

牛乳清蛋白的合成生物学研究进展

翟征远^{1,2} 侯凯旋¹ 王 怡¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中原食品实验室, 河南 漯河 462300)

摘要:牛乳清蛋白约占牛乳中总蛋白质质量的 20%, 因其较高的营养价值和多功能性, 在食品工业中被广泛应用, 市场需求巨大。但国内在牛乳清蛋白生产方面存在原料不足、缺乏高效分离技术等问题。传统生产方式不仅复杂, 而且伴随严重的“三废”污染。利用合成生物学技术, 通过建立微生物细胞工厂, 能够实现食品蛋白质的大量合成。目前, 这种异源蛋白质表达方法已逐渐用于牛乳清蛋白的生产。作者概述了牛源 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白的功能与应用, 介绍了当前利用各种表达系统进行生物合成的现状, 并对未来优化底盘细胞、开发更高效的表达元件, 从而实现牛乳清蛋白的工业化生产进行了展望。

关键词:牛源 β -乳球蛋白; 牛源 α -乳白蛋白; 蛋白质异源表达; 细胞工厂

Progress in Synthetic Biology of Bovine Whey Proteins

ZHAI Zhengyuan^{1,2} HOU Kaixuan¹ WANG Yi¹

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462300, China)

Abstract: Bovine whey protein accounts for about 20% of the total protein mass in cow's milk. With its rich nutritional value and multifunctionality, it is widely applied in the food industry and has substantial market demand. However, domestic production of bovine whey protein faces challenges such as insufficient raw materials and a lack of efficient separation technologies. Traditional production methods are complex and generate significant "three wastes" pollution. Recent advancements in synthetic biology have enabled the construction of microbial cell factories for the large-scale synthesis of food proteins. Currently, this heterologous protein expression technology has been gradually applied to bovine whey protein production. The functions and applications of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin are outlined, the current status of biosynthesis using various expression systems is described, and the future optimization of chassis cells and development of more efficient expression components for the industrial production of bovine whey proteins are envisioned.

Keywords: bovine β -lactoglobulin; bovine α -lactalbumin; heterologous protein expression; microbial cell factories

随着中国经济的发展, 现代人的膳食与生活观念发生了显著转变, 膳食结构从过去的粗茶淡饭逐渐转向“低糖、低脂、高蛋白质”的膳食黄金法则。蛋白质作为构成人体细胞组织、参与生命活动的重要营养成分, 来源广泛, 包括畜肉、水产、乳制品、蛋制品, 以及用大豆、豌豆制成的植物肉^[1]。

其中乳制品约占蛋白质消费总量的 10%, 仅次于谷物(40%)和肉类(18%), 是第三大蛋白质来源^[2]。乳制品中不仅含有人体生长发育所需的氨基酸, 且消化率高达 98%~100%, 远超植物蛋白, 因此乳制品是人类膳食结构中重要的蛋白质来源。

基金项目: 国家“十四五”重点研发计划项目(2022YFF1100102); 中国农业大学国家级大学生科研创新项目(2022002)。

通信作者: 翟征远(1985—), 男, 博士, 副教授, 博士研究生导师, 主要从事食品微生物学研究。E-mail: zhaizy@cau.edu.cn

收稿日期: 2023-06-21 **修回日期:** 2023-09-04

按照当前的人口增长速度,预计未来30年全球粮食系统还需要增加30%~50%的蛋白质产量,以满足接近100亿人口的需求。然而,传统农牧业方式中,家畜的生长周期通常需要数月至数年,农作物的生长周期通常也需要数周或数月,导致蛋白质的供给速率相对缓慢,还面临环境污染、成本高昂、土地和水资源过度消耗等问题。因此,为了满足不断增长的蛋白质需求,必须探索新型蛋白质来源。

近年来,替代蛋白质逐渐受到人们的重视。植物来源的乳蛋白替代物已取得实质性进展,质量也在不断提升。然而,这类替代蛋白质在营养价值上仍无法与传统动物乳蛋白相媲美,无法提供完全一致的营养素或氨基酸特征,且口感上也存在一定差距。随着合成生物学的发展,通过构建细胞工厂表达乳蛋白成了应对这些问题的有效途径。

1 牛乳清蛋白应用现状

牛乳中富含多种人体所需的蛋白质,主要分为酪蛋白和乳清蛋白。乳清蛋白约占牛乳中总蛋白质质量的20%,包括 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白、牛血清蛋白、乳铁蛋白等。这些乳清蛋白广泛应用于焙烤食品、酸奶、干酪、配方食品中,是重要的食品基料^[3]。

1.1 牛源 β -乳球蛋白功能及应用现状

牛源 β -乳球蛋白是乳清中含量最丰富的蛋白质,占乳清蛋白质量的48%~68%。其相对分子质量约为18 400,等电点(pI)为5.2,主要以二聚体的形式存在,由非共价键连接2个单位亚基,包含162个氨基酸,其中包括缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸等多种支链氨基酸和必需氨基酸,具有较高的营养价值^[3]。

