白溶液、透析后的目的蛋白溶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证分析。

1.3.3 目的蛋白浓度和甜味阈值的测定 首先,蛋白样品在测定浓度之前要进行离心,以便除去可能存在的沉淀,将配置好的考马斯亮蓝溶液加入到 96 孔酶标板中,每个孔加入 200 μL 考马斯亮蓝,接下来将配制好的 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白质标准溶液(结晶牛血清白蛋白),分别定量加入到 96 孔酶标板中,以确定 96 孔酶标板的牛血清白蛋白质量浓度分别为 0,40,80,120,160,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,做 3 组平行试验,求取平均值,绘制标准曲线,根据所测蛋白样品的吸光度计算得出目的蛋白的浓度。

本试验中甜味蛋白样品的甜味阈值测定采用双盲法感官品评^[25]。首先进行蔗糖甜味阈值的测定,以蔗糖溶液的甜味阈值为对照组,分别测定野生型 MNEI 和突变体蛋白的甜味阈值,根据先前测得的蛋白样品浓度,通过添加蒸馏水将蛋白样品稀释成 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。组织 20 位身体健康的感官品评者,10 名男性和 10 名女性,年龄 20~45 岁,要求专业品评小组成员味觉嗅觉感官方面正常,不酗酒,没有怀孕的。在测试前半小时内要求不许进食,测试时先用蒸馏水进行漱口,然后按蛋白样品的质量浓度由低到高依次进行品尝,每次品尝的样品量为 5 mL,品尝后吐出,用蒸馏水漱口。如果在品尝时测试者感受到甜味是介于相邻质量浓度梯度的 2 个样品之间,需要对高质量浓度样品再次进行稀释,找出测试者能感受到甜味的最低质量浓度,蛋白的最低质量浓度即为样品的甜味阈值,最后结果求取 20 个人的平均值。

1.3.4 蛋白二级结构的测定 圆二色光谱(Circular dichroism)是目前研究蛋白质二级结构的常用方法,测定时蛋白样品在溶液状态下进行,快速简便,且对构象的变化反应灵敏。蛋白质中二级结构的信息变化主要为 α -螺旋结构在波长 192 nm 处有一正的吸收谱带,在 208~222 nm 范围呈现出负的吸收谱带;蛋白 β -折叠结构在波长 217~218 nm 范围有一负的吸收谱带,在波长 185~200 nm 范围有一正的吸收谱带;无规则卷曲在波长 200

nm 处有一负的吸收谱带,在波长 218 nm 处有一正的吸收谱带^[26]。

本试验中所测蛋白样品是在蒸馏水中透析后的蛋白溶液($\text{pH}=7.0$),为了避免蛋白样品沉淀影响测量,在测定之前需要离心,然后用蒸馏水将浓度稀释为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,取蛋白样品 200 μL ,在室温条件下,使用 Jasco-815 圆二色谱仪对纯化透析后的蛋白样品进行二级结构的检测,比色皿光径为 0.5 mm,光谱值范围为 190~260 nm,扫描速度为 60 nm/min,扫描次数为 3 次,累加求平均值,结果用平均摩尔椭圆率 $[\theta]$ 表示,摩尔椭圆率 $[\theta]$ 与 mdeg 之间的转换根据朗伯比尔定律推出: $[\theta]=\text{mdeg}/(L \times c)$ 。其中, $[\theta]$ 为摩尔椭圆率($\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$), L 为光径(mm), c 为蛋白样品的浓度(mmol/L)。试验中测得的 mdeg 值乘以 1 000 除以光径(mm)再除以浓度(mmol/L)求得的数值即为单位换算后的摩尔椭圆率 $[\theta]$ 。

1.3.5 蛋白质稳定性研究 本试验中蛋白样品热稳定性的测定选取固定波长 222 nm,升温范围从 50~95 $^{\circ}\text{C}$,速率为 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,根据蛋白二级结构在温度升高过程中的变化趋势曲线计算得出其熔点温度。蛋白的去折叠比例用 f_u (Fraction unfolded)表示,蛋白在温度升高过程中的二级结构变化趋势曲线,根据公式 $f_u=([\theta]_{222}-[\theta]_N)/([\theta]_U-[\theta]_N)$ ^[27]计算得出。其中, $[\theta]_N$ 是指未变性时的摩尔椭圆率($\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$), $[\theta]_U$ 是指完全变性时的摩尔椭圆率($\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$)。蛋白的熔点温度(T_m)是指蛋白开始变性到完全变性时的中点温度($^{\circ}\text{C}$)^[28],通过对蛋白的去折叠比率求一价导数得到蛋白变化速率曲线,曲线中的 Y 轴最高点即为 T_m 值。

