

# Proteini sladkega okusa kot alternativna sladila

## Sweet-tasting proteins as alternative sweeteners

Aleš Berlec, Borut Štrukelj

**Povzetek:** Sladek okus zbuja pri ljudeh prijetne občutke, zato se sladkim jedem v prehrani nismo pripravljene odreči. Namizni sladkor (saharoz) je najpogosteje uporabljeno sladilo, ki pa ga pogosto povezujemo z določenimi zdravstvenimi tveganji, zlasti debelostjo, diabetesom in kariesom. K zmanjšanju uporabe namiznega sladkorja bi lahko pripomogla večja uporaba alternativnih sladil. Nekatera od njih predstavljamo v članku. Poseben razred alternativnih sladil tvorijo proteini sladkega okusa. Zaenkrat jih poznamo sedem (taumat, monelin, brazein, pentadin, mabinlin, kurkulin, mirakulin) in so od nekaj sto do več tisočkrat bolj sladki od saharoze. Njihova prednost sta tudi varnost in naraven izvor.

**Ključne besede:** sladkor, saharoz, alternativna sladila, proteini sladkega okusa, taumat, monelin, brazein

**Abstract:** Sweet taste elicits pleasant feelings in humans and for this reason sweet-tasting food still represents an important part of our diet. Table sugar (sucrose) is the most widely used sweetener. It is often related to certain health risks, such as obesity, diabetes and caries. Greater use of alternative sweeteners could contribute to reduced use of table sugar. Most common alternative sweeteners are presented in the article. Sweet-tasting proteins represent a distinct class of alternative sweeteners. Currently, there are seven sweet-tasting proteins known (thaumat, monellin, brazzein, pentadin, mabinlin, curculin, miraculin), which are several hundred to several thousand times sweeter than sucrose. Their advantages are safety and natural origin.

**Keywords:** sugar, sucrose, alternative sweeteners, sweet-tasting proteins, thaumat, monellin, brazzein

## 1 Uvod

V vsakdanjem življenju pogosto enačimo besedo »sladko« z nečim negativnim, celo pregrešnim. Sladkor povezujemo s prekomernim vnosom kalorij, znan je njegov vpliv na karies. Pri diabetesu se njegov vnos nadzoruje in omejuje. Uporabo sladkorja bi lahko omejili na račun večje rabe alternativnih sladil. Vendar pa se tudi alternativna sladila pogosto povezuje z zdravstvenim tveganjem, zlasti za razvoj rakavih obolenj. Namen tega članka je razširiti vpogled v alternativna sladila, še posebej v nekoliko manj znana, kot so proteini sladkega okusa.

V življenju se vsakodnevno srečujemo z izrazi sladkor, sladkorji, ogljikovi hidrati, umetna sladila, alternativna sladila. Ker so izrazi nekoliko dvoumni in se pogosto uporabljajo nepravilno, jih bomo uvodoma nekoliko natančneje definirali.

Beseda sladkorji se v najširšem pomenu pogosto uporablja na nepravilen način za opis ogljikovih hidratov. V ožjem pomenu se beseda sladkorji uporablja za enostavne ogljikove hidrate, ki so sladkega okusa, t. j. monosaharide (glukoza, fruktoza, galaktoza) in disaharide (saharoz, maltoza, laktoza, trehaloza). Beseda sladkor je v vsakodnevem življenju sinonim za namizni, jedilni sladkor ali saharoz. Poleg sladkorjev se za slajenje zlasti v industrijskem merilu pogosto uporabljajo tudi umetna ali alternativna sladila. Izraz alternativna je mogoče ustrežnejši, saj vsa niso sinteznega ali polysinteznega izvora.

