

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-021

合成生物学和AI驱动的甜味蛋白智能制造

杨申燕¹, 霍润甜¹, 邹沁^{1, 2}, 孙丽超^{1, 2}, 霍毅欣^{1, 2, 3}(¹ 北京理工大学生命学院 & 航天中心医院, 北京 100081; ² 北京理工大学唐山研究院, 河北 唐山 063000; ³ 牧原大厦未来食品中心牧原实验室, 河南 郑州 450016)

摘要: 在全球“减糖”消费需求持续增长的背景下, 甜味蛋白作为一类不直接参与血糖代谢的功能性蛋白, 因其高甜度、优良感官特性及广阔应用前景而受到广泛关注。然而, 其产业化应用仍面临生产成本高、蛋白稳定性不足以及甜味感官特征与蔗糖存在差异等挑战。本文系统梳理了索马甜、巴西甜蛋白、莫内林等八种典型甜味蛋白在结构特征、制备方法及甜味受体识别机制等方面的研究进展, 综述了底盘细胞工程、表达元件优化及蛋白质工程改造等合成生物学策略在甜味蛋白生物制造中的应用与最新进展。进一步地, 本文重点讨论了人工智能在新型甜味蛋白设计、表达量提升、稳定性优化、口感调控以及复杂食品体系适配等方向的创新应用与发展潜力, 并探讨了甜味蛋白的技术经济性与产业化可行性, 旨在为甜味蛋白的绿色生物制造、智能化设计及产业化开发提供参考。

关键词: 甜味蛋白; 蛋白质工程; 法夫驹形氏酵母; 绿色智造; 人工智能

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Synthetic biology and AI-driven intelligent manufacturing of sweet proteins

YANG Shenyan¹, HUO Runtian¹, ZOU Qin^{1, 2}, SUN Lichao^{1, 2}, HUO Yixin^{1, 2, 3}(¹Key Laboratory of Molecular Medicine and Biotherapy, School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; ²Tangshan Research Institute, Beijing Institute of Technology, Tangshan 063000, Hebei, China; ³Muyuan Laboratory, Center for Future Foods, Muyuan Building, Zhengzhou 450016, Henan, China)

Abstract: Under the growing global demand for sugar reduction, sweet proteins have emerged as promising natural sweeteners owing to their ultrahigh sweetness, favorable sensory attributes, and negligible impact on blood glucose metabolism. Despite their considerable commercial potential, large-scale application remains constrained by challenges including high production costs, limited protein stability, and sensory characteristics that differ from those of sucrose. This review systematically summarizes the current research progress on eight representative sweet proteins, including thaumatin, brazzein, monellin, mabinlin, neoculin, curculin, miraculin, and pentadin. Their sources, structural features,

收稿日期: 2026-04-07 修回日期: 2026-07-12

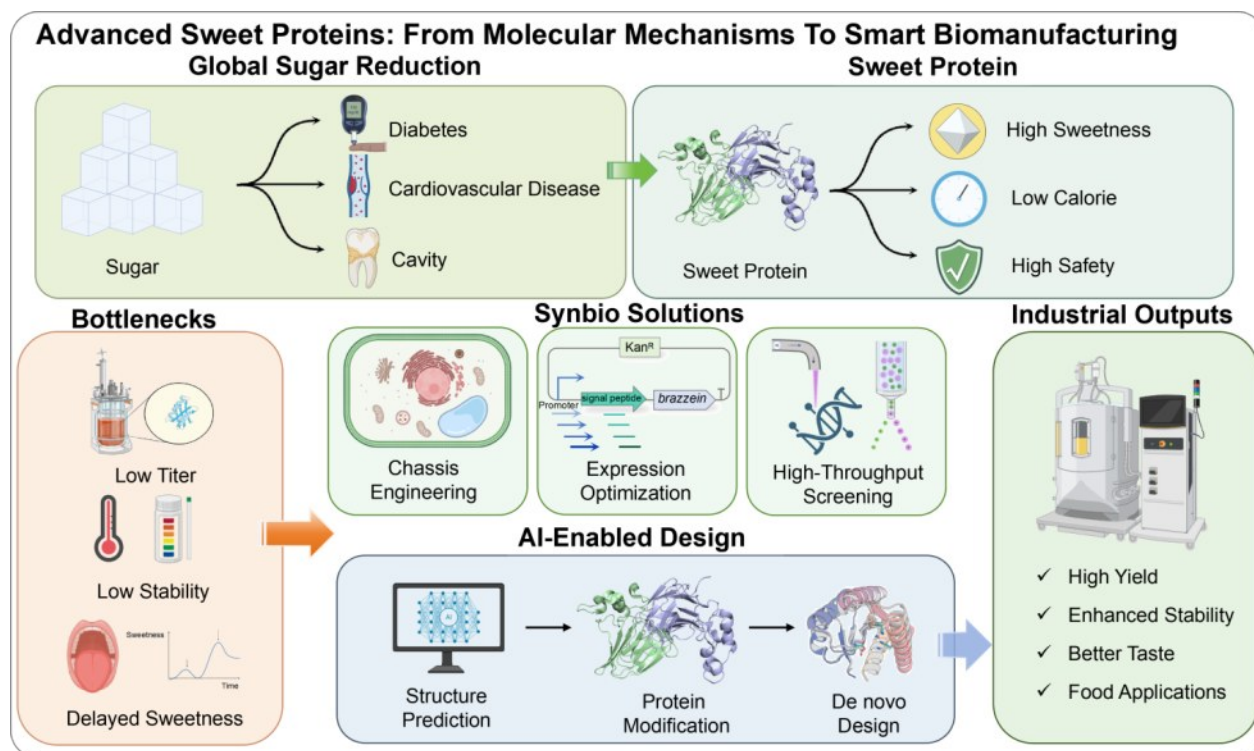
基金项目: 国家重点研发计划项目 (2024YFC3407000); 通用技术航天医学研究与转化重点实验室开放课题 (AMRTOP25015); 北京市科技计划项目 (Z251100000125015)

引用本文: 杨申燕, 霍润甜, 邹沁, 孙丽超, 霍毅欣. 合成生物学和AI驱动的甜味蛋白智能制造[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-021

Citation: YANG Shenyan, HUO Runtian, ZOU Qin, SUN Lichao, HUO Yixin. Synthetic biology and AI-driven intelligent manufacturing of sweet proteins [J].

Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-021

sweetness characteristics, and physicochemical properties are comprehensively discussed. Particular emphasis is placed on the molecular mechanisms underlying sweet taste perception, including the interaction of sweet proteins with the human sweet taste receptor and recent advances in elucidating receptor activation pathways through structural biology and computational modeling. These findings provide an important theoretical foundation for the rational design and optimization of sweet proteins. Furthermore, recent advances in synthetic biology-enabled biomanufacturing of sweet proteins are reviewed, covering chassis cell engineering, promoter and codon optimization, secretion pathway regulation, fermentation process development, and downstream purification strategies. The applications of protein engineering approaches, including rational design, directed evolution, computational redesign, and structure-guided mutagenesis, are also discussed with respect to improving protein expression, sweetness potency, thermostability, pH tolerance, and overall industrial applicability. Particular attention is devoted to the emerging role of artificial intelligence (AI) in sweet protein research and development. Recent breakthroughs in protein structure prediction, generative protein design, machine learning-assisted sequence optimization, and AI-driven codon engineering have significantly accelerated the discovery and engineering of sweet proteins. AI-based frameworks integrated with structural biology, molecular simulation, and Design-Build-Test-Learn (DBTL) cycles are enabling the development of novel sweet proteins with enhanced functionality and manufacturability. Moreover, advances in de novo protein design offer unprecedented opportunities for creating artificial sweet proteins beyond the limitations of naturally occurring protein scaffolds. Finally, this review discusses the techno-economic feasibility, regulatory considerations, and commercialization prospects of sweet protein production. Future developments are expected to arise from the convergence of synthetic biology, protein engineering, structural biology, and artificial intelligence, driving the transition from natural sweet protein optimization toward the rational creation of next-generation sweet proteins. These advances will facilitate the establishment of sustainable, intelligent, and economically viable production platforms, supporting the broader adoption of sweet proteins as key ingredients in the future healthy food industry.



Keywords: sweet proteins; protein engineering; *Komagataella phaffii*; green biomanufacturing; artificial intelligence

近年来,全球超重与肥胖人群数量持续攀升,已成为严峻的公共卫生问题。根据世界卫生组织(WHO)报告,过量摄入游离糖与2型糖尿病、心血管疾病及龋齿等多种非传染性疾病的发生风险相关。在《“健康中国2030”规划纲要》提出的“减糖”行动目标推动下,食品产业正加速向以降低糖摄入为核心的结构性转型。在此背景下,甜味剂也经历了由传统化学合成向多元化替代的发展过程。以糖精、甜蜜素为代表的第一代化学合成甜味剂,以及阿斯巴甜、安赛蜜和三氯蔗糖等第二代甜味剂,凭借明显成本优势长期占据市场主导地位。然而,随着毒理学与营养学研究的不断深入,部分合成甜味剂潜在的健康风险逐渐受到关注。例如,长期摄入部分人工甜味剂可能与2型糖尿病发生风险升高相关^[1]。此外,此类甜味剂通常伴随金属苦味或化学后味,难以真实还原蔗糖所带来的自然愉悦感官体验。基于对安全性与感官品质的双重需求,甜味剂市场正逐步转向以赤藓糖醇、甜菊糖苷和罗汉果甜苷为代表的小分子甜味剂。尽管此类甜味剂在安全性方面具有明显优势,但在实际应用中仍存在一定局限。例如,甜菊糖苷常伴有明显苦涩后味,而糖醇类物质在高摄入条件下易引发渗透性腹泻等胃肠道不适。这些问题在一定程度上限制了天然甜味剂对传统蔗糖的全面替代,也进一步凸显了开发兼具优良风味特性与代谢适配性的下一代甜味剂的迫切需求。

甜味蛋白是一类兼具高甜度、零热量代谢特征及优异生物相容性的功能性生物大分子^[2]。针对传统小分子代糖在口感表现及潜在代谢风险方面的局限,甜味蛋白凭借其独特优势,正逐步成为新一代健康代糖的重要发展方向。依托持续迭代的工程化细胞工厂,甜味蛋白的生物合成效率与规模化生产水平不断提升。近年来,人工智能技术的快速发展进一步推动了蛋白质工程领域的变革。借助生成式AI大模型及AlphaFold等高精度结构预测工具,甜味蛋白的研发模式有望由“天然蛋白局部改造”转向“全新蛋白的全局设计”^[3-4]。利用AI从头设计与味觉受体高度匹配的人工甜味蛋白,不仅为获得更优受体结合特性提供了新的可能,也为系统解决天然甜味蛋白在热

稳定性不足及甜味动力学滞后等方面的缺陷奠定了基础。未来,计算设计与合成制造的深度融合,将从分子性能优化与产业制造能力提升两个维度共同推动甜味蛋白的智能化制造,并加速其对传统甜味剂的替代,推动全球甜味剂产业格局的重构。

1 甜味蛋白的独特优势与产业瓶颈

1.1 甜味蛋白的独特优势

与人工合成甜味剂(如阿斯巴甜、三氯蔗糖)及天然来源甜味剂(如甜菊糖苷、赤藓糖醇)相比,甜味蛋白是一类兼具高甜度、低热量及可消化降解特征的生物大分子型甜味剂。作为功能性蛋白质,甜味蛋白进入人体后可在胃肠道蛋白酶作用下降解为氨基酸或小分子肽,并进一步被吸收利用^[2]。因此,甜味蛋白不会像蔗糖等可消化碳水化合物那样直接引起血糖快速升高,在低糖或减糖食品开发中具有重要应用潜力。甜味蛋白的优势之一在于其高甜度与低添加量。绝大多数已知甜味蛋白仅需较低浓度即可产生明显甜味。例如,巴西甜蛋白的甜度达到蔗糖的500至2000倍^[5]。以莫内林为例,其部分突变体的甜味阈值低至0.64 $\mu\text{g/mL}$,即受试者能够刚刚感知甜味的最低浓度为0.64 $\mu\text{g/mL}$ ^[6-7]。这意味着在食品加工过程中,仅需微量添加即可达到目标甜度,大幅降低了食品体系中的固形物含量,并为低热量食品配方设计提供了更大的灵活性。近年来,大量毒理学与微生物组学研究表明,部分非营养性甜味剂可改变肠道微生物群的组成与功能,并可能影响宿主葡萄糖代谢稳态^[8]。甜味蛋白作为可消化降解的生物大分子,其在胃肠道中的代谢行为不同于非营养性的小分子甜味剂。通常情况下,甜味蛋白在胃肠道前端便被迅速降解,不会以原型分子形式富集于肠道末端,因而避免了对肠道微环境的物理化学扰动,具有良好的长期食用安全性^[9-10]。此外,部分甜味蛋白还具有味觉调节与风味协同作用。例如,非洲奇果蛋白能够在感知层面将酸味转化为甜味^[11]。在现代食品配方工程中,甜味蛋白常与赤藓糖醇、阿洛酮糖等低倍甜味剂

