

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO - DGE**

**LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL - LB VEGETAL**

Lucas Sustena Carvalho Silva

**PROTEÍNAS MODIFICADORAS DE SABOR: PRODUÇÃO  
RECOMBINANTE E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

São Carlos - SP

2023

**Lucas Sustena Carvalho Silva**

**PROTEÍNAS MODIFICADORAS DE SABOR: PRODUÇÃO  
RECOMBINANTE E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de São Carlos, como parte das  
exigências para a conclusão do curso de Bacharelado  
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia vegetal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Soares da C. Fuentes

## AGRADECIMENTOS

A Deus, com seu incontestável amor e magnanimidade, por habitar em mim.

Aos meus pais Márcia e Eurípedes, minha irmã Luiza e todos os meus familiares que confiaram e continuam a confiar plenamente em minha trajetória pessoal. Agradeço pelos incontáveis esforços que fizeram para que eu chegasse ao fim de mais uma etapa importante em minha vida. Eu os amo demais.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Soares da Costa Fuentes, por sua permanente compreensão, paciência e dedicação empregadas na realização deste trabalho. Agradeço por me abrir as portas para o lugar onde mais gostei de estar em meus últimos anos de graduação.

A imensa família que construí em São Carlos, da qual também costumo chamar de amigos, por me fazerem compreender o significado de resiliência. Em especial a Laura, Analu e Natália por dividirem assento comigo na embarcação turbulenta da graduação.

A cidade de São Carlos, minha segunda casa por anos, por testemunhar minha caminhada de autoconhecimento.

Agradeço a ciência, por seu influxo em nossa breve existência.

*“A perda das forças não esgota a vontade. Crer é apenas a segunda potência; a primeira é querer; as montanhas proverbiais que a fé transporta nada valem ao lado do que a vontade produz”*

*Os trabalhadores do mar - Victor Hugo (1866)*

## RESUMO

Uma classe de proteínas de sabor doce oriundas de frutos de plantas de florestas tropicais vem sendo estudadas quanto a sua potencialidade adoçante e também quanto a sua atividade modificadora de sabor. As chamadas proteínas modificadoras de sabor possuem a capacidade de alterar o sabor amargo e azedo em doce. A caracterização dessas proteínas já se encontra em estudo nos últimos anos, de igual forma também a ação das propriedades modificadoras de sabor nos receptores de sabor humano. Como as proteínas de sabor doce e modificadoras de sabor apresentam baixo ou nenhum teor calórico, elas têm sido apontadas como potenciais substitutos da sacarose pelas indústrias alimentícias direcionadas para consumidores que visam uma dieta com fins dietéticos e diabéticos. A Diabetes, obesidade e síndrome metabólica, têm se intensificado gradualmente nos últimos anos no Brasil e no mundo e as proteínas modificadoras de sabor surgem como importante alternativa no combate a doenças relacionadas ao consumo excessivo do açúcar convencional. A produção dessa classe de proteínas já é discutida e sabe-se que a obtenção por fontes naturais representa uma barreira logística e economicamente desfavorável se comparada a produção por expressão recombinante. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo revisar o estado da arte em relação às proteínas de sabor doce e modificadoras de sabor conhecidas até o momento, suas potenciais aplicações biotecnológicas e barreiras que tais produtos recombinantes terão que enfrentar antes de serem comercializados.

**Palavras chave:** proteínas de sabor doce, proteínas modificadoras de sabor, expressão recombinante, expressão heteróloga, biotecnologia.

## ABSTRACT

A class of sweet-tasting proteins from tropical forest plant fruits has been studied for their sweetening potential and also for their taste-modifier activity. The taste-modifier proteins have the ability to change bitter and sour tastes into sweet ones. The characterization of these proteins has already been studied in recent years, as well as the action of taste-modifier properties on human taste receptors. As sweet-tasting proteins and taste-modifiers have low or no caloric content, they have been identified as potential substitutes for sucrose by the food industries aimed at consumers who aim for a diet with dietary and diabetic purposes. Diabetes, obesity and metabolic syndrome have gradually intensified in recent years in Brazil and in the world, and taste-modifier proteins have emerged as an important alternative in the fight against diseases related to excessive consumption of conventional sugar. The production of this class of proteins has already been discussed and it is known that obtaining them from natural sources represents a logistic and economically unfavorable barrier when compared to production by recombinant expression. Therefore, the present work aimed to review the state of the art in relation to sweet-tasting proteins and taste-modifiers known so far, their potential biotechnological applications and barriers that such recombinant products will have to face before being commercialized

**Keywords:** sweet-tasting proteins, taste-modifier proteins, recombinant production, heterologous expression, biotechnology

## **LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS**

ATD - domínio amino terminal

CRD - domínio rico em cisteína

DMT - domínio transmembrana helicoidal

MLP - proteínas do tipo miraculina

pET SUMO – pequeno modificador relacionado a ubiquitina

STI - superfamília de inibidores de tripsina de soja

FDA - Food and Drugs Administration

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classificação geral dos adoçantes (Página 12).

Tabela 2 - Tabela de comparação das proteínas de sabor doce quanto a distribuição geográfica, variantes, fator de doçura, massa molecular, quantidade de aminoácidos e forma ativa (Página 19).

Tabela 3 - Resultados mais relevantes publicados sobre a expressão de taumatina recombinante (Página 23).



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do poro gustativo (Página 16).

Figura 2 - Representação esquemática do receptor T1R2-T1R3 mostrando possível estabilização pela ligação de uma proteína de sabor doce a um sítio de ligação secundário na superfície da forma livre 2. A proteína de sabor doce é representada em vermelho na parte esquerda da forma livre 2, impedindo-a de voltar à forma livre 1 (Página 17)

Figura 3 - Estruturas tridimensionais das cinco proteínas de sabor doce caracterizadas. As hélices  $\alpha$  e folha  $\beta$  são representadas em vermelho e amarelo, respectivamente. As superfícies das proteínas são representadas em branco (Página 18).

Figura 4 - Fruto da planta *Pentadiplandra brazzeana Baillon* (Página 20).

Figura 5 - Estrutura de uma variante da proteína brazzeína (Página 21).

Figura 6 - Fruto da planta *Thaumatococcus daniellii* (Página 23).

Figura 7 - Fruto da planta *Dioscoreophyllum cumminsii* (Página 24).

Figura 8 - Fruto da planta *Curculigo latifolia* (Página 25).

Figura 9 - Estrutura cristalina da Curculina (Neoculina). Proteína heterodimérica composta por uma subunidade ácida (rosa) e outra subunidade básica (azul). Os resíduos de cisteína formando ligações dissulfeto são representados como modelos de bola e bastão e coloridos em amarelo. Resíduos de histidinas estão indicados por flechas (Página 26).

Figura 10 - Fruto da *Capparis masaikai* (Página 27).

Figura 11 - Fruto da planta *Synsepalum dulcificum* (fruta-do-milagre) (Página 29).

Figura 12 - Esquema do efeito da miraculina nos receptores de sabor doce (Página 31).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2. OBJETIVO</b>	14
<b>3. REVISÃO</b>	15
3.1. Proteínas de sabor doce (sweet-tasting protein)	15
3.2. Proteínas modificadoras de sabor (taste-modifier protein)	15
3.3. Receptores de sabor humano	15
3.4. Descrição das proteínas de sabor doce	17
3.4.1. Brazzeína	19
3.4.2. Taumatina	22
3.4.3. Monelina	24
3.4.4. Curculina (Neoculina)	25
3.4.5. Mabinlina	27
3.4.6. Pentadina	28
3.4.7. Miraculina	29
3.5. Características evolutivas das proteínas de sabor doce	32
3.6. Desafios da produção recombinante	33
3.7. Exploração comercial e validação toxicológica	33
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	35
<b>5. REFERÊNCIAS</b>	36

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o final do século XX, a obesidade tem sido apontada como um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo (Disse et al., 2010), podendo desencadear diversas doenças cardiovasculares (Ribeiro & Santos, 2013), hipertensão arterial sistêmica, distúrbios do colesterol, diabetes e até mesmo vários tipos de câncer. A obesidade é conhecida por ser um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, por exemplo.

No Brasil, segundo a Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), do Ministério da Saúde, constatou-se uma frequência de 18,9% de adultos obesos, chegando a dobrar entre a faixa etária de 18 a 34 anos de idade. Nos EUA, a obesidade também aumentou de forma radical e atinge 3% da população do país. Já a prevalência da obesidade global duplicou entre os anos de 1908 e 2008, com 30% da população acima de 20 anos apresentando o quadro de sobrepeso (Malta, 2017). Hoje estima-se que 28 milhões de pessoas morram a cada ano devido a doenças relacionadas com obesidade (Bastien et al., 2014).

A diabetes é a principal doença relacionada ao sobrepeso, segundo Organização Mundial de Saúde, sua prevalência está em 10% da população. A sociedade Brasileira de Diabetes estima que existam por volta de 12 milhões de diabéticos no país e que 50% destes portadores ainda não foram diagnosticados. Observa-se também uma maior predisposição à obesidade em mulheres, estando estas em maior risco de desenvolver a doença (Food Ingredients Brasil, 2013).

Para evitar a prevalência dessas doenças relacionadas com distúrbios alimentares e o excessivo consumo de açúcar, pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de adoçantes que possam servir como uma alternativa ao convencional açúcar de mesa. Estes adoçantes possuem maior poder de adoçar do que a sacarose (dissacarídeo composto por glicose e frutose, extraído da cana de açúcar ou de beterraba) e são recomendados, coadjuvadamente, para os que passam por tratamentos para perda ou controle de peso.