## 1.1 Snovi sladkega okusa

Ljudje smo sposobni ločevanja med petimi različnimi okusi: sladkim, grenkim, kislim, slan in okusom glutamata (umami, iz jap. *umai*, kar pomeni slasten) (1, 2). Snovi sladkega okusa zbujejo pri človeku prijetne občutke, za razliko od grenkih snovi, ki človeka odvrtaajo od zaužitja. To dejstvo je evolucijskega pomena, saj omogoča ločevanje visokokaloričnih virov hrane (sladek okus) od potencialno toksičnih snovi, npr. alkaloidov, ki so običajno grenki. Ljudje lahko ločimo tudi različne kvalitete sladkega okusa, kar pomeni, da lahko sladek okus še dodatno opišemo. Nabor snovi sladkega okusa je zelo širok. Snovi sladkega okusa so lahko anorganskega, naravnega ali sinteznega izvora in se po kemijski sestavi močno razlikujejo. Nekateri (reprezentativni) snovi sladkega okusa so prikazane v preglednici 1, ki je prirjena po (3, 4).

## 1.2 Alternativna sladila

Alternativna sladila lahko pomagajo pri uravnavanju telesne teže, nadzoru krvne ravni glukoze in preprečevanju kariesa. Razdelimo jih lahko na poliole in alternativna sladila brez hranilne vrednosti. Sladkorni poliole so derivati sladkorjev in izkazujejo tudi podobno sladkost. Ker se iz črevesja ne absorbirajo v popolnosti, so slabše dostopni kot vir energije. Za razliko od poliolov, alternativna sladila brez hranilne vrednosti praktično ne prispevajo k vnosu energije, saj

Preglednica 1: Nekateri snovi sladkega okusa.

Table 1: Some sweet-tasting compounds.

ANORGANSKE NOVI	BeCl <sub>2</sub> , BeSO <sub>4</sub> , Pb(OAc) <sub>2</sub>				
NARAVNE ORGANSKE SPOJINE	<b>Ogljikovi hidrati (mono- in disaharidi)</b>	<b>Polioli</b>	<b>D-aminokislina</b>	<b>Proteini sladkega okusa</b>	<b>Produkti sekundarnega metabolizma rastlin</b>
	saharoza glukoza fruktoza maltoza laktoza	sorbitol manitol ksilitol eritritol	glicin alanin (D- in L-) fenilalanin triptofan	brazein taumatin monelin mabinlin mirakulin pentadin kurkulin	steviozid rebaudiozid glicirizin mogrozid V abruzozidi A-D filodulcin neohesperidin dihidrohalcon heranandulcin seliguaein
SINTEZNE ORGANSKE SPOJINE	<b>Oksimi</b>	<b>3-nitroanilini</b>		<b>Derivati sladkorjev</b>	
	α-anisaldoksim	6-kloro-3-nitroanilin		sukraloza	
	<b>Sulfamati</b>	<b>Aspartil dipeptidi</b>		<b>Derivati gvanidinoocetne kisline</b>	
	saharin ciklamat acesulfam	aspartam alitam neotam		sukrononska kislina gvanidinoocetna kislina-1 gvanidinoocetna kislina-2	

izkazujejo zelo intenziven sladek okus in jih je zato potrebno dodajati v minimalnih količinah (5).

Pri alternativnih sladilih so pomembne predvsem naslednje lastnosti:

- senzorična kakovost (»čist« sladek okus, brez grenkobe, brez vonja)
- varnost
- kompatibilnost z ostalimi sestavinami hrane
- stabilnost v različnih pogojih uporabe in priprave hrane (npr. termostabilnost)