进一步试验验证突变体蛋白的稳定性,将得到的突变体蛋白进行冻融试验、常温试验和高温处理试验,首先将准备好的蛋白样品放置在 4, -20 $^{\circ}\text{C}$ 、室温 24 h,观察突变体蛋白是否有发生集聚沉淀;另外,比较野生型 MNEI 和突变体蛋白样品在 65 $^{\circ}\text{C}$ 和 85 $^{\circ}\text{C}$ 分别处理不同时间之后,蛋白样品是否发生集聚沉淀和降解。最后将经过不同温度处理后的蛋白样品通过 SDS-PAGE 验证条带位置和颜色深浅,并由专业感官品评小组品评分析处理后和未处理前蛋白样品的甜度。

2 结果与讨论

2.1 野生型 MNEI 和突变体的 SDS-PAGE 验证

如图 1 所示, 突变体 E2M/E50N 和突变体 E2A/E50N 在蛋白分子质量 10~15 ku 之间没有目的条带, 说明这 2 个突变体未能成功表达, 可能由于突变的 2 个位点之间的相互作用, 破坏了甜味蛋白 MNEI 的三维结构, 从而导致突变体蛋白未能表达。突变体 E2Q/E50N 在蛋白分子质量 13 ku 左右观察到存在清晰的目的条带, 说明该突变体成功表达。

图 2 表明野生型 MNEI 及其突变体 E2Q/E50N 在大肠杆菌 BL21-codonPlus (DE3)-RIL 中成功表达, 从该图可以看出, 蛋白纯化和透析后的条带在 13 ku 左右, 与通过氨基酸序列预测的分子质量大小基本一致, 验证了目的蛋白被成功纯化。经过酶标仪测得的野生型 MNEI、突变体 E2Q/E50N 的蛋白质量浓度分别为 100.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 107.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 蛋白质二级结构分析

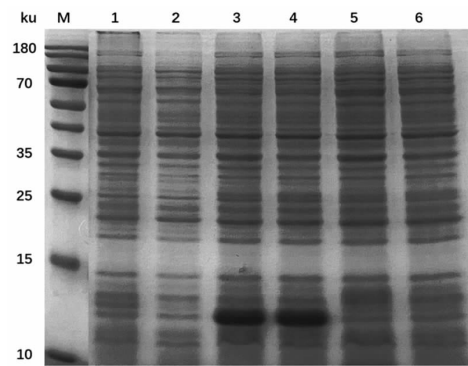
通过圆二色谱仪扫描野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 在波长 190~260 nm 范围蛋白的 α -螺旋和 β -折叠的变化情况。结果如图 3 所示, 从图中可以看出野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 整体上有相似的变化曲线, 说明两者具有相似的蛋白二级结构图谱, 突变体 E2Q/E50N 保留了与野生型 MNEI 相同的整体构象。然而, 与野生型 MNEI 相比, 突变体 E2Q/E50N 在波长 192, 200, 217~218, 208~222 nm 处有一定程度的变化, 说明突变导致该蛋白质的 α -螺旋、 β -折叠与无规则卷曲均发生了局部的变化。

2.3 突变体蛋白的甜味特性

野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 的甜度感官品评结果如图 4 所示。从图中可以看出, 野生型 MNEI 的甜味阈值是 1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 突变体 E2Q/E50N 的甜味阈值是 0.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 所测蛋白样品的甜味阈值越低, 说明甜度越高, 突变体 E2Q/E50N 与野生型 MNEI 相比, 甜味提升了将近一倍, 证实了突变体 E2Q/E50N 的甜度明显提升。