Os edulcorantes, ou simplesmente adoçantes, são substâncias utilizadas para substituir o açúcar em alimentos e bebidas, proporcionando uma doçura intensa e com baixa ou sem adição de calorias. Os mesmos podem ser classificados em duas categorias, os edulcorantes nutritivos e não nutritivos (Tabela 1). Os edulcorantes nutritivos são aqueles que não somente contribuem para dar

sabor doce aos alimentos como também oferecem um grande aporte de caloria. Eles possuem sabor inferior à sacarose. A glicose, xarope de frutose, aspartame e polióis são ótimos exemplos de edulcorantes nutritivos. Já os edulcorantes não nutritivos, também chamados de edulcorantes de alta intensidade, podem ser considerados todos aqueles que possuem um alto poder de dulçor e que não contribuem com o aporte calórico do indivíduo, como a sacarina, ciclamato, acessulfame e sucralose. Eles possuem sabor doce superior a sacarose (Food Ingredients Brasil, 2013).

Os edulcorantes não nutritivos (não calóricos) são os mais recomendados para fins dietéticos e diabéticos. No entanto, apesar de conseguirem substituir o açúcar, nem sempre apresentam uma saciedade fisiológica satisfatória para o consumidor (Raben et al., 2002). A maioria dos edulcorantes de alta intensidade que possuem maior dulçor retêm sabores residuais que acabam sobrepondo o sabor doce, mostrando limitações em termos de qualidade. Com base nisso, o desafio da indústria tem sido desenvolver novos produtos com baixa ou sem calorias e que sejam de maior aceitação sensorial.

Pesquisadores estudam formas de combinações entre as substâncias não calóricas, assim como combinações com adoçantes de hidratos de carbono (polióis, nutritivos) de diferentes propriedades, a fim de obter um perfil de dulçor que poderia melhor reproduzir o gosto do açúcar tradicional (Priya et al., 2011). Porém, poucos resultados foram obtidos com essas combinações que ainda apresentam muito atributos negativos quanto ao persistente sabor residual. Em anos recentes, muitas substâncias têm sido categorizadas conforme seu potencial de sabor e capacidade de melhorar a doçura, modificando e mascarando sabores desagradáveis (Stoger, 2012).

CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS ADOÇANTES			
Nutritivos		Não nutritivos	Extratos vegetais
Carboidratos & Derivados	Peptídeos & Derivados		
Sacarose e derivados	Alitame	Acessulfame-K	3-acetato-de(+)-dihidroquercetina
Frutose	Aspartame	Ciclamato	Curculina
Glicose	Neotame	Dihidrochalconas	Estévia
Lactose e seus produtos de hidrólise		Frutooligossacarídeos	Filodulcina
Tagatose		L-açúcares	Glicirrizina
Polióis (eritritol, isomalte, lactitol, maltitol, manitol, sorbitol, xilitol, hidrolisado de amido hidrogenado e xarope de glicose hidrogenado)		Sacarina	Hernandulcina
Xaropes de glicose ou xaropes de milho (HFCS, xarope de maltose)		Sucralose	Mabinlina
			Miraculina
			Mogrosídeo
			Monelina
			Osladina
			Oximas
			Pentadina
			Rubosósídeo
			Taumatina

**Tabela 1:** Classificação geral dos adoçantes. Fonte: adaptado de “Adoçantes calóricos e não calóricos - Parte II” - Food Ingredients Brasil, nº.15, pág. 24, 2010. Disponível em: <https://revista-fi.com.br/edicoes/15/fib-edicao-15>

Além dos edulcorantes nutritivos e não nutritivos citados acima, existe também uma classe bastante explorada de “adoçantes” provindos de extratos vegetais, tais como a estévia, monelina, miraculina e outras tantas substâncias. Dentre estes, o extrato de folhas de estévia (*Stevia rebaudiana*) é um dos produtos mais comercializados. Denominado genericamente de esteviosídeos, o extrato de estévia é composto por esteviosídeos propriamente dito e seus anômeros, os rebaudiosídeos, responsáveis por conferir o sabor doce ao composto (Gremby, 1983). O produto é bastante notável por sua doçura intensa e por ser praticamente isento de calorias, além do fato de não deixar gosto residuais desagradáveis (Soerjato et al., 1982).

Com a crescente incidência de doenças relacionadas ao sobrepeso em todo mundo, a demanda por edulcorantes para fins dietéticos e diabéticos, que seja mais prazeroso ao paladar, tem aumentado (Freitas et al., 2014) e a procura por

substitutos de açúcar de fontes naturais também tem levado à descobertas de um grande número de substâncias que possuem propriedades modificadoras de sabor.

## **2. OBJETIVO**

Revisar criticamente a literatura científica disponível a respeito das proteínas de sabor doce e proteínas modificadoras de sabor bem como suas potenciais aplicações biotecnológicas.

### **3. REVISÃO**

#### **3.1. Proteínas de sabor doce (*sweet-tasting protein*)**

A demanda por substitutos alternativos para o açúcar, nas últimas décadas, tem direcionado pesquisas não somente para a identificação de genes humanos que codificam receptores de sabor doce, como também na descoberta de adoçantes naturais intensificadores de sabor e mecanismos de ação das proteínas modificadoras de sabor.

A existência de proteínas de sabor doce na natureza é conhecida há anos, sendo sua maioria encontrada em frutos de plantas tropicais, comumente usadas por populações indígenas no preparo de seus alimentos. No entanto, somente nos últimos 30 anos esforços foram tomados na exploração e comercialização de proteínas de sabor doce (Faus, I., 2000).

Existem seis proteínas de sabor doce conhecidas: taumatina, monelina, mabinlina, pentadina, brazzeína e curculina. Uma sétima proteína, a miraculina, não se configura como proteína de sabor doce, mas sim como uma proteína modificadora de sabor.

#### **3.2. Proteínas modificadoras de sabor (*taste-modifier protein*)**

As proteínas modificadoras de sabor possuem a capacidade de alterar os receptores de sabor doce presentes nas papilas gustativas. Desta forma, todos ácidos (que normalmente são azedos) adquirem um gosto doce quando ingeridos após o consumo dessas proteínas modificadoras de sabor. Os efeitos dessas proteínas nos receptores de sabor podem perdurar por cerca de 1 a 2 horas após o seu consumo, fazendo com que ao ingerir qualquer substância ácida, a mesma terá um sabor doce durante este período de tempo (Kant et al., 2005). Este efeito é temporário e as papilas gustativas voltam ao normal com o decorrer do tempo.

#### **3.3. Receptores de sabor humano**

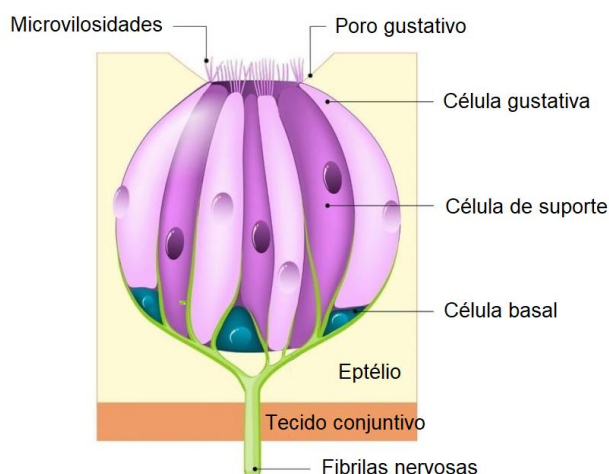
Sabemos que para que seja possível aferir a qualidade e sabor dos componentes dos alimentos é necessário que tenhamos a informação sensorial do



gosto. Os seres humanos podem detectar pelo menos cinco gostos: doce, salgado, umami, azedo e amargo (Meyers & Brewer, 2008) e os mecanismos de detecção dessas qualidades gustativas se dão por receptores de sabor localizados na membrana apical das células receptoras gustativas da língua (Figura 1). Estes receptores se ligam às substâncias gustativas e transmitem informações sensoriais para as células nervosas do cérebro (Strapasson et al., 2011).

A identificação de receptores gustativos fez com que novas ferramentas moleculares para a investigação da função de células receptoras de sabor surgissem. As células receptoras de gostos, quando agrupadas, são chamadas de papilas gustativas. Essas papilas que estão presentes na língua humana, possuem poros que se abrem e permitem com que moléculas e íons consigam alcançar o interior de células receptoras de gosto (Kant et al., 2005).

### Células Receptoras de sabor

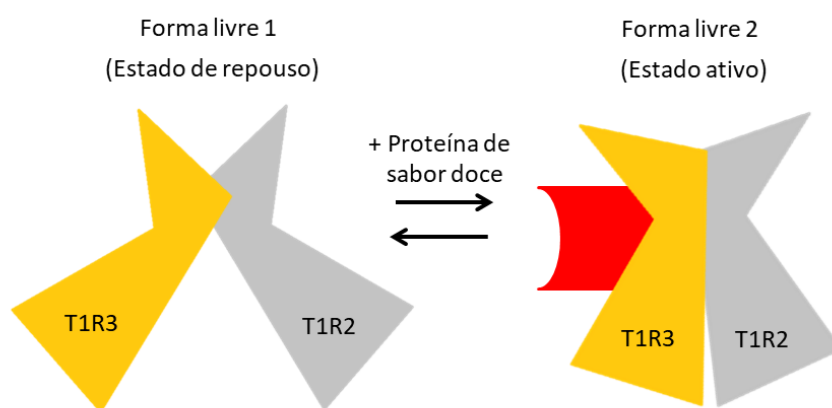


**Figura 1** - Anatomia do poro gustativo. Disponível em: <https://www.lifeder.com/papilas-gustativas/>

O sabor doce, amargo e umami são medidos por um receptor acoplado à proteína G, chamados receptores do tipo 1 (T1Rs) para doce e umami e tipo 2 (T2Rs) para o gosto amargo (Belloir et al., 2017). Ambos são expressos em células receptoras da língua e do palato. A classe de receptor T1R é composta por um domínio amino terminal (ATD), um domínio rico em cisteína (CRD) e um domínio transmembrana helicoidal (DMT) (Greg et al., 2001). Já a classe de receptor T2R pertence a uma família de 30 genes diferentes, que incluem vários receptores de sabor amargo.