复配使用,通过多位点变构激活机制优化受体响应,掩盖人工甜味剂常见的金属苦味,从而形成更接近蔗糖的感官释放曲线,赋予产品更加自然、纯正的风味表现^[1, 9]。

1.2 甜味蛋白产业化进程中的主要瓶颈

尽管甜味蛋白在营养代谢与感官品质方面具有明显优势,但其从实验室研究走向大规模产业化应用仍面临多重关键技术瓶颈。其中,天然资源稀缺与异源表达效率不足,是制约甜味蛋白规模化生产的首要因素。大多数甜味蛋白来源于热带雨林地区的特有植物,例如西非植物 *Pentadiplandra brazzeana*,其生长周期长、对气候条件高度敏感,且难以实现规模化种植。同时,由于提取工艺复杂,天然来源甜味蛋白的单位成本远高于阿斯巴甜等合成甜味剂,难以在终端消费市场形成价格竞争优势^[12-14]。目前,多种甜味蛋白已在微生物底盘中实现异源表达(表1)^[15-28],为其规模化制备奠定了重要基础。然而,不同甜味蛋白在表达水平、可溶性、分泌效率和活性等方面差异显著,其生产效率同时受到蛋白自身结构特征与宿主表达环境的共同影响^[29-33]。在大肠杆菌等原核表达体系中,部分甜味蛋白易因二硫键形成不足或折叠不完全而形成包涵体,后续复性

过程还可能进一步影响蛋白活性。对于法夫驹形氏酵母(*Komagataella phaffii*,曾用名 *Pichia pastoris*;下文简称 *K. phaffii*)、酿酒酵母等真核分泌体系,其主要限制因素则包括二硫键错配、内质网折叠压力、蛋白酶降解、异常糖基化以及分泌通路容量不足等^[2, 34-36]。与此同时,外源蛋白高水平表达还可能增加宿主细胞的代谢负担。尽管部分工程化体系已实现克每升级别的产量,但多数甜味蛋白距离稳定高产、低成本制造及工业化放大仍存在较大差距^[37, 29]。因此,研究人员仍需围绕启动子强度调控、信号肽适配、密码子优化、分子伴侣共表达、蛋白酶缺陷底盘构建、分泌途径强化和发酵过程控制等方面开展系统优化。

甜味蛋白难以进入主流食品配料体系的另一关键障碍,在于其在复杂加工环境中的理化稳定性不足。食品加工过程通常涉及高温处理及极端 pH 条件,这对蛋白质结构稳定性提出了严峻挑战^[35, 38]。例如,天然莫内林在 50 °C 以上即会发生亚基解离并导致甜味消失。尽管通过单链化改造可提升其热变性温度(T_m),但与工业加工要求相比仍存在差距^[36-40],且不同品种间稳定性差异较大。因此,在维持高甜度的同时实现热稳定性的提升,是其进入主流饮料工业体系亟待突破的关键技术瓶颈^[39, 41]。

此外,甜味蛋白在感知动力学特征上与蔗糖

表1 甜味蛋白的微生物异源表达

Table 1 Heterologous expression of sweet proteins in microbial hosts

甜味蛋白	宿主	发酵条件	产量	文献	商业化	食品应用
巴西甜蛋白	<i>Kluyveromyces lactis</i>	摇瓶发酵,葡萄糖:半乳糖=1:2进行诱导	170 mg/L	15	Oobli 公司布局	减糖饮料
	<i>Komagataella phaffii</i>	摇瓶发酵,利用信号肽高效分泌溶菌酶	345 mg/L	16	Sweegen 公司布局	果汁/果昔
	<i>Komagataella phaffii</i>	5 L 发酵罐,优化 P _{AOXI} 和 S _{aa57-70}	1.4 g/L	17		咖啡与茶
索马甜	<i>Komagataella phaffii</i>	摇瓶发酵,甘油甲醇诱导	100 mg/L	18	Nomad	冰淇淋、烘焙早
	<i>Aspergillus awamori</i>	5 L 发酵罐,外源添加天冬酰胺	105 mg/L	19	Bioscience	餐谷物、酒类、
	<i>Komagataella phaffii</i>	摇瓶发酵,培养基优化及添加维生素	68.6 mg/L	20	Sweegen 公司布	口香糖等
	<i>Komagataella phaffii</i>	摇瓶发酵,培养基优化	62.8 mg/L	21	局	
莫内林	<i>Candida utilis</i> KU101	5 L 发酵罐,用钾盐替代钠盐形式的磷酸盐	6.0 g/L	22	Oobli	酱料/抹酱/
	<i>Komagataella phaffii</i>	5 L 发酵罐,低浓度下甲醇诱导	2.71 g/L	23	Amai Proteins	沙拉酱、零食、
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	摇瓶发酵,半乳糖诱导并添加信号肽	0.41 g/L	24		花生酱等
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	摇瓶发酵,高拷贝整合至 rDNA 位点	0.675 g/L	25		
	<i>Bacillus subtilis</i>	摇瓶发酵,添加信号肽控制分泌到胞外	0.29 g/L	26		
	<i>Komagataella phaffii</i>	5 L 发酵罐,甲醇诱导	2.45 g/L	27		
奇果蛋白	<i>Escherichia coli</i>	摇瓶发酵,外源添加精氨酸	0.48 mg/L	28	Miracle Fruit Farm	风味水、酸性饮料等

存在明显差异，其甜味感知通常表现为起效较慢、持续时间较长，这种动力学特性的不匹配使其难以完全复现蔗糖的味觉体验。现代消费者的感官预期建立在蔗糖“起甜迅速、峰值明显、余味干净”的典型特征之上。然而，由于甜味蛋白分子体积较大，其穿透口腔唾液层并与 TAS1R2/TAS1R3 受体发生多位点变构结合的过程相对缓慢，因此在感官上往往呈现“滞后味”特征^[9]。同时，由于其与受体之间具有较高亲和力，甜味蛋白在口腔中的留存时间过长，易产生明显的甜味滞后现象，部分情况下可能伴随轻微甘草味。这种非理想的“时间-强度”感知曲线，限制了其在高端饮料等应用场景中的感官表现^[42]。

总体而言，尽管甜味蛋白凭借高甜度、低热量和良好生物相容性展现出巨大的应用潜力，但其商业化应用仍面临天然资源有限、提取成本高、蛋白稳定性不足及规模化生产受限等多重挑战。为系统应对上述问题，本文综述了甜味蛋白的基本特性及其与人类甜味受体的分子互作机制，并重点探讨了合成生物学与人工智能手段在甜味蛋白及宿主细胞改造、表达优化与功能提升中的应用策略，旨在为突破甜味蛋白产业化瓶颈、提升产量与感官品质以及推动绿色智能制造提供理论

依据与技术参考。

2 甜味蛋白的类型、结构与制备方法

甜味蛋白并非一类单一的蛋白质家族，而是一类系统发育来源多样、序列同源性较低，但在味觉功能上表现出高度趋同的功能蛋白。截至目前，自然界中已发现并被广泛认可的甜味蛋白共有八种（图 1），分别为索马甜（Thaumatococcus）、巴西甜蛋白（Brazzein）、莫内林（Monellin）、马槟榔甜蛋白（Mabinlin）、仙茅甜蛋白 I（Curculin）、奇果蛋白（Miraculin）、仙茅甜蛋白 II（Neoculin）以及培它丁（Pentadin）^[41, 43-49]。其中，仙茅甜蛋白 I 和奇果蛋白均属于典型的味觉修饰蛋白，但二者的作用机制存在明显差异。仙茅甜蛋白 I 本身具有甜味，同时能够赋予酸味物质甜感；而奇果蛋白本身几乎不表现甜味，却可在特定条件下使酸味感知转化为甜味^[2]。此外，奇果蛋白还具有独特的味觉滞后效应，其初始甜味可持续数分钟，并在甜味消退后经饮水刺激再次激活，使甜味感知重新出现并持续约 5 分钟。这些甜味蛋白主要来源于西非和东亚地区的热带植物果实，尽管它们的

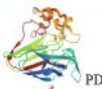
(1) Thaumatococcus 索马甜  PDB:3AOK 分子量 (kDa)22 主要二级结构多个β-结构 热稳定性 (Tm)90℃ 相对甜度 (Sucrose=1)2000-3000	(2) Brazzein 巴西甜蛋白  PDB:2BRZ 分子量 (kDa)6.5 主要二级结构α, β-, β-, β- 热稳定性 (Tm)92℃ 相对甜度 (Sucrose=1)500-2000	(3) Monellin 莫内林  PDB:1MOL 分子量 (kDa)10.7 主要二级结构α, 5股β- 结构 热稳定性 (Tm)74℃ 相对甜度 (Sucrose=1)1500-3000	(4) Mabinlin 马槟榔甜蛋白  PDB:2DS2 分子量 (kDa)12.4 主要二级结构4个反α螺旋结构 热稳定性 (Tm)80℃ 相对甜度 (Sucrose=1)100-400
(5) Curculin 仙茅甜蛋白 I  PDB:2DPF 分子量 (kDa)24.9 主要二级结构β折叠结构 热稳定性 (Tm)50℃ 相对甜度 (Sucrose=1)400-550	(6) Miraculin 奇果蛋白  UniProt ID:P13087 分子量 (kDa)28 主要二级结构α, β折叠结构 热稳定性 (Tm)70℃ 相对甜度 (Sucrose=1)0	(7) Neoculin 仙茅甜蛋白 II  PDB:2D04 分子量 (kDa)30 主要二级结构β折叠结构 热稳定性 (Tm)44℃ 相对甜度 (Sucrose=1)500	(8) Pentadin 培它丁 尚未成功解析 分子量 (kDa)24 主要二级结构认为含丰富β折叠 热稳定性 (Tm)60℃ 相对甜度 (Sucrose=1)500

图 1 八种典型甜味蛋白的分子特性与结构概览

（图中比较了索马甜、巴西甜蛋白、莫内林、马槟榔甜蛋白、仙茅甜蛋白I、奇果蛋白、仙茅甜蛋白II以及培它丁等甜味蛋白的来源、分子量、结构折叠、稳定性及风味特征，突出不同天然分子在甜度、热稳定性和受体结合界面上的结构基础）

Fig. 1 Molecular characteristics and structural overview of eight representative sweet proteins

(Comparison of representative sweet proteins, including Thaumatococcus, Brazzein, Monellin, Mabinlin, Curculin, Miraculin, Neoculin, and Pentadin, with respect to their sources, molecular weights, structural folds, thermal stability, and flavor characteristics. The figure highlights the structural basis underlying differences in sweetness intensity, thermal tolerance, and receptor-binding interfaces among these natural molecules.)