2.4 突变体蛋白的稳定性

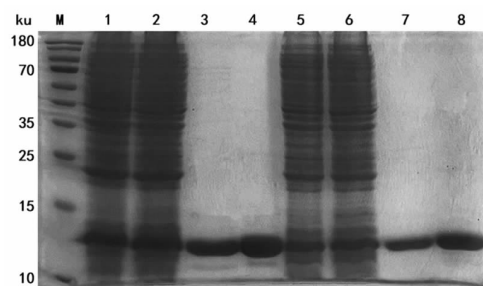
如图 5 所示, 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 蛋白在特定波长 222 nm 处逐渐升温的热稳



注: M. 蛋白标准 Marker, 1. 超声波破壁后得到的突变体 E2M/E50N 总蛋白液, 2. 突变体 E2M/E50N 的总蛋白上清液, 3. 破壁后突变体 E2Q/E50N 总蛋白液, 4. 突变体 E2Q/E50N 的总蛋白上清液, 5. 破壁后突变体 E2A/E50N 总蛋白液, 6. 突变体 E2A/E50N 的总蛋白上清液。

图 1 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE electrophoretic diagram



注: M. 蛋白标准 Marker, 1. 超声波破壁后得到的野生型 MNEI 总蛋白液, 2. 野生型 MNEI 离心后收集的总蛋白上清液, 3. 镍柱亲和层析和分子筛纯化后得到的野生型 MNEI 蛋白液, 4. 透析后得到的野生型 MNEI, 5. 突变体 E2Q/E50N 破壁后收集的总蛋白液, 6. 突变体 E2Q/E50N 的总蛋白上清液, 7. 纯化后得到的突变体 E2Q/E50N, 8. 透析后得到的突变体 E2Q/E50N。

图 2 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 的 SDS-PAGE 图
Fig.2 SDS-PAGE of wild-type MNEI and mutant E2Q/E50N

定性结果表明, 随着温度的逐渐升高, 图中突变体 E2Q/E50N 的蛋白去折叠速度明显慢于野生型 MNEI, 说明相比于野生型 MNEI, 突变体 E2Q/E50N 的三维空间结构耐热性能更好, 蛋白的受变性温度更高。

如图 6 所示, 通过野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 的去折叠比率一阶导数图可以看出, 随着温度的逐渐升高, 野生型 MNEI 在 74 $^{\circ}\text{C}$ 时, 蛋白变性最快, 该点即为野生型 MNEI 的熔点温度

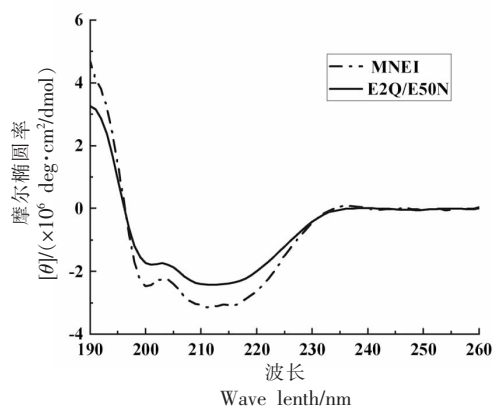
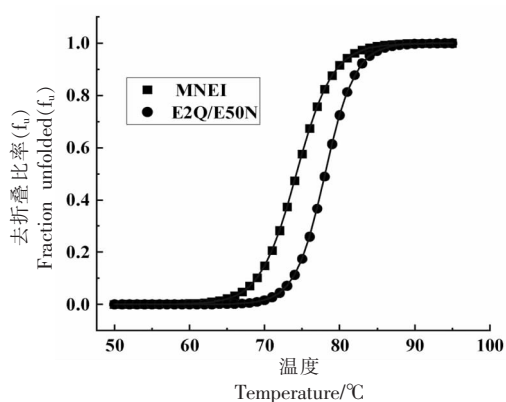


图 3 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 蛋白在 190~260 nm 的圆二色谱图

Fig.3 Circular dichrograms of wild-type MNEI and mutant E2Q/E50N proteins at 190 to 260 nm



注:在升温的过程中蛋白的去折叠速度越慢,稳定性越高。

图 5 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 在 50~95 °C 中的去折叠比率变化图

Fig.5 Changes in folding ratios of wild-type MNEI and mutant E2Q/E50N at 50~95 °C

(T_m),与野生型 MNEI 相比,突变体 E2Q/E50N 的 T_m 为 78 °C, T_m 提高了 4 °C 左右,进一步说明了突变体蛋白结构的热稳定性优于野生型 MNEI。