β -乳球蛋白在食品工业中应用广泛。如在瞬时超高温灭菌奶的贮藏过程中,胶凝现象可能会影响奶产品的货架期,而添加 β -乳球蛋白能够延缓胶凝的发生^[4-5]。利用这一特性,变性的 β -乳球蛋白可用于酸奶生产,能形成比普通酸奶多6~10倍的凝脂,从而提升产品质量。 β -乳球蛋白富含必需氨基酸和支链氨基酸,是乳清蛋白中半胱氨酸和甲硫氨酸的主要来源,因此可添加到蛋白质强化饮料中。 β -乳球蛋白的疏水结构使其可结

合脂溶性维生素和脂肪酸,从而提高这些分子的转运效率,促进机体的吸收^[6]。

1.2 牛源 α -乳白蛋白功能及应用现状

牛源 α -乳白蛋白占乳清蛋白质量的20%~25%,占牛乳总蛋白质质量的2%~3%。作为一种钙结合球蛋白, α -乳白蛋白结构紧密,前体肽由142个氨基酸残基组成,其中前19个氨基酸为信号肽。成熟的 α -乳白蛋白包含123个氨基酸残基,含有8个半胱氨酸,通过4个二硫键连接,相对分子质量约为14 000,pI为4~5^[7]。不同哺乳动物的 α -乳白蛋白氨基酸序列存在差异,物种亲缘性越低,差异越大。而牛源 α -乳白蛋白与人乳中 α -乳白蛋白的氨基酸序列相似性高达76%。牛源 α -乳白蛋白富含色氨酸和半胱氨酸等必需氨基酸,具有极高的营养价值。

α -乳白蛋白是多种必需氨基酸(如色氨酸、赖氨酸、半胱氨酸)及支链氨基酸(如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)的重要来源。色氨酸能够提高机体免疫能力,促进5-羟色胺和褪黑素的合成,从而调节神经系统的中枢安定效应^[8-9]。研究表明,增加 α -乳白蛋白的摄入可明显改善婴儿的安静睡眠期和睡眠潜伏期^[8]。同时, α -乳白蛋白还可以提供血管紧张素转换酶-I抑制剂、抗菌肽等生物活性肽^[10]。在乳清蛋白中, α -乳白蛋白作为 Ca^{2+} 结合载体,还能够与 Zn^{2+} 等其他金属离子结合,促进微量元素元素的吸收,增强机体及细胞的免疫功能及吞噬细胞的吞噬能力。研究显示, α -乳白蛋白具有改善肠道菌群的潜力,对婴儿肠道中的双歧杆菌具有促进增殖作用,表现出类似益生元的功能;且添加 α -乳白蛋白的配方乳粉可有效降低婴儿肠道不适的发生率,使喂养效果更加接近母乳喂养^[8,11-13]。此外,在运动饮料中添加 α -乳白蛋白能够有效维持血红蛋白的水平,提高体能、缓解疲劳,在维持肌肉微结构方面也展现出一定效果^[14]。

2 牛乳清蛋白分离制备及存在的问题

尽管 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白应用前景广阔,市场需求量大,但我国在乳清蛋白分离和生产方面几乎处于空白状态,极度依赖进口^[15]。产生这一现状的原因主要在于国外在生产干酪的同时产生大量副产物乳清,进而通过多级膜、色谱和萃取等集成技术分离 α -乳白蛋白,成本低且技术成

熟^[6]。相比之下,国内缺少乳清蛋白原料,如果从鲜奶中直接分离 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白,缺少牛乳蛋白全组分分离技术,同时存在干扰成分多、副产物浪费、成本过高等问题。例如,牛乳中部分蛋白质的pI、相对分子质量相近,蛋白质之间易相互交联,难以获得高纯度的蛋白质基料;此外,如果无法同时有效分离和纯化牛乳中的酪蛋白、乳糖、矿物盐等成分,必然导致资源浪费;牛乳蛋白质量分数受奶牛营养摄入、肠道微生物组成、血液中氨基酸浓度等较难直接调控的因素影响^[16];同时,从传统畜牧业获得的牛乳中提取乳清蛋白,会产生大量温室气体,对环境造成负担。因此,直接从牛乳中提取乳清蛋白存在诸多难题,难以应用一种成熟的技术进行工业化生产。为解决这些问题,人们尝试通过微生物细胞工厂生产乳清蛋白,作为一种潜在的替代方案解决当前技术的局限性。

3 牛乳清蛋白的合成生物学研究现状

合成生物学遵循“自下而上”的理念,结合工程与计算科学的原理,重新设计并优化生命系统,通过“设计-构建-检测-分析”这一科学闭环过程,实现高效合成。通过合成生物学制备牛乳清蛋白,不仅可以减少传统畜牧业对资源的过度消耗,减轻对环境的压力,同时可缓解因过量摄入动物蛋白带来的健康问题^[2]。目前,已有研究者以牛乳铁蛋白基因为模板,经过密码子优化后,以pPIC9K为表达载体,构建重组表达载体转入毕赤酵母中,成功实现了牛乳铁蛋白的异源高效表达^[17]。因此,作者对 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白的异源表达研究进展进行了综述。

3.1 β -乳球蛋白异源生物合成现状

3.1.1 利用原核表达系统合成 β -乳球蛋白

大肠杆菌作为使用最广泛的蛋白质表达系统,具有繁殖周期较短、培养过程简单、遗传背景清晰、基因表达易于控制的特点,可通过大量试验进行单个蛋白质的低成本、大规模表达^[18-19]。

目前已有许多研究者成功利用大肠杆菌表达 β -乳球蛋白,技术也较为成熟。大肠杆菌DH5 α 是一种免疫缺陷型诱变菌株,无法在外源DNA入侵时利用限制性内切酶将其剪切,是常用的基因工程宿主菌,目前也常用于质粒的克隆等。早在

1996年,Chatel等^[20]就利用IPTG诱导pTTQ18 β lac.7.7.1质粒,在大肠杆菌DH5 α 中成功表达了 β -乳球蛋白,表达量为5~10 mg/L。3年后,Chatel等^[21]又利用2种寡聚核苷酸在BLG的N端和C端分别添加BamH 1和Xho 1位点,将 β -乳球蛋白基因扩增到pET26质粒中,在大肠杆菌BL21中成功表达 β -乳球蛋白并表征了其结构,表达量为670 ng/ μ g(以总蛋白质质量计)。Ariyaratne等^[22]将 β -乳球蛋白基因克隆到pTrxFus载体中,转化至*E.coli* G1724感受态细胞,以融合蛋白形式成功表达,表达量为15 mg/L。有研究者利用pET21a载体在*E. coli* DE3菌株中表达 β -乳球蛋白,表达量为109 mg/g(以湿菌质量计),并探究了位于121位的半胱氨酸对 β -乳球蛋白结构的影响^[23]。Loch等^[24]利用pETDuet-1载体在*E. coli* Origami B菌株中表达 β -乳球蛋白,产生30~40 mg/L的功能性重组 β -乳球蛋白。该研究将L1A/I2S突变引入蛋白质序列,从而获得了可溶性蛋白质。此外,李建杰等^[25]提取牛乳腺细胞RNA后,首先进行RT-PCR得到 β -乳球蛋白片段,再利用pET-32a载体构建重组表达质粒,转化至*E. coli* Origami,经IPTG诱导后,采用Western blot确定 β -乳球蛋白的表达量可以达到350 mg/L。

乳酸菌广泛应用于食品加工和保存,同时也可以作为蛋白质异源表达的宿主。Hazebrouck等^[26]在干酪乳杆菌中利用乳杆菌素诱导质粒系统,在 β -乳球蛋白N端融合乳杆菌信号肽SP_{USP45},构建pCYT质粒和pSCE质粒,并转化至干酪乳杆菌BL23,最终 β -乳球蛋白的表达量达到27 μ g/L。

虽然大肠杆菌等原核表达系统能够用于 β -乳球蛋白的生物合成,但其产量较低,仅够支撑科学研究用途,尚无法满足食品生产的需求。由于大肠杆菌是原核生物,一般缺乏成熟的翻译后修饰系统,蛋白质的加工修饰体系不完善,会导致表达的真核蛋白质不能正确折叠或生物活性降低;异源蛋白质表达产物,尤其是相对分子质量较大的蛋白质,难以进行正确的折叠。大肠杆菌表达的目的蛋白质常以包涵体形式存在,较难分离纯化。因此大肠杆菌表达系统仍存在一定缺陷。

3.1.2 利用真核表达系统合成 β -乳球蛋白

酵母是一种常用于异源重组蛋白表达的宿主系统。其培养简单、成本低、蛋白质表达量高且具

有多种细胞器,能够通过翻译后的加工修饰来提升蛋白质生物活性。且不含毒素,无须加入抗生素等不利于蛋白质表达的物质。与昆虫或哺乳动物细胞相比,更易于大规模培养,因此常被用于异源重组蛋白的表达^[27]。此外,酵母菌能在较高的细胞密度下持续发酵,这使其适于工业化生产。在众多酵母种类中,酿酒酵母和毕赤酵母是最常用的菌株。毕赤酵母相比于酿酒酵母的表达产物活性更高,更适用于高等真核生物基因的表达^[28]。

酿酒酵母是最早用于异源蛋白质表达的真

核细胞,目前已成为重要的模式生物,并已完成全基因组测序,常用于表达在大肠杆菌中不能很好生产、具有折叠问题或需要翻译后修饰的重组蛋白。已有利用酿酒酵母制成的胰岛素、乙型肝炎表面抗原等产品。如表1所示,Totsuka等^[29]将编码 β -乳球蛋白的cDNA全编码区插入酵母表达载体pYG100的酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子和终止子之间,转化酿酒酵母AH22,在培养基中成功表达了 β -乳球蛋白,表达量为1.1 mg/L。

表1 β -乳球蛋白异源表达案例

Table 1 Example of the heterologous expression of β -lactoglobulin

表达系统	表达方式	表达量	参考文献	
细菌	<i>E. coli</i> DH5a	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pTTQ18 β lac.7.7.1 载体上进行表达	5~10 mg/L	[20]
	<i>E. coli</i> BL21	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pET26 载体上进行表达	670 ng/mg(以总蛋白质质量计)	[21]
	<i>E. coli</i> G1724	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pTrxFus 载体上进行表达	15 mg/L	[22]
	<i>E. coli</i> DE3	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pET21a 载体上进行表达	109 mg/g(以湿菌质量计)	[23]
	<i>E. coli</i> Origami B	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pETDuet-1 载体上进行表达	30~40 mg/L	[24]
	<i>E. coli</i> Origami	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pET-32A 载体上进行表达	350 mg/L	[25]
	干酪乳杆菌 BL23	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pCYT、pSCE 载体上进行表达	27 μ g/L	[26]
真菌	酿酒酵母 AH22	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pYG100 载体上进行表达	1.1 mg/L	[29]
	毕赤酵母 GS115	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pPIC9 载体上进行表达	1 g/L	[31]
	毕赤酵母 X33	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pPICZaA 载体上进行表达	150 mg/L	[32]
	毕赤酵母 X33	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pPICZaB 载体上进行表达	200 mg/L	[33]
	里氏木霉 M1908	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pTTv248 载体上进行表达	1 g/L	[34]
动物细胞系	草地夜蛾 Sf9 细胞	将 <i>rBLG</i> 基因构建至 pVL1392 载体上进行表达	5 mg/L	[35]
转基因动物	转基因小鼠	显微注射 β -乳球蛋白基因片段	2 g/L	[36]

注:转基因小鼠的 β -乳球蛋白异源表达方式与其他有所不同,是在克隆 β -乳球蛋白基因后双酶切,利用同源重组的原理对DNA片段直接进行显微注射获得。

毕赤酵母是甲醇酵母的一种,也是常用的异源蛋白质表达宿主之一^[30]。Kim等^[31]构建了具备来自酿酒酵母的醇氧化酶I启动子、His标签、 α -交配型因子分泌信号和 β -乳球蛋白基因的pPIC9质粒,电转化毕赤酵母GS115,成功表达了 β -乳球蛋白,表达量为1 g/L。Wilson等^[32]利用毕赤酵母X33表达了野生型重组 β -乳球蛋白,表达量为150 mg/L。Invernizzi等^[33]利用pPICZaB载体对毕赤酵母X33表达系统进行了优化,使用组成型启动子,优化编码基因并提高培养时的透气量,将表达量提高到200 mg/L。甲醇是毕赤酵母的唯一碳源和能量来源,也是诱导毕赤酵母外源蛋白质表达的常用诱导物,但甲醇本身对宿主也会产生胁迫效应。因此,若要在工业应用中获得甲醇诱导外源蛋白质的高水平表达,甲醇的胁迫效应是

一个需要考虑的重要因素。

里氏木霉是木霉的一种,培养简单、培养基价格低廉易得,适合大规模工业发酵。其工程菌株在优化发酵条件下可分泌最高100 g/L的纤维素酶。里氏木霉本身无毒,被美国食品药品监督管理局认定为安全菌株,其生产的蛋白质可用于食品行业。里氏木霉是异源蛋白质表达中一种非常有潜力的菌株,已有了初步的表达元件体系,并已成功表达了多种酶类。Aro等^[34]通过Genart软件对里氏木霉进行了密码子优化,将其构建至表达载体pTTv248上,进一步将含有强诱导cbh1启动子和 β -乳球蛋白基因的表达盒转入敲除了11种蛋白酶基因的里氏木霉M124菌株,之后得到重组菌株M1908。经过发酵条件优化后, β -乳球蛋白的表达量达到1 g/L。

3.1.3 利用转基因细胞或动物合成 β -乳球蛋白

Mizumachi 等^[35]将 β -lg 基因插入转移载体 pVL1392 中,并将其导入苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)的基因组,随后转染草地贪夜蛾 Sf9 细胞。通过悬浮培养,获得的 β -乳球蛋白表达量达到 5 mg/L。Hyttinen 等^[36]从公牛精子基因组中分离出 β -乳球蛋白基因,克隆后通过标准显微注射技术将其注入小鼠受精卵的原核中。在成功构建的转基因小鼠乳汁中 β -乳球蛋白的质量浓度最高可达 2 g/L。乳腺生物反应器是一种高潜力的表达体系,具有不干扰生物体代谢、产量高且易于提纯等优点,目前已在乳铁蛋白的表达中获得成熟应用^[37]。

3.2 α -乳白蛋白异源生物合成现状

3.2.1 利用原核表达系统合成 α -乳白蛋白

闫浩等^[38]从牛肝脏细胞中克隆了 α -乳白蛋白基因,并将其构建至 pET28a 表达载体上,但未报道 α -乳白蛋白的表达情况。庞雨^[2]将经过密

码子优化的牛源 α -乳白蛋白成熟编码序列与戈壁异常球菌 S8 家族蛋白酶的前肽序列 PEP 进行融合表达,通过 Western blot 分析表明,牛源 α -乳白蛋白能够在大肠杆菌中成功表达。由此可见,通过融合表达策略能够实现 α -乳白蛋白在大肠杆菌中的表达,但目前表达量较低。

3.2.2 利用真核表达系统合成 α -乳白蛋白

如表 2 所示,林敏等^[39]将经过密码子优化后的牛源 α -乳白蛋白基因序列整合到 pPIC9K 表达载体上,在毕赤酵母 GS115 中表达, α -乳白蛋白的表达量为 4.32 mg/L。通过优化质粒,构建了多基因串联表达单元,组建 α -乳白蛋白表达功能模块,使表达量提高到 13.76 mg/L。刘延峰等^[40]利用分子伴侣蛋白共表达技术,将编码 α -factor 信号肽的基因和 α -乳白蛋白基因在毕赤酵母中融合表达。 α -乳白蛋白的摇瓶发酵表达量为 6.0 mg/L,3 L 发酵罐中最高表达量为 56.3 mg/L。

表 2 α -乳白蛋白异源表达案例

Table 1 Example of the heterologous expression of α -lactalbumin

	表达系统	表达方式	产量	文献
细菌	大肠杆菌	将 <i>bALA</i> 基因构建至 pET28a 载体上进行表达	未报道	[2]
	毕赤酵母 GS115	将 <i>ALA</i> 基因构建至 pPIC9K 载体上进行表达	4.32 mg/L	[39]
真菌	毕赤酵母 <i>K. phaffii</i>	将 <i>ALA</i> 基因构建至 pPICZ α A 载体上进行表达	摇瓶发酵:6.0 mg/L 3 L 发酵罐:56.3 mg/L	[40]
转基因植物	番茄	将 <i>hALA</i> 基因构建至 pBRALA 载体上进行表达	未报道	[41]
细胞系	人乳腺上皮细胞	将 <i>hALA</i> 基因构建至 PSV 载体上进行表达	0.64 g/L	[47]
	奶山羊胎儿成纤维细胞	pCEP4 载体上进行表达	未报道	[48]
转基因动物	转基因小鼠	α -乳白蛋白基因等位替代	1.38 g/L	[49]
	转基因小鼠	pcDNA4La	0.3 g/L	[50]
	转基因猪	显微注射 α -乳球蛋白的 DNA 构建物	0.9 g/L	[51]

注:转基因猪的表达方式与其他有所不同,是利用包含 2.0 kb 的 5'侧翼区、2.0 kb 的 α -乳白蛋白编码区和 329 bp 的 3'侧翼区的 DNA 构建物直接进行显微注射获得 α -乳白蛋白。

3.2.3 利用转基因植物合成 α -乳白蛋白

转基因植物一般应用于农产品的性状改进或营养成分提升,而利用转基因植物作为生物反应器是一种新型蛋白质表达方式,其优势如下:具有较高等的蛋白质合成途径,产物结构完整、活性高;稳定、高效、成本低;安全性高,不是对人类和动物造成危害的病原体的天然宿主。

番茄生物反应器因来源广泛、制备技术成熟,已成为一种有潜力的植物表达系统。李文明^[41]构建了 α -乳白蛋白的植物表达载体 pBRALA,通过

农杆菌介导转化至番茄中,再利用双元载体系统成功培养出转基因番茄,成功率为 66.7%,但未检测 α -乳白蛋白是否表达。番茄生物反应器已成功用于多种物质的表达,包括黄色素^[42]、乙酰胆碱酯酶^[43]和 Monellin 甜蛋白^[44]等,展现了其在生产多种功能性物质方面的广泛应用前景。

3.2.4 利用动物细胞表达系统合成 α -乳白蛋白

哺乳动物细胞系已广泛应用于分子生物学、生物医学等领域,细胞系的应用具有降低试验动物使用量、降低科研费用等优点^[45]。哺乳动物细

胞表达系统的构建,使得异源表达的蛋白质在结构和功能上都更加接近天然蛋白质^[29]。乳腺上皮细胞是制备乳腺生物反应器的靶细胞,可通过体外培养合成并分泌乳蛋白,能够更方便且较为贴合地体现重组表达载体在乳腺生物反应器中的表达水平^[46]。张莉等^[47]人工合成 α -乳白蛋白基因,将牛 α_{s1} -酪蛋白5'调控序列作为启动子,连接到含 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)的PSV载体上,并将重组表达载体转染至牛乳腺上皮细胞, α -乳白蛋白表达量为0.64 g/L。苏磊等^[48]将 α -乳白蛋白基因克隆至真核表达载体pCEP4上,构建了表达载体pCLA。用脂质体法将pCLA转染至奶山羊胎儿成纤维细胞中,用Western blot法检测到培养上清液中含有 α -乳白蛋白,表明所克隆的 α -乳白蛋白基因能够在奶山羊胎儿成纤维细胞中成功转录和翻译。

3.2.5 利用转基因动物合成 α -乳白蛋白

转基因动物作为表达异源蛋白质的生物反应器具有以下优点:转基因动物可进行繁殖从而扩大生产规模;表达产物能进行翻译后加工且具有生物活性;产物易提纯,能够避免化学及生物毒素的污染。Stacey等^[49]利用胚胎干细胞的基因靶向技术替换小鼠的乳白蛋白基因,通过Western blot检测发现乳白蛋白表达量为1.38 mg/mL。刘思国等^[50]培育了乳腺特异表达 α -乳白蛋白的转基因小鼠,用Western blot检测G0代转基因母鼠的乳汁中 α -乳白蛋白表达量为0.3 g/L。Bleck等^[51]培育了表达 α -乳白蛋白的半合子母猪,饲养后在泌乳期0~5 d中 α -乳白蛋白分泌量最高,可达0.9 g/L,较对照组提高了50%。

4 展望

牛乳清蛋白中的 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白具有较高的营养价值和广泛的应用前景,在食品工业中作为重要的基料蛋白质具有巨大的国内市场需求。然而,国内通过分离乳清获取牛乳蛋白存在原料成本高、分离技术不成熟和分离效率低等问题。利用微生物细胞工厂合成牛乳蛋白成为解决这些问题的可行途径。目前,已有一些对牛乳清蛋白异源表达的研究取得初步进展。如利用大肠杆菌等原核生物或真核生物进行表达并成功合成了部分牛乳清蛋白。然而,原核表达系统的 β -乳球蛋白和

α -乳白蛋白的合成量较低,且无法进行翻译后修饰。相比之下,真核表达系统的产量有明显提升。特别是一些丝状真菌,如里氏木霉等,凭借其培养成本低廉、蛋白质分泌表达量高、可进行翻译后修饰等优势,有望成为乳蛋白表达的优选底盘细胞。但目前 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的合成量尚未达到工业化生产的要求。主要原因在于异源表达系统仍然存在缺少高效的启动子、信号肽等表达元件,以及宿主的蛋白酶会降解异源蛋白质等亟待解决的问题。针对这些问题,未来需要从以下3个方面进行突破:1)分子生物学技术优化,包括密码子优化、使用强启动子、添加保护肽序列等^[52];2)菌株优化,通过筛菌或基因敲除等技术,从蛋白质的加工及分泌等途径进行优化^[53];3)发酵条件优化,包括培养基优化、诱导策略优化、高密度培养等方面。综上所述,牛乳清蛋白的微生物合成技术尚不成熟,需要进一步开发合成生物学元件并优化底盘细胞以获得更高效的表达系统。

参考文献

- [1] 周景文,张国强,赵鑫锐,等. 未来食品的发展:植物蛋白肉与细胞培养肉[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(10):1-8.
ZHOU J W, ZHANG G Q, ZHAO X R, et al. Future of food: plant-based and cell-cultured meat [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(10): 1-8. (in Chinese)
- [2] 庞雨. 牛乳蛋白在大肠杆菌中的异源表达和组合合成[D]. 北京:中国农业科学院, 2021.
- [3] MECHERFI K E, CURET S, LUPI R, et al. Combined microwave processing and enzymatic proteolysis of bovine whey proteins: the impact on bovine β -lactoglobulin allergenicity[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(1):177-186.
- [4] 张莉,张健,李盛钰. 遗传因素对乳蛋白凝乳特性的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(8):38-42.
ZHANG L, ZHANG J, LI S Y. Influence of genetic factors on milk coagulation properties[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2015, 51(8):38-42. (in Chinese)
- [5] 任大喜,陈有亮,刘建新. 乳蛋白基因多态性对加工与营养的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(1):6-11.
REN D X, CHEN Y L, LIU J X. Genetic polymorphism of milk proteins and its influence on processing and nutrition [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(1):6-11. (in Chinese)

- [6] 马小梅, 苏津贤, 陈遥, 等. 动物乳中四种主要蛋白结构功能及其分离纯化方法研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2022, 43(2): 74-79.
MA X M, SU J X, CHEN Y, et al. Research advance about structure, function, separation and purification of four main proteins from animal milk proteins[J]. Journal of Northwest Minzu University (Natural Science Edition), 2022, 43(2): 74-79. (in Chinese)
- [7] JIANG Z M, LI T Q, MA L, et al. Comparison of interaction between three similar chalconoids and α -lactalbumin: impact on structure and functionality of α -lactalbumin[J]. Food Research International, 2020, 131: 109006.
- [8] 朱凌燕, 朱晗, 王军波. α -乳白蛋白对婴儿生长发育影响的研究现状[J]. 中国生育健康杂志, 2015, 26(2): 193-196.
ZHU L Y, ZHU H, WANG J B. Research status of the effect of α -lactalbumin on infant growth and development[J]. Chinese Journal of Reproductive Health, 2015, 26(2): 193-196. (in Chinese)
- [9] 闫序东, 王彩云, 云战友, 等. α -乳白蛋白提取工艺研究及副产物功能性质评价[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 253-256.
YAN X D, WANG C Y, YUN Z Y, et al. Process for producing α -lactalbumin-enriched whey and evaluation of functional properties of rennet casein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(6): 253-256. (in Chinese)
- [10] 王蓓, 唐艳斌, 张炎, 等. 牛乳中乳清蛋白质的功能活性研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 366-373.
WANG B, TANG Y B, ZHANG Y, et al. Research progress on functional activity of whey protein in milk[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9): 366-373. (in Chinese)
- [11] 陈文亮, 苏米亚, 贾宏信, 等. α -乳白蛋白的功能特性及其在婴儿配方乳粉中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2019, 42(1): 33-38.
CHEN W L, SU M Y, JIA H X, et al. Functional characteristics and application in infant formula of α -lactalbumin[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2019, 42(1): 33-38. (in Chinese)
- [12] BRÜCK W M, REDGRAVE M, TUOHY K M, et al. Effects of bovine α -lactalbumin and casein glycomacropptide-enriched infant formulae on faecal microbiota in healthy term infants[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2006, 43(5): 673-679.
- [13] 李梦寒. α -乳白蛋白对肠道菌群的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- [14] 胡芳豪. 乳清蛋白在运动饮料中的应用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [15] 迟涛, 王芸, 徐欣, 等. 乳清蛋白粉国内外标准对比分析[J]. 乳业科学与技术, 2021, 44(2): 48-51.
CHI T, WANG Y, XU X, et al. Comparative analysis of Chinese and other countries and regions' whey protein powder standards[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2021, 44(2): 48-51. (in Chinese)
- [16] 仝钰洁, 魏勇, 马晓姣, 等. 影响奶牛乳蛋白合成的主要营养因素分析[J]. 饲料工业, 2023, 44(5): 84-88.
TONG Y J, WEI Y, MA X J, et al. Analysis of the main nutritional factors affecting milk protein synthesis in dairy cattle[J]. Feed Industry, 2023, 44(5): 84-88. (in Chinese)
- [17] 赵慧婷, 李利宏, 张荣珍, 等. 牛乳铁蛋白 N-叶在毕赤酵母中的高效表达及抑菌性[J]. 微生物学报, 2022, 62(4): 1425-1437.
ZHAO H T, LI L H, ZHANG R Z, et al. High expression of bovine lactoferrin N-lobe in *Pichia pastoris* and its antibacterial activity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(4): 1425-1437. (in Chinese)
- [18] 张齐, 崔金明, 蒙海林, 等. 7 种牛奶蛋白基因在大肠杆菌中的异源表达[J]. 集成技术, 2016, 5(6): 79-84.
ZHANG Q, CUI J M, MENG H L, et al. Synthesis of seven milk proteins in *Escherichia coli*[J]. Journal of Integration Technology, 2016, 5(6): 79-84. (in Chinese)
- [19] 冀成法, 刘忠, 马鲁南, 等. 重组大肠杆菌高密度、高表达研究进展[J]. 生物技术, 2022, 32(2): 246-251.
JI C F, LIU Z, MA L N, et al. Review of high density fermentation and high expression of engineering *E. coli*[J]. Biotechnology, 2022, 32(2): 246-251. (in Chinese)
- [20] CHATEL J M, BERNARD H, CLEMENT G, et al. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant bovine beta-lactoglobulin, a major cow milk allergen[J]. Molecular Immunology, 1996, 33(14): 1113-1118.
- [21] CHATEL J M, ADEL-PATIENT K, CRÉMINON C, et al. Expression of a lipocalin in prokaryote and eukaryote cells: quantification and structural characterization of recombinant bovine β -lactoglobulin[J]. Protein Expression and Purification, 1999, 16(1): 70-75.
- [22] ARIYARATNE K A N S, BROWN R, DASGUPTA A, et al. Expression of bovine β -lactoglobulin as a fusion protein in *Escherichia coli*: a tool for investigating how structure affects function[J]. International Dairy Journal, 2002, 12(4): 311-318.
- [23] INVERNIZZI G, ANNONI E, NATALELLO A, et al. *In vivo* aggregation of bovine β -lactoglobulin is affected by Cys at position 121[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 62(1): 111-115.

- [24] LOCH J I, BONAREK P, TWORZYDŁO M, et al. Engineered β -lactoglobulin produced in *E. coli*: purification, biophysical and structural characterisation[J]. *Molecular Biotechnology*, 2016, 58(10):605-618.
- [25] 李建杰, 陈大玮, 闫浩, 等. 牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白的一基因片段的克隆、表达、纯化及抗原性鉴定[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(2):109-113.
- LI J J, CHEN D W, YAN H, et al. Cloning, expression and allergenicity-characterization of a fragment of the major milk allergen β -lactoglobulin[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2011, 23(2):109-113. (in Chinese)
- [26] HAZEBROUCK S, POTHELUNE L, AZEVEDO V, et al. Efficient production and secretion of bovine β -lactoglobulin by *Lactobacillus casei* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2007, 6:12.
- [27] 田晓娟. 酵母表达系统研究概述[J]. *陇东学院学报*, 2018, 29(1):72-76.
- TIAN X J. A review of the research on yeast expression system [J]. *Journal of Longdong University*, 2018, 29(1):72-76. (in Chinese)
- [28] 韩雪清, 刘湘涛, 尹双辉. 毕赤酵母表达系统[J]. *微生物学杂志*, 2003, 23(4):35-40.
- HAN X Q, LIU X T, YIN S H. *P. pastoris* expression system[J]. *Journal of Microbiology*, 2003, 23(4):35-40. (in Chinese)
- [29] TOTSUKA M, KATAKURA Y, SHIMIZU M, et al. Expression and secretion of bovine β -lactoglobulin in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(12):3111-3116.
- [30] 王晨蕾, 刘松, 堵国成, 等. 共表达分子伴侣提高漆酶在毕赤酵母中的分泌[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(11):1-8.
- WANG C L, LIU S, DU G C, et al. Improving the secretory expression of laccase in *Pichia pastoris* by co-expressing chaperones[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(11):1-8. (in Chinese)
- [31] KIM T R, GOTO Y, HIROTA N, et al. High-level expression of bovine beta-lactoglobulin in *Pichia pastoris* and characterization of its physical properties[J]. *Protein Engineering*, 1997, 10(11):1339-1345.
- [32] WILSON C, QUARRIE L, ALLAN G J, et al. Expression of recombinant wild-type and mutant β -lactoglobulins in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 1999, 34(5):445-450.
- [33] INVERNIZZI G, RAGONA L, BROCCA S, et al. Heterologous expression of bovine and porcine β -lactoglobulins in *Pichia pastoris*: towards a comparative functional characterisation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 109(1):169-178.
- [34] ARO N, ERCILI-CURA D, ANDBERG M, et al. Production of bovine beta-lactoglobulin and hen egg ovalbumin by *Trichoderma reesei* using precision fermentation technology and testing of their techno-functional properties [J]. *Food Research International*, 2023, 163:112131.
- [35] MIZUMACHI K, KURISAKI J, TSUJI N M. High-level expression of recombinant bovine β -lactoglobulin in insect cells[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993: 115-121.
- [36] HYTTINEN J M, KORHONEN V P, HILTUNEN M O, et al. High-level expression of bovine β -lactoglobulin gene in transgenic mice[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 61(3):191-198.
- [37] 庞晓楠, 弘笑, 魏璇, 等. 乳铁蛋白的理化性质及其重组表达系统的研究进展[J]. *遗传*, 2015, 37(9):873-884.
- PANG X N, HONG X, WEI X, et al. Research progress in physicochemical characteristics of lactoferrin and its recombinant expression systems [J]. *Hereditas*, 2015, 37(9):873-884. (in Chinese)
- [38] 闫浩, 郭玉兰, 夏立新, 等. 牛乳主要过敏原 α -乳白蛋白基因的克隆及其原核表达载体的构建[J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 34(3):244-248.
- YAN H, WU Y L, XIA L X, et al. Gene cloning and prokaryotic expression vector construction of α -lactalbumin one of major allergens in milk [J]. *Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science)*, 2010, 34(3):244-248. (in Chinese)
- [39] 林敏, 张瑞雪, 周正富, 等. 一种高效表达 α -乳白蛋白的酵母菌株和 α -乳白蛋白及其应用:CN114957448A[P]. 2022-08-30.
- [40] 刘延峰, 刘龙, 邓梦婷, 等. 一种共表达分子伴侣蛋白生产 α -乳白蛋白的菌株及其应用:CN114292324A[P]. 2022-04-08.
- [41] 李文明. 人 α -乳清白蛋白基因植物表达载体的构建及其转基因可育番茄的获得[D]. 福州:福建师范大学, 2008.
- [42] DHARMAPURI S, ROSATI C, PALLARA P, et al. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits[J]. *FEBS Letters*, 2002, 519(1):30-34.
- [43] MOR T S, STERNFELD M, SOREQ H, et al. Expression of recombinant human acetylcholinesterase in transgenic tomato plants [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 75(3):259-266.
- [44] PEÑARRUBIA L, KIM R, GIOVANNONI J, et al. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants[J]. *Nature Biotechnology*, 1992, 10(5):561-564.

- [45] 李晓梅, 曾养志. 哺乳动物细胞系(株)的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(1): 10-12.
LI X M, ZENG Y Z. Application of mammalian cell line and cell strain[J]. Bulletin of Biology, 2004, 39(1): 10-12. (in Chinese)
- [46] 张莉, 李庆章, 田雷, 等. 人 α -乳白蛋白在奶牛乳腺上皮细胞中的表达[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(2): 4-5, 12.
ZHANG L, LI Q Z, TIAN L, et al. Construction of human alpha lactalbumin expression vector and its expression in bovine mammary epithelial cells[J]. China Dairy Industry, 2011, 39(2): 4-5, 12. (in Chinese)
- [47] 张莉, 李庆章, 陈建晖, 等. 牛 α_{s1} -酪蛋白 5' 调控序列驱动人 α -LA 基因与 LacZ 基因在牛乳腺上皮细胞中的表达[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(12): 1371-1377.
ZHANG L, LI Q Z, CHEN J H, et al. Expression of LacZ and human α -LA regulated by 5' flanking sequence of bovine α_{s1} casein in bovine mammary epithelial cells[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2008, 35(12): 1371-1377. (in Chinese)
- [48] 苏磊, 曹少先, 丰秀静, 等. 人 α -乳白蛋白质基因的克隆及其在奶山羊胎儿成纤维细胞中的表达[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(3): 581-585.
SU L, CAO S X, FENG X J, et al. Cloning of human α -lactalbumin gene and its expression in dairy goat fetal fibroblasts [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2012, 28(3): 581-585. (in Chinese)
- [49] STACEY A, SCHNIEKE A, KERR M, et al. Lactation is disrupted by alpha-lactalbumin deficiency and can be restored by human alpha-lactalbumin gene replacement in mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92(7): 2835-2839.
- [50] 刘思国, 魏影允, 胡国法, 等. 人 α -乳白蛋白在转基因小鼠乳汁中的动态表达图貌[J]. 中国科学: 生命科学, 2003, 33(4): 317-322
LIU S G, WEI Y Y, HU G F, et al. Dynamic expression patterns of human α -lactalbumin in the milk of transgenic mice[J]. Scientia Sinica(Vitae), 2003, 33(4): 317-322. (in Chinese)
- [51] BLECK G T, WHITE B R, MILLER D J, et al. Production of bovine α -lactalbumin in the milk of transgenic pigs[J]. Journal of Animal Science, 1998, 76(12): 3072-3078.
- [52] 韩铭海, 王未鲜, 付相荣, 等. 毕赤酵母对甲醇胁迫的响应及其对蛋白表达的影响[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(16): 1-4.
HAN M H, WANG W X, FU X R, et al. Research progress on the effect of methanol stress response on production of heterologous proteins in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(16): 1-4. (in Chinese)
- [53] 刘甜甜, 徐显皓, 孔晓, 等. 酿酒酵母代谢调控合成功能营养品: 进展与挑战[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(8): 10-21.
LIU T T, XU X H, KONG X, et al. Metabolic regulation and synthesis of functional nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*: progress and challenges[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(8): 10-21. (in Chinese)

(责任编辑: 史润东东)