Sugere-se que o receptor específico de sabor doce funcione na verdade com uma combinação de receptores heterodiméricos. A combinação dos receptores T1R2-T1R3 consegue reconhecer o sabor doce natural e o sabor doce sintético, ao passo que a combinação de receptores T1R1-T1R3, consegue reconhecer o sabor umami (Li et al., 2002).

Ainda não se é conhecido o exato mecanismo de interação de receptores de sabor doce das papilas gustativas com as proteínas modificadoras de sabor, porém alguns estudos sugerem que tais proteínas atuem nos receptores T1R2-T1R3. A hipótese é de que essas proteínas se aderem a esses receptores de sabor doce, ou seja, elas se ligam com o complexo de receptores T1R2-T1R3, mantendo uma ativação constante dos mesmos (Figura 2). Sabe-se que o complexo de receptores T1R2-T1R3 possui múltiplos locais de ligações para diferentes sabores doces (Koizumi et al., 2011). Estudos demonstram que a proteína do receptor T1R3, codificada pelo gene *Tas1r3*, também está relacionada na transdução de sabor doce (Trancredi et al., 2004).



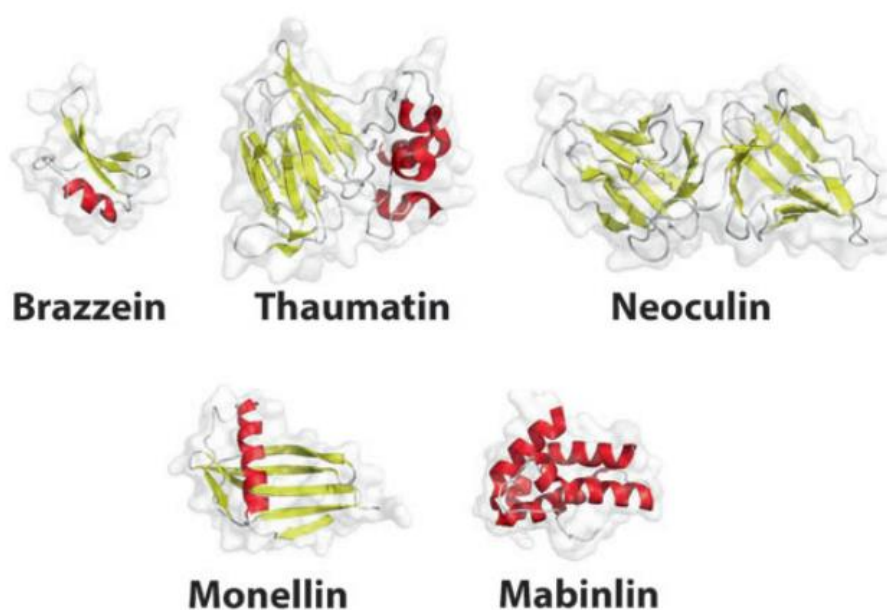
**Figura 2** - Representação esquemática do receptor T1R2-T1R3 mostrando possível estabilização pela ligação de uma proteína de sabor doce a um sítio de ligação secundário na superfície da forma livre 2. A proteína de sabor doce é representada em vermelho na parte esquerda da forma livre 2, impedindo-a de voltar à forma livre 1 - Fonte: traduzido e adaptado de “*Sweet proteins - potential replacement for artificial low calorie sweeteners*” - Kant R, pág. 4, 2005.

### 3.4. Descrição das proteínas de sabor doce

Até o momento, em todo mundo, se conhecem seis proteínas de sabor doce existentes. São elas: brazzeína, taumatina, monelina, curculina (que recentemente passou a se chamar neoculina), mabinlina e pentadina. Todas, com exceção da pentadina, foram caracterizadas. Outra proteína bastante elucidada é a miraculina, que apesar de converter sabor ácido e azedo em doce não possui sabor doce por si só como as demais proteínas anteriores. Desta forma, a miraculina é caracterizada como uma proteína modificadora de sabor e não como proteína de sabor doce.

Todas as sete proteínas são provenientes de plantas que crescem em florestas tropicais do sul da Ásia e África. Os mecanismos-chave relacionado com a atividade biológica de modificação do sabor, para todas as proteínas acima descritas, ainda não foram totalmente elucidados (Cadwell et al., 1998), mas se sabe que as sequências de aminoácidos de cada uma delas se diferem muito, provando que não existe uma origem relacionada entre elas.

Para as cinco proteínas de sabor doce caracterizadas, todas apresentam uma diferente estrutura tridimensional, além de uma grande diferença de massa molecular (Tabela 2). Não somente apresentam dobragens proteicas diferentes como a quantidade de estruturas secundárias são bem dissemelhantes (Figura 3). Estruturas quaternárias das sete proteínas modificadoras de sabor doce também são diversas, o que inclui estados monoméricos, homodiméricos e heterodiméricos (Neiers, F. et al., 2016).



**Figura 3:** Estruturas tridimensionais das cinco proteínas de sabor doce caracterizadas. As hélices  $\alpha$  e folha  $\beta$  são representadas em vermelho e amarelo, respectivamente. As superfícies das proteínas

são representadas em branco. Fonte: “*The Recent Development of a SweetTasting Brazzein and its Potential Industrial Applications*” - F. Neiers et al., pág. 5, 2016.

As distintas formas estruturais destas proteínas podem explicar também as diferentes propriedades de doçura, sabor e estabilidade térmica de cada uma delas.

	<b>Thaumatococcus daniellii</b>	<b>Monellin</b>	<b>Mabinlin</b>	<b>Pentadin</b>	<b>Brazzein</b>	<b>Curculin</b>	<b>Miraculin</b>
Source	Thaumatococcus daniellii Benth	Dioscoreophyllum cumminsii Diels	Capparis masakai Levl	Pentadiplandra brazzeana Baillon	Pentadiplandra brazzeana Baillon	Curculingo latifolia	Richadella dulcifica
Geographic distribution	West Africa	West Africa	China	West Africa	West Africa	Malaysia	West Africa
Variants	I, II, a, b, c <sup>a</sup>	-	I, II- a, III, IV <sup>a</sup>	-	-	-	-
Sweetness factor (weight basis)	3000	3000	100	500	2000	550	-
Molecular mass (active form, kDa)	22.2	10.7	12.4	12.0 <sup>b</sup>	6.5	24.9	98.4
Amino acids	207	45 (A chain) 50 (B chain)	33 (A chain) 72 (B chain)	?	54	114	191
Active form	Monomer	Dimer (A + B)	Dimer (A + B)	?	Monomer	Dimer (A + A)	Tetramer (A+A+A+A)

**Tabela 2** - Tabela de comparação das proteínas de sabor doce quanto a distribuição geográfica, variantes, fator de doçura, massa molecular, quantidade de aminoácidos e forma ativa - Fonte: “*Sweet proteins - potential replacement for artificial low calorie sweeteners*” - Kant R, pág. 2, 2005.

### 3.4.1. Brazzeína

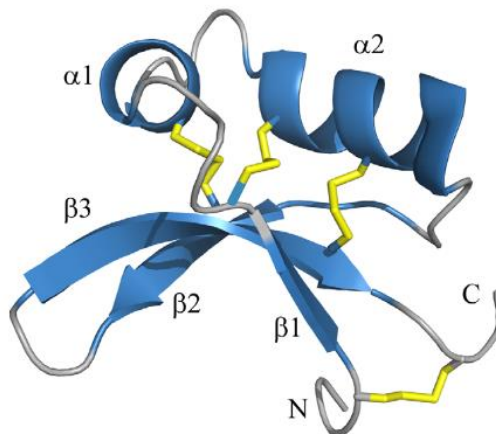
A brazzeína, assim como a pentadina, é uma proteína de sabor doce produzida pelo fruto da planta *Pentadiplandra brazzeana Baillon*, originária da África Ocidental (Figura 4). As populações indígenas desta região usavam a planta para adoçar bebidas (Van der Wel, Larson et al., 1989). Ela contém um total de 54 resíduos de aminoácidos e pesa 6.473 Da. Estima-se que é cerca de 2.000 vezes mais doce do que a sacarose e é bastante estável ao calor, uma vez que é altamente termoestável, persistindo por até 4 horas a 80°C (Ming e Hellekant 1994). Essas propriedades fazem com que a brazzeína represente uma excelente alternativa como adoçante de baixa caloria.



**Figura 4** - Fruto da planta *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. Disponível em <https://insider.si.edu/2016/09/gorillas-arent-tricked-faux-sugary-fruit-thanks-mutation/pentadiplandra-brazzeana-oublie-berry-780687/>

A proteína apresenta uma doçura significativamente maior do que a da sacarose e suas propriedades organolépticas são altamente adequadas para uso como adoçante natural, não apresentando acidez, salinidade ou amargor. O início da doçura da brazzeína é mais lento do que a sacarose, tornando seu uso mais adequado quando em conjunto com outros adoçantes. Testes mostraram que a brazzeína combina bem com adoçantes sintéticos, como o acessulfame-K, aspartame e esteviosídeo (Hellekant e Danilova 2005).