将分别在 4, -20 °C 和室温放置 24 h 处理后的突变体 E2Q/E50N 蛋白样品进行离心之后,观察到蛋白样品中没有沉淀的产生。经过 SDS-PAGE (图 7) 验证和专业品评小组感官品评分析,结果表明,处理后的蛋白样品和未处理的蛋白样品相比目的蛋白条带的位置及颜色深浅没有变化,感官品评结果表明,甜度没有明显变化,说明突变体 E2Q/E50N 蛋白在上述环境条件下具有较好的稳

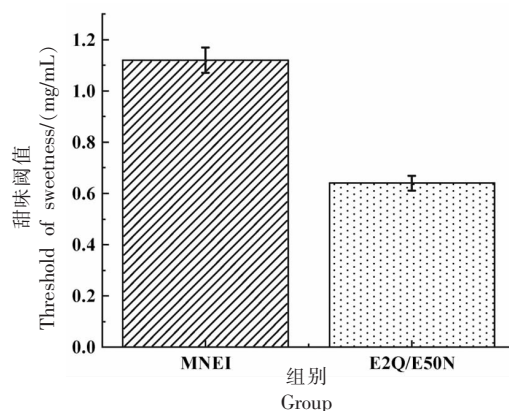
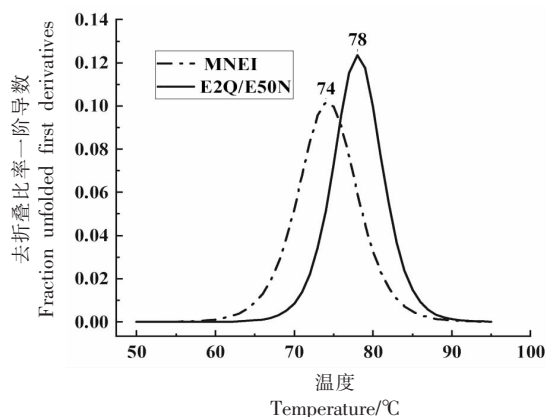


图 4 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 的甜味阈值测定图

Fig.4 Plot of sweetness threshold determination for wild-type MNEI and mutant E2Q/E50N



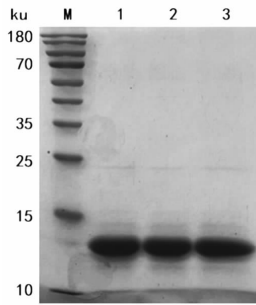
注:图中变性最快的点即为蛋白质的熔点温度值(T_m)。

图 6 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 去折叠比率的一价导数图

Fig.6 Monovalent derivative plot of the folding ratio of wild-type MNEI and mutant E2Q/E50N

定性。

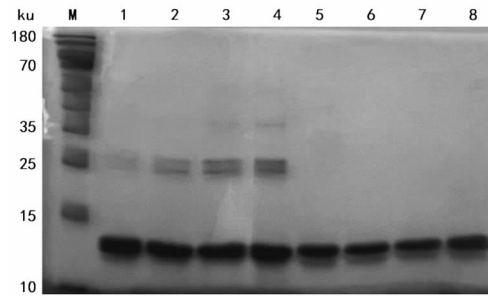
将经过 65 °C 和 85 °C 处理后的野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 蛋白样品进行离心后,观察到样品中无沉淀产生。如图 8 所示蛋白样品在 65 °C 中处理 2, 4, 6, 8 h 后的 SDS-PAGE 验证结果,图中野生型 MNEI 随着处理时间的增加,蛋白样品的条带深浅无明显变化,而在 Marker 分子质量 25 ku 处观察到的杂蛋白条带越来越清晰,这说明野生型 MNEI 发生了部分蛋白的集聚。通过感官品评小组品尝后发现,野生型 MNEI 甜味逐渐降低,在处理 2 h 时可以品尝到明显的甜味,4 h 时



注:M. 蛋白标准 Marker,1. 突变体 E2Q/E50N 放置于 4 °C、24 h 后的透析蛋白液,2. 突变体 E2Q/E50N 放置在 -20 °C 中 24 h 后的透析蛋白液,3. 突变体 E2Q/E50N 放置在常温中 24 h 后的透析蛋白液。