一级结构差异显著,但在空间构象上普遍表现出高度致密且稳定的折叠特征,这为在复杂食品加工环境中的稳定性以及对受体的精准识别提供了重要结构基础^[47]。

2.1 商业化最成熟的高倍甜味蛋白——索马甜

索马甜最早分离自西非植物 *Thaumatococcus daniellii* 的果实,是目前已知甜度最高且应用历史最悠久的天然甜味蛋白之一,同时也是最早获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准使用的甜味蛋白,其相关法规体系相对完善。索马甜的甜度约为等质量浓度蔗糖的2000至3000倍,但其甜感起效较慢、持续时间较长,并伴有轻微甘草后味。除直接提供甜味外,索马甜更重要的功能在于风味增强与异味掩盖^[48]。即使在极低浓度下,其仍可有效中和人工代糖的金属苦味或植物蛋白的豆腥味。凭借良好的生物安全性及独特的味觉修饰功能,索马甜在食品添加剂体系中的重要应用价值^[50]。索马甜为单链多肽,由207个氨基酸残基组成,分子量约22 kDa。其结构中富含 β 折叠,并含有多对二硫键,形成高度交联的三维网络结构,因此具有优异的结构稳定性,能够耐受酸性环境及加工过程中的物理应力^[51-52]。尽管在高温长时处理下其甜味会出现一定程度衰减,但在短时巴氏杀菌过程中仍可保持90%以上的活性^[53-55]。由于天然索马甜依赖特定地域植物资源,其产量受气候与政策因素影响,因此,基于合成生物学的规模化生产已成为重要发展方向^[56]。例如,利用冷大气压氦等离子体诱变技术对 *K. phaffii* 底盘进行诱变筛选后,重组菌株的索马甜表达水平较野生底盘提升13.3%,显著提升了蛋白合成速率^[57]。目前,索马甜已获得多个国家和地区监管机构批准,作为公认安全(GRAS)的添加剂,广泛应用于饮料、咀嚼片及乳制品等领域^[58]。

2.2 高稳定性的小分子甜味蛋白代表——巴西甜蛋白

巴西甜蛋白提取自西非藤本植物 *Pentadiplandra brazzeana* Baillon 的鲜果^[5]。在目前已知的八种甜味蛋白中,巴西甜蛋白因其分子量最小、热稳定

性最高以及风味特征最接近蔗糖,被认为是最具产业化潜力的候选甜味蛋白之一^[59]。其甜味起效较快,风味特性曲线与蔗糖高度相似,甜度约为等质量浓度蔗糖的500至2000倍^[15]。巴西甜蛋白由54个氨基酸残基组成,理论分子量约6.5 kDa,其空间结构呈高度紧凑的拓扑构型,由一个 α 螺旋和三股反平行 β 折叠构成^[5, 20, 60]。此外,其内部含有4对二硫键,构建了稳定的三维支架结构,使其在98.0℃加热2小时后仍能保持甜味活性,因此能够适应食品工业中的巴氏杀菌及超高温瞬时灭菌等工艺条件^[16]。巴西甜蛋白表面特定的电荷分布(如Arg33和Arg43)与甜味受体TAS1R2/TAS1R3的VFTD(Venus flytrap domain)结构域之间存在较强的静电相互作用^[2, 36, 61-62]。同时,其在pH 2.5至8.0范围内均可保持良好的结构稳定性,尤其适用于酸性碳酸饮料体系^[12]。由于天然来源受制于产地稀缺及极低提取率(仅0.05%~0.1%),通过微生物异源表达实现规模化制备已成为其产业化的主要路径^[62]。*K. phaffii* 因具有高效分泌能力及完善的二硫键折叠机制,被认为是理想的表达宿主^[63]。通过筛选内源醇氧化酶启动子 P_{AOX1} 并优化信号肽 $S_{\alpha\Delta 57-70}$,可以提高巴西甜蛋白的表达量^[17]。进一步结合分子伴侣共表达及精细化发酵控制,研究者在5 L生物反应器中实现了1.4 g/L的产量。这一进展降低了巴西甜蛋白的单位甜度生产成本,也标志着其距离工业化生产更进一步。

2.3 从天然二聚体到工程化突变体——莫内林

莫内林提取自西非灌木 *Dioscoreophyllum cumminsii* 的浆果,其甜度约为等质量蔗糖的1500至3000倍,部分工程化突变体甚至可超过4000倍。同时,莫内林具有起甜较快、无金属苦味等优势,因此常被视为高端饮料中合成甜味剂的重要替代品^[40]。天然莫内林由A、B两条多肽链通过非共价相互作用形成异源二聚体,分子量约为10.7 kDa,其结构由一个 α 螺旋与五股反平行 β 折叠组成^[40]。然而,该天然二聚体在超过50℃时易发生亚基解离并导致甜味丧失,从而限制了其工业化应用^[41]。为提升其稳定性,研究者通过引入柔性连接肽(如Gly-Phe),将B链C端与A链N端

共价相连, 构建了单链莫内林 (single-chain monellin, MNEI), 显著提高了其结构稳定性, 热变性温度提升至 74 °C 左右^[64]。利用 PCR 定向突变技术, 对 MNEI 表面的甜味受体结合位点进行氨基酸替换, 获得了双突变体 E2Q/E50N, 其热变性温度达到 78 °C 左右^[39]。目前, 莫内林的异源表达主要依赖大肠杆菌和法夫驹形氏酵母体系^[57, 63]。例如, 在大肠杆菌 BL21-codon Plus (DE3) -RIL 菌株中, 利用 pET 系列载体表达 MNEI, 并结合镍柱亲和层析及分子筛纯化, 可获得高纯度重组蛋白^[40]。莫内林的受体识别高度依赖其表面电荷网络。其中, Glu2 和 Glu50 位于甜味受体结合界面的关键区域, 将其突变为中性残基可降低局部静电排斥, 从而增强蛋白与受体之间的结合自由能, 并进一步提升蛋白稳定性^[62, 65]。尽管 MNEI 在热稳定性方面已有所改善, 但其在高盐环境及复杂食品基质中的稳定性与溶解度仍有待进一步优化。

2.4 其它甜味蛋白

马槟榔甜蛋白来源于中国云南白马槟榔, 是目前已知唯一以 α -螺旋为主要二级结构的甜味蛋白^[13]。其由两条多肽链通过链间二硫键连接形成稳定结构, 在 80 °C 条件下仍能保持甜味活性, 甜度约为蔗糖的 100-400 倍, 且风味纯正、无明显苦味^[48, 66]。仙茅甜蛋白 I 来源于马来西亚仙茅属植物, 由 114 个氨基酸组成, 为同源二聚体结构, 分子量约 24.9 kDa。仙茅甜蛋白 I 兼具甜味与味觉修饰功能, 不仅能够提供甜味 (400-550 倍蔗糖甜度), 还可实现酸味转甜的感知效果, 因此在功能性糖果开发中具有独特应用价值。然而, 其热稳定性较差, 在 50 °C 以上容易发生失活^[13]。仙茅甜蛋白 II 同样来源于大叶仙茅, 由酸性链与碱性链通过二硫键连接形成异源二聚体, 在中性条件下几乎不表现甜味, 但在酸性环境中可产生明显甜感^[67]。这种 pH 响应型甜味特性使其适用于酸性饮料及酸奶制品等食品体系。由培它丁 *Pentadiplandra brazzeana* 果实经热干燥后提取得到, 是非天然的非交联态巴西甜蛋白分子, 分子量约为巴西甜蛋白的 2 倍, 但甜度明显低于巴西甜蛋白, 仅为蔗糖的 500 倍^[49]。

3 甜味蛋白与受体相互作用机制

甜味蛋白产生甜味感官效应, 通常被认为源于其与人类甜味受体 (Human Sweet Taste Receptor, hSTR) 之间复杂的蛋白质-蛋白质相互作用网络。2025 年发表于《Nature》杂志的 hSTR 全长结构解析研究, 为理解甜味蛋白的受体识别与激活机制提供了重要的结构基础^[62, 68]。甜味与鲜味感知均由 C 类 G 蛋白偶联受体 (class C GPCR) 家族中的 TAS1R 成员介导。该家族主要包含 TAS1R1、TAS1R2 和 TAS1R3 三个成员。其中, TAS1R2/TAS1R3 异二聚体构成人类甜味受体, 能够识别天然糖类、小分子人工甜味剂以及大分子甜味蛋白等多种甜味配体; 而 TAS1R1/TAS1R3 异二聚体则构成鲜味受体, 主要识别 L-氨基酸与呈味核苷酸等鲜味分子^[69] (图 2)。

3.1 甜味受体 TAS1R2/TAS1R3 的非对称结构基础

人类甜味受体由 TAS1R2 与 TAS1R3 组成异二聚体复合物。每个亚基均由三个主要结构域组成, 包括胞外捕蝇草结构域 (Venus flytrap domain, VFTD)、富含半胱氨酸结构域 (cysteine-rich domain, CRD)、以及由七次跨膜螺旋组成的跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD)^[2, 70]。Shi 等^[44] 利用冷冻电镜 (cryo-electron microscopy, Cryo-EM) 解析了全长人源甜味受体的无配体结合态和三氯蔗糖结合态结构, 揭示了 TAS1R2/TAS1R3 复合物的非对称异源二聚体构象。研究表明, 三氯蔗糖等部分小分子甜味剂能够特异性结合于 TAS1R2 亚基 VFTD 内部的配体结合口袋中, 并诱导受体发生构象变化。

相比之下, 甜味蛋白由于分子体积庞大、结合界面复杂, 通常难以进入小分子甜味剂所占据的 VFTD 核心结合口袋。因此, 甜味蛋白更多依赖受体胞外表面的其他区域, 通过表面电荷互补、多位点接触以及变构调节等方式实现受体识别与激活 (图 2)。然而, 目前这一机制仍主要基于分子动力学模拟以及功能实验推断, 尚缺乏高分辨率甜味蛋白-受体复合物结构的直接证据。

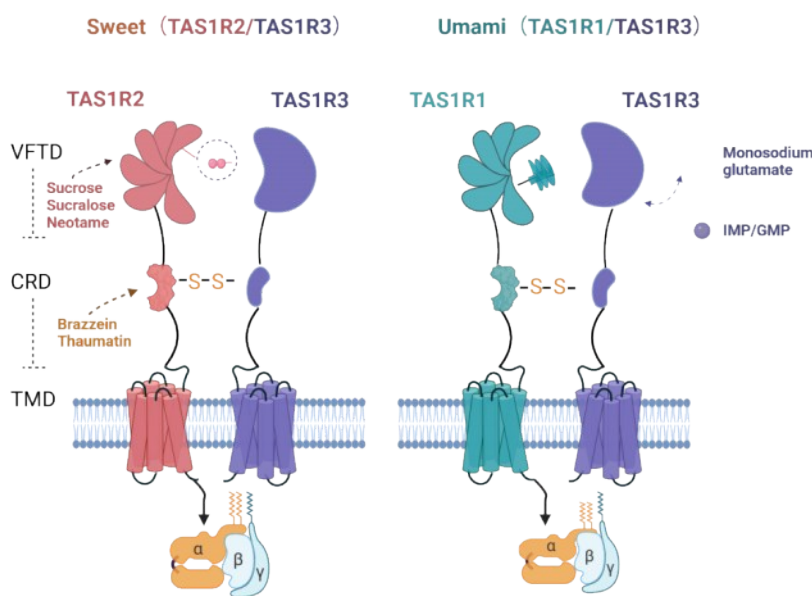


图2 甜味受体 (TAS1R2/TAS1R3) 与鲜味受体 (TAS1R1/TAS1R3) 介导的下游信号转导过程示意图。

(图中展示了甜味蛋白或小分子甜味剂与甜味受体胞外域结合后, 通过激活G蛋白、磷脂酶Cβ2及IP3介导的Ca²⁺释放通路, 进一步打开TRPM5通道, 最终触发味觉神经信号输出的过程。GMP: 鸟苷一磷酸; IMP: 肌苷一磷酸。)

Fig. 2 Schematic illustration of ligand-induced activation of downstream signaling pathways via sweet taste receptor (TAS1R2/TAS1R3) and umami taste receptor (TAS1R1/TAS1R3).

(The figure illustrates the process by which sweet proteins or small-molecule sweeteners bind to the extracellular domain of taste receptors, leading to activation of G proteins, phospholipase Cβ2, and IP3-mediated Ca²⁺ release, and opening of TRPM5 channels, ultimately triggering gustatory nerve signal output. GMP: guanosine monophosphate; IMP: inosine monophosphate.)

3.2 表面电荷驱动与多位点识别机制

不同于小分子甜味剂, 大分子甜味蛋白由于分子量较大、结合界面复杂, 通常难以进入VFTD内部的核心结合口袋, 而更依赖于受体表面的静电作用实现多位点协同锚定。尽管不同来源甜味蛋白在氨基酸序列及折叠拓扑结构上差异明显, 但它们普遍富集高密度碱性正电荷, 呈现出一定程度的静电势趋同特征。这种局部强正电势可能是其作为高效变构配体发挥作用的重要前提^[1-2, 12, 62, 71]。TAS1R2/TAS1R3异二聚体的胞外区域, 尤其是TAS1R3亚基的CRD及VFTD外侧区域, 暴露着大量带负电荷的酸性残基^[12, 62]。静电吸引作用引导甜味蛋白贴附于受体表面交界区域, 并通过盐桥及氢键形成广泛的接触界面。多位点协同作用在一定程度上弥补了缺乏封闭结合口袋的结构限制, 使甜味蛋白能够实现皮摩尔至纳摩尔级别的高亲和力结合^[2, 62]。静电引力促使配体与受体接近后, 界面脱水效应进一步增强疏水残

基之间的紧密贴合, 从而稳定受体活性构象。由于该识别机制高度依赖表面电荷网络, 环境pH值的细微变化即可改变关键残基的质子化状态, 进而重塑局部静电相互作用。这一机制有助于解释部分甜味蛋白(如马槟榔甜蛋白)甜味阈值对食品基质酸碱度高度敏感的现象^[72-73], 但其具体作用模式仍需结合不同蛋白及食品体系进一步研究。

3.3 “楔形模型”与全变构激活机制

在长程静电相互作用实现空间定位后, 甜味蛋白如何进一步打破受体静息状态并触发胞内信号转导, 是解释其超高甜度的关键。结合最新冷冻电镜结构解析^[62, 69]与分子动力学模拟结果, 研究者提出了“楔形模型”驱动的全变构激活机制^[74-79]。该模型认为, 甜味蛋白并不直接占据传统的配体结合口袋, 而是通过远端作用实现受体激活。具体而言, 甜味蛋白可能作为一个“楔子”, 插入或附着于TAS1R2与TAS1R3胞外域的交界区

域,尤其是富含半胱氨酸的CRD外侧连接区域^[71]。与之相比,小分子甜味剂(如三氯蔗糖)作为正构激动剂,可直接进入VFTD内部口袋并诱导其闭合,而大分子甜味蛋白则在不占据正构位点的情况下,从受体外部触发非经典激活路径^[62]。这种“楔入”作用可能打破受体在无配体状态下的非对称动态平衡,并对受体施加一定的机械拉力及侧向推力,诱导CRD区域发生局部弯曲,进而导致亚基CRD结构发生空间位移^[62, 71]。这种由胞外配体结合界面起始、向受体内部逐步传递的物理扭矩,可能驱动整个胞外结构域发生全局构象重排,从而为后续跨膜信号转导奠定结构基础^[2, 65]。

3.4 TMD动态重排与跨膜信号转导

胞外域的构象变化需进一步通过CRD与TMD等结构区域传递至胞内侧,才能最终触发G蛋白信号转导。在这一跨膜传导过程中,TAS1R2/TAS1R3受体的七次跨膜域(TMD)表现出高度的构象可塑性。最新结构动力学研究表明,该过程并非单向信号传递,而是依赖胞内G蛋白介导的“由内而外”双向变构调节机制^[62]。当胞外域发生“楔形”变构后,由此产生的物理扭矩通过CRD与TMD之间的柔性铰链区域向下传递,进而驱动跨膜螺旋束(尤其是TMD螺旋)发生动态重排,并在胞内侧暴露出原本处于闭合状态的结合腔。随后,下游味觉特异性G蛋白被迅速招募,其中,G α 亚基C末端约20个氨基酸残基可能嵌入TMD2与TMD3之间的胞内界面区域,从而完成受体与效应蛋白之间的物理偶联^[2, 80]。在G蛋白介导的构象锁定作用下,甜味蛋白与受体表面的结合变得异常牢固,可在复杂口腔流体环境中保持较高稳定性,并持续维持信号输出。这种胞外配体结合、跨膜构象变化与胞内G蛋白偶联之间的双向变构关系,为理解甜味受体的信号放大机制提供了新的理论框架。同时,该机制也从分子层面解释了高亲和力结合与变构放大之间的协同效应,并最终体现为甜味蛋白在感官层面的甜味滞后等典型特征^[44, 78]。

综上所述,甜味蛋白与人源甜味受体TAS1R2/

TAS1R3之间的相互作用,主要受到受体结合界面、蛋白表面电荷分布、柔性结构区域、二硫键网络及糖基化修饰等因素的综合影响。这些结构特征可进一步转化为甜度增强、稳定性提升和表达优化的工程靶点。因此,对甜味蛋白受体识别机制的深入解析,不仅有助于阐明甜味感知的分子基础,也为后续蛋白质工程改造与合成生物学制造提供了重要设计依据。

4 合成生物学与AI辅助的甜味蛋白高效合成策略

天然甜味蛋白在替代传统糖类方面具有巨大潜力,但受限于植物提取成本高昂、产量受限等因素,基于微生物异源表达的生物制造已成为推动其产业化的关键路径。然而,面对食品工业对低成本、高稳定性(如耐酸、耐热)以及接近蔗糖风格特征等严格要求,传统微生物发酵体系仍普遍受到表达水平有限、易形成包涵体以及错误折叠等问题的制约^[2]。当前,合成生物学正与AI技术加速融合,通过工程化设计与计算优化相结合的方式,有望为甜味蛋白的规模化生产与性能提升提供新的解决方案(图3)。

4.1 底盘菌株筛选与表达元件优化

底盘细胞的选择及其代谢微环境对甜味蛋白的最终产量具有决定性影响。在常用的微生物细胞工厂中,大肠杆菌缺乏完善的翻译后修饰能力,酿酒酵母则易发生过度糖基化;相比之下,*K. phaffii*兼具完整的翻译后修饰体系和高效蛋白分泌能力,更有利于复杂二硫键蛋白的正确折叠与胞外分泌^[81-84]。同时,*K. phaffii*具有优异的高密度发酵耐受性,在甜味蛋白异源表达体系中展现出明显优势。迄今为止,基于*K. phaffii*的甜味蛋白生物合成已取得重要进展,巴西甜蛋白^[17]及莫内林^[23]等蛋白均已实现克级每升的高效表达(表1)。其中,工程化莫内林菌株的发酵滴度已突破2.71 g/L^[23],进一步验证了*K. phaffii*在甜味蛋白规模化生产中的应用潜力。

冷大气压氦等离子体诱变作为一种非理性进

化策略,也展现出良好的底盘优化潜力^[57]。针对野生型底盘在高水平异源表达中易诱发内质网应激的问题,Parsekar等^[57]以*K. phaffii* GS115为底盘,通过冷大气压氦等离子体诱变所得突变株不仅提高了对甲醇和甘油的代谢效率,同时将索马甜产量提升至73.2 mg/L,较对照组提高了13.3%。该研究表明,物理诱变与代谢工程相结合,是提升工业发酵性能的重要策略^[12, 57]。

在表达调控方面,强诱导型启动子 P_{AOX1} 仍广泛应用于*K. phaffii*甜味蛋白的分阶段发酵策略中^[57, 85]。该策略允许细胞在富碳源条件下先完成高密度增殖,随后再诱导靶基因表达,从而有效降低高水平重组蛋白表达对宿主代谢造成的负担。相比之下,组成型启动子 P_{GAP} 更适用于连续发酵体系,可在无甲醇条件下实现绿色生产^[82]。针对植物与酵母之间存在的密码子偏好差异,可通过全序列同义密码子优化,有效缓解因稀有tRNA匮乏而引发的核糖体翻译停滞及mRNA过早降解现

象^[83]。此外,采用计算优化的柔性截短型信号肽 $S_{\alpha\Delta 57-70}$ 替换天然信号肽,并在宿主内质网中共表达分子伴侣蛋白二硫键异构酶(PDI),可以有效提升蛋白折叠的正确率与分泌效率。结合分批补料策略,最终在5 L规模发酵体系中实现了高达1.4 g/L的分泌表达水平^[17]。

4.2 甜味蛋白结构重塑与耐受优化

碳酸饮料、果汁等食品体系通常呈酸性,并需经历超高温瞬时灭菌或巴氏杀菌等加工过程。在此条件下,天然甜味蛋白内部静电排斥增强,易诱发空间构象塌陷、蛋白去折叠及功能失活,最终导致甜味功能的不可逆丧失。因此,除表达效率外,甜味蛋白在高温、酸性等复杂加工环境下的稳定性,也是决定其能否实现规模化食品应用的关键因素。近年来,随着甜味蛋白向终端食品应用不断推进,以MNEI为代表的工程化甜味蛋

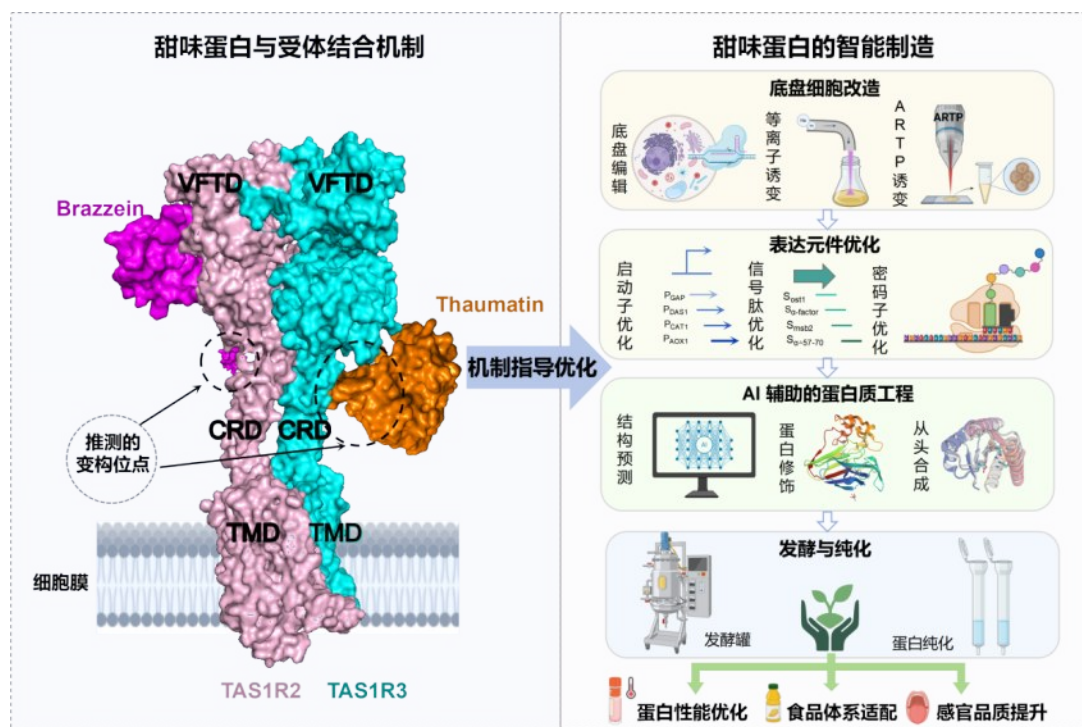


图3 受体结合机制指导的甜味蛋白智能制造

(以TAS1R2/TAS1R3受体识别界面、电荷互补及构象变构机制为指导,整合蛋白结构解析、AI序列设计、底盘细胞重构、表达优化以及发酵纯化等关键环节,构建从机制解析到工程制造的闭环体系。)

Fig. 3 Receptor binding mechanism-guided intelligent engineering of sweet proteins

(Guided by the TAS1R2/TAS1R3 receptor recognition interface, electrostatic complementarity, and conformational allosteric mechanisms, a closed-loop workflow is established that integrates protein structural analysis, AI-driven sequence design, host cell engineering, expression optimization, and fermentation/purification, bridging mechanistic insights with engineered production.)

白逐渐成为研究热点。Nativi等^[86]针对甜味蛋白MNEI开发出兼具高热力学稳定性与增强甜度的新型突变体。通过结构指导的理性设计,研究者对其关键柔性区域及表面电荷分布进行了精准重构。这类靶向突变不仅在蛋白内部形成了更加紧密的疏水核心和盐桥网络,使其在极端加工条件下仍能维持天然折叠状态,同时还优化了蛋白表面拓扑结构,显著提升了其与甜味受体异二聚体TAS1R2/TAS1R3之间的空间匹配度与静电相互作用。Liu等^[87]通过计算设计获得了具有耐沸水特性的单链莫内林突变体。随后,You等^[88]进一步从原子尺度解析了该耐沸MNEI突变体热稳定性的结构基础,揭示了相关突变对蛋白质内部相互作用网络和构象稳定性的影响,为耐高温甜味蛋白的理性设计提供了结构生物学依据。针对MNEI稳定性易受环境pH影响的问题,Leone等^[41]基于蛋白表面静电势和结构特征开展理性设计,将稳定性突变E23Q引入高甜度MNEI变体。结构分析表明,23位残基位于蛋白质疏水腔内,E23Q突变能够重塑局部氢键网络,从而提高蛋白质的热稳定性并降低其稳定性对pH的依赖。这一策略为其他甜味蛋白的环境适应性优化提供了具有普适意义的设计思路。

4.3 面向甜味蛋白“滞后味”的性能优化

多数天然甜味蛋白普遍存在起甜缓慢、作用持续时间较长等问题,从而产生明显的“滞后味”现象。因此,开发具有“起甜迅速、衰减干净”的类蔗糖风味曲线的新型代糖分子,已成为当前的重要研究方向^[2]。随着人源TAS1R2/TAS1R3甜味受体全长结构的解析,这一风味缺陷的结构基础已逐渐得到揭示。与可以嵌入经典跨膜结构域结合口袋的小分子甜味剂不同,大分子甜味蛋白更依赖于与受体胞外表面的广泛接触、界面电荷互补及变构识别机制来实现受体激活^[62, 89]。这种复杂的多位点协同作用虽然赋予其极高甜度,但也同时导致其结合与解离动力学过程相对缓慢,从而形成冗长的甜味后味。为改善这一感官缺陷,早期研究主要依赖随机突变、局部截短以及基于同源序列的初步理性设计,如对索马甜和奇果蛋

白的非核心结构域进行末端截短或特定位点定向突变^[90-91]。然而,由于传统方法缺乏对蛋白质整体构象网络及受体结合界面的高精度预测,此类相对粗放的蛋白质改造策略往往会破坏蛋白质的关键二硫键或氢键网络,导致突变体在表达后无法正确折叠,甚至完全丧失与TAS1R2/TAS1R3受体的结合能力,最终失去甜味功能^[90-91]。天然莫内林由两条多肽链通过非共价相互作用形成异源二聚体,在受热条件下极易发生解离并导致活性丧失。Kim等^[64]创新性地引入Gly-Phe柔性连接肽,将两条链共价串联,成功构建了单链莫内林MNEI。这种“物理绑定”策略显著提高了蛋白热稳定性,但并未从根本上改变其表面复杂且广泛分布的静电斑块特征^[92]。因此,MNEI在感官评测中仍表现出起效迟缓等问题,尚难完全复现蔗糖的风味曲线。

4.4 AI驱动的甜味蛋白智能设计

4.4.1 从传统蛋白质工程到AI辅助的甜味蛋白改造

在甜味蛋白研究领域,蛋白质工程长期以来一直是提升其应用性能的核心手段。早期研究主要基于天然甜味蛋白,通过定向进化、随机突变、二硫键重构、连接肽引入以及表面电荷调控等策略,对蛋白的甜度、热稳定性、酸碱耐受性、溶解性及异源表达能力进行优化。然而,传统蛋白质工程的改造空间通常局限于已知功能位点或局部结构区域,难以突破现有认知。此外,传统定向进化通常依赖大规模突变文库构建与高通量功能筛选,但由于甜味强度、后味持续时间及风味曲线等指标难以像酶活那样实现快速、标准化和高通量检测,甜味蛋白的筛选难度远高于酶类蛋白。

近年来,随着机器学习、蛋白质语言模型(protein language model, pLM)以及结构预测算法的发展,AI辅助蛋白质工程逐渐成为甜味蛋白优化的重要方向。与传统经验驱动的突变设计不同,AI辅助策略虽然仍以天然甜味蛋白为序列或结构起点,但能够借助模型学习蛋白质序列、结构及功能之间的隐含规律,实现突变效应预测、多目

标性能评估及组合优化,从而显著提高有益突变筛选效率,加速稳定性、表达量、耐受性等关键性能的协同改造^[93]。例如,Chua等^[20]利用蛋白质语言模型设计新型巴西甜蛋白突变体,获得了热稳定性更高、潜在风味更优的候选突变体V23,表明语言模型已能够在甜味蛋白序列优化中发挥指导作用。Liu等^[88]利用PyRosetta对单链莫内林MNEI进行计算设计,获得了接近耐沸水水平的高热稳定突变体。Leone等^[41]通过分子动力学模拟解析不同pH条件下MENI的构象变化,并据此构建了pH非依赖型稳定突变体。Ma等^[94]在仙茅甜蛋白II的工程化改造中,结合PyRosetta进行二硫键设计及饱和突变筛选,有效提升了蛋白热稳定性。这些研究表明,通过预测不同突变对受体结合能力、热稳定性、pH适应性的影响,有望筛选出适配不同食品体系的候选序列。基于甜味蛋白感官动力学等有限实验数据,机器学习模型还可逐步建立“序列突变—结构差异—受体界面变化—甜味效果”之间的映射关系,从而指导下一轮突变体的甜味设计。此外,AI驱动的甜味蛋白工程还可与宿主表达系统及细胞工厂构建深度结合。多数甜味蛋白含有多对二硫键,并具有复杂的表面电荷网络,其能否在异源宿主中正确折叠、分泌与积累,直接决定其产业化可行性。AI可以进一步预测密码子适配性、分泌效率、聚集倾向及表达负担,实现“蛋白—宿主”协同设计。基于大语言模型的CodonBERT可以捕捉氨基酸与同义密码子间的长程依赖关系,优化翻译动力学,目前已在蛋白质表达优化中得到应用,该方法有望为甜味蛋白在异源宿主中的密码子优化提供强有力的预测工具^[95]。

综上所述,计算辅助的蛋白质工程改造已逐渐由单一甜味蛋白扩展至多种甜味蛋白体系,AI辅助的甜味蛋白改造可归纳为三个方向。首先,是基于蛋白质语言模型的序列空间探索,该策略不再完全依赖天然同源序列或经验突变,而是利用大规模蛋白数据库训练集,在更广阔的序列空间中挖掘潜在的有益突变。其次,是基于结构能量计算与分子动力学模拟的稳定性优化。该方向主要利用PyRosetta、Rosetta $\Delta\Delta G$ 计算及分子动力学模拟,对甜味蛋白在食品加工条件下的热稳定

性、pH稳定性和可溶性进行理性设计。第三,是基于受体界面的多目标协同优化。随着人源甜味受体TAS1R2/TAS1R3结构解析的深入,研究者可以将受体结合特征纳入AI优化框架。例如,通过预测蛋白表面电荷分布、柔性结构区及受体结合界面之间的匹配关系,对甜味强度、后味持续时间及结合动力学进行联合优化,从而改善天然甜味蛋白普遍存在的“滞后味”问题。这一方向标志着甜味蛋白工程正由单一性能优化,逐渐转向兼顾感官品质与食品适配性的系统性设计。

另一方面,天然植物及其特定生态位仍是发现新型甜味蛋白和味觉修饰蛋白的重要来源。通过将热带及亚热带可食植物资源普查与多组学筛选相结合,有望系统挖掘具有甜味或味觉调节特性的野生植物、传统食用植物及潜在候选资源^[91, 96]。在此基础上,结合植物分类鉴定、基因组和转录组挖掘、蛋白质组与代谢组联合分析以及味觉受体活性评价,有望构建甜味蛋白候选数据库。借助AlphaFold等结构预测工具^[97]、受体分子对接、细胞甜味感知模型及异源表达验证手段,可以建立“天然资源发现—候选序列筛选—结构功能预测—合成表达验证”的系统化流程。该策略不仅有助于突破现有八类典型甜味蛋白分子库有限的瓶颈,也可为AI从头设计提供更多天然模板和结构约束,从源头拓展甜味蛋白绿色智能制造的分子基础。

4.4.2 AI驱动的甜味蛋白从头设计

尽管AI辅助的蛋白质工程策略已显著提高天然甜味蛋白的优化效率,但其本质上仍属于“基于已知蛋白的智能改造”,设计空间依然受到天然蛋白序列、折叠骨架及进化路径的限制。目前,系统研究的天然甜味蛋白种类仍然较少,主要集中于索马甜、巴西甜蛋白和莫内林等代表性分子。这些天然蛋白虽然具备较高甜度与良好生物相容性,但在热稳定性、pH耐受性、甜味动力学及工业表达性能等方面仍存在明显不足。仅依赖天然骨架上的局部改造,较难满足高甜度、低滞后味、高稳定性和低成本制造等多重产业要求。基于AI的甜味蛋白从头设计(*de novo design*)正逐渐成为突破天然蛋白限制的重要方向(图4)。与传统的蛋白改造方式不同,AI从头设计并不依赖已有

天然序列，而是以功能目标和结构约束为核心，通过生成式模型直接设计全新的蛋白骨架与序列。人工甜味蛋白的设计目标并非单纯追求更高的受体结合能力，而是在保证甜味受体有效激活的基础上，同时兼顾甜度、稳定性、感官品质及工业可制造性。理想的人工甜味蛋白应具有较低的甜味阈值和较高的受体激活效率，能够在酸性饮料、高温杀菌及长期储藏等食品加工条件下保持稳定，并具备良好的水溶性、较低的聚集倾向和较高的异源表达水平。此外，还应尽可能避免天然甜味蛋白普遍存在的起甜缓慢和后味持续时间过长等感官缺陷。因此，甜味蛋白的从头设计属于典型的“功能导向型蛋白设计”，需要同时兼顾受体激活能力、结构稳定性、感官品质及工业生产适配性等多重指标。

前述研究表明，甜味蛋白与 TAS1R2/TAS1R3 受体之间的相互作用受到受体结合区域、蛋白表面电荷分布、柔性结构区、二硫键网络以及糖基化修饰等多种因素的共同影响。其中，受体结合界面的静电互补性、表面正电荷斑块的空间分布以及参与变构调控的柔性结构单元，被认为是决定甜味蛋白识别和激活受体的重要结构基础。因此，这些特征均可进一步转化为 AI 设计过程中的约束条件和优化目标。在具体设计过程中，通常首先基于甜味受体 TAS1R2/TAS1R3 的结构信息，结合实验数据、分子对接及界面分析，识别 VFTD 和 CRD 区域中可能参与甜味蛋白识别的关键残基和结合热点。随后利用 RFdiffusion 等生成式模型^[98]，以受体结合界面为约束条件生成候选蛋白骨架，并对蛋白质的分子尺寸、二级结构组成、折叠紧凑性及表面电荷分布进行调控，使其能够在空间上覆盖目标结合区域，同时形成有利于受体识别的界面拓扑结构。与传统蛋白质工程主要依赖天然甜味蛋白骨架不同，该策略能够在更广阔的结构空间中探索全新的蛋白折叠形式，从而突破天然甜味蛋白数量有限所带来的设计约束。获得候选骨架后，可进一步利用 ProteinMPNN、ESM-IF1 或 ProGen 等模型开展序列设计^[99]。该过程不仅需要保证蛋白质能够稳定折叠，还需重点优化界面区域的理化性质，包括表面正电荷残基的分布、潜在盐桥与氢键网络的构建、疏水区域

的合理布局以及二硫键形成的可能性。对于直接参与受体识别的界面区域，还可通过保留热点残基、引入电荷约束或限制关键位点氨基酸类型等方式，提高候选蛋白与甜味受体之间的结合特异性和界面互补性。完成序列设计后，可利用 AlphaFold3、Boltz-1 等结构预测工具对候选蛋白的折叠稳定性进行评估^[100]，并进一步预测其与 TAS1R2/TAS1R3 形成的复合物结构。随后结合蛋白质-蛋白质对接、界面分析和分子动力学模拟，系统评价候选蛋白与受体之间的结合模式。重点关注界面埋藏面积、形状互补性、静电势匹配程度、氢键与盐桥网络以及关键残基贡献等参数，从而筛选出具有较高受体结合潜力的候选分子。对于表现较优的设计，可进一步采用 MM/GBSA 等方法估算结合自由能，并结合逐残基能量分解分析识别受体结合热点，为后续理性优化提供依据。针对天然甜味蛋白普遍存在的甜味滞后现象，仅依赖结合自由能评价往往难以准确预测其感官表现。因此，在候选蛋白筛选过程中，还需重点关注其与受体之间的结合和解离动力学特征。通过长时间尺度分子动力学模拟分析界面接触寿命、关键盐桥形成频率以及复合物构象稳定性，可初步评估候选蛋白是否存在过强结合或解离缓慢等问题，从而避免产生持续时间过长的后味效应。设计目标并非获得与受体结合最紧密的蛋白，而是在保证受体有效激活的同时，实现更加接近蔗糖的甜味动力学特征。在获得具有良好受体结合能力的候选蛋白后，还可进一步利用 PyRosetta 等计算工具开展稳定性优化。通过虚拟饱和突变扫描、折叠自由能分析以及二硫键工程设计，识别能够提高热稳定性、酸碱耐受性和可溶性的关键位点，并同步评估其对受体结合界面的影响。对于具有产业化潜力的候选蛋白，还可结合机器学习模型预测其聚集倾向、优化表达水平^[101]、提升分泌能力，从而实现甜味活性、结构稳定性和可制造性的协同优化。Ding 等^[102]基于人甜味受体 TAS1R2/TAS1R3 的结构信息，建立了面向潜在甜味蛋白的从头设计流程。该研究综合应用 RFdiffusion、ProteinMPNN、Boltz-1 以及 MM/GBSA 等工具，针对 TAS1R2 胞外结构域中的 VFTD 和 CRD 区域设计受体结合蛋白。结果表明，

部分设计分子在结构可信度、受体结合模式以及预测结合能等方面表现良好,初步验证了AI驱动从头设计策略在新型蛋白甜味剂开发中的应用潜力,也为基于人类甜味受体的功能蛋白理性设计提供了新的技术路线。

尽管AI生成模型能够显著拓展甜味蛋白的分子设计空间,其计算结果仍需通过实验体系验证。由于甜味功能涉及受体识别、信号转导及人体感官响应,仅依赖计算预测难以准确评价真实甜味强度与风味品质。因此,经计算筛选获得的候选序列仍需进一步进行基因合成、密码子优化、载体构建、宿主表达、蛋白纯化和功能检测。早期功能验证可采用甜味受体细胞报告系统、细胞内 Ca^{2+} 流检测或受体激活实验,以初步判断候选蛋白是否能够有效激活受体。此外,还需结合电子舌分析、感官评价及食品基质测试,系统评估其甜度、起甜速度、甜味持续时间以及在复杂食品体系中的适配性。同时,对于具有潜在应用价值的候选蛋白,还需进一步检测其在酸性、高温、高

盐、冷冻及长期储藏条件下的稳定性,以评价其在食品工业应用中的真实潜力。Amai Proteins公司的SweeLin®是AI驱动的甜味蛋白商业化开发领域的代表性案例。该公司利用自主AI蛋白质设计平台,在柔性区域识别、序列重构及表达适配等层面进行系统设计,开发出了能够在高温及宽pH范围下保持稳定甜味的人工甜味蛋白。该产品已获得美国FDA的GRAS认证,表明AI设计甜味蛋白已开始具备商业化推进潜力。

综上所述,AI驱动的甜味蛋白智能制造正在形成由“受体机制解析—生成式分子设计—计算筛选—实验验证—定向进化—细胞工厂优化”共同构成的闭环体系。该体系以甜味受体结构和感官评价数据为基础,通过生成式模型获得候选分子,再利用结构预测、分子对接、动力学模拟及表达性能预测进行多目标筛选。在此基础上,进入基因合成、宿主表达、受体激活检测及食品体系评价,并将实验数据进一步反馈至机器学习模型,通过模型微调,完成下一轮序列生成与优化。

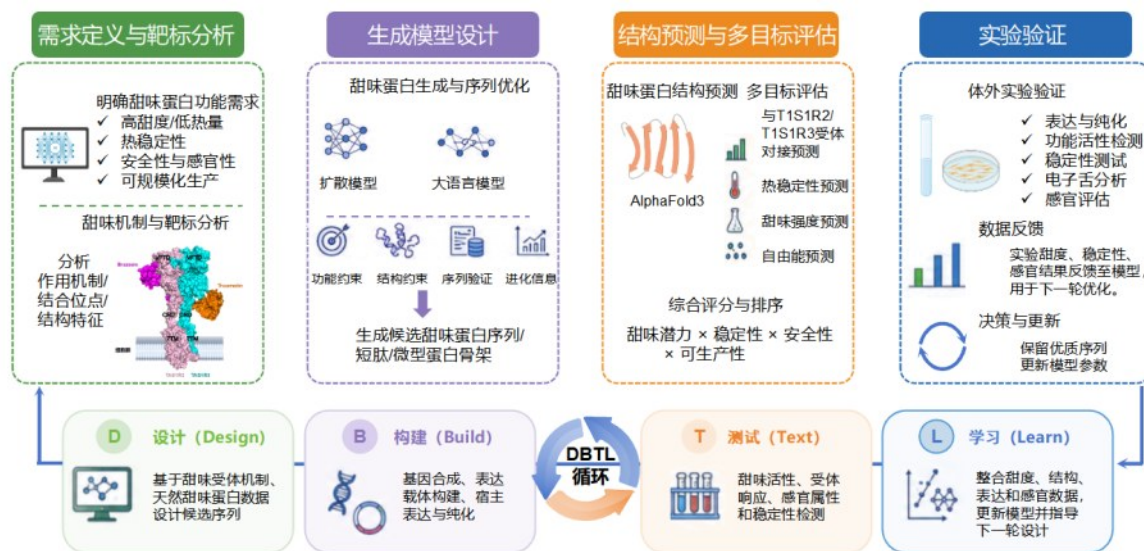


图4 AI从头合成甜味蛋白的总体流程(DBTL循环驱动)

(该图展示了AI从头合成甜味蛋白的DBTL闭环流程。首先根据功能需求和靶标结构确定设计目标,随后利用扩散模型、蛋白质语言模型等生成候选序列或骨架,并通过AlphaFold3等结构预测工具进行多目标评估与排序。筛选后的候选蛋白进入基因合成、表达纯化和功能验证阶段,实验结果进一步反馈至模型训练与参数更新,用于指导下一轮设计优化。)

Fig. 4 Overall workflow of AI-driven *de novo* sweet protein synthesis guided by the DBTL cycle

(This figure illustrates the DBTL closed-loop workflow for AI-driven *de novo* sweet protein synthesis. First, design objectives are defined based on functional requirements and target structures. Candidate sequences or protein backbones are then generated using diffusion models, protein language models, and related generative approaches, followed by multi-objective evaluation and ranking with structural prediction tools such as AlphaFold3. The selected candidates are subsequently subjected to gene synthesis, expression and purification, and functional validation. Finally, the experimental results are fed back into model training and parameter updating to guide the next round of design optimization.)

随着蛋白质语言模型、自动化生物铸造平台、高通量受体筛选技术及食品感官数据库的不断发展,甜味蛋白工程有望由经验驱动的局部改造,逐步转向数据驱动、机制指导与自动化迭代的新范式。AI不仅能够拓展新型甜味蛋白的分子发现空间,也有望从甜味强度、结构稳定性、表达效率及食品体系适配性等多个维度,推动甜味蛋白的智能绿色制造。

5 技术经济性与产业化可行性分析

合成生物学与人工智能技术的发展,为甜味蛋白的分子设计、异源表达、稳定性改良及食品体系适配提供了重要支撑,使其逐步具备由实验室研究向规模化制造转化的基础。然而,甜味蛋白能否真正实现产业化应用,除了受生物学性能影响外,还取决于生产成本、下游加工、规模放大、法规准入及终端产品适配等多重因素。因此,有必要从技术经济性和产业化可行性两个层面对其发展前景进行系统评估。

5.1 等甜度成本下的经济竞争力分析

对于甜味剂而言,单位质量价格并不能直接反映其经济价值,更合理的评价指标是达到相同甜度时的实际使用成本。若某甜味剂的单位质量成本为 P ,相对于蔗糖的甜度倍数为 R ,则其单位蔗糖等甜度成本(Cost of Sweetness Equivalence, CSE)可近似表示为: $CSE=P/R$ 。因此,高倍甜味剂即使单位质量价格远高于蔗糖或糖醇,只要其甜度提升幅度更大,仍可能在实际应用中具备成本优势。目前已实现较深入研究的天然甜味蛋白中,巴西甜蛋白(Brazzein)、索马甜(Thaumatococcus)和莫内林(Monellin)的甜度通常分别可达到蔗糖的500~2000倍、2000~3000倍和1000~3000倍,而阿斯巴甜约为蔗糖的200倍,赤藓糖醇仅为蔗糖的0.6~0.7倍^[5, 47, 50-54]。按照等甜度换算,提供与100 g蔗糖相同甜味时,仅需约0.03~0.20 g甜味蛋白,而阿斯巴甜需约0.5 g,赤藓糖醇则需143~167 g。从理论上讲,甜味蛋白具有极高的甜度优势,即使其单位质量制造成本显著高于传统甜味

剂,仍可能保持相近甚至更低的单位等甜度成本。例如,在等甜度条件下,即使巴西甜蛋白、索马甜和莫内林的单位质量制造成本分别达到阿斯巴甜的2.5~10.0倍、10.0~15.0倍和7.5~15.0倍,其单位甜度成本仍具有竞争力。然而,上述分析仅基于甜度折算得到的理论盈亏平衡价格,尚未考虑生产损耗、配方补偿、运输储存以及法规成本等因素,因此更适用于早期工艺经济性评估,而不能直接等同于实际商业竞争力。与赤藓糖醇相比,甜味蛋白的理论盈亏平衡价格倍数非常高,约为赤藓糖醇的700~5000倍。然而,甜味蛋白与赤藓糖醇之间并非简单的替代关系。赤藓糖醇属于典型体积型甜味剂,除提供甜味外,还承担固形物构建、口感增强、保湿以及冰点调节等功能;而甜味蛋白主要提供甜味和风味修饰作用。在烘焙食品、糖果和冷冻甜品等体系中,即使采用甜味蛋白替代甜味来源,仍需额外加入膳食纤维、糊精、阿洛酮糖或其他填充剂以维持产品质构。因此,其经济性评价应基于完整配方体系,而非仅比较甜味剂本身的价格。

5.2 发酵生产与下游加工的成本约束

甜味蛋白的产业化可行性在很大程度上取决于上游发酵和下游纯化过程的综合效率。对于重组蛋白产品而言,单位产品制造成本主要受到发酵滴度、生产强度、分泌效率以及下游回收率等因素影响。目前公开报道的代表性生产水平显示,以*K. phaffii*为底盘的巴西甜蛋白发酵滴度可达到约1.4 g/L,而莫内林工程菌株的滴度已达到2.45~6.0 g/L^[17, 22-23, 27]。若按每立方米发酵液计算,可分别获得约1.4 kg巴西甜蛋白和2.45~6.0 kg莫内林产物。考虑到其数百至数千倍于蔗糖的甜度,上述产量在理论上已能够对应数吨至十余吨蔗糖的等甜度产出。然而,与工业化生产的氨基酸、有机酸、酶制剂以及赤藓糖醇等发酵产品相比,当前甜味蛋白的发酵滴度仍处于相对较低水平。工业成熟产品的发酵终浓度通常可达到50~200 g/L以上,而多数甜味蛋白仍处于个位数g/L水平。因此,进一步提高表达量、缩短发酵周期、增强分泌效率以及提升单位时间生产强度,仍是降低生

表2 甜味蛋白与典型甜味剂的甜度-价格盈亏平衡关系

Table 2 Break-even price relationships of sweet proteins and representative sweeteners on an equi-sweetness basis				
甜味剂	相对甜度 (蔗糖=1)	100 g蔗糖等甜度 理论用量/g	相对阿斯巴甜的盈亏 平衡价格倍数	产业化特点及应用定位
赤藓糖醇	0.6~0.7	143~167	—	体积型甜味剂,可提供甜味贡献、固形物支撑及口感改善作用,具有冰点调节效果,不能仅依据甜度进行等量替代
阿斯巴甜	约200	约0.50	1.0	成熟的高倍甜味剂,甜味特征接近蔗糖,高温加工及部分酸碱条件下稳定性受限,应用场景受到一定限制
巴西甜蛋白	500~2000	0.05~0.20	2.5~10.0	甜度高,用量低,具有较好的热稳定性和酸稳定性,适用于饮料等酸性食品体系,并可用于复配减糖配方
索马甜	2000~3000	0.033~0.050	10.0~15.0	甜度极高,可作为风味调节剂使用,存在起甜较慢和后味持续时间较长等特点,需通过复配优化感官表现
莫内林	1500~3000	0.033~0.067	7.5~15.0	甜度高,甜味品质接近蔗糖,工业应用通常采用热稳定性更高的单链工程化变体

注: 未计入加工损失、复配及质构补偿成本。

产成本的重要方向。除发酵过程外,下游纯化工艺同样决定最终制造成本。相比医药蛋白需要高纯度层析纯化,食品级甜味蛋白对纯度要求相对宽松,因此更适合采用离心澄清、膜过滤、超滤浓缩及喷雾干燥等低成本工艺路线。若目标蛋白能够实现高效胞外分泌,则可有效避免细胞破碎、包涵体复性及复杂层析步骤,从而显著降低生产成本。相反,若仍需依赖多步层析纯化或低效率复性过程,其经济竞争力将受到明显制约。因此,未来产业化菌株评价不应仅关注最高滴度,还应综合考虑生产强度、分泌率、批间稳定性、总回收率以及食品级纯化的可简化程度等指标。

5.3 法规准入与市场应用前景

除生产成本外,法规准入也是影响甜味蛋白商业化的重要因素。目前,索马甜已获得多个国家和地区批准并实现商业化应用,而部分新型甜味蛋白及人工设计甜味蛋白仍处于研发阶段。对于通过人工智能设计的新型蛋白质分子,还需开展系统的毒理学、安全性及潜在致敏性评价,并完成FDA、EFSA及国家食品监管机构的审批程序。这些研究与注册成本可能在产业化早期占据相当比例,并影响产品上市周期。从应用场景来看,甜味蛋白与阿斯巴甜、安赛蜜和三氯蔗糖等高倍甜味剂具有更接近的功能边界。凭借天然来源标签、较好的风味特征以及部分蛋白所具有的增味和掩味功能,甜味蛋白在饮料、乳制品、营养食品及功能食品领域具有较大的应用潜力。相

比之下,在需要大量固形物支撑的烘焙食品、糖果和冷冻甜品中,甜味蛋白短期内更可能作为复配组分使用,而难以完全替代糖醇类甜味剂。综合现有技术水平与市场需求分析,甜味蛋白更现实的发展路径并非直接替代所有传统甜味剂,而是遵循“先复配、后替代;先液体、后固体;先高附加值、后大宗市场”的产业化策略。当前最具潜力的应用方向包括减糖饮料、乳制品、植物基食品、运动营养食品以及天然标签产品等领域。

综上,甜味蛋白已初步具备产业化发展的技术基础,其超高甜度赋予了显著的单位等甜度成本优势,使其即使在单位质量成本高于传统甜味剂的情况下,仍有望保持经济竞争力。然而,现阶段公开数据主要源于实验室和中试规模研究,对于工业放大后的生产强度、回收率、能耗及整体制造成本仍缺乏系统数据支撑。综合来看,甜味蛋白已展现出明确的理论成本窗口和产业化潜力,但其能否实现与现有主流甜味剂的全面竞争,仍有待中试和工业化数据进一步验证。未来随着高效底盘细胞构建、发酵过程强化、低成本纯化工艺以及AI辅助蛋白设计技术的持续发展,甜味蛋白有望逐步突破生产成本和应用性能限制,从高附加值功能配料进一步发展为新一代绿色天然甜味剂平台,为减糖食品和健康食品产业提供新的技术路径。

6 结论与展望

总体来看,甜味蛋白兼具高甜度、低热量及

优良生物相容性等多重优势，是极具应用前景的新型代糖之一。随着人源甜味受体结构解析研究的不断深入，研究者对其变构识别与信号激活机制的理解，正由早期的宏观现象描述逐步迈向原子尺度的定量解析阶段。与此同时，针对 *K. phaffii* 等底盘细胞的合成生物学改造，也在持续推动甜味蛋白由传统天然提取模式向工程化、绿色化和规模化制造模式转变。此外，AI 驱动的蛋白质工程优化及从头设计技术，为甜味蛋白的性能提升及新型分子创制提供了重要的方法学支撑^[4, 93, 100-101]。未来，甜味蛋白领域仍亟需在多个关键方向实现突破。首先，需要系统阐明不同甜味蛋白与人源甜味受体之间的差异化识别与激活机制，进一步构建具有更高普适性的“序列—结构—界面—甜感”定量关联模型。其次，应围绕热稳定性、酸碱耐受性、甜味动力学及后味控制等核心性能指标，发展多目标协同优化的蛋白工程策略。此外，还需结合高效底盘细胞构建、发酵过程强化及下游分离纯化技术，系统提升甜味蛋白规模化生产能力与产业化经济性。同时，推动 AI 设计、自动化实验平台与 DBTL (Design-Build-Test-Learn) 闭环体系的深度融合，加速甜味蛋白由天然分子改良向全新人工甜味蛋白理性创制的转变。随着结构生物学、合成生物学与人工智能等领域的持续交叉融合，甜味蛋白有望由当前的高附加值功能性配料，进一步发展为面向健康食品工业的重要蛋白质创新品类，并推动未来代糖产业体系的绿色化与智能化升级^[2, 103]。

参 考 文 献

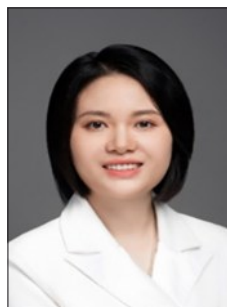
- [1] DEBRAS C, DESCHASAUX-TANGUY M, CHAZELAS E, et al. Artificial Sweeteners and Risk of Type 2 Diabetes in the Prospective NutriNet-Santé Cohort [J]. *Diabetes Care*. 2023;46(9):1681-1690.
- [2] 刘倩, 彭梓昌, 王雅梦, 等. 合成生物学驱动的甜味蛋白创新生产 [J]. *化学进展*, 2025, 37(8): 1131-1141.
LIU Q, PENG Z C, WANG Y M, et al. Innovative production of sweet proteins driven by synthetic biology [J]. *Progress in Chemistry*, 2025, 37(8): 1131-1141.
- [3] ABRAMSON J, ADLER J, DUNGER J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 [J]. *Nature*, 2024, 630(8016): 493-500.
- [4] ANISHCHENKO I, PELLOCK SJ, CHIDYAUSIKU TM, et al. *De novo* protein design by deep network hallucination [J]. *Nature*, 2021;600(7889):547-552.
- [5] NOVIK TS, KOVESHNIKOVA EI, KOTLOBAY AA, et al. Sweet-tasting natural proteins brazzein and monellin: safe sugar substitutes for the food industry [J]. *Foods*, 2023, 12(22): 4065.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] SUEZ J, KOREM T, ZEEVI D, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014;514(7521):181-186.
- [9] KANT R. Sweet proteins-potential replacement for artificial low calorie sweeteners [J]. *Nutrition Journal*, 2005, 4: 5.
- [10] POTTER S M, ZHAO D, ROBERTS A, et al. Safety evaluation of honey truffle sweet protein produced from *Komagataella phaffii* [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2026, 211: 115987.
- [11] THEERASILP S, KURIHARA Y. Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(23): 11536-11539.
- [12] 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 on the expression of sweet proteins by genetic engineering [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(2): 453-459.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] LEE HM, PARK SW, LEE SJ, 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.
- [16] NEIERS F, BELLOIR C, POIRIER N, 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.
- [17] 高鹏, 张胜梦, 孙元伟, 等. 毕赤酵母高效合成甜味蛋白 Brazzein [J]. *食品科学*, 2025, 46(17):111-119.
GAO P, ZHANG S M, SUN Y W, et al. Efficient synthesis of

- sweet protein brazzein by *Komagataella phaffii* [J]. Food Science, 2025, 46(17): 111-119.
- [18] DANIELL S, MELLITS KH, FAUS I, et al. Refolding the sweet-tasting protein thaumatin II from insoluble inclusion bodies synthesised in *Escherichia coli* [J]. Food Chemistry, 2000, 71(1): 105-110.
- [19] MORALEJO FJ, CARDOZA RE, GUTIÉRREZ S, et al. Overexpression and lack of degradation of thaumatin in an *aspergillopepsin* A-defective mutant of *Aspergillus awamori* containing an insertion in the *pepA* gene [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(6): 772-777.
- [20] NICHOLAS CHUA B, GUO WM, TENG WONG H, et al. A sweeter future: using protein language models for exploring sweeter brazzein homologs [J]. Food Chemistry, 2023, 426: 136580.
- [21] JOSEPH JA, AKKERMANS S, VAN IMPE JFM. Effects of Temperature and pH on Recombinant Thaumatin II Production by *Pichia pastoris*[J]. Foods, 2022, 11(10):1438.
- [22] XIAOLI ZHANG, TAKESHI ITO, KEIJI KONDO, et al. Production of single chain recombinant monellin by high cell density culture of genetically engineered *Candida utilis* using limited feeding of sodium ions [J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 2002, 35(7): 654-659.
- [23] JIA L, TU T, HUAI Q, et al. 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.
- [24] Chen Z, Li Z, Yu N, et al. Expression and secretion of a single-chain sweet protein, monellin, in *Saccharomyces cerevisiae* by an α -factor signal peptide [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(4): 721-725.
- [25] 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.
- [26] CHEN Z, HENG C, LI Z, et al. 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.
- [27] JIA L, LI T, YANG Z, et al. Enhancing monellin production in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation through an efficient on-line methanol/sorbitol co-feeding strategy [J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 369: 133350.
- [28] TOMOMI MATSUYAMA, MAKIKO SATOH, RIEKO NAKATA, et al. Functional Expression of Miraculin, a Taste-Modifying Protein in *Escherichia Coli*[J]. The Journal of Biochemistry, 2009, 145(4): 445 - 450.
- [29] BERLEC A, TOMPA G, SLAPAR N, et al. 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.
- [30] POIRIER N, ROUDNITZKY N, BROCKHOFF A, et al. Efficient production and characterization of the sweet-tasting brazzein secreted by the yeast *Pichia pastoris* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(39): 9807-9814.
- [31] YAN S, SONG H, PANG DX, et al. Expression of plant sweet protein brazzein in the milk of transgenic mice [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76769.
- [32] 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.
- [33] LAMPHEAR BJ, BARKER DK, BROOKS CA, et al. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener [J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3(1): 103-114.
- [34] LOZANO TEROL G, GALLEG0-JARA J, SOLA MARTÍNEZ RA, et al. Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 682001.
- [35] JIANG RZ, YUAN ST, ZHOU YL, et al. Strategies to overcome the challenges of low or no expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Advances, 2024, 75: 108417.
- [36] HUNG CY, CHENG LH, YEH CM. Functional expression of recombinant sweet-tasting protein brazzein by *Escherichia coli* and *Bacillus licheniformis* [J]. Food Biotechnology, 2019, 33(3): 251-271.
- [37] MACAULEY-PATRICK S, FAZENDA M L, MCNEIL B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270.
- [38] 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.
- [39] 刘毅, 卢尚阳, 王语晴, 等. 甜味蛋白 monellin 高甜度、高热稳定性突变体的分子构建及性质研究 [J]. 中国食品学报, 2024, 24(8): 53-61
- LIU Y, LU S Y, WANG Y Q, et al. Molecular construction and characterization of high-sweetness and thermostable mutants of the sweet protein monellin [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(8): 53-61.
- [40] 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.
- [41] 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
- [42] HELLEKANT G, DANILOVA V. Brazzein a small, sweet protein: discovery and physiological overview [J]. Chemical Senses, 2005, 30(Suppl 1): i88-i89.
- [43] LUCIGNANO R, SPADACCINI R, MERLINO A, et al. 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.
- [44] ASSADI-PORTER FM, ACETI DJ, CHENG H, 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.
- [45] MASUDA T, SUZUKI M, YAMASAKI M, et al. 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.
- [46] MING D, HELLEKANT G. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B [J]. FEBS Letters, 1994, 355(1): 106-108.
- [47] FARAG MA, REZK MM, 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(Pt A): 111853.
- [48] LIU X, MAEDA S, HU Z, et al. 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.
- [49] 卢尚阳, 常诗瑜, 王语晴, 等. 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(02): 559-573..
LU S Y, CHANG S Y, WANG Y Q, et al. Research progress in genetic engineering and molecular modification of sweet proteins [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 559-573.
- [50] 杨阳, 李淑燕, 倪元颖. 甜味蛋白 Thaumatin 研究进展及在食品工业中的应用 [J]. 中国食品添加剂, 2012, (05): 171-176.
YANG Y, LI S Y, NI Y Y. Research progress of the sweet protein thaumatin and its application in the food industry [J]. China Food Additives, 2012, (5): 171-176.
- [51] 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 the natural sweet protein thaumatin [J]. China Food Additives, 2018, (5): 186-189.
- [52] BAYRAM H M, OZTURKCAN A. Added sugars and non-nutritive sweeteners in the food supply: Are they a threat for consumers? [J]. Clinical Nutrition ESPEN, 2022, 49: 442-448.
- [53] CASTRO-MUÑOZ R, CORREA-DELGADO M, CÓRDOVA-ALMEIDA R, et al. Natural sweeteners; Sources, extraction and current uses in foods and food industrie [J]. Food Chemistry, 2022, 370: 130991.
- [54] 谭家忠, 廖娜, 张宝堂, 等. 天然甜味剂的开发应用及展望 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33 (1): 32-39.
TAN J Z, LIAO N, ZHANG B T, et al. Development, application and prospects of natural sweeteners [J]. China Food Additives, 2022, 33(1): 32-39.
- [55] 谢新春, 王红波, 胡思前, 等. 一种基于微生物发酵从非洲竹芋中提取索马甜的方法: CN111574607B [P]. 2023.
XIE X C, WANG H B, HU S Q, et al. A method for extracting thaumatin from *Thaumatococcus daniellii* based on microbial fermentation: CN111574607B [P]. 2023.
- [56] 朱凌宣, 崔鑫, 胡善桐, 等. 毕赤酵母全蛋白质组信号肽及分泌蛋白分析 [J]. 生物工程学报, 2024, 40(03): 834-846.
ZHU L X, CUI X, HU S T, et al. Proteome-wide analysis of signal peptides and secreted proteins in *Pichia pastoris* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 834-846.
- [57] PARSEKAR N, AKKERMANS S, KOZAK D, et al. Enhancing recombinant thaumatin production by *Komagataella phaffii* through cold atmospheric helium plasma jet [J]. Scientific Reports, 2025, 15: 39397.
- [58] 国家市场监督管理总局, 国家卫生健康委员会. 食品安全国家标准食品添加剂索马甜: GB 1886.321—2021 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
State Administration for Market Regulation; National Health Commission of the People's Republic of China. National food safety standard—Food additive thaumatin: GB 1886.321-2021 [S]. Beijing: China Standards Press, 2021.
- [59] 张连忠, 孙涛, 高帅. 甜味蛋白 Brazzein 的研究进展 [J]. 唐山师范学院学报, 2007, (05): 29-32.
ZHANG L Z, SUN T, GAO S. Research progress on the sweet protein brazzein [J]. Journal of Tangshan Normal University, 2007, (5): 29-32.
- [60] 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.
- [61] ASSADI-PORTER F M, ACETI D J, MARKLEY J L. Sweetness determinant sites of brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, 376(2): 259-265.
- [62] SHI Z, XU W, WU L, et al. Structural and functional characterization of human sweet taste receptor [J]. Nature, 2025, 645: 801-808.
- [63] 史勇, 张明军, 张英, 等. 甜味蛋白 Brazzein 基因酵母表达系统的建立 [J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(01): 43-46.

- SHI Y, ZHANG M J, ZHANG Y, et al. Construction of a yeast expression system for the sweet protein brazzein gene [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2010, 32(1): 43-46.
- [64] 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.
- [65] QI T, LI X, LAI L, et al. Boiling-Resistant Single-Chain Sweet Protein Monellin as a Safe and Effective Sugar Alternative for Metabolic and Glycemic Management in Mice [J]. Foods, 2025, 14(21): 3667.
- [66] 邹嘉讯, 张语桐, 杨洋, 等. 马槟榔甜味蛋白在大肠杆菌BL21中的异源表达及摇瓶发酵条件优化 [J]. 化学与生物工程, 2025, 42(12): 53-59.
- ZOU J X, ZHANG Y T, YANG Y, et al. Heterologous expression of mabinlin sweet protein in *Escherichia coli* BL21 and optimization of shake-flask fermentation conditions [J]. Chemistry & Bioengineering, 2025, 42(12): 53-59.
- [67] 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.
- [68] TONG M, DUAN S, WANG L, et al. Molecular mechanism of aspartame recognition by the human sweet taste receptor T1R2-T1R3 revealed by homology modeling and molecular dynamics simulations [J]. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2026, 40(1): 74.
- [69] JUEN Z, LU Z, YU R, et al. The structure of human sweetness [J]. Cell, 2025, 188(15):4141-4153.
- [70] LAFFITTE A, NEIERS F, BRIAND L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues [J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2014, 17(4): 379-385.
- [71] VO P, CONNORS DE, SHARKEY BP, et al. Sweet protein allosteric binding and activation of the human T1R2/R3 sweet receptor: A simulation model validated by in vitro receptor activation assay [J]. Biochemistry, 2026, 65: 399-416.
- [72] 何明娟, 刘宁, 邹曙明, 等. 马槟榔甜蛋白基因(MabinlinII)的密码子优化及其在大肠杆菌中的表达 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(18): 78-84.
- HE M J, LIU N, ZOU S M, et al. Codon optimization of the sweet protein gene Mabinlin II and its expression in *Escherichia coli* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(18): 78-84.
- [73] 何明娟, 邹曙明, 蒋霞云, 等. 甜味蛋白特性及其表达的研究进展 [J]. 生物化工, 2018, 4(5): 105-108.
- HE M J, ZOU S M, JIANG X Y, et al. Research progress on the properties and expression of sweet proteins [J]. Biological Chemical Engineering, 2018, 4(5): 105-108.
- [74] MORINI G, BASSOLI A, TEMUSSI PA. From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2-T1R3 receptor [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48(17):5520-5529.
- [75] TEMUSSI PA. Natural sweet macromolecules: how sweet proteins work [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63(16): 1876-1888.
- [76] SHIMIZU-IBUKA A, MORITA Y, TERADA T, et al. Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity [J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 359(1):148-158.
- [77] TANCREDI T, PASTORE A, SALVADORI S, et al. Interaction of sweet proteins with their receptor. A conformational study of peptides corresponding to loops of brazzein, monellin and thaumatin [J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(11): 2231-2240.
- [78] SHIMIZU-IBUKA A, NAKAI Y, NAKAMORI K, et al. Biochemical and genomic analysis of neoculin compared to monocot mannose-binding lectins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(13):5338.
- [79] 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 Univ Biol Sci Bull, 2021, 76(4): 175-190.
- [80] HAO S, GUTHRIE B, KIM KS, et al. Steviol rebaudiosides bind to four different sites of the human sweet taste receptor (T1R2/T1R3) complex explaining confusing experiments [J]. Communications Chemistry, 2024, 7(1):236.
- [81] 白淑锦, 胡康琦, 黄守法, 等. 索马甜在毕赤酵母中的高效表达[J/OL]. 食品与发酵工业, 1-16.
- BAI S J, HU K Q, HUANG S F, et al. Efficient expression of thaumatin in *Pichia pastoris* [J/OL]. Food and Fermentation Industries, 1-16.
- [82] SATOSHI OKUBO, TOMIKO ASAKURA, KAZUE OKUBO, et al. Neoculin, a taste-modifying sweet protein, accumulates in ripening fruits of cultivated *Curculigo latifolia* [J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165(18): 1964-1969.
- [83] DAMASCENO L M, HUANG C J, BAIRD E E. Co-overexpression of chaperones for enhanced secretion of heterologous proteins in *Pichia pastoris* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(2): 381-389.
- [84] GASSER B, SALOHEIMO M, RINAS U, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview [J]. Microbial Cell Factories, 2008, 7: 11.
- [85] KARBALAEI M, REZAEI SA, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins [J]. Journal of Cellular

- Physiology, 2020, 235(9): 5867-5881.
- [86] DELFI M, EMENDATO A, LEONE S, et al. A Super Stable Mutant of the Plant Protein Monellin Endowed with Enhanced Sweetness [J]. Life (Basel), 2021, 11(3): 236.
- [87] LIU Y, XU J, MA M, et al. Computational design towards a boiling-resistant single-chain sweet protein monellin [J]. Food Chemistry, 2024, 440: 138279.
- [88] YOU T, SHI S, CHEN C et al. Structural Basis for the Exceptional Thermal Stability of the Boiling-Resistant Sweet Protein MNEI [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(25): 15959-15966.
- [89] BILAL M, JI L, XU S, et al. Bioprospecting and biotechnological insights into sweet-tasting proteins by microbial hosts: a review [J]. Bioengineered, 2022, 13(4):9815-9828.
- [90] MASUDA T, KITABATAKE N. Developments in biotechnological production of sweet proteins [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 102(5): 375-89.
- [91] TEMUSSI PA. Why are sweet proteins sweet? Interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor [J]. FEBS Letters, 2002, 526(1-3): 1-4.
- [92] SPADACCINI R, TRABUCCO F, SAVIANO G, et al. The mechanism of interaction of sweet proteins with the T1R2-T1R3 receptor: evidence from the solution structure of G16A-MNEI [J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 328(3): 683-92.
- [93] MADANI A, KRAUSE B, GREENE E R, et al. Large language models generate functional protein sequences across diverse families [J]. Nature Biotechnology, 2023, 41(8): 1099-1106.
- [94] MA M, SHI S, HUANG Z, et al. Enhancing the stability of sweet protein neoculin for food applications using computational strategies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(11): 6867-6877.
- [95] REN Z, JIANG L, DI Y, et al. CodonBERT: a BERT-based architecture tailored for codon optimization using the cross-attention mechanism [J]. Bioinformatics, 2024, 40(7): btac330.
- [96] ZHAO X, WANG C, ZHENG Y, et al. 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.
- [97] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold [J]. Nature, 2021, 596(7873): 583-589.
- [98] WATSON JL, JUERGENSEN D, BENNETT NR, et al. *De novo* design of protein structure and function with RFdiffusion [J]. Nature, 2023, 620(7976): 1089-1100.
- [99] LIN Z, AKIN H, RAO R, et al. Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model[J]. Science, 2023, 379(6637): 1123-1130
- [100] BAEK M, DIMAIO F, ANISHCHENKO I, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network [J]. Science, 2021, 373(6557): 871-876.
- [101] FALLAHPOUR A, GUREGHIAN V, FILION GJ, et al. CodonTransformer: a multispecies codon optimizer using context-aware neural networks [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 3205.
- [102] DING S, ZHANG Y. *De novo* design of protein binders targeting the human sweet taste receptor as potential sweet proteins[EB/OL]. arXiv. 2026:2601.14574.
- [103] RADIVOJEVIĆ T, COSTELLO Z, WORKMAN K, et al. A machine learning Automated Recommendation Tool for synthetic biology [J]. Nature Communications, 2020, 11: 4879.



通讯作者: 孙丽超(1988-),女,副研究员,硕士生导师,研究方向为合成生物学与代谢工程。

E-mail: sunlichao@bit.edu.cn



共同通讯作者: 霍毅欣(1980-),男,教授,博士生导师,研究方向为合成生物学与代谢工程。

E-mail: huoyixin@bit.edu.cn



第一作者: 杨申燕(2000-),女,硕士研究生,研究方向为合成生物学与代谢工程。

E-mail: shenyanyang202204@163.com