A brazzeína é um ótimo modelo de estudo quando o objetivo é investigar as propriedades químicas e estruturais envolvidas no sabor doce, pois a proteína é pequena, solúvel e bastante estável. Experimentos realizados com a estrutura da brazzeína sugerem que os resíduos 29-33 e 39-43, mais o resíduo 36 entre esses trechos, assim como o terminal C estão envolvidos na doçura da mesma (Figura 5) (Jin et al., 2003). Porém, como o interesse tem sido em buscar a relação entre estrutura-atividade destas proteínas e sendo a síntese química da mesma bastante inviável, pesquisadores têm optado por realizar a produção heteróloga da brazzeína.



**Figura 5** - Estrutura de uma variante da proteína brazzeína - Fonte: “*Structure-function relationships of brazzein variants with altered interactions with the human sweet taste receptor*” - Kiran K. et al., pág. 2, 2015.

A produção dos frutos de *Pentadiplandra brazzeana* Baillon contendo brazzeína é bastante complicada, uma vez que o cultivo desta planta é complexo e a extração da proteína também é economicamente inviável. Desta forma, a maneira mais fácil de se obter facilmente a brazzeína é utilizando a tecnologia do DNA recombinante. No contexto do evidente interesse, não somente comercial, mas como em pesquisas, desta proteína, a tecnologia do DNA recombinante mostra-se como uma solução para o problema da obtenção da brazzeína (Neiers, F. et al., 2016).

Dentre os diferentes organismos possíveis para a produção heteróloga da proteína, a bactéria *Escherichia coli* é a mais utilizada. A primeira produção recombinante obtida com sucesso de brazzeína foi feita com este organismo. A *E. coli* é sempre a opção considerada por seu perfil de rápido crescimento, meio de cultivo barato e susceptibilidade a transformações com DNA exógeno, além claro, de uma genética muito bem elucidada (Rosano e Ceccarelli 2014).

Assadi-Porter et al. (2008) produziram e purificaram com sucesso uma brazzeína com sabor doce utilizando *Escherichia coli*. No estudo em questão os pesquisadores customizaram um protocolo de expressão utilizando o sistema de expressão pET SUMO com o intuito de obter um grande rendimento da brazzeína recombinante solúvel. O sistema de expressão pET SUMO é conhecida por produzir elevados níveis de proteínas em *Escherichia coli* por utilizar um pequeno modificador relacionado a ubiquitina (fusão SUMO), que permite um aumento na solubilidade das proteínas expressas em fusão. Resultados indicaram que o

protocolo customizado por eles forneceram por fim um rendimento maior da proteína e em menor tempo.

Vahab J. et al. (2020), em estudo mais recente, também realizaram a expressão recombinante de brazzeína em cepa SHuffle® T7 de *E. coli*. Utilizando da forma menor de brazzeína como sequência básica, projetaram um gene com otimização de códon com base no conteúdo GC e no códon preferido da cepa de *E. coli* e em seguida o clonaram no vetor pET28a e expressaram na linhagem SHuffle® T7. Obtiveram como resultado uma alta taxa de brazzeína recombinante expressa nessa linhagem, além de um perfil de doçura intenso.

### 3.4.2. Taumatina

A taumatina é uma proteína de sabor doce monomérica e possui aproximadamente 22 kDa (Grenier et al., 1999). A proteína também foi isolada de uma planta nativa da África, a *Thaumatococcus daniellii* (Figura 6). Ela é comumente utilizada como adoçante e realçador de sabor industrial em alimentos e medicamentos (Masuda et al., 2004). No Brasil, a taumatina também é bastante utilizada pela indústria animal como um palatabilizante, estimulando o consumo de ração, para suínos.

Devido às dificuldades de se obter a taumatina de sua fonte natural, diversas tentativas de cultivar a planta *Thaumatococcus daniellii* em habitats diferentes do seu habitat natural foram realizadas. Nesses diferentes ambientes (incluindo estufas) a planta cresceu, porém sem frutos, onde está presente a proteína de sabor doce. Nesse contexto, como uma alternativa à produção de taumatina a partir de sua fonte natural, esforços têm sido feitos para produzir esta proteína em sistemas recombinantes (Witty e Higginbotham, 1994).





**Figura 6** - Fruto planta *Thaumatococcus daniellii*. Disponível em <https://www.convivendocomdiabetes.com/taumatina-novo-adocante-natural/>

A proteína taumatina consiste de 207 resíduos de aminoácidos com oito ligações dissulfeto intramoleculares e não possui resíduos de cisteína livre. Ela se agrega ao aquecer em pH 7,0 acima de 70°C, onde sua doçura desaparece (Kaneko et al., 1999). Estudos apontam que a proteína se liga a certos elementos nos poros gustativos das papilas de macaco Rhesus (Farbman et al., 1987).

Todas as formas de taumatina possuem poder de doçura intenso e as duas formas mais predominantes, taumatina I e taumatina II diferem-se apenas em 2 aminoácidos (Edens et al., 1982). Tentativas para produzir taumatina recombinante em diferentes microrganismos e plantas têm sido feitas usando o gene clonado da taumatina II (Faus, I., 2000). Em estudos anteriores, Faus et al. (1997 e 1998) expressaram taumatina em dois microrganismos hospedeiros diferentes. Comparação dos resultados pode ser observada na tabela 3.

Host	Promoter	Secretion	Yield	Sweet phenotype	Reference
<i>Escherichia coli</i>	Trp/lac	No	Very low	No	Edens et al. 1982
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PgK	No	Low	No	Lee et al. 1988
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Gapdh	Yes	Low	No	Edens and van der Wel 1985
<i>Bacillus subtilis</i>	$\alpha$ -amy	Yes	1 mg/l	Yes	Illingworth et al. 1988
<i>Streptomyces lividans</i>	$\beta$ -gal	Yes	0.2 mg/l	?	Illingworth et al. 1989
<i>Penicillium roquefortii</i>	Gla	Yes	1–2 mg/l	Yes	Faus et al. 1997
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	Gla	Yes	5–7 mg/l	Yes	Faus et al. 1998
<i>Solanum tuberosum</i>	CaMV	No	Low	Yes	Witty 1990

**Tabela 3** - Resultados mais relevantes publicados sobre a expressão de taumatina recombinante -

Fonte: “Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins” - Faus, I., pág. 147, 2000.

É importante destacar, dentre os resultados mais relevantes, que as expressões realizadas por Faus et al. (1997 e 1998) em *Penicillium roquefortii* e *Aspergillus niger* obtiveram, além de um bom rendimento, se comparado a outros



hospedeiros, também uma proteína expressa e secretada com seu fenótipo doce, essa característica é fundamental quando se pensa na empregabilidade comercial dessa proteína.

A taumatina pode apresentar um sabor residual considerado não aceitável para alguns paladares. Buscando contornar esse problema, Blair et al. (1990) realizaram uma mutação direcionada em um gene sintético da taumatina I, o que acabou resultando em uma variedade de análogos da taumatina I contendo substituições de aminoácidos selecionados e com melhor desempenho em relação ao sabor doce e, portanto, com qualidades mais comercializáveis.

### 3.4.3. Monelina

A monelina é uma proteína de sabor doce obtida do fruto de *Dioscoreophyllum cumminsii*, proveniente da África Ocidental (Figura 7), que consiste de duas cadeias polipeptídicas não covalentemente associadas, uma cadeia A com 44 resíduos de aminoácidos e uma cadeia B de 50 resíduos de aminoácidos (Ota et al., 1999). A monelina é aproximadamente 100.000 vezes mais doce do que o açúcar (Ogata et al., 1987).



**Figura 7** - Fruto da planta *Dioscoreophyllum cumminsii*. Disponível em <https://www.rarepalmseeds.com/dioscoreophyllum-cumminsii>

Foi demonstrado que quando aquecida acima de 50 °C em pH ácido, a monelina perde sua doçura. Kim et al. (1989), com o intuito de contornar essa falta de estabilidade da proteína, prepararam análogos de cadeia única onde as duas cadeias foram unidas por vários ligantes. Um desses análogos de cadeia simples foi

expresso em *Escherichia coli* e atestou-se apresentar uma doçura tão forte quanto a proteína original, além também de uma maior estabilidade em condições de pH e temperatura extremas.

A expressão de monelina em plantas transgênicas também foi testada, embora em menor quantidade (Peñarrubia et al., 1992). Mais atualmente, também foram estudadas a expressão da monelina em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* (Kondo et al., 1997).

#### 3.4.4. Curculina (Neoculina)

A curculina é uma proteína extraída do fruto da *Curculigo latifolia*, uma planta comum das regiões tropicais da Ásia e África (Figura 8). Assim como as proteínas descritas anteriormente, a curculina também possui propriedades modificadoras de sabor, além de possuir um sabor doce intrínseco. Não existe descrito até o momento outra proteína que tenha capacidade modificadora de sabor e que tenha sabor doce ao mesmo tempo (Yamashita et al., 1990). A atividade modificadora de sabor dessa proteína não se altera quando incubada a 50°C por 1 hora, com pH entre 3 e 11 (Yamashita et al., 1995).