Od uveljavitve alternativnih sladil so se v medijih pojavljala poročila o potencialnem kancerogenem delovanju, kar je zmanjševalo zaupanje javnosti. Sedaj prevladuje mnenje, da je tveganje za razvoj raka zanemarljivo (6). Alternativna sladila, ki jih odobrijo pristojne regulatorne agencije, so varna. Zanje je opredeljen dovoljen dnevni vnos, varnost pa je potrjena tudi pri večjem vnosu. Vendar pa med regulatornimi agencijami prihaja do nekaterih neskladij, saj so nekatera alternativna sladila v določenih državah dovoljena, v drugih pa prepovedana, kar ne prispeva k večjemu zaupanju javnosti. Ameriška FDA tako dovoljuje uporabo naslednjih sladil brez hranilne vrednosti: acesulfam kalij, aspartam, neotam, saharin in sukraloza (5). V Evropski Uniji pa se lahko uporabljajo: acesulfam kalij (E950), aspartam (E951), sol aspartama-acesulfama (E962), ciklamat (E952), neohesperidin dihidrohalcon (E959), saharin (E954), sukraloza (E955) in taumatin (E957) (7). V nadaljevanju so naštet nekatera alternativna sladila, zraven pa opisani nekateri potencialni vplivi na zdravje (5, 8):

- Polioli (sorbitol (E420), manitol (E421), ksilitol (E967), eritritol (E968)): Iz črevesja se absorbirajo počasi in le delno. Imajo

laksativen učinek in pri prekomernem vnosu (50 g/dan sorbitola, 20 g/dan manitola) lahko povzročijo diarejo. Njihova intenziteta sladkega okusa ustreza od 50 do 90 % intenzitete saharoze, kalorična vrednost pa je približno enaka saharozi.

- Acesulfam kalij (E950): Je 200-krat bolj sladek od saharoze. 95 % zaužitega acesulfam kalija se izloči nespremenjenega z urinom.
- Aspartam (E951): Je 160 do 220-krat bolj sladek od saharoze. V črevesju ga esterase razgradijo do asparaginske kisline, metanola in fenilalanina, ki so tudi pogoste sestavine normalne prehrane. Pri segrevanju se razgradi, zato za določene namene uporabe ni primeren. Vnos aspartama je lahko problematičen pri bolnikih s fenilketonurijo.
- Alitam: Je 2000-krat bolj sladek od saharoze in je brez grenkega ali kovinskega okusa. 77 % do 96 % se ga hidrolizira do asparaginske kisline in alanin amida, preostanek pa se izloči v nespremenjeni obliki. Uporaba je dovoljena v Avstraliji in Novi Zelandiji.
- Ciklamat (E952): Je 30-krat bolj sladek od saharoze. Leta 1969 je FDA prepovedala njegovo uporabo, ker naj bi povzročal raka na laboratorijskih podganah (9). Kasnejše študije so ovrgle njegovo karcinogenost (10). Danes je v uporabi v več kot 50 državah, v ZDA pa je še vedno prepovedan.
- Neohesperidin dihidrohalcon (E959): Je 1500-krat bolj sladek od saharoze. Hrani in pijači daje likorizen okus (po sladkem korenu). V ZDA je splošno priznan kot varen (status GRAS), vendar le kot sestavina okusa in ne kot sladilo.

- Neotam: Je 7000 do 13000-krat bolj sladek od saharoze in ima čist sladek okus brez kovinskega ali grenkega priokusa. Je tudi derivat dipeptida fenilalanina in asparaginske kisline, podobno kot aspartam in alitam. V črevesju se delno absorbira, nato pa hitro metabolizira in izloča z urinom in fecesom. Uporaba je dovoljena v številnih državah po svetu, v EU pa zaenkrat še ne.
- Saharin (E954): Je 200 do 700-krat bolj sladek od saharoze. V ljudeh se ne metabolizira. Kljub nekoliko zmanjšani uporabi je še vedno najpogosteje uporabljeno alternativno sladilo brez hranilne vrednosti in je v uporabi v več kot 100 državah, vključno z EU in ZDA. Leta 1977 je FDA predlagala prepoved njegove uporabe, ker naj bi povzročal raka pri laboratorijskih živalih (11), kar pa je bilo kasneje ovrženo (12).
- Sukraloza (E955): Je 600-krat bolj sladka od saharoze in je disaharidne strukture. Absorbira se je le od 11 % do 27 % in ta se izloči z urinom v nespremenjeni obliki. Je termostabilna in obstojