

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**SUZANA MARIA PEREIRA COSTA**

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA TAUMATINA**

**SÃO CARLOS – SP  
2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Suzana Maria Pereira Costa

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA TAUMATINA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado junto à Universidade  
Federal de São Carlos como  
requisito para a obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.a Dr.a Andrea Soares da Costa Fuentes

SÃO CARLOS - SP  
2023

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe por sua fé em mim, por seus conselhos e auxílio durante todo o meu percurso na universidade e na vida.

Agradeço ao meu pai por seu apoio moral, sinceridade e cuidado em todos os momentos. Se não fosse vocês eu não teria suportado tanto tempo lutando sozinha.

## RESUMO

A Taumatina é uma proteína presente nas folhas da planta *Thaumatococcus daniellii*, nativa da África Ocidental. Essa proteína é conhecida por seu sabor doce intenso e por ser cerca de 2000 vezes mais doce que o açúcar. Por esse motivo, essa proteína tem sido estudada como um possível substituto do açúcar em alimentos e bebidas, especialmente em produtos dietéticos. Além disso, a Taumatina (combinado de proteínas Taumatina I e II) é considerada segura para consumo humano, pois é uma proteína natural que não causa efeitos colaterais.

Embora a Taumatina seja naturalmente doce, ela não tem o mesmo sabor do açúcar. Apresenta um sabor doce prolongado, com uma nota de amargor no final, e pode ser combinada com outros edulcorantes, como o stévia, para criar um sabor mais próximo ao do açúcar. Além disso, a Taumatina é um aditivo que pode ser utilizado em uma variedade de produtos, como bebidas, sobremesas, cereais, barras de proteína, chicletes e produtos farmacêuticos. Mais recentemente, estudos biotecnológicos têm surgido para aumentar a variedade de possíveis novos produtos na prateleira do consumidor. Sua capacidade de intensificar o sabor doce em pequenas quantidades também a torna uma opção econômica para os fabricantes de alimentos. Dessa forma, este trabalho propõe-se a revisar as informações bibliográficas acerca dessa temática, confirmando o potencial no uso dessas macromoléculas para fins terapêuticos visando amenizar patologias relacionadas ao alto consumo de açúcar, além de fornecer um exemplo prático de possível aplicação biotecnológica já em estudo.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES, QUADROS E TABELAS

- Figura 1 - Mercado de açúcares substitutos no Brasil.
- Figura 2 - Comparação dos valores do fator B em diferentes valores de pH.
- Figura 3 - Estrutura esquelética da taumatina I em resolução 1,1 Å.
- Figura 4 - Estrutura geral da taumatina recombinante I.
- Figura 5 - Estrutura geral da taumatina recombinante I.
- Figura 6 - Região T-DNA da pinII-taumatina.
- Figura 7 - Bioensaio de plantas de arroz transgênicas T2 homozigóticas com *R. solani*.
- Figura 8 - Bioensaio de plantas de arroz transgênicas T2 homozigóticas com *R. solani*.
- Figura 9 - Ensaio de mudas de *Arachis diogeni* com NaCl 200mM.
- Figura 10 - Inibição do crescimento de *A. flavus* em pão branco contaminado pela proteína antifúngica de banana basrai.
- Quadro 1 - Valores de ingestão diária aceitável (IDA) em mg/kg de peso corporal, para os edulcorantes permitidos para consumo no Brasil.
- Quadro 2 - Propriedades e características dos principais edulcorantes.
- Tabela 1 - Divergências de sequência entre a proteína Taumatina II deduzida do cDNA clonado e da proteína sequência de Taumatina I derivada por Iyengar et al. (1979).
- Tabela 2 - Diferenças na sequência de aminoácidos e nucleotídeos entre Taumatinas I, II, A e B de diferentes pesquisas.
- Tabela 3: Formulações de massa de biscoitos.

## SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
1.2 INCORPORAÇÃO DA TAUMATINA NO MERCADO DE ALIMENTOS.....	10
1.3 ESTABILIDADE EM TERMOS DE PRODUÇÃO DA TAUMATINA.....	11
1.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA TAUMATINA.....	13
2.0 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	19
2.1 EXTRAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA MOLÉCULA.....	19
2.2 PRODUÇÃO RECOMBINANTE DAS TAUMATINAS.....	20
2.3 OUTRAS ABORDAGENS PARA ESTUDOS DE TAUMATINAS.....	24
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 INTRODUÇÃO

A taumatina é uma proteína, proveniente da África Ocidental, com aplicações em produtos doces e salgados, bem como em produtos farmacêuticos/cosméticos/nutracêuticos (GREEN, 1999). Esta molécula faz parte de uma mistura de proteínas correlacionadas extraídas da planta *Thaumatococcus daniellii* (fruta katemfe). A proteína é encontrada em cinco isoformas na fruta, a saber, as taumatinas I, II, III, A e B, todas doces (KINGHORN et al. 2010). Não há estudos que confirmem se há diferença da potência doce dentre as isoformas caracterizadas.

Com a mudança nos hábitos alimentares das pessoas e a busca por uma vida mais saudável, a indústria alimentícia tem se esforçado para atender ao crescente consumo de alimentos funcionais com melhor qualidade nutricional. Nesse contexto, a substituição da sacarose por edulcorantes (substâncias naturais ou artificiais, diferentes dos açúcares, que conferem sabor doce aos alimentos, possuem pouco ou nenhum valor calórico e, em sua maioria, não são absorvidos pelo organismo) tem se destacado como uma das modificações mais promissoras. No entanto, um dos maiores desafios enfrentados pela indústria é desenvolver tecnologias que permitam a substituição sem alterar as características sensoriais dos produtos modificados, garantindo que os consumidores continuem a desfrutar do mesmo sabor e textura dos alimentos. (FERREIRA, 2017). Tendo em vista o aumento da procura por produtos com ingredientes naturais, a taumatina tem tomado parte do mercado de adoçantes junto com outras moléculas, diminuindo assim a aquisição e ingestão de edulcorantes artificiais.

Embora tenha sido introduzido na dieta humana visando a diminuição do consumo de calorias e normalizar os níveis de glicose no sangue, o consumo de edulcorantes artificiais reflete o sério aumento nos casos de diabetes e obesidade. Esses adoçantes também podem aumentar o risco de intolerância à glicose em ratos, bem como ganho de peso e alteração da composição da microbiota intestinal dos indivíduos (proporção de aeróbicos para anaeróbicos). Segundo os autores de um estudo da Nature, os edulcorantes artificiais não são digeridos no intestino delgado e vão diretamente para o intestino grosso, o que pode causar impacto na microbiota intestinal (GOMEZ-VASQUEZ, 2017; SUEZ et al., 2014).

Um estudo epidemiológico francês comparou os efeitos do consumo de bebidas adoçadas com açúcar, bebidas adoçadas com adoçantes artificiais e suco 100% integral ao aumento do risco de diabetes tipo 2 em mais de 66.000 mulheres durante 14 anos. Concluiu-se que apenas o consumo de suco 100% integral não estava associado ao aumento do risco de diabetes tipo 2, enquanto os outros sucos apresentavam um risco maior. O consumo médio de bebidas adoçadas pelas consumidoras foi de 328 e 568 mL por semana para bebidas adoçadas com açúcar e bebidas adoçadas artificialmente, respectivamente. Em comparação com as não consumidoras, há um maior risco de diabetes tipo 2 com uma razão de aumento de 1,34 para mulheres que consumiram 359 mL por semana de bebidas adoçadas com açúcar e 2,21 para mulheres que consumiram 603 mL por semana de bebidas adoçadas artificialmente. (FAGHERAZZI et al., 2013).

Em uma visão econômica, o Brasil ocupa a posição de maior produtor e exportador mundial de açúcar, sendo visto como um destino de mercado atraente para a indústria açucareira. Durante o período de previsão entre 2020 e 2025, é projetado um crescimento anual composto (CAGR) de 0,99% para o mercado de adoçantes alimentares no Brasil (“Brazil Food Sweetener Market Analysis - Industry Report - Trends, Size & Share”, [s.d.]).

Tendo em vista os problemas de saúde ligados ao consumo de açúcares artificiais, o governo brasileiro tem implementado ações para substituir esses ingredientes por produtos naturais e isto é refletido no aumento do mercado de substitutivos (Fig. 1).



## Sugar Substitutes Market: Market Share (%), by Country, Brazil, 2018

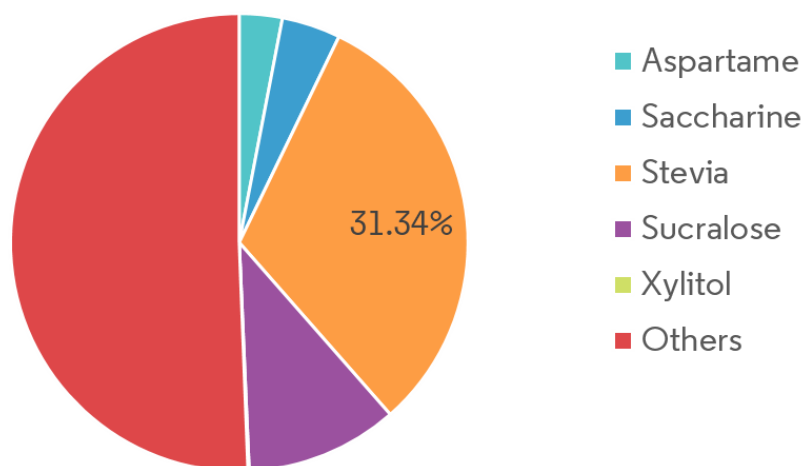


Figura 1: Mercado de açúcares substitutos no Brasil. A Stevia é o ingrediente natural mais utilizado.

Fonte: Mordor Intelligence.

O Ministério da Saúde firmou uma parceria com várias associações do setor de bebidas e alimentos em 2017 (ABIA, Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação; ABIR, Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas; ABIMAPI, Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados e Viva Lácteos) para desenvolver um plano voluntário de redução de açúcar nos alimentos produzidos pela indústria. O objetivo é encontrar estratégias para substituir o açúcar por edulcorantes que não afetem as características sensoriais e reológicas dos produtos (nos caso dos alimentos, incluem-se a cremosidade ou dureza, suculência ou suavidade, fragilidade ou delicadeza, etc). Essa iniciativa tem como objetivo incentivar a indústria a produzir alimentos mais saudáveis e nutritivos, atendendo à demanda crescente por produtos com menor teor de açúcar e, conseqüentemente, reduzir o consumo excessivo de açúcar pela população brasileira. (ABIAD, 2017).

Apesar de existir um esforço ativo na substituição destes ingredientes, no Brasil ainda não há estatísticas que demonstrem ou revelem com precisão a quantidade de pessoas que consomem adoçantes e o aumento desse consumo (ALVES, 2017). Porém, a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Congêneres (ABIAD) estima que produtos dietéticos estejam presentes em cerca de 35% dos

lares brasileiros. Além disso, de acordo com o Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC), os refrigerantes adicionados de edulcorantes são os produtos mais consumidos pelos brasileiros (IDEC, 2015).

Em uma análise de mercado dos adoçantes naturais é esperado um aumento de 7,2% até 2027 globalmente (“Natural Sweeteners Market Analysis - Industry Report - Trends, Size & Share”, [s.d.]).

## **1.2 INCORPORAÇÃO DA TAUMATINA NO MERCADO DE ALIMENTOS.**

A taumatina (E 957) é atualmente um aditivo alimentar autorizado na União Europeia sob instrução do anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008. A proteína também é aprovada para uso nos EUA, Canadá, Austrália e Nova Zelândia, Israel, China, Japão, Hong Kong, Coreia do Sul, Cingapura, México e África do Sul. Pode ser usada em várias categorias de alimentos, seja como adoçante ou como intensificador de sabor (“Scientific Opinion on the safety of the extension of use of thaumatin (E 957)”, 2015).

No Brasil, a Taumatina foi aprovada para o uso como aditivo alimentar não calórico pela ANVISA em 2008. Não possui um valor limite de ingestão diário especificado, por considerarem não haver necessidade de se estabelecer um valor máximo de consumo, mas que seja adicionada em alimentos apenas a quantidade necessária para adoçá-los, de acordo com as boas práticas de fabricação (Quadro 1) (BRASIL, 2008).

Quadro 1 – Valores de ingestão diária aceitável (IDA) em mg/kg de peso corporal, para os edulcorantes permitidos para consumo no Brasil. Fonte: ANVISA, 2008.

<b>Edulcorante</b>	<b>IDA (mg/kg de peso corporal)</b>
Ciclamato	11
Sacarina	3,5
Acessulfame-k	15
Sucralose	15
Polióis (manitol, sorbitol, etc.)	Quantum satis*
Aspartame	40
Esteviosídeo	5,5
Taumatina	Não especificado
Neotame	2

\*quantum satis = quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário.

A segurança concedida à molécula se deu por vários estudos ao longo dos anos. A Taumatina foi estudada quanto à toxicidade subaguda em ratos e cães (HIGGINBOTHAM et al. 1983). Não houve efeitos adversos resultantes de sua administração contínua a esses animais em concentrações dietéticas de 0%, 0,3%, 1% e 3,0% para 13 semanas. A falta de potencial mutagênico e teratogênico da proteína Taumatina também foi confirmada. Além disso, os testes de desafio em humanos não demonstraram qualquer sensibilização oral (HIGGINBOTHAM et al. 1983). Os resultados indicam que a Taumatina, quando utilizada como modificador e extensor de sabor, e adoçante parcial, é pouco provável que seja perigosa ao nível previsto de consumo.

Um estudo buscou determinar a influência de dietas com adição de frutos de tomate transgênico expressando o gene da Taumatina, sobre o grau de digestão de nutrientes, bem como sobre o crescimento, desenvolvimento, funções metabólicas e estado de saúde dos animais modelo (ratos). Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores dos coeficientes de digestibilidade aparente de nutrientes entre dietas com frutos de tomate transgênico e não transgênico e não houve diferenças significativas encontrado no crescimento de ratos. Assim, o consumo do OGM citado durante a dieta não aparenta produzir potenciais riscos (KOSIERADZKA et al., 2014).

Ao testar o potencial alérgico em trabalhadores, uma mistura de pó composta por 10% de taumatina e 90% de goma arábica levou a sintomas alérgicos nas vias

aéreas superiores em indivíduos ocupacionalmente expostos: quatro dos oito trabalhadores de uma fábrica de goma de mascar exposta a essa mistura em pó tinham rinite pronunciada. Porém, é sabido que a goma arábica é um alérgeno potencial bem conhecido. Ainda, não foi possível encontrar documentação prévia de sintomas alérgicos à Taumatina quando é usada na indústria alimentícia. A substituição de uma Taumatina em pó com forma líquida reduziu os sintomas entre os trabalhadores com rinite (TSCHANNEN et al., 2017).

### 1.3 ESTABILIDADE EM TERMOS DE PRODUÇÃO DA TAUMATINA

A termoestabilidade da Taumatina e o mecanismo de termo inativação são dependentes do pH. A propriedade doce da Taumatina desapareceu sob aquecimento em pH acima de 7 por 15 min, mas a doçura permaneceu mesmo após o aquecimento a 80 °C por 4 h em pH 2 (KANEKO; KITABATAKE, 2001).

A Taumatina também demonstrou ser estável sob pasteurização e condições UHT (*ultra high temperature*). Um maior aprimoramento de sua estabilidade física e química pode ser alcançado através da reformulação com compostos protetores (KINGHORN; COMPADRE, 2011).

A bioprodução de proteínas recombinantes requer a identificação de variáveis de processo ótimas, constituindo o rendimento máximo do produto de interesse. Essas variáveis têm um efeito direto sobre o crescimento do organismo hospedeiro e os níveis de secreção da proteína recombinante. Dessa forma, os fatores pH e temperatura foram avaliados cultivando *Pichia pastoris* para entender sua influência no crescimento e nos níveis de produção da proteína Taumatina II. Os resultados do estudo de pH indicam que *P. pastoris* alcançou densidade celular viável e níveis de proteína maiores em pH 6,0 em comparação com pH igual à 5,0 quando cultivada a 30 °C (JOSEPH; AKKERMANS; VAN IMPE, 2022).

Usando fluorimetria de varredura diferencial, a temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) da Taumatina em pH 4,0 foi substancialmente menor e o valor geral do fator B de sua estrutura foi maior do que aqueles em pH 6,0. Curiosamente, os valores relativos do fator B para a maioria dos resíduos de lisina diminuíram à medida que o pH diminuiu. Estes resultados sugerem que a estrutura global em pH 4,0 torna-se flexível, mas a flexibilidade relativa de algumas regiões é menor do que a em pH 6,0 (Fig. 2). Assim, a redução da flexibilidade relativa pode desempenhar um papel

importante na prevenção da agregação térmica, mantendo assim a doçura (MASUDA et al. 2022).

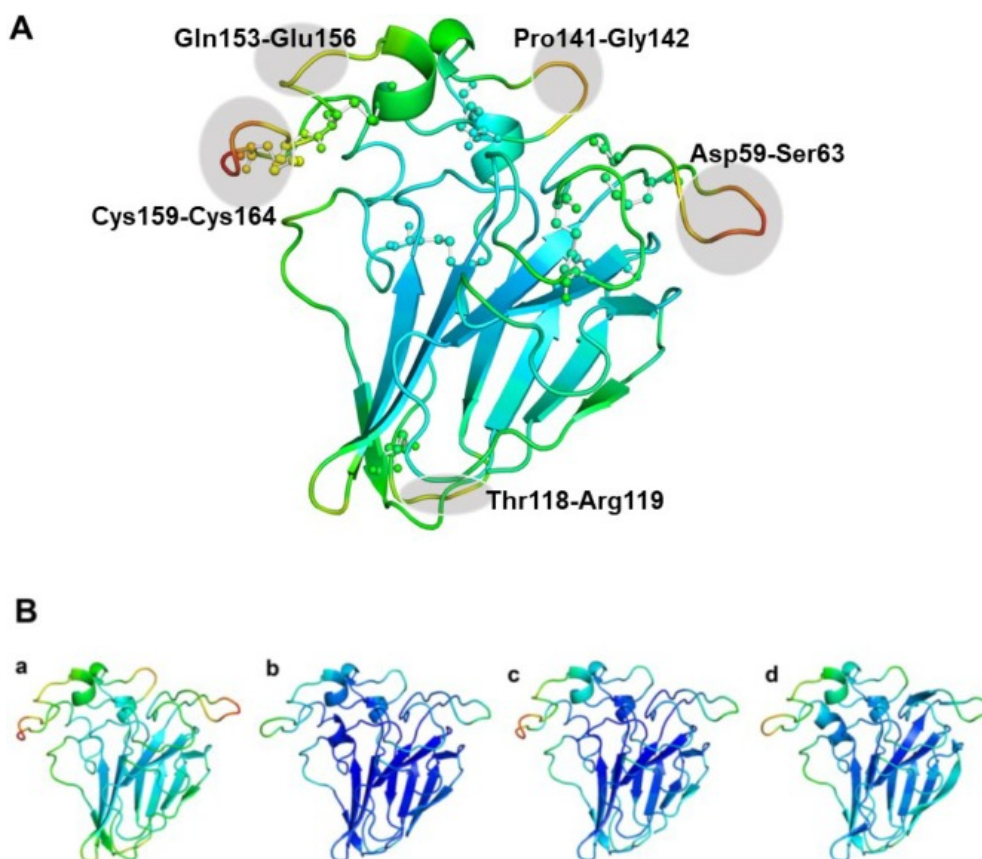


Figura 2: Comparação dos valores do fator B em diferentes valores de pH. (A) Estrutura da taumatina em pH 4,0. Os fatores B médios de mais de 30 Å são indicados em círculos cinzentos. As ligações dissulfeto são mostradas em um modelo de esfera e vara. (B) Perfis de fator B em diferentes valores de pH. a) pH 4,0, b) pH 6,0, (c) pH 6,0, (d) pH 8,0. Fonte: MASUDA et al., 2022.

#### 1.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA TAUMATINA

A Taumatina é um pó inodoro, de cor creme e solúvel em água. Funciona principalmente como um realçador de sabor e como um adoçante de alta intensidade. As características do sabor são o início lento da doçura e um sabor final doce (Quadro 2). A Taumatina I e II são cerca de 1600 vezes mais doce que a sacarose quando comparada com uma solução de sacarose 70% (WEL; LOEVE, 1972).

Quadro 2 – Propriedades e características dos principais edulcorantes. Adaptado de BARBOSA, 2013; García-Almeida et al., 2013.

<sup>1</sup> Poder edulcorante relativo à sacarose, considerando seu valor como sendo 1.

EDULCOR ANTE	PODER EDULCOR ANTE <sup>1</sup>	ESTABILIDADE	SÁBOR	CALORIAS (Kcal/g)	TIPO
Acessulfame -K	200 x	Estável	Rápida percepção	0	Artificial
Ciclamato	30 x	Estável	Metálico	0	Artificial
Aspartame	150-200 x	Pouco estável	Similar ao açúcar	4	Artificial
Sacarina	300-400 x	Estável	Residual	0	Artificial
Taumatina	2500-3000 x	Estável	Percepção rápida/longa	4	Natural
Neotame	7000-13000 x	Estável	Residual	0	Artificial
Sucralose	600 x	Estável	Similar ao açúcar	0	Artificial
Estévia	300-400 x	Estável	Residual amargo	0	Natural

Pode haver várias proteínas relacionadas na planta, mas existem duas principais formas: Taumatinas I e II (ambas autorizadas ao consumo pela ANVISA). As Taumatinas I e II são compostas, cada uma, por 207 aminoácidos com oito ligações dissulfeto intramoleculares e diferem na sequência de aminoácidos em cinco posições (N46K, S63R, K67R, R76Q e N113D), o que sugere que as duas proteínas são 98% idênticas, como visto na Tabela 1 (IYENGAR et al., 1979; EDENS et al., 1982).

Number of aa	Thaumatococcus II		Thaumatococcus I		
	codon	aa	codon	aa	
46	AAG	lys	AAC, AAT		asN
63	CGC	arg	AGC, TCC, TCT,	AGT, TCG, TCA	ser
67	CGG	arg	AAG, CGT, CGG, CGA,	AAA, CGC, AGG, AGA	lys
76	CAG	gln			arg
113	GAC	asp	AAC, AAT		asN

Tabela 1 - Divergências de sequência entre a proteína Taumatina II deduzida do cDNA clonado e da proteína sequência de Taumatina I derivada por Iyengar et al. (1979). Fonte: EDENS et al., 1982

Mais tarde, Lee e seus colegas (1988) examinaram os dois principais componentes da Taumatina natural e os designaram Taumatina A e Taumatina B. Já Iyengar e colaboradores determinaram as sequências de aminoácidos da Taumatina I e esta se difere das do estudo de Lee. Assim, a Taumatina A difere em um aminoácido (Asp113 em vez de Asn113) e a Taumatina B em dois aminoácidos (Lys46 em vez de Asn46 e Asp113 em vez de Asn113).

A sequência de nucleotídeos da Taumatina I a partir de cDNA clonado foi determinada em detalhes (IDE et al., 2007). A sequência de aminoácidos deduzida deste cDNA diferiu da Taumatina I relatada por Iyengar e colaboradores no resíduo 113 (Asp113 em vez de Asn) e foi idêntica à da Taumatina A de Lee (Tabela 2).

thaumatin	amino acid position				
	46	63	67	76	113
novel (this study) <sup>b</sup>	AAC (Asn)	AGC (Ser)	AAG (Lys)	CGG (Arg)	GAC (Asp)
I (Iyengar et al.) <sup>c</sup>	Asn	Ser	Lys	Arg	Asn
A (Lee et al.) <sup>e</sup>	Asn [AAC]	Ser [TCC]	Lys [AAG]	Arg [AGA]	Asp [GAC]
B (Lee et al.) <sup>e</sup>	Lys [AAG]	Ser [TCC]	Lys [AAG]	Arg [AGA]	Asp [GAC]
II (Evens et al.) <sup>b</sup>	AAG (Lys)	CGC (Arg)	CGG (Arg)	CAG (Gln)	GAC (Asp)
II (Matsuda et al.) <sup>b</sup>	AAG (Lys)	CGC (Arg)	CGG (Arg)	CAG (Gln)	GAC (Asp)
II (this study) <sup>b</sup>	AAG (Lys)	CGC (Arg)	CGG (Arg)	CAG (Gln)	GAC (Asp)

Tabela 2 - Diferenças na sequência de aminoácidos e nucleotídeos entre Taumatinas I, II, A e B de diferentes pesquisas. Fonte: IDE et al., 2007.

As Taumatinas que sofreram redução parcial das ligações dissulfeto apresentaram atividade de protease (contra caseína e cisteína), amidase (contra N-benzoyl-L-arginine-p-nitro-anilide, conhecido como Bz-Arg-Nan e utilizado como um substrato sintético frequentemente usado em ensaios enzimáticos para detectar a presença e a atividade de enzimas proteolíticas) e esterase (contra N-benzoyloxycarbonyl-glycinep-nitro-phenyl ester, conhecido como Cbz-Gly-ONp e utilizado como um substrato sintético frequentemente usado em ensaios enzimáticos para detectar a atividade das enzimas carboxipeptidases). Tais atividades não ocorrem na planta nativa (WEL; BEL, 1980).

Dentre as Taumatinas b, c, I, II e III (com pontos isoelétricos crescentes), a Taumatina I apresentou a menor atividade enzimática (WEL; BEL, 1980). A acetilação do grupo  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina nas Taumatinas por anidrido acético, causando uma diminuição na basicidade, levou a um aumento na atividade enzimática, que está correlacionada com o número de grupos acetila introduzidos.

Para entender a base molecular do sabor doce, se fez necessário conhecer a estrutura tridimensional da taumatina. A estrutura tem formato do tipo  $\beta$  barril e possui 11 fitas em seu domínio, cada fita é antiparalela às suas vizinhas com exceção de a cadeia terminal NH<sub>2</sub> e a cadeia terminal COOH, que são paralelas entre si (DE VOS et al., 1985). A estrutura esquelética é sustentada por 8 pontes dissulfetos (Fig. 3).



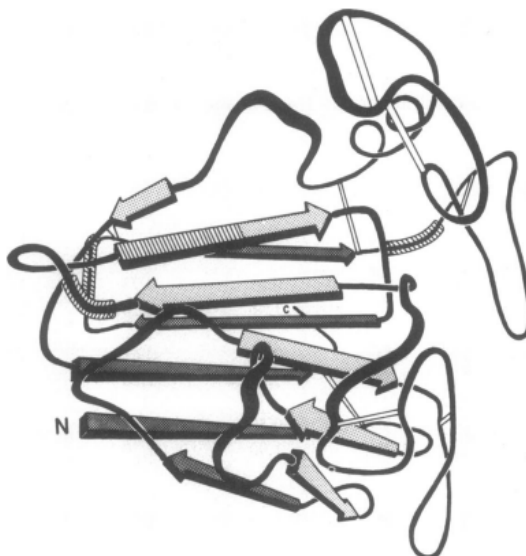


Figura 3: Estrutura esquelética da taumatina I. As fitas na folha superior são sombreadas claras e as da folha inferior são mais escuras. As barras abertas representam ligações dissulfeto. A direção de visualização é ao longo do eixo C cristalográfico. Fonte: DE VOS, 1985.

A estrutura de alta resolução da taumatina I recombinante produzida por *Pichia pastoris* foi determinada em resolução de 1,1 Å (Fig. 4). Uma análise estrutural de alta resolução com átomos de hidrogênio mostrou uma melhoria dos mapas e pôde discriminar entre variantes de taumatina (MASUDA et al. 2011).

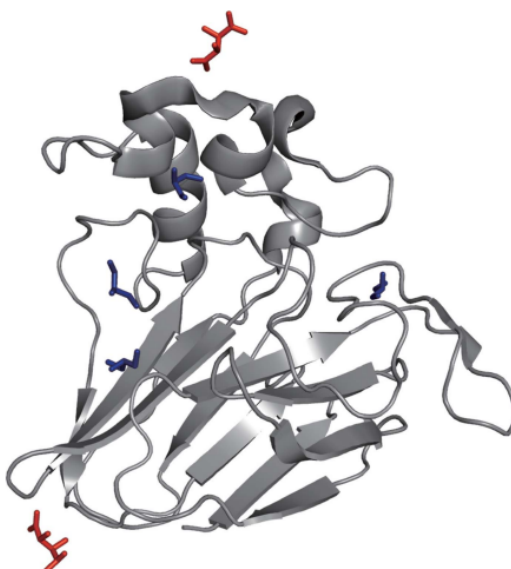


Figura 4: Estrutura geral da taumatina recombinante I em resolução 1,1 Å. Os íons tartarato são mostrados em vermelho e as moléculas de glicerol são mostradas em azul. Fonte: MASUDA, 2011.

A estrutura da taumatina II recombinante a partir do meio de cultura da levedura *Pichia pastoris* foi determinada a uma resolução de 0,99 Å, utilizando a estrutura da planta taumatina II (1.27 Å) como referência. Cinco resíduos (R67, R82, R119, R122 e K163), incluindo dois resíduos críticos para doçura (R67 e R82), foram modelados em duas ou três conformações, sugerindo que esses resíduos possuem conformações flexíveis (MASUDA; MIKAMI; TANI, 2014).

Em busca de explorar as características da Taumatina, uma proteína com doçura aumentada foi produzida ao remover as cargas negativas no lado de interação da taumatina com o receptor de sabor. Um estudo a partir de um mutante D21N revelou que a remoção do resíduo D21 negativamente carregado produziu um mutante muito mais doce (MASUDA et al. 2016). Posteriormente Masuda e colegas (2019) revelaram em uma análise de resolução subatômica que conformações flexíveis nos locais adjacentes às posições 19 e 21 do mutante D21N desempenham um papel crucial no aumento da potência do sabor doce e podem servir para aumentar a complementaridade dos potenciais eletrostáticos para a interação com o receptor de sabor.

Foi observado que resíduos de lisina modificados no grupo carboxila diminuem a doçura. A análise por espectroscopia de dicroísmo circular de UV distante indicou que a estrutura secundária de todos os derivados permaneceu inalterada, sugerindo que a perda de doçura não foi resultado de uma grande ruptura na estrutura da proteína. Os cinco resíduos de lisina, cuja modificação afetou a doçura, existem na taumatina, mas não em proteínas não doces semelhantes à taumatina, sugerindo que esses resíduos de lisina são necessários para a doçura (KANEKO; KITABATAKE, 2001).

A expressão de níveis extremamente elevados da proteína Taumatina homogênea é necessária para preparar cristais de alta qualidade para análise de difração de raios X para exame dos mecanismos de aspectos intensamente doces da proteína. Dessa forma, no estudo de Masuda e colegas (2010), investigou-se as propriedades das extremidades N- e C-terminais da Taumatina I e foi obtido um alto rendimento de Taumatina I recombinante expressa em *Pichia pastoris* com o objetivo de preparar cristais de alta qualidade na presença de glicerol crioprotetor para análise estrutural da proteína. Os espectros de fluorescência analisados nessa proteína mostraram os mesmos máximos de emissão para as variantes de Taumatina I recombinante e para a Taumatina vegetal. Isso indica que as variantes de Taumatina

recombinante não diferem notavelmente em suas estruturas secundárias e terciárias da Taumatina nativa. A Taumatina I recombinante produzida neste estudo se apresentou homogênea e não contém outras variantes, como a Taumatina II.

## **2.0 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Tendo em vista tudo que já foi apresentado no presente trabalho, propõe-se, a partir desse ponto, relatar exemplos de aplicações biotecnológicas envolvidas com o estudo.

### **2.1 EXTRAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA MOLÉCULA.**

Tradicionalmente, a fruta é colhida da natureza. Antigamente, os arilos eram retirados da fruta à mão no país de origem e depois congelados para envio ao Reino Unido para extração. A extração era aquosa ou por um tampão diluído, quase neutro (WEL; LOEVE, 1972). O extrato é concentrado por ultrafiltração de osmose reversa ou cromatografia de troca iônica, depois liofilizado para produzir taumatina de alta pureza.

Outros processos foram sugeridos, incluindo a precipitação do aduto de alumínio (um composto formado pela ligação de uma molécula orgânica a um íon de alumínio, podendo ocorrer através de um ou mais átomos de oxigênio, nitrogênio ou enxofre presentes na molécula orgânica) da taumatina a partir da solução (HIGGINBOTHAM, 1977) e a liofilização preliminar do fruto. Este último processo torna os arilos quebradiços e facilita a sua separação mecânica do resto da fruta, agitando e peneirando. Os arilos separados são moídos ou triturados em pó e extraídos com ácido diluído (pH 2,7–3,0) (DANIELS; HIGGINBOTHAM, 1980). Após a extração, a solução aquosa obtida é ultrafiltrada e liofilizada para produzir a taumatina.

### **2.2 PRODUÇÃO RECOMBINANTE DAS TAUMATINAS**

Em processos biotecnológicos, a Taumatina tem sido expressa em vários sistemas heterólogos tais como — *Escherichia coli* (EDENS et al., 1982), *Bacillus subtilis* (ILLINGWORTH et al., 1988), *Streptomyces lividans* (ILLINGWORTH, 1989),

*Saccharomices cerevisiae* (EDENS et al., 1984), *Kluyveromyces lactis* (EDENS; VAN DER WEL, 1985), *Aspergillus oryzae* (HARM; BATT, 1990) e *Pichia pastoris* (MASUDA et al., 2004), *Aspergillus niger var. awamori* (FAUS et al., 1998), *Aspergillus awamori* (MORALEJO et al., 1999), *Penicillium roqueforti* (FAUS et al., 1997)

Para a produção recombinante da Taumatina II em *Escherichia coli*, o RNA mensageiro da Taumatina foi isolado dos arilos, convertido em cDNA de fita dupla e clonado em vetor pBR322 transformado em células em *E. coli* HB101. O cDNA clonado foi projetado para codificar a preprotaumatina e também suas formas de maturação. A preprotaumatina é um produto de tradução primário de cadeia mais longa que a Taumatina I e II, o que implica que há um processamento pós-transcricional tanto no terminal amino como no terminal carboxi da proteína que age como um sinal para compartimentalização nas vesículas citoplasmáticas (EDENS et al., 1982).

Em outro estudo para a expressão recombinante da Taumatina em *Bacillus subtilis* foi utilizado um vetor que utiliza o promotor da  $\alpha$ -amilase e foi possível expressar a Taumatina II, fusionada no *reading frame* com o peptídeo líder da  $\alpha$ -amilase para conferir a conformação nativa. A Taumatina foi purificada do meio de cultivo em uma coluna de S-Sepharose e detectada por uma técnica de western blot com anticorpos específicos. Nesse estudo, o rendimento da Taumatina estimado foi de 1 mg/L em um tempo de três horas e meia após o fim do crescimento exponencial (ILLINGWORTH et al., 1988).

Posteriormente, Illingworth (1989) fusionou o cDNA da Taumatina II no *reading frame* da  $\beta$ -galactosidase sob o controle do seu promotor e do sítio de ligação do ribossomo em *Streptomyces lividans*. A proteína recombinante apresentou o mesmo tamanho da proteína nativa, porém com uma produção estimada de 0,2 mg/L. Não foi possível confirmar se a mesma possuía a conformação correta e se apresentava sabor doce.

A produção recombinante da Taumatina II em *Saccharomices cerevisiae* foi realizada usando um fragmento promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH)(Fig 5). A quantidade de proteína não foi informada (EDENS et al. 1984).

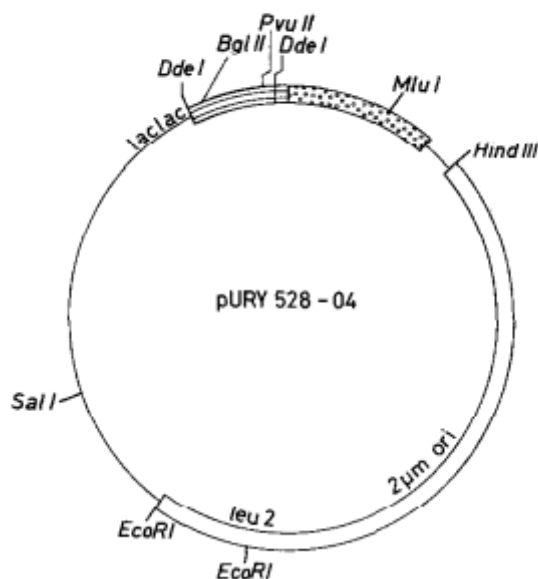


Figura 5: Representação do plasmídeo pUR528-04 com a cópia do cDNA da taumatina II usando o promotor GAPDH. Fonte: EDENS, 1984.

Em *Aspergillus oryzae*, a Taumatina II foi expressa através de vetor que contém um promotor gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPD) de *Saccharomyces cerevisiae*, e sua secreção é aparentemente direcionada para o meio pela presença de uma sequência que codifica um peptídeo sinal da própria taumatina presente na planta nativa. O promotor é regulado em *A. oryzae* pela adição de glicose que estimula a produção de Taumatina. O estudo resultou na expressão da Taumatina madura de 22 kDa. Uma proteína ligeiramente maior, de 25 kDa, também é observada em extratos celulares e pode representar a forma não processada da proteína (HARM; BATT, 1990).

Uma sequência que codifica a Taumatina II, juntamente com os elementos promotores da beta caseína de cabra, foi empregada para construir um vetor de expressão específico da glândula mamária de camundongos transgênicos. Uma resultante Taumatina II com doçura mantida foi expressa nas glândulas mamárias, conforme determinado por ELISA, *western blot* e teste de intensidade de doçura (LU et al. 2021). Esses resultados demonstraram que animais transgênicos poderiam ser utilizados como biorreatores na produção da proteína Taumatina II, constituindo assim um passo inicial para a produção de leite adoçado com Taumatina de proteína vegetal de animais de grande porte, como vaca leiteira e cabra. Embora as concentrações não atendam aos requisitos de produção em massa de Taumatina II

pura, a expressão permitiu que o leite tivesse um alto nível de doçura. A pontuação de classificação de doçura do leite diluído 2 vezes da linhagem 1 do rato (com 20,8 mg/L de proteína taumatina II) é comparável à da solução de sacarose a 4%.

A Taumatina também tem sido expressa em sistemas plantas como, tomate, batata, pêra, pepino, morango, maçãs e cenoura (WITTY, 1990; LEBEDEV et al., 2002; SZWACKA et al., 2002; BARTOSZEWSKI et al., 2003; SCHESTIBRATOV; DOLGOV, 2005; DOLGOV; SCHESTIBRATOV; MIKHAILOV, 2004; LUCHAKIVSKA et al., 2015).

Pela expressão do gene quimérico 35S-pré-protaumatina II em botões florais e frutos de pepino transgênico (*Cucumis sativus L.*) linhagem 225, verificou-se que o acúmulo de Taumatina recombinante variou espacialmente em tecidos de botões florais e a proteína também foi encontrada em quase todas as partes dos frutos jovens das plantas transgênicas. Análises imunocitoquímicas de cortes de órgãos controle revelaram homólogo(s) endógeno(s) de Taumatina quando se utilizam antissoros policlonais, mas não quando se utilizam anticorpos monoclonais para detecção de Taumatina recombinante em pepino transgênico (SZWACKA et al 2009).

Em uma análise sensorial de frutos de pepino transgênicos Szwacka e colaboradores (2012) obtiveram linhagens com sabor mais amargo e menor desgosto (exceto a linhagem 224) em comparação com os frutos controle, mas não diferiram em termos de acidez, bem como odor (acentuado ou azedo), cor da carne, e firmeza (exceto a linhagem 212).

Recentemente, um estudo buscou identificar e caracterizar genes diferencialmente expressos e miRNAs reguladores em frutos de pepino transgênicos que contêm o gene da Taumatina II, que codifica a proteína de sabor doce taumatina II, por sequenciamento de NGS (PAWEŁKOWICZ et al., 2020). Os transcriptomas de três linhagens de pepino transgênico foram comparados com o pepino do tipo selvagem e encontrou-se 47 genes diferencialmente expressos entre o controle e todas as três linhas transgênicas. Dentre os 12 miRNAs regulados diferencialmente que foram identificados, três podem influenciar os dois alvos (atribuídos como genes diferencialmente expressos) em uma das linhagens transgênicas estudadas (linhagem 224). Verificou-se que a transformação do pepino com Taumatina II e a expressão do transgene tiveram impacto mínimo na expressão gênica e na regulação epigenética pelo miRNA nos frutos do pepino. Isso demonstra

que as possíveis alterações nos processos biológicos em plantas com um transgene são ínfimas.

Um vetor plasmídeo pinII Ti foi construído com o gene da Taumatina sob o controle do promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S em arroz (*Oryza sativa* L. var. *japonica* cv. 'Dongjin byeo') pela transformação mediada por *Agrobacterium* para gerar plantas transgênicas. No experimento, a linhagem *E. coli* DH5 $\alpha$  foi usada para clonagem e a linhagem *Agrobacterium tumefaciens* EH105 foi usada para a transformação (Fig. 6). Houve um acúmulo de Taumatina (não foi especificado a isoforma da Taumatina) na folha e o sabor doce foi confirmado pelo resultado da análise sensorial (AKTER et al., 2020).

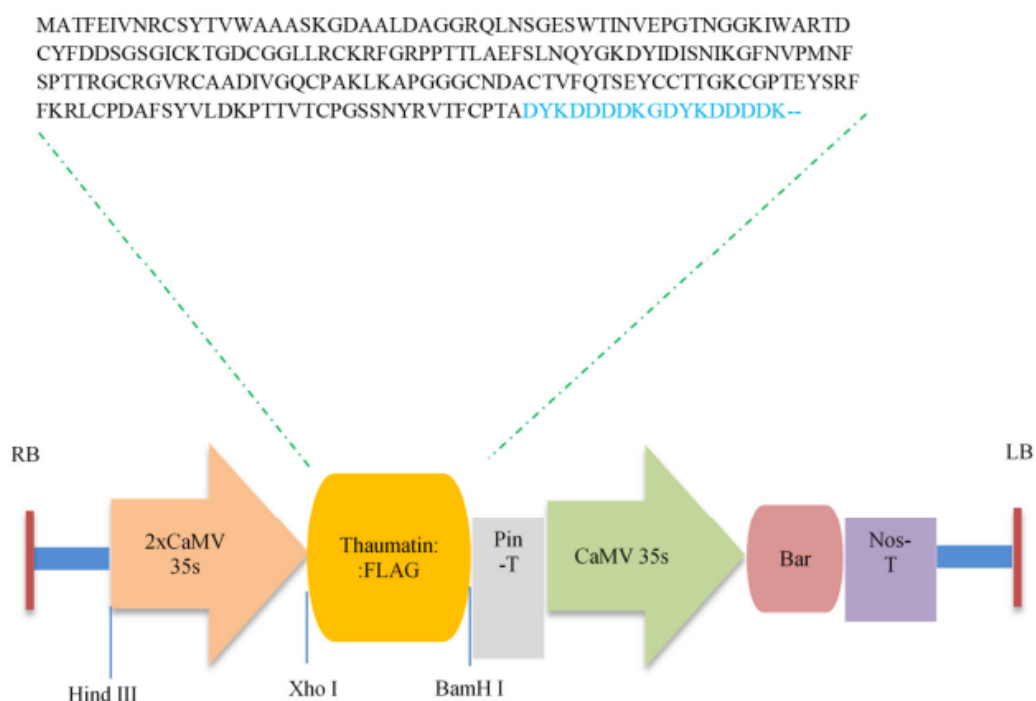


Figura 6: Região T-DNA da pinII-taumatina. Taumatina, gene taumatina; FLAG, Flag-tag epítipo; RB, lado direito; LB, lado esquerdo; Nos-T, terminador nopalina sintase; Pin-T, terminador pinII; 2xCaMV 35S, promotor duo do vírus mosaico de couve-flor 35S; CaMV 35S, promotor do vírus mosaico de couve-flor 35S; Bar, marcador de gene seletivo, gene resistente basta.

### 2.3 OUTRAS ABORDAGENS PARA ESTUDOS DE TAUMATINAS

Estudos sobre os efeitos da Taumatina nas propriedades mecânicas de biscoitos foram realizados e assim como sua análise sensorial (SILVA et al., 2022).

Na tabela 3 é descrito os tratamentos com redução gradual de sacarose e aumento de Taumatina.

Ingredients	Control (g)	RED 25% (g)	RED 35% (g)	RED 50% (g)	RED 65% (g)
Wheat Flour	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Butter	50.37	50.38	50.38	50.38	50.38
Sugar	40.44	30.34	26.30	20.23	14.16
Thaumatococcus	0.000	0.0033	0.0039	0.0038	0.0053
Powdery Milk	2.28	2.29	2.29	2.29	2.29
Ammonia Bicarbonate	1.14	0.99	0.92	0.92	0.92
Soy Lecithin	2.02	2.06	2.06	2.06	2.06
Sodium Acid Pyrophosphate	0.33	0.32	0.11	0.11	0.11
Salt	0.69	0.69	0.68	0.68	0.69
Sodium Bicarbonate	0.12	0.11	0.37	0.37	0.37
Water	6.86	6.87	13.74	13.74	13.74

Tabela 3: Formulações de massa de biscoitos. Fonte: Silva et al. 2022.

Os resultados do estudo indicaram que as reduções da sacarose de 25% e 35% produziram pequenas alterações nas características reológicas, o que proporcionou melhor qualidade física da massa de biscoito, como firmeza, consistência e dureza. Tais atributos influenciaram positivamente a qualidade sensorial, como maior crocância e sensação na boca. Dessa forma, foi possível manter a qualidade tecnológica e sensorial dos biscoitos, a partir de formulações contendo menos sacarose em combinação com Taumatina.

Novos estudos têm explorado a complexa família de proteínas do tipo Taumatina (TLPs), classificadas como PR-5 (*Pathogenesis-Related*). Esta família além de ter estrutura semelhante a da Taumatina também apresenta atividades de defesa imunológica e fisiológica (DE JESUS-PIRES et al., 2020).

Lopes e colegas (2019) relataram que os TLPs têm uma atividade anticâncer seletiva por induzir apoptose por meio de um receptor de membrana. Dessa forma, tais proteínas têm sido intimamente associados a características de resistência em mapas genéticos, como no estudo com grão-de-bico (*Cicer arietinum*), no qual um gene TLP foi localizado próximo ao locus de resistência ciceri de *Fusarium oxysporum fsp* (WINTER et al., 2000; BENKO-ISEPPON et al., 2003).

Os TLPs contêm uma grande quantidade de resíduos Cys (cisteína) (BREITENEDER, 2004), bem como uma sequência conservada de cinco aminoácidos, incluindo uma arginina (R), um ácido glutâmico (E) e três resíduos de ácido aspártico (D), conhecido como motivo REDDD. Descobriu-se que esse motivo



é responsável pela atividade antifúngica dos TLPs nativos de vegetais (GHOSH; CHAKRABARTI, 2008; CAO et al., 2015)

O interesse em TLPs resultou no aumento de estudos em melhoramento de plantas devido ao seu potencial de uso no desenvolvimento de plantas transgênicas com maior desempenho sob estresses bióticos e abióticos.

Sripriya e colegas (2017) descobriram que linhagens de arroz transgênico expressando uma combinação de gene quitinase de arroz (chi11) e gene osmotina de tabaco (ap24) em um mesmo T-DNA apresentaram níveis mais altos de resistência à praga da queima da bainha do que aquelas expressando chi11 ou ap24 individualmente (Fig. 7). Três plantas transgênicas (CO1, CO2 e CO3) obtiveram cópias completas de T-DNAs com chi11 e ap24, mas apenas CO1 e CO2 tinham níveis de expressão mais elevados de ambos os genes.

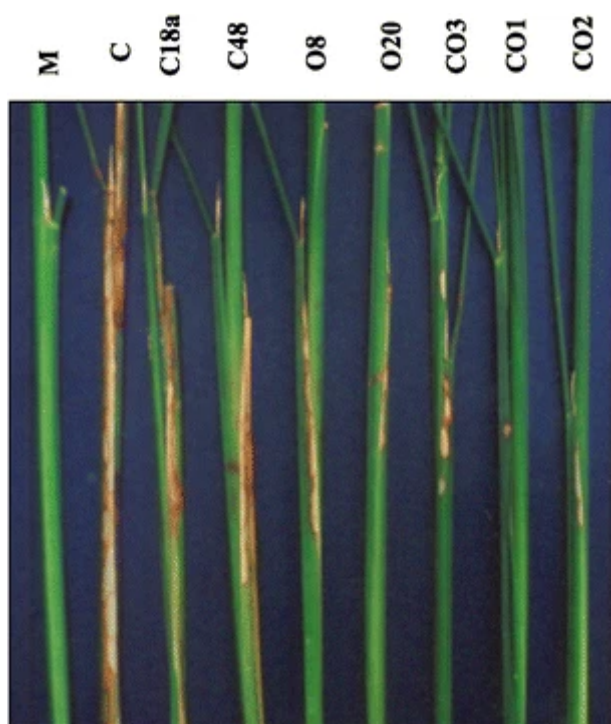


Figura 7: Bioensaio de plantas de arroz transgênicas T2 homozigóticas com *R. solani* para avaliar a resistência à doença da bainha. A infecção foi feita em três perfilhos de cada uma das plantas controle e T2 homozigóticas. A foto mostra a porção infectada de um perfilho de uma planta representativa de cada categoria. M, planta não transformada sem inoculação de *R. solani*; C, planta não transformada (controle) com inoculação de *R. solani*. As linhagens transgênicas incluíram aquelas com o gene chi11 sozinho (C18a e C48), gene ap24 (osmotina) sozinho (O8 e O20) e genes chi11 + ap24 (CO1, CO2 e CO3). Fonte: SRIPRIYA; PARAMESWARI; VELUTHAMBI, 2017.

Misra e colegas (2016), por sua vez, identificaram e caracterizaram um TLP de manjeriço (ObTLP1 de *Ocimum basilicum*) em bibliotecas de EST (tag de expressão de sequência) tratadas com Metil Jasmonato (MeJA). O isolado ObTLP1 foi posteriormente expresso ectopicamente em *Arabidopsis thaliana*, indicando resistência a fungos patogênicos (*Sclerotonia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*) e tolerância a estresses abióticos (seca e alta salinidade) (Fig. 8).

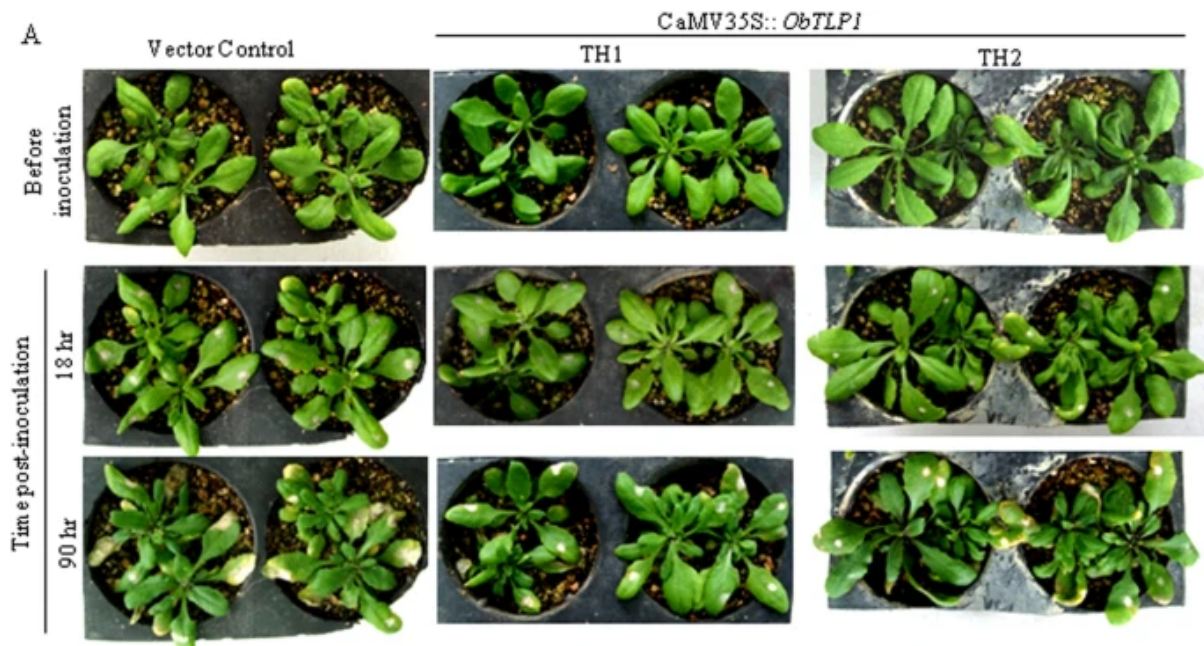


Figura 8: Plantas de *Arabidopsis* que expressam ObTLP1 se mostram tolerantes à infecção por *S. sclerotiorum*. (A) Folhas de linhagens transgênicas que expressam ObTLP1 (TH1 e TH2) e plantas de controle de vetores foram inoculadas com igual quantidade de suspensão micelial do fungo.

Fonte: MISRA, 2016.

Linhagens transgênicas de *Brassica napus* foram transformadas via *Agrobacterium* com a inserção de cDNA, resultando em um TLP isolado de cevada (Hv-TLP8) com maior resistência ao protozoário de solo *Plasmodiophora brassicae* (REISS et al., 2009).

Plantas transgênicas de tabaco que superexpressam o gene GbTLP1, um TLP do algodão, demonstraram resistência a vários agentes estressantes, incluindo uma notável resistência ao fungo *Verticillium dahliae*. As plantas também adquiriram considerável resistência ao *Fusarium oxysporum*, além de uma maior tolerância à salinidade e à seca (MUNIS et al., 2010).

Singh e colaboradores (2013) testaram plantas transgênicas de tabaco contendo uma sequência de cDNA codificando um TLP isolado de *Arachis diogeni* (amendoim selvagem). Além de apresentar resistência ao fungo *Rhizoctonia solani*, as plantas transgênicas mostraram tolerância à salinidade (200-300 mM NaCl) e ao estresse oxidativo (Fig. 9).

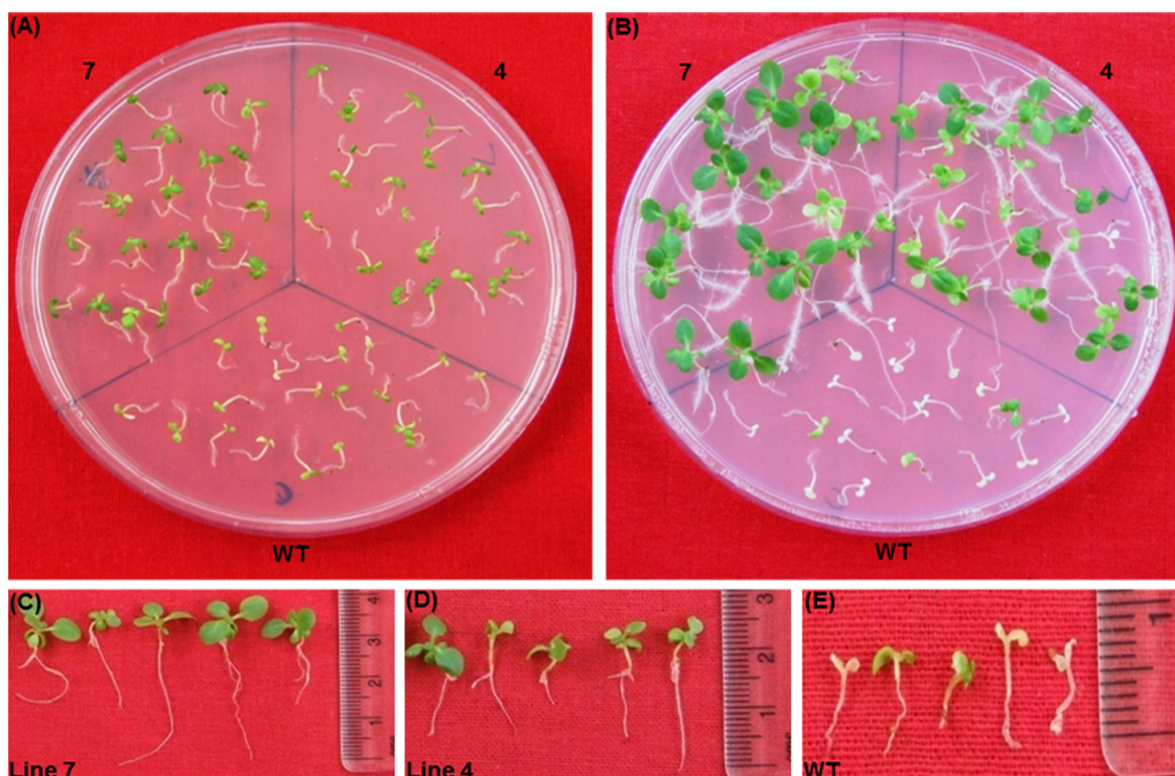


Figura 9: Ensaio de mudas com NaCl 200mM. Mudas foram transferidas em meio NaCl 200mM por 14 dias (A). Mudas em meio de recuperação (B). Mudas em condição após 10 dias de período de recuperação da linha 7 (C), linha 4 (D) e tipo selvagem (E). Fonte: SINGH et al., 2013.

Em um trabalho formidável, Yasmin e colaboradores (2014) purificaram um TLP de banana Basdai usando uma combinação de cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Este TLP demonstrou atividade contra *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichoderma viride*. A proteína também foi eficaz na inibição do crescimento de *Aspergillus phoenicis* e *Aspergillus flavus* em pão branco, indicando um potencial uso como conservante de alimentos (Fig. 10).

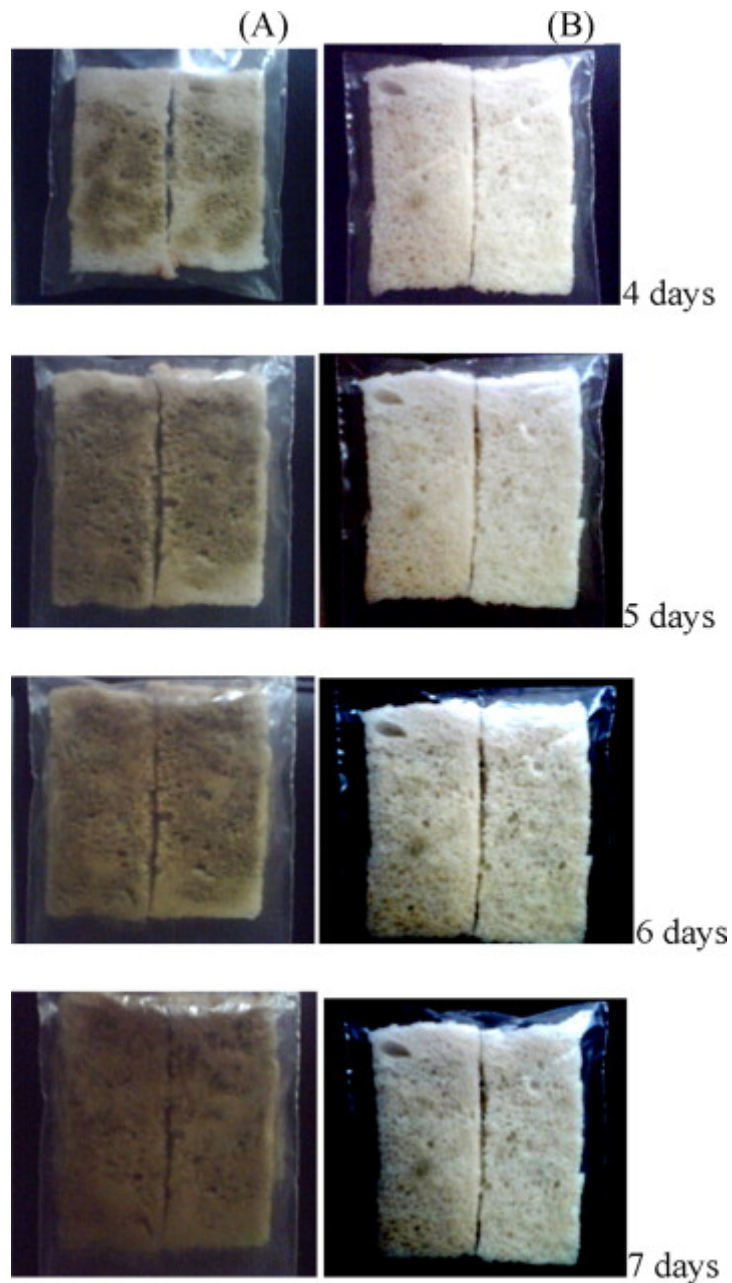


Figura 10: Inibição do crescimento de *A. flavus* em pão branco contaminado pela proteína antifúngica de banana basrai purificada. Os pães foram contaminados com *A. flavus* na ausência (A) e na presença (B) de proteína antifúngica de banana basrai purificada (4 μM/cm<sup>2</sup>) pelo número de dias indicado. Fonte: YASMIN et al., 2014.

Essas descobertas sugerem que o TLP tem aplicações promissoras no melhoramento de culturas por meio da transformação genética, com benefícios potenciais para proteção contra estresses bióticos e abióticos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os adoçantes de origem natural tornaram-se cada vez mais populares mundialmente devido ao seu teor calórico nulo, além das alegações de benefícios para a saúde, como controle de peso e regulação do nível de glicose no sangue em diabéticos. No entanto, ainda há controvérsias quanto à sua segurança, especialmente quando administrados a longo prazo, tendo em conta que a maioria dos estudos de segurança se baseia em modelos animais e apenas em alguns estudos em humanos.

Nesta revisão, a Taumatina foi apresentada como um substituto do açúcar de origem proteica/peptídica de forma abrangente no que diz respeito às suas propriedades químicas, de saúde e de segurança. A partir dos estudos observacionais, concluímos que os adoçantes recombinantes de baixa caloria e as proteínas doces naturais exibem efeitos positivos para a saúde. O aprofundamento das atividades biológicas e funcionais dos substitutos do açúcar e seu mecanismo de ação firma uma ligação entre seus efeitos na saúde e a ingestão alimentar. Embora vários estudos apoiem o uso da Taumatina, sua aplicação enfrenta problemas na indústria devido à sua baixa disponibilidade e alto custo. Para contornar esses problemas, a modificação por superexpressão dos genes em OGMs deve ser considerada para melhorar sua disponibilidade em diferentes aplicações alimentares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAD – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. Ministério da Saúde e setor produtivo promovem debate sobre redução de açúcar nos alimentos industrializados. Disponível em: <[https://www.abia.org.br/vsn/tmp\\_2.aspx?id=338](https://www.abia.org.br/vsn/tmp_2.aspx?id=338)>. Acesso em: 01 mar. 2023.

AKTER, S. et al. Expression of thaumatin, a new type of alternative sweetener in rice. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, v. 48, n. 3, p. 1276–1291, 25 ago. 2020.

ALVES, G. Consumo de Adoçante Dispara nos EUA e Preocupa Especialistas. Folha de São Paulo. Janeiro de 2017. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2017/01/1849396-consumo-de-ado-cantedispara-nos-eua-e-preocupa-especialistas.shtml>>. Acesso em: 01 mar. 2023.

BARBOSA, A. Dossiê Edulcorantes. *Revista Food Ingredients Brasil*. 2013. v. XIV, n. 24, p. 28-52. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/302.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2023.

BARTOSZEWSKI, G. et al. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breeding*, v. 122, n. 4, p. 347–351, ago. 2003.

BENKO-ISEPPON, A.-M. et al. Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 107, n. 2, p. 379–386, 23 abr. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 18, de 24 de março de 2008. Dispõe sobre o "Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos". *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Brasília, DF, 25 mar. 2008. Disponível em: <Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Publicada em DOU nº 57, de 25 de março de 2008)>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2023.

Brazil Food Sweetener Market Analysis - Industry Report - Trends, Size & Share. Disponível em: <[https://www.google.com/url?q=https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/brazil-food-sweetener-market-industry&sa=D&source=docs&ust=1677629288797482&usq=AOvVaw1byOfMpDTUYPyk-\\_NW1qqW](https://www.google.com/url?q=https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/brazil-food-sweetener-market-industry&sa=D&source=docs&ust=1677629288797482&usq=AOvVaw1byOfMpDTUYPyk-_NW1qqW)>. Acesso em: 28 fev. 2023.

BREITENEDER, H. Thaumatin-like proteins - a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*, v. 59, n. 5, p. 479–481, maio 2004.

CAO, J. et al. Expansion and evolution of thaumatin-like protein (TLP) gene family in six plants. *Plant Growth Regulation*, v. 79, n. 3, p. 299–307, 9 nov. 2015.

DE JESÚS-PIRES, C. et al. Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications. *Current Protein & Peptide Science*, v. 21, n. 1, p. 36–51, 27 jan. 2020.

DE VOS, A. M. et al. Three-dimensional structure of thaumatin I, an intensely sweet protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 82, n. 5, p. 1406–1409, 1 mar. 1985.

DOLGOV, S. V.; SCHESTIBRATOV, K. A.; MIKHAILOV, R. V. APPLE TRANSFORMATION WITH THE GENE OF SUPERSWEET PROTEIN THAUMATIN II. *Acta Horticulturae*, n. 663, p. 507–510, dez. 2004.

EDENS, L. et al. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, v. 18, n. 1, p. 1–12, 1982.

EDENS, L. et al. Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast. *Cell*, v. 37, n. 2, p. 629–633, jun. 1984.

EDENS, L.; VAN DER WEL, H. Microbial synthesis of the sweet-tasting plant protein thaumatin. *Trends in Biotechnology*, v. 3, n. 3, p. 61–64, mar. 1985.

ETHERIDGE, K. The sales and marketing of talin. In: Witty M.; Higginbotham J.D. (ED.). *Thaumatin*. Boca Raton: CRC Press, p. 47–59, 1994.

FAGHERAZZI, G. et al. Consumption of Artificially and Sugar-sweetened Beverages and Incident Type 2 diabetes in the Etude Epidemiologique aupres des femmes de la Mutuelle Generale de l'Education Nationale-European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 97, n. 3, p. 517–523, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002916523054412?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 de fev. 2023.

FAUS, I. et al. Expression of a synthetic gene encoding the sweet-tasting protein thaumatin in the filamentous fungus *Penicillium roquefortii*. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 12, p. 1185–1191, 1997.

FAUS, I. et al. Secretion of the sweet-tasting protein thaumatin by recombinant strains of *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 4, p. 393–398, 27 abr. 1998.

FERREIRA, T. Desenvolvimento e Análise Sensorial de Sorvete à Base de Soja com Redução de Açúcar. *Revista Uningá*, [S.l.], v. 25, n. 1, nov. 2017. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/895>>. Acesso em: 9 fev. 2023.

GARCÍA-ALMEIDA, J. M. et al. A Current and Global Review of Sweeteners; Regulatory Aspects. *Nutrición Hospitalaria*, v. 28, ed. 4. 2013, p. 17-31. Disponível em: <<http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/6793.pdf>>. Acesso em: 01 mar 2023.

GHOSH, R.; CHAKRABARTI, C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta*, v. 228, n. 5, p. 883–890, 24 jul. 2008.

GOMEZ-VAZQUEZ, H.M. La Paradoja de los Endulzantes Sin Calorías. *Med. interna Méx.*, v. 33, n. 2, p. 204-208, abr. 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-48662017000200204&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-48662017000200204&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 27 fev. 2023.

GREEN, C. Thaumatin: a natural flavour ingredient. *World Review of Nutrition and Dietetics*, v. 85, p. 129–132, 1999.

HARM, Y. T.; BATT, C. A. Expression and secretion of thaumatin from *Aspergillus oryzae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 54, n. 10, p. 2513–2520, 1990.

HIGGINBOTHAM, J. D. et al. Safety evaluation of thaumatin (talin protein). *Food and Chemical Toxicology*, v. 21, n. 6, p. 815–823, dez. 1983.

IDE, N. et al. Cloning of the thaumatin I cDNA and characterization of recombinant thaumatin I secreted by *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, v. 23, n. 5, p. 1023–30, 2007.

IDEC – INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. De Olho nos adoçantes. *Revista do IDEC*. n. 197, p. 14-17, abril 2015. Disponível em: <[https://www.idec.org.br/uploads/revistas\\_materias/pdfs/197-edulcorantes1.pdf](https://www.idec.org.br/uploads/revistas_materias/pdfs/197-edulcorantes1.pdf)>. Acesso em: 01 mar. 2023.

ILLINGWORTH, C.; LARSON, G.; HELLEKANT, G. Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, v. 10, n. 8, p. 587–592, ago. 1988.

ILLINGWORTH, C.; LARSON, G.; HELLEKANT, G. Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Streptomyces lividans*. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 37–42, jan. 1989.

IYENGAR, R. B. et al. The Complete Amino-Acid Sequence of the Sweet Protein Thaumatin I. *European Journal of Biochemistry*, v. 96, n. 1, p. 193–204, maio 1979.

JOSEPH, J. A.; AKKERMANS, S.; VAN IMPE, J. F. M. Effects of Temperature and pH on Recombinant Thaumatin II Production by *Pichia pastoris*. *Foods*, v. 11, n. 10, p. 1438, 16 de maio de 2022.

KANEKO, R.; KITABATAKE, N. Structure-Sweetness Relationship in Thaumatin: Importance of Lysine Residues. *Chemical Senses*, v. 26, n. 2, p. 167–177, 1 fev. 2001.

KANEKO, R.; KITABATAKE, N. Sweetness of Sweet Protein Thaumatin Is More Thermoresistant under Acid Conditions Than under Neutral or Alkaline Conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 65, n. 2, p. 409–413, jan. 2001.

KINGHORN, DOUGLAS; COMPADRE, C. Less Common High-Potency Sweeteners. In: O'BRIEN-NABORS, L. (Ed.). *Alternative Sweeteners*. Boca Raton: CRC Press, p. 228, 2012.



KOSIERADZKA, I. et al. Nutritive and Dietetic Value of Genetically Modified Tomatoes Expressing Thaumatin Gene. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 64, n. 1, p. 35–43, 31 mar. 2014.

LEBEDEV, V. G. et al. Pear transformation with the gene for supersweet protein thaumatin ii. *Acta Horticulturae*, n. 596, p. 199–202, dez. 2002.

LEE, J. H. et al. Expression of synthetic thaumatin genes in yeast. *Biochemistry*, v. 27, n. 14, p. 5101–5107, 12 jul. 1988.

LU, R. et al. Expression of functional plant sweet protein thaumatin II in the milk of transgenic mice. *Food and Bioprocess Technology*, v. 125, p. 222–227, jan. 2021.

LOPES, F. E. S. et al. Peptide from thaumatin plant protein exhibits selective anticandidal activity by inducing apoptosis via membrane receptor. *Phytochemistry*, v. 159, p. 46–55, mar. 2019.

LUCHAKIVSKA, YU. S. et al. Construction and analysis of the transgenic carrot and celery plants expressing the recombinant thaumatin II protein. *Biopolymers and Cell*, v. 31, n. 4, p. 285–293, 20 ago. 2015.

MASUDA, T. et al. A Hypersweet Protein: Removal of The Specific Negative Charge at Asp21 Enhances Thaumatin Sweetness. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 3 fev. 2016.  
MASUDA, T. et al. Crystal structure of the sweet-tasting protein thaumatin II at 1.27Å. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 410, n. 3, p. 457–460, jul. 2011.

MASUDA, T. et al. High-resolution structure of the recombinant sweet-tasting protein thaumatin I. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, v. 67, n. 6, p. 652–658, 24 maio 2011.

MASUDA, T. et al. High-yield Secretion of the Recombinant Sweet-Tasting Protein Thaumatin I. *Food Science and Technology Research*, v. 16, n. 6, p. 585–592, 2010.

MASUDA, T. et al. Structure of thaumatin under acidic conditions: Structural insight into the conformations in lysine residues responsible for maintaining the sweetness after heat-treatment. *Food Chemistry*, v. 389, p. 132996, set. 2022.

MASUDA, T. et al. Subatomic structure of hyper-sweet thaumatin D21N mutant reveals the importance of flexible conformations for enhanced sweetness. *Biochimie*, v. 157, p. 57–63, fev. 2019.

MASUDA, T.; MIKAMI, B.; TANI, F. Atomic structure of recombinant thaumatin II reveals flexible conformations in two residues critical for sweetness and three consecutive glycine residues. *Biochimie*, v. 106, p. 33–38, nov. 2014.

MISRA, R. C. et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 6 maio 2016.

MORALEJO, F.-J. et al. Thaumatin Production in *Aspergillus awamori* by Use of Expression Cassettes with Strong Fungal Promoters and High Gene Dosage. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 1168–1174, mar. 1999.

MUNIS, M. F. H. et al. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 393, n. 1, p. 38–44, fev. 2010.

Natural Sweeteners Market Analysis - Industry Report - Trends, Size & Share. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/natural-sweeteners-market>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

Natural Sweeteners Market Analysis - Industry Report - Trends, Size & Share. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/natural-sweeteners-market>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

PAWEŁKOWICZ, M. E. et al. Effect of Transgenesis on mRNA and miRNA Profiles in Cucumber Fruits Expressing Thaumatin II. *Genes*, v. 11, n. 3, p. 334, 20 mar. 2020.

REISS, E. et al. The barley thaumatin-like protein Hv-TLP8 enhances resistance of oilseed rape plants to *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Breeding*, v. 128, n. 2, p. 210–212, abr. 2009.

SCHESTIBRATOV, K. A.; DOLGOV, S. V. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Scientia Horticulturae*, v. 106, n. 2, p. 177–189, set. 2005.

Scientific Opinion on the safety of the extension of use of thaumatin (E 957). *EFSA Journal*, v. 13, n. 11, nov. 2015.

SILVA, L. O. et al. Structural and sensory changes in short-dough biscuits: addition thaumatin and sucrose reduction effects. *Revista Cincia, Tecnologia & Ambiente*, v. 12, p. e12233, 2022.

SINGH, N. K. et al. Characterization of a Pathogen Induced Thaumatin-Like Protein Gene AdTLP from *Arachis diogenii*, a Wild Peanut. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e83963, 19 dez. 2013.

SRIPRIYA, R.; PARAMESWARI, C.; VELUTHAMBI, K. Enhancement of sheath blight tolerance in transgenic rice by combined expression of tobacco osmotin (*ap24*) and rice chitinase (*chi11*) genes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 53, n. 1, p. 12–21, fev. 2017.

SUEZ, J. et al. Artificial Sweeteners Induce Glucose Intolerance by Altering the Gut Microbiota. *Nature*, p. 181–186, 2014. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/publico/images/pdf/artificial-sweeteners-induce-glucose-intolerance-by-altering-the-gut-microbiota.pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

SZWACKA, M. et al. Expression pattern of the pre-prothaumatin II gene under the control of the CaMV 35S promoter in transgenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) flower buds and fruits. *Journal of Applied Genetics*, v. 50, n. 1, p. 9–16, mar. 2009.

SZWACKA, M. et al. Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 24, n. 2, p. 173–185, jun. 2002.

SZWACKA, M. et al. Genetically Modified Crops Expressing 35S-Thaumatin II Transgene: Sensory Properties and Food Safety Aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 11, n. 2, p. 174–186, 29 fev. 2012

TSCHANNEN, M. P. et al. Thaumatin and gum arabic allergy in chewing gum factory workers. *American Journal of Industrial Medicine*, v. 60, n. 7, p. 664–669, 24 maio 2017.

WEL, H.; BEL, W. J. Enzymatic Properties of the Sweet-Tasting Proteins Thaumatin and Monellin after Partial Reduction. *European Journal of Biochemistry*, v. 104, n. 2, p. 413–418, mar. 1980.

WEL, H.; LOEVE, K. Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *European Journal of Biochemistry*, v. 31, n. 2, p. 221–225, dez. 1972.

WITTY, M. Thaumatin II — a palatability protein. *Trends in Biotechnology*, v. 8, p. 113–116, 1990.

WINTER, P. et al. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum*×*C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 101, n. 7, p. 1155–1163, nov. 2000.

YASMIN, N.; SALEEM, M. Biochemical characterization of fruit-specific pathogenesis-related antifungal protein from basrai banana. *Microbiological Research*, v. 169, n. 5-6, p. 369–377, maio 2014.