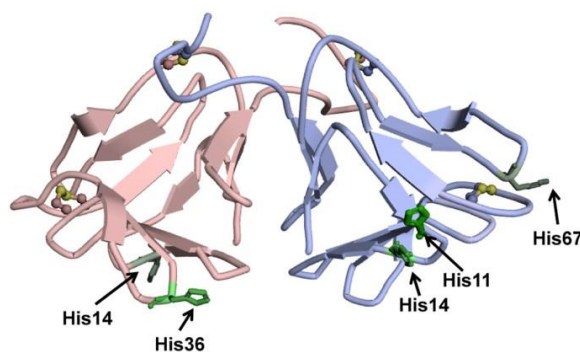


**Figura 8** - Fruto da planta *Curculigo latifolia* - Fonte: “Potency of *Curculigo capitulata* and *Curculigo latifolia* Fruit Based on Nutrient Content (a Case for Preservation Need in Kebonharjo)” - Marbelisa B. et al., pág. 70, 2018.

A proteína curculina é um dímero que compreende dois polipeptídeos idênticos conectados por meio de duas pontes dissulfeto, com um total de 144 resíduos de aminoácidos (Figura 9). Ela consegue ser 550 vezes mais doce que a

sacarose. A curculina também possui atividade modificadora de sabor, com a capacidade de transformar sabores azedos em doces (Faus, I., 2000).

Algumas pesquisas afirmam que no modelo tridimensional da curculina existem algumas regiões na superfície da proteína que poderiam atuar como epítomos responsáveis pelas propriedades de sabor adocicado da mesma (Barre et al., 1997).



**Figura 9** - Estrutura cristalina da Curculina (Neoculina). Proteína heterodimérica composta por uma subunidade ácida (rosa) e outra subunidade básica (azul). Os resíduos de cisteína formando ligações dissulfeto são representados como modelos de bola e bastão e coloridos em amarelo. Resíduos de histidinas estão indicados por flechas. Fonte: “*Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor*” - Koizumi, T., pág. 2, 2015.

Suzuki, M. et al. (2004) fizeram a produção de curculina recombinante utilizando um sistema de expressão de *Escherichia coli*. Os pesquisadores isolaram um gene que codifica uma nova proteína contida na fração nativa da curculina que apresenta sequência de aminoácidos homóloga à sequência de aminoácidos da curculina original. Usando os cDNAs dessas proteínas (designadas como curculina1 e curculina2) os pesquisadores produziram um painel de curculinas recombinantes homodiméricas e heterodiméricas e examinaram sua atividade de sabor doce e modificadora de sabor. A curculina1 e curculina2 recombinantes foram expressas separadamente em *E. coli* como corpos de inclusão. Por procedimentos de desnaturação de guanidina e redobramento oxidativo, os pesquisadores conseguiram preparar 3 possíveis isoformas diméricas de curculina1 e curculina 2, ou seja, os homodímeros de curculina1 (curculina1-1) e de curculina2 (curculina2-2) juntamente com o heterodímero que consiste em essas subunidades (curculina1-2).

De acordo com os pesquisadores, verificou-se que o heterodímero curculina1-2 possuía o fenótipo de sabor doce e atividade modificadora de sabor,

enquanto as formas homodiméricas (curculina1-1 e curculina2-2) não apresentavam nenhuma dessas propriedades (Suzuki, M. et al., 2004)

### 3.4.5. Mabinlina

A mabinlina é uma proteína de sabor doce derivada das sementes da planta chinesa *Capparis masaikai* (Figura 10). É uma proteína heterodimérica e suspeita-se que existam pelo menos cinco isoformas. A mais estudada foi denominada de mabinlina II. A sequência de aminoácidos dessa isoforma foi descrita como possuindo 33 resíduos de aminoácidos na cadeia A e 72 resíduos de aminoácidos na cadeia B. A proteína é solúvel em água e chega a ser 400 vezes mais doce do que a sacarose, além de exibir alta estabilidade a calor, por conta de quatro ligações dissulfeto intramoleculares entre a cadeia A e B (Nirasawa et al., 1993). Aponta-se que a proteína mantém seu sabor doce após incubação por 48 horas a 85°C.



**Figura 10** - Fruto da *Capparis masaikai*. Disponível em <https://www.foodnavigator.com/Article/2018/12/10/Scaling-up-high-value-sweet-proteins-flavours-with-biostimulation-hydroponics>

A estabilidade ao calor e, conseqüentemente o nível de doçura, das proteínas mabinlinas é notavelmente distinta de outras proteínas de sabor doce e essa característica tem sido atribuída a substituição de um único aminoácido. Acredita-se que a diferença na estabilidade ao calor das diferentes isoformas da mabinlina se deve à presença de um resíduo de arginina (homólogo estável a altas temperaturas) ou uma glutamina (homólogo instável a altas temperaturas) na posição 47 da cadeia B (Nirasawa et al., 1994).

Segundo Xiong e Sun (1996), tentativas de expressar a mabinlina II em tubérculos de batata transgênicas foram feitas, embora sem resultados notáveis. Em estudos mais recentes Gu, W. et al. (2015) realizaram a expressão heteróloga de mabinlina II com em *E. coli* e em *Lactococcus lactis*. Os pesquisadores se utilizaram da mabinlina II recombinante MBL-BH (contendo as cadeias B de mabinlina II fundidas com His-tag) e MBL-ABH (contendo as cadeias A e B de mabinlina II fundidas com His-tag) para expressá-las na cepa BL21 (DE3) de *E. coli* na forma de corpos de inclusão, que posteriormente foram purificadas e renaturadas. Resultados deste estudo indicaram que a proteína recombinante MBL-BH possuía fenótipo de sabor doce, enquanto que a proteína recombinante MBL-ABH não. Autores acreditam que a ausência do fenótipo de sabor doce da MBL-ABH ocorreu possivelmente a um incorreto redobramento da proteína ou por uma estrutura inativa. Verificou-se ainda que as proteínas recombinantes mabinlina II eram insolúveis quando expressas na cepa de *E. coli* em questão e a renaturação dessas proteínas era bastante difícil. No mesmo estudo de Gu, W. et al. (2015), que também realizaram a expressão da mabinlina II em *Lactococcus lactis* (sistema de expressão com certificação de qualidade alimentar (*L. lactis* NZ3900/pNZ8149)), obtiveram uma expressão satisfatória da proteína com fenótipo de sabor doce, porém com rendimento não muito considerável.

#### 3.4.6. Pentadina

A pentadina, assim como a brazzeína, é uma proteína de sabor doce extraída da *Pentadiplandra brazzeana*, uma planta encontrada nas florestas tropicais de alguns países africanos. Não existem muitas informações a respeito dessa proteína (Van der Wel et al., 1989), mas estudos afirmam que ela possui cerca de 500 vezes mais sabor doce do que a sacarose. Seu perfil de doçura assemelha-se mais ao da monelina do que ao da taumatina. A pentadina também consiste em subunidades acopladas por ligações dissulfeto.

Pentadina é uma derivada da mesma planta da qual a brazzeína, enquanto a pentadina é extraída da forma seca da fruta, a brazzeína é extraída da forma fresca. A pentadina aparenta uma forma reticulada e não nativa de brazzeína com um peso molecular aproximadamente o dobro do da brazzeína e com uma doçura

significativamente reduzida em comparação com a mesma (Van der Wel, H. et al., 1989).

Nenhum trabalho a respeito de expressão recombinante dessa proteína de sabor doce foi encontrado.

### 3.4.7. Miraculina

A miraculina é descrita como uma glicoproteína homodimérica encontrada nos frutos da planta *Synsepalum dulcificum*, a planta-do-milagre (ou fruta-do-milagre), que posteriormente foi renomeada de *Richadella dulcifica*, pertencente à família Sapotaceae. Essas plantas são comumente encontradas em regiões tropicais e subtropicais nas formas de arbustos e árvores (De Marqui, 2007 Theerasilp e Kurihara, 1988).

A proteína consiste em polipeptídeos compostos por 191 resíduos de aminoácidos, com uma massa de 24 a 28 kDa. As duas subunidades são mantidas juntas por ligações dissulfeto intramoleculares. Sua sequência desnaturada constitui-se de um tetrâmero, e um dímero e ambos apresentam atividade modificadora de sabor ácido (Igeta et al., 1991).

Os frutos da planta milagrosa se assemelham a azeitonas vermelhas (Figura 11) e quando ingeridas possuem a capacidade de anular o sabor amargo e azedo de frutas cítricas consumidas após a sua ingestão. Essa sensação de doçura é exercida sobre as papilas gustativas durante o período de 1 a 2 horas após consumo de substâncias ácidas (Theerasilp e Kurihara, 1988). O limão azedo, por exemplo, passa a ter um sabor doce com a ingestão prévia da fruta do milagre. A miraculina é o componente ativo responsável pelo sabor doce, quando na língua, a mesma faz com que alimentos azedos fiquem com sabor doce.



**Figura 11** - Fruto da planta *Synsepalum dulcificum* (fruta-do-milagre). Disponível em <https://www.tecnoveste.com.br/entenda-os-beneficios-da-fruta-do-milagre-synsepalum-dulcificum-para-sua-saude/>

A fruta-do-milagre era tradicionalmente utilizada pelos povos indígenas no intuito de melhorar a palatabilidade de seus alimentos ácidos (Kurihara e Beidler, 1969). Hoje, é possível encontrar comercialmente a fruta *in natura* em pó e também na forma de comprimidos no Japão.

As proteínas do tipo miraculina (MLP) também estão classificadas na superfamília de inibidores de tripsina de soja (STI) do tipo Kunitz, devido a alta afinidade com a estrutura primária destes inibidores (Takai et al., 2013). Tal como os inibidores de tripsina de soja do tipo Kunitz, estudos apontam que as miraculinas também possuem atividade inibidora de tripsina do tipo Kunitz, servindo como bioinseticida contra pragas e predadores (Gahloth et al., 2011).

Neste contexto, a miraculina apresenta grande relevância comercial quanto ao seu potencial modificador de sabor e também quanto a seu potencial bioinseticida, tornando alvo de investimento e exploração por parte das indústrias de alimentos e agricultura (Sun et al., 2006).

Entretanto, devido às dificuldades e a baixa disponibilidade da proteína por fontes naturais, diversas pesquisas e estratégias de engenharia genética vêm sendo desenvolvidas quanto à produção recombinante em larga escala dessa proteína em diversos sistemas de expressão heterólogas *in vitro* e *in planta*. *Escherichia coli*, levedura, tabaco transgênicos são exemplos dos principais modelos (Kurihara e Nirasawa, 1997).

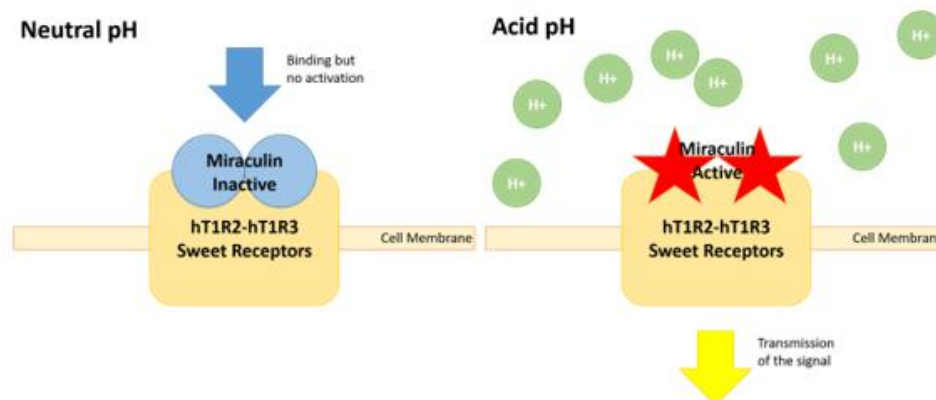
### ***Atividade modificadora de sabor (miraculina)***

Além das características já citadas acima, a miraculina pode também estar envolvida em uma gama de funções biológicas extras que envolvem propriedades antifúngicas, antioxidantes, ação anti carcinogênese, agregação plaquetária e coagulação do sangue (Ryan 1978; Kennedy, 1998; Oliva et al., 2000). No entanto, a atividade modificadora de sabor talvez seja a sua característica comercial de maior destaque e entender esse sistema tem sido o foco de diversas pesquisas sobre a ação dessa proteína.



De acordo com estudos de mutagênese, a atividade modificadora de sabor da miraculina é atribuída a seus dois resíduos de histidinas (His30 e His60) localizados nas regiões mais expostas de sua estrutura (Ito et al., 2007). Sua atividade somente ocorre quando a miraculina assume a sua forma de homodímero (Igeta et al., 1991). Segundo Misaka (2013) a miraculina age como um agonista e um antagonista dependente de pH. Em meio ácido, a miraculina liga-se aos receptores de sabor doce, funcionando como agonista, porém em meio neutro a miraculina atua como antagonista inibindo a ação dos receptores de sabor doce (Figura 12).

Durante um período de 30 minutos a duas horas a miraculina reativa os receptores de sabor doce, sempre que um pH ácido for detectado. Apesar dos recentes avanços em pesquisas, esse mecanismo ainda não é completamente elucidado.



**Figura 12** - Esquema do efeito da miraculina nos receptores de sabor doce - Fonte: disponível em [https://2019.igem.org/Team:TU\\_Dresden/Spirulina](https://2019.igem.org/Team:TU_Dresden/Spirulina)

A modificação de sabor é causada pela ligação direta e contínua da miraculina com os receptores de sabor doce T1R2-T1R3. É conhecido que o complexo de receptores T1R2-T1R3 possui múltiplos locais de ligação para diferentes sabores doces. A porção do complexo desses receptores que está envolvida com a resposta da miraculina na indução da doçura é o domínio Amino-terminal (ATD) (Koizumi et al., 2011).

De acordo com Misaka (2013) a miraculina liga-se a microvilosidades da membrana plasmática de células epiteliais da língua sem ativar necessariamente os receptores de sabor doce, pois a proteína não possui sabor doce. O receptor T1R2-



T1R3 fica inativo até a ingestão de algum alimento ácido, com pH variando de 3,0 a 6,0 durante um período de até duas horas (Kurihara, 1992).

### ***Miraculina citrus***

A expressão recombinante em larga escala da miraculina ainda não é uma realidade e a busca por fontes alternativas de proteínas do tipo miraculina tem sido intensificada por parte dos pesquisadores devido a dificuldade de acesso à fruta-do-milagre. A miraculina de citrus é um exemplo de fonte alternativa viável, uma vez que o gênero citrus inclui uma das mais importantes árvores frutíferas cultivadas em todo o globo.

Laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*) e a toranja (*Citrus grandis*) são ótimos representantes de plantas cítricas (Mattos Junior et al., 2005). As laranjas doces estão entre as frutas cítricas de maior valor comercial e dentre os genes de *Citrus sinensis* de interesse para aplicações biotecnológicas encontram-se os genes de tipo miraculina.

### **3.5. Características evolutivas das proteínas de sabor doce**

Tanto as proteínas de sabor doce como as modificadoras de sabor apresentadas anteriormente não apresentam homologia óbvias em suas estruturas conformacionais e em suas sequências gênicas. Este fato intriga e faz com que pesquisadores questionem se as propriedades modificadoras e realçadoras de sabor atuam de maneiras análogas ou completamente distintas em cada uma das proteínas (Faus, I., 2000)

Van der Wel et al. (1989) sugere ainda que o fato de todas as proteínas serem isoladas de plantas de florestas tropicais não é uma simples coincidência e que essa característica têm um importante valor evolutivo. Acredita-se que animais selvagens tenham preferência por esses frutos e que isso leva a uma dispersão maior de sementes das plantas. Chimpanzés são eficientes dispersores de sementes e há uma grande possibilidade que os receptores de sabor dos primatas tenham sido os principais alvos na evolução das proteínas de sabor doce.

### 3.6. Desafios da produção recombinante

Muitos esforços estão sendo empregados para a superexpressão das proteínas modificadoras de sabor utilizando vários sistemas heterólogos, incluindo o de bactérias, leveduras, animais e plantas. Sistema de expressão de levedura, *Pichia pastoris*, por exemplo, já provou ser muito eficaz na obtenção dessas proteínas doces purificadas (Macauley-Patrick et al., 2005). As proteínas secretadas também são fáceis de purificar e apresentam, na maioria das vezes, características idênticas às proteínas extraídas naturalmente. A obtenção em larga escala dessas proteínas por métodos biotecnológicos abre novos caminhos para a indústria de adoçantes e também impulsiona cada vez mais pesquisas sobre os reais mecanismos de ações biológicas das proteínas modificadoras de sabor.

A utilização de um alto número de cepas de *Pichia pastoris* e o design de vias metabólicas para a otimização e aumento de proteínas heterólogas foram observadas nos últimos anos. A compreensão das reações metabólicas que envolvem o processamento dessas proteínas também nos fornece *insights* pertinentes para o estabelecimento de modelos metabólicos que podem vir a servir como uma importante ferramenta para o processo em biorreatores. Compreender o processamento dessas proteínas pelos organismos significa prever parâmetros que podem influenciar o processo ou modificações genéticas no comportamento da cepa (Kerkhoven et al., 2014).

### 3.7. Exploração comercial e validação toxicológica

A maioria das proteínas de sabor doce e modificadoras de sabor foram inicialmente descobertas e caracterizadas graças a estudos e pesquisas em universidades e laboratórios de importantes institutos nacionais e internacionais, chamando a atenção de empresas que se interessaram por sua exploração comercial. Muitas das proteínas já são utilizadas comercialmente.

A taumatina, desde que foi aprovada pela primeira vez em 1983 por autoridades reguladoras no Reino Unido como um ingrediente alimentar seguro, tem sido empregada em rações animais (principalmente animais domésticos), goma de mascar e como excipientes em produtos farmacêuticos. Largamente utilizada no Japão em uma grande diversidade de produtos comerciais (Faus, I., 2000).

Por sua vez, o empreendimento comercial da monelina, tem se mostrado um pouco mais lento devido a grande instabilidade da proteína em altas temperaturas. No entanto, pesquisadores da Kirin Co. no Japão obtiveram sucesso na expressão recombinante de monelina em *Candida utilis*, obtendo rendimentos altos se comparado com a extração de fonte natural. Tais resultados, somados com o fato de que a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA já reconhece a *C. utilis* como seguro, garantem uma nova e boa perspectiva para a comercialização desta proteína (Kondo et al., 1997).

Antes que qualquer uma das proteínas citadas se torne um potencial adoçante e chegue ao mercado, várias etapas técnicas e regulatórias são necessárias. A obtenção de qualquer uma dessas proteínas pode ser feita através de suas fontes naturais ou através de produção recombinante em larga escala. No entanto, vimos que a extração por fontes naturais é inviável, uma vez que produzir os frutos em um habitat diferente do seu original é complexo e demorado. As plantas não respondem bem a tentativas dessa natureza. Isto implica na instalação da produção em localidades de origem dessas plantas, sobrecarregando e encarecendo o processo logístico e operacional. Somado a isso, dependendo das necessidades do mercado para o produto em questão a extração por fontes naturais pode não suprir a demanda necessária do mesmo (Faus, I., 2000)

A expressão recombinante, a priori, pode parecer ser a solução mais segura, mas ainda assim também passa por algumas barreiras. A primeira consideração a ser feita quando se fala nesta tecnologia é se o produto final (a proteínas expressa) possui o mesmo fenótipo de sabor doce do produto natural. Segundo Faus, I. (2000), como visto anteriormente, a própria taumatina adquirida de expressão recombinante, por razões não elucidadas, não apresentava sabor doce, isso pode se dar devido à falta de modificações pós-traducionais necessárias e até mesmo a má dobragem das proteínas. A segunda consideração é se os microrganismos empregados para a produção em larga escala são seguros e validados. Garantir que os modelos utilizados estejam dentro de um padrão de segurança para utilização em humanos é essencial.

Para competir de forma eficiente com a extração por fontes naturais, a abordagem biotecnológica deve atingir não somente rendimento maior, como excelência fenotípica. A determinação do custo de produção, de igual forma, também depende de qual das duas abordagens serão escolhidas.

Uma vez que se determine um processo biotecnológico favorável, eficiente e de custo competitivo, o produto em potencial ainda precisará ser aprovado por eventuais autoridades reguladoras em seu domínio. Estudos toxicológicos são parte do pacote de validação desses produtos e existe uma deficiência muito grande em pesquisas que abordam essa questão toxicológica. Os ensaios de toxicidade são os responsáveis por identificar possíveis efeitos adversos que as proteínas de sabor doce e modificadoras de sabor podem causar aos consumidores finais. Como as atividades dessa classe de proteínas ainda não são amplamente estabelecidas é primordial que se entenda os efeitos dela, bem como os parâmetros de consumo. A quantidade (porção) diária que pode ser ingerida pelo consumidor de forma segura e saudável, as possíveis contraindicações para crianças, idosos e portadores de doenças metabólicas, bem como os fatores nutricionais, são bons exemplos de tópicos que carecem de maior entendimento.

Por fim, uma vez que todo processo foi validado e o produto aprovado, o sucesso mercadológico é a etapa seguinte. As proteínas de sabor doce e as modificadoras de sabor competirá com uma variedade de produtos semelhantes já disponíveis no mercado, incluindo outras proteínas de sabor doce. Para Faus, I., (2000), como cada proteína de sabor doce possui um diferente e único perfil de doçura, é provável que o mercado faça suas próprias apostas e escolhas, dando margem para novas pesquisas com interesse industrial.

O fato de já existirem empresas investindo nesse nicho é um claro sinal de que a demanda por substitutos dos convencionais edulcorantes é emergente e potencial.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Estimulado pela crescente demanda do mercado por adoçantes de baixa caloria, que possuem uma maior palatabilidade em relação ao sabor do açúcar, a busca por compostos de extratos naturais permanece incessante. Descobriu-se uma gama de proteínas doce provenientes de extratos vegetais que possuem maior poder adoçante do que a sacarose e com um baixo valor calórico. Tais proteínas se colocam como uma alternativa bastante viável para o consumo por pessoas com problemas relacionados à obesidade, diabetes e hiperlipidemia.

As proteínas têm sido estudadas quanto às suas atividades biológicas com o receptor de sabor humano. Quanto mais se sabe a respeito de seus mecanismos de ação e mais se conhece a respeito de suas estruturas, mais se torna possível direcionar pesquisas eficientes na produção de novos adoçantes. A descoberta dos genes humanos que codificam o receptor de sabor doce também representa um enorme passo para o desenvolvimento de produtos adoçantes comerciais.

Contudo, apesar de muitos estudos em etapa de desenvolvimento a respeito dessas proteínas doces, ainda pouco se conhece sobre seu mecanismo de ação e atividade, o que faz cada vez mais necessário a viabilização de estudos que contribuam para o entendimento de suas atividades.

## 5. REFERÊNCIAS

ABE K., YAMASHITA H., ARAI S., KURIHARA Y. (1992) **Molecular cloning of curculin, a novel taste-modifying protein with a sweet taste.** *Biochim Biophys Acta* 1130: 232-234.

ASSADI-PORTER FM., PATRY S., MARKLEY JL. (2008) **Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in E. coli.** *Protein Expr Purif* 58(2):263–268.

BARRE A., VAN DAMME EJ., PEUMANS WJ., ROUGE P.: **Curculin, a sweet tasting and taste-modifying protein, is a non-functional mannose-binding lectin.** *Plant Mol Biol* 1997, 33(4):691-8.

BASTIEN, M.; POJRIER, P.; LEMIEUX, L.; DESPRÉS, JP. **Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease.** *Progress in Cardiovascular Disease*, Jan – Feb. 2014. v. 56, n. 4, p. 369-381.

BELLOIR, C., NEIERS, F., & BRIAND, L. (2017). **Sweeteners and sweetness enhancers.** *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(4), 279-285.

BLAIR LC., KODURI RJ., LEE JH., WEICKMANN JL. (1990) **DNA encoding [Lys46, Asp97, Asp113] and [Lys46, Asp113, Asp137] thaumatin I polypeptides**. PCT Patent WO 90/05775.

CALDWELL J., ABILDGAARD F., DZAKULA Z., MING D, HELLEKANT G., MARKLEY J.: **Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein**. Nat Struct Biol 1998, 5:427-431.

DE MARQUI, S. R. **Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de Chrysophyllum flexuosum (Sapotaceae)**. Dissertação (Mestre em Química). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química – Campus de Araraquara 2007.

DISSE, E., BUSSIER, A. L., VEYRAT-DUREBEX, C., DEBLON, N., PFLUGER, P. T., TSCHÖP, M. H., LAVILLE, M., & ROHNER-JEANRENAUD, F. (2010). **Peripheral ghrelin enhances sweet taste food consumption and preference, regardless of its caloric content**. *Physiology & Behavior*, 101(2), 277-281.

EDENS L., HESLINGA L., KLOK R., LEDEBOER AM., MAAT J., TOONEM MY., VISSER CT., VERRIPS T. (1982) **Cloning of cDNA encoding the sweet tasting plant protein thaumatin and its expression in Escherichia coli**. *Gene* 18: 1-12.

**Edulcorantes e seu Papel na Saúde Pública**. *Food Ingredients Brasil*, nº. 24, pág. 40-45, 2013.

FARBMAN AI., OGDEN-OGLE CK., HELLEKANT G., SIMMONS SR., ALBRECHT RM., VAN DER WEL H.: **Labeling of sweet taste binding sites using a colloidal gold-labeled sweet protein, thaumatin**. *Scanning Microsc* 1987, 1(1):351-7.

FAUS, I. **Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins**. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 145–151 (2000).

FREITAS, M. L. F., DUTRA, M. B. L., & BOLINI, H. M. A. (2014). **Development of pitanga nectar with different sweeteners by sensory analysis: Ideal pulp**

**dilution, ideal sweetness, and sweetness equivalence.** Food Science and Technology, v. 34, n. 1, p. 174-180.

GAHLOTH, D.; SHUKLA, U.; BIRAH, A.; GUPTA, G. P.; KUMAR, P. A. DHALIWAL, H. S.; SHARMA, A. K. **Bioinsecticidal activity of *Murraya koenigii* miraculina-like protein against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*.** Archives of Insect Biochemistry and Physiology. v. 78, n. 3. p.132 – 144. 2011.

GREG NELSON, MARK. A. HOON, JAYARAM CHANDRASHEKAR, YIFENG ZHANG, NICHOLAS J.P. RYBA, CHARLES S. ZUKER. **Mammalian Sweet Taste Receptors.** Cell. Vol. 106, Issue 3. p. 381-390. 2001.

GREMBY, T. H., PARKER, K. J., LINDLEY, M. G. **Developments in sweeteners-2.** London: Applied Science. Publ., 1983. p. 119-55.

GRENIER J., POTVIN C., TRUDEL J., ASSELIN A. **Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric b-1,3-glucans.** Plant Journal , 1999; 19: 473-480.

GU W., XIA Q., YAO J., FU S., GUO J., HU X. **Recombinant expressions of sweet plant protein mabinlin II in *Escherichia coli* and food-grade *Lactococcus lactis*.** World J Microbiol Biotechnol. 2015 Apr;31(4):557-67.

HELLEKANT, G. and V. DANILOVA (2005). "**Brazzein a small, sweet protein: discovery and physiological overview.**" Chemical senses 30(1): i88.

IGETA, H.; TAMURA, Y.; NAKAYA, K.; NAKAMURA, Y.; KURIHARA, Y. **Determination of disulfide array and subunit structure of taste-modifying protein, miraculina.** Biochimica et Biophysica Acta. V.1079. p.303-307. 1991.

ITO, K.; ASAKURA, T.; MORITA, Y.; NAKAJIMA, K.; KOIZUMI, A.; SHIMIZUIBUKA, A.; MASUDA, K.; ISHIGURO, M.; TERADA, T.; MARUYAMA, I.; KITAMOTO, K.; MISAKA, T.; ABE, K. **Microbial production of sensory-active miraculina.** Biochemical and Biophysical Research Communications. V.360. p.407-411. 2007.

JIN Z., DANILOVA V., ASSADI-PORTER F., ACETI D., MARKLEY J., HELLEKANT G.: **Critical regions for the sweetness of brazzein**. FEBS Lett 2003, 544(1–3): 33-7.