图 7 突变体 E2Q/E50N 不同条件处理后的 SDS-PAGE 图

Fig.7 SDS-PAGE of mutant E2Q/E50N after treatment at different conditions



注:M 为蛋白标准 Marker;1~4 为野生型 MNEI 分别处理 2,4,6,8 h 后的 SDS-PAGE 图;5~8 为突变体 E2Q/E50N 分别处理 2,4,6,8 h 后的 SDS-PAGE 图。

图 8 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 在 65 °C 中处理不同时间的 SDS-PAGE 图

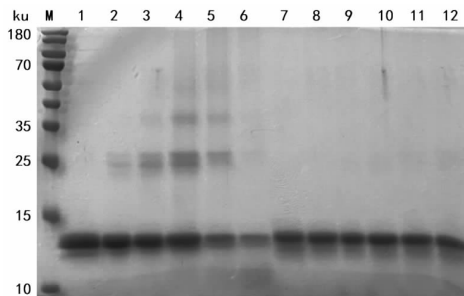
Fig.8 SDS-PAGE of wild type MNEI and mutant E2Q/E50N treated at 65 °C for different time

有少许甜味,6 h 和 8 h 时甜味完全丧失;与野生型 MNEI 相比,突变体 E2Q/E50N 蛋白样品在 65 °C 处理不同时间后条带无明显变化,且通过品尝后发现突变体 E2Q/E50N 甜度无明显变化,说明突变体 E2Q/E50N 在 65 °C 下有较好的稳定性。

如图 9 所示,野生型 MNEI 在 85 °C 随着处理时间的增加,在 Marker 分子质量 25 ku 处观察到的杂蛋白条带在 0~4 h 逐渐加深,在 4~8 h 逐渐变浅,且蛋白样品的目的条带在 4~8 h 时逐渐变浅,这说明野生型 MNEI 发生了蛋白的集聚或降解。通过感官品评小组品尝后发现,野生型 MNEI 甜味逐渐降低,在处理 0.5 h 时可以品尝到甜味,1 h 时只能品尝到轻微的甜味,2,4,8 h 时甜味完全丧失;与野生型 MNEI 相比,突变体 E2Q/E50N 蛋白样品条带在处理 8 h 后无明显变化,且通过品尝后发现突变体 E2Q/E50N 在 85 °C 处理不同时间后仍有甜味,说明突变体 E2Q/E50N 在 85 °C 下有较好的稳定性。

2.5 突变体蛋白的构效分析

近几年来,关于甜味蛋白中蛋白结构与生物活性之间相互关系的研究受到广泛关注^[29-30]。甜味蛋白的甜度主要取决于蛋白的净电荷、蛋白表面的电荷分布以及蛋白的三维结构构象^[31]。相关研究表明,甜味蛋白与其它的甜味剂一样,激活相同的甜味受体 T1R2/T1R3,但是相比于小分子质量



注:M 为蛋白标准 Marker;1~6 为野生型 MNEI 分别处理 0,0.5,1,2,4,8 h 时的 SDS-PAGE 图;7~12 为突变体 E2Q/E50N 分别处理 0,0.5,1,2,4,8 h 时的 SDS-PAGE 图。

图 9 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 在 85 °C 中处理不同时间的 SDS-PAGE 图

Fig.9 SDS-PAGE of wild type MNEI and mutant E2Q/E50N treated at 85 °C for different time

甜味剂,甜味蛋白的空间体积和分子质量大得多,故与甜味受体的结合方式存在很大的不同。目前比较流行的楔形物模型认为,甜味蛋白通过长距离正负电荷的作用对甜味受体进行变构激活,并存在多氨基酸位点相互结合模式^[32-33]。

本研究中,基于甜味蛋白 MNEI 结构与功能之间的关系以及前期研究成果,将野生型 MNEI 序列中的第 2 位和第 50 位带有负电荷的 E 分别突变为极性不带电荷的 Q 和 N,根据“相似相溶”的原理,这一改变增加了蛋白内部的极性,使得蛋

白水溶性更好,蛋白整体更趋于稳定。从表 1 中可以看出,与野生型 MNEI 相比,突变体 E2Q/E50N 的甜度和热稳定性均具有明显的提升。

表 1 野生型 MNEI 和突变体 E2Q/E50N 的甜度和热稳定性

Table 1 Sweetness and thermal stability of wild-type MNEI and mutant E2Q/E50N

样品	甜味阈值/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	与蔗糖甜 度对比	热稳定性 (T_m)/ $^{\circ}\text{C}$
蔗糖	4 000	1	
野生型 MNEI	1.12 ± 0.05	3 571	74.00 ± 0.20
突变体 E2Q/E50N	0.64 ± 0.03	6 250	78.00 ± 0.11

3 结论

在本研究中,大肠杆菌 BL21-codonPlus (DE3)-RIL 成功表达和纯化出了突变体 E2Q/E50N 蛋白,并以野生型 MNEI 蛋白为对照,研究其甜味和热稳定性。结果表明相对于野生型蛋白,突变体 E2Q/E50N 蛋白的甜度提升将近一倍,热稳定提升 4°C ,且该突变蛋白在 -20°C 至 85°C 温度范围内具有较好的稳定性和甜味,显著提高了该甜味蛋白的性质及其在食品行业中的应用潜力。本研究可为甜味蛋白 monellin 在食品和医药行业中的推广使用提供了新的选择,同时也能为该蛋白基因突变和构效关系的研究提供理论参考。

参 考 文 献

- [1] BILAL M, JI L Y, XU S, et al. Bioprospecting and biotechnological insights into sweet-tasting proteins by microbial hosts - A review [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 9815-9828.
- [2] TEMUSSI P A. Natural sweet macromolecules: How sweet proteins work [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2006, 63(16): 1876-1888.
- [3] KOIZUMI A, NAKAJIMA K, ASAKURA T, et al. Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 358(2): 585-589.
- [4] YAMAMOTO M, TERADA Y, MOTOYAMA T, et al. Sweet proteins lysozyme and thaumatin are protein-type agonists for the calcium-sensing receptor [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 521(1): 227-231.
- [5] CHUNG J H, KONG J N, CHOI H E, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-allergic activities of the sweet-tasting protein brazzein [J]. *Food Chemistry*, 2018, 267: 163-169.
- [6] DONNARUMMA F, LEONE S, DELFI M, et al. Probing structural changes during amyloid aggregation of the sweet protein MNEI [J]. *The FEBS Journal*, 2020, 287(13): 2808-2822.
- [7] TANG N, LIU J C, CHENG Y Q. Potential improvement of the thermal stability of sweet-tasting proteins by structural calculations [J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128750.
- [8] FARAG M A, REZK M M, HAMDI ELASHAL M, et al. 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 (PA): 111853.
- [9] REGA MICHELE F, DI MONACO R, LEONE S, et al. Design of sweet protein based sweeteners: Hints from structure-function relationships [J]. *Food Chemistry*, 2015, 173(C): 1179-1186.
- [10] MORRIS J A, CAGAN R H. Purification of monellin, the sweet principle of *Dioscoreophyllum cumminsii* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1972, 261(1): 114-122.
- [11] 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.
- [12] MORRIS J A, MARTENSON R, DEIBLER G, et al. Characterization of monellin, a protein that tastes sweet [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248(2): 534-539.
- [13] BOHAK Z, LI S L. The structure of monellin and its relation to the sweetness of the protein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976, 427(1): 153-170.
- [14] PICA A, LEONE S, DI GIROLAMO R, et al. pH driven fibrillar aggregation of the super-sweet protein Y65R-MNEI: A step-by-step structural analysis [J].

- BBA – General Subjects, 2018, 1862(4): 808–815.
- [15] KIM S H, KANG C H, KIM R, et al. Redesigning a sweet protein: Increased stability and renaturability[J]. Protein Engineering, 1989, 2(8): 571–575.
- [16] TANCREDI T, IJIMA H, SAVIANO G, et al. Structural determination of the active site of a sweet protein A ¹H NMR investigation of pMNEI [J]. FEBS Letters, 1992, 310(1): 27–30.
- [17] SOMOZA J R, JIANG F, TONG L, et al. Two crystal structures of a potently sweet protein. Natural monellin at 2.75 Å resolution and single-chain monellin at 1.7 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 234(2): 390–404.
- [18] HUNG L W, KOHMURA M, ARIYOSHI Y, et al. Structure of an enantiomeric protein, *D*-monellin at 1.8 Å resolution[J]. Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography, 1998, 54(Pt 4): 494–500.
- [19] SUNG Y H, SHIN J, CHANG H J, et al. Solution structure, backbone dynamics, and stability of a double mutant single-chain monellin. Structural origin of sweetness[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(22): 19624–19630.
- [20] 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.
- SHI T Y, CAO G Q. Research progress in gene engineering expression of sweet proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 453–459.
- [21] LEE J W, CHA J E, JO H J, et al. 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.
- [22] LEONE S, PICA A, MERLINO A, et al. Sweeter and stronger: Enhancing sweetness and stability of the single chain monellin MNEI through molecular design[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 34045.
- [23] 叶倩. PCR技术综述[J]. 科技创新导报, 2009(5): 5.
- YE Q. Review of PCR technology[J]. Science and Technology Innovation Herald, 2009(5): 5.
- [24] 刘秋蕾. 甜味蛋白 monellin 分子的理性设计及改造[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2016.
- LIU Q L. Rational design and modification of sweet protein monellin[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2016.
- [25] TOMOHISA T, RYOTARO H, YUJI N, et al. Dietary intake of carotenoid-rich vegetables reduces visceral adiposity in obese Japanese men—A randomized, double-blind trial[J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2342.
- [26] 陈中, 卢星宇. 基于蛋白质二级结构热稳定性的正交方法[J]. 生物技术通报, 2021, 37(2): 236–245.
- CHEN Z, LU X Y. An orthogonal method to study the thermal stability of secondary structure of protein [J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(2): 236–245.
- [27] LEE S B, KIM Y, LEE J, et al. Stable expression of the sweet protein monellin variant MNEI in tobacco chloroplasts [J]. Plant Biotechnology Reports, 2012, 6(4): 285–295.
- [28] SONG X D, YI Y T, LIU L, et al. Design and development of a high temperature stable sweet protein base on monellin[J]. Process Biochemistry, 2020, 89(C): 29–36.
- [29] ZHAO M, XU X Q, LIU B. Structure basis of the improved sweetness and thermostability of a unique double-sites single-chain sweet-tasting protein monellin (MNEI) mutant[J]. Biochimie, 2018, 154(9): 156–163.
- [30] KASHANI AMIN E, FARAJI H, NOURIYENGEJEH S, et al. Structure-sweetness relationship of sweet proteins: A systematic review on ‘sweet protein’ studies as a sub-group of ‘sweetener’ investigations [J]. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2022, 76(4): 175–190.
- [31] WEIFFERT T, LINSE S. Protein stabilization with retained function of monellin using a split GFP system[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 12763.
- [32] ASSADI-PORTER F M, MAILLET E L, RADEK J T, et al. 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.
- [33] DELFI M, EMENDATO A, LEONE S, et al. A super stable mutant of the plant protein monellin endowed with enhanced sweetness[J]. Life, 2021, 11(3): 236.

Studies on Molecular Construction of the Sweet Protein monellin Mutant with Intense Sweetness and High Thermal Stability and Its Properties

Liu Yi, Lu Shangyang, Wang Yuqing, Liu Bo*

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

Abstract In this paper, PCR technology was used to carry out targeted mutation of single-stranded monellin (MNEI), and the constructed recombinant plasmid pET15b-MNEI double-site mutant was transformed into *Escherichia coli* BL21-codonPlus (DE3)-RIL for recombinant expression of heterologous protein. The target proteins were purified by nickel column affinity chromatography and collected by molecular sieve. The dialysis of the proteins was carried out using distilled water in a dialysis bag with a interception volume of 3.5 ku. The sweet threshold of the target proteins obtained by dialysis was determined by double-blind sensory evaluation. The secondary structure and thermal stability of the protein mutants were determined by circular dichrometry. The results showed that three double-site mutants E2M/E50N, E2Q/E50N and E2A/E50N were successfully constructed, and the mutant E2Q/E50N was successfully expressed and purified. Compared with wild-type MNEI control, the sweet threshold of the mutant E2Q/E50N was 0.64 $\mu\text{g/mL}$, and the sweetness was nearly doubled; the T_m value was 78 $^{\circ}\text{C}$, the thermal stability was improved by 4 $^{\circ}\text{C}$. These results could provide theoretical basis and technical support for the production and application of sweet protein monellin in food, beverage and pharmaceutical industries.

Keywords sweet protein; monellin; secondary structure; gene mutation; sweetness threshold; thermal stability