KANEKO R., KITABATAKE N.: **Heat-induced formation of intermolecular disulfide linkages between thaumatin molecules that do not contain cysteine residues**. J Agric Food Chem 1999, 47(12):4950-5.

KANT, R.; RAJASEKARAN, M.B.; SURYANARAYANARAO, R. **Sweet and Taste Modifying Proteins – Comparative Modeling and Docking Studies of Curculin, Mabinlin, Miraculin with the T1R2–T1R3 Receptor**. Internet Electron. Journal of Molecular Designer. v.4, n.2, p.106–123. 2005.

KANT, R.; **Sweet proteins--potential replacement for artificial low calorie sweeteners**. Nutr J. 2005 Feb 9;4:5.

KENNEDY, A. R. **Chemopreventive agents: protease inhibitors**. Pharmacology & Therapeutics. v. 78, n. 3. p. 167 – 209. 1998.

KERKHOVEN, E. J., LAHTVEE, P., and NIELSEN, J. (2014). **Applications of computational modeling in metabolic engineering of yeast**. FEMS Yeast Res. 15, 1–13.

KIM SH., KANG CH., KIM R., CHO JM., LEE YB., LEE TK. (1989) **Redesigning a sweet protein: increased stability and renaturability**. Prot Eng 2: 571-575.

KOIZUMI, A.; TSUCHIYAA, A.; NAKAJIMAA, K.I.; ITOA, K.; TERADAB, T.; SHIMIZU-IBUKAA, A.; BRIANDC, L.; ASAKURAA, T.; MISAKAA, T.; ABEA, K. **Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin**. PNAS. vol. 108, no. 40, p. 16819–16824. October 4, 2011.

KOIZUMI, T., TERADA, T., NAKAJIMA, KI et al. **Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor**. Sci Rep 5, 12947 (2015).



KONDO K., MIURA Y., SONE H., KOBAYASHI K., IJIMA H. (1997) **Highlevel expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis***. *Nat Biotechnol* 15: 453-457.

KURIHARA Y. **Characteristics of antisweet substances, sweet proteins, and sweetness-inducing proteins**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v. 32, p. 231 – 252.1992.

KURIHARA, K.; BEIDLER, L.M. **Taste-modifying protein from miracle fruit**. *Science*. V.161, p.1241–1243. 1969.

KURIHARAA, Y.; NIRASAWA, S. **Structures and Activities of Sweetness-inducing Substances (Miraculin, Curculin, Strogin) and the Heat-stable Sweet Protein, Mabinlin**. *Foods and Food Ingredients Jornal of Japan*, v. 174, 1997.

LI, X.; STASZEWSKI, L.; XU, H.; DURICK, K.; ZOLLER, M.; ADLER, E. **Human receptors for sweet and umani taste**. *PNAS*. v.99. n.7. p.4692-4696. 2002.

MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M. L., MCNEIL, B., and HARVEY, L. M. (2005). **Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system**. *Yeast* 22, 249–270.

MALTA, J. P. C. **Utilização de Estévia como Edulcorante na Substituição da Sacarose**. 2017. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro Universitário IBMR - Laureate, Rio de Janeiro, 2017.

MASUDA T., TAMAKI S. KANEKO R., WADA R., FUJITA Y., MEHTA A., KITABAKE N. **Cloning, expression and characterization of recombinant sweet-protein thaumatin II using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris***. *Biotechnology and Bioengineering* 2004; 30:761-9.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JUNIOR, J. **CITROS: principais informações e recomendações de cultivo**. Instituto Agrônômico de Campinas. 2005.

MEYERS, B., & BREWER, M. S. (2008). **Sweet taste in men: a review**. *Journal of Food Science*, 73(6), R81-R90.

MING, D. and G. HELLEKANT (1994). "**Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B.**" *Febs Letters* 355(1): 106-108.

MISAKA, T. **Molecular mechanisms of the action of miraculina, a tastemodifying proteins**. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. v.24. p.222-225. 2013.

NEIERS, F., NAUMER, C., KROHN, M., & BRIAND, L. (2016). **The recent development of a sweet-tasting brazzein and its potential industrial applications**. *Sweeteners*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 20.

NIRASAWA S., LIU X., NISHINO T., KURIHARA Y.: **Disulfide bridge structure of the heat-stable sweet protein mabinlin II**. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1202(2):277-80.

NIRASAWA S., NISHINO T., KATAHIRA M., UESUGI S., HU Z., KURIHARA Y. (1994) **Structures of heat-stable and unstable homologues of the sweet protein mabinlin**. *Eur J Biochem* 223: 989-995.

OGATA C., HATADA M., TOMLINSON G., SHIN WC., KIM SH.: **Crystal structure of the intensely sweet protein monellin**. *Nature* 1987, 328(6132):739-42.

OLIVA, M. L. V.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F. C.; ARAUJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M. **Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema**. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1477, n.1. p. 64 – 74. 2000.

OTA M., SAWA A., NIO N., ARIYOSHI Y.: **Enzymatic ligation for synthesis of single-chain analogue of monellin by transglutaminase**. *Biopolymers* 1999, 50(2):193-200.

PEÑARRUBIA L., KIM R., GIOVANNONI J., KIM SH., FISHER R. (1992) **Production of the sweet protein monellin in transgenic plants.** *Biotechnol* 10: 561- 564.

PRIYA, K., GUPTA, V. R. M., & SRIKANTH, K. (2011). **Natural sweeteners: a complete review.** *Journal of Pharmacy Research*, 4(7), 2034-2039.

RABEN, A., VASILARAS, T. H., MØLLER, A. C., & ASTRUP, A. (2002). **Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 721-729.

RIBEIRO, G., & SANTOS, O. (2013). **Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade.** *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes & Metabolismo*, 8(2), 82-88.

ROSANO, G. L., & E. A. CECCARELLI. 2014. **Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges.** *Front Microbiol.* 5:172

RYAN, C. **Proteinase inhibitors in plant leaves: a biochemical model for pest induced natural plant protection.** *Trends in Biochemical Sciences.* v. 3, n. 3. p. 148 – 150. 1978.

SOEJARTO, D. D., KINGHORN, A. D., FARNS-WORTH, N. R. **Potential sweetening agents of plant origin.** III. Organoleptic evaluation of stevia leaf herbarium samples for sweetness. *J. Nat. Prod.*, v. 45, p. 590-9, 1982.

STOGER, E. (2012). **Plant bioreactors – the taste of sweet success.** *Biotechnology Journal*, 7(4), 475-476.

STRAPASSON, G. C., LOPEZ, A. C. M., BASSO, T., SANTOS, D. F., MULINARI, R. A., WILLE, G. M. F. C., & BARREIRA, S. W. (2011). **Percepção de sabor: uma revisão.** *Visão Acadêmica*, 12(1), 65-73.

SUN, H.J et al. **Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce.** FEBS Letters, v. 580, p.620–626, january, 2006.

SUZUKI M., KURIMOTO E., NIRASAWA S., MASUDA Y., HORI K., KURIHARA Y., SHIMBA N., KAWAI M., SUZUKI E., KATO K. **Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities.** FEBS Lett. 2004 Aug 27;573(1-3):135-8.

TAKAI, A.; SATOH, M.; MATSUYAMA, T.; ITO, A.; NAKATA, R.; AOYAMA, T.; INOUE, H. **Secretion of miraculin through the function of a signal peptide conserved in the Kunitz-type soybean trypsin inhibitor Family.** FEBS Letters. V.587, p. 1767–1772. 2013.

TANCREDI, T.; PASTORE, A.; SALVADORI, S.; ESPOSITO, V.; TEMUSSI, P. A. **Interaction of sweet proteins with their receptor. A conformational study of peptides corresponding to loops of brazzein, monellin and thaumatin.** European Journal. Biochemistry. v. 271. p. 2231–2240. 2004.

THEERASILP, S.; KURIHARA, Y. **Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculina, from miracle fruit.** The Journal of Biological Chemistry. V.263, n.23. p.11536-11539. 1988.

VAHAB JAFARIAN, KHADIJEH BAGHERI, JABRAEIL ZAREI, SHIMA KARAMI & PARISA GHANAVATIAN. **Improved expression of recombinant sweet-tasting brazzein using codon optimization and host change as new strategies.** Food Biotechnology. 34:1, 62-76. 2020.

VAN DER WEL H., LARSON G., HLADIK A., HLADIK CM., HELLEKANT G., GLASER D.: **Isolation and characterisation of pentadin, the sweet principle of Pentadiplandra brazzeana Baillon.** Chem Senses 1989, 14:75-79.

VAND DER WEL, H., G. LARSON, et al. (1989). **"Isolation and characterization of pentadin, the sweet principle of Pentadiplandra brazzeana Baillon."** Chemical senses 14(1): 75-79.

WITTY M., HIGGINBOTHAM JD. (1994) **Thaumatococcus**. CRC, Boca Raton.

XIONG L., SUN S. (1996) **Molecular cloning and transgenic expression of the sweet protein mabinlin in potato tubers**. *Plant Physiol* 111:57.

YAMASHITA H., AKABANE T., KURIHARA Y.: **Activity and stability of a new sweet protein with taste-modifying action, curculin**. *Chem Senses* 1995, 20(2):239-43.

YAMASHITA H., THEERASILP S., AIUCHI T., NAKAYA K., NAKAMURA Y., KURIHARA Y.: **Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein taste-modifying activity, curculin**. *J Biol Chem* 1990, 265(26):15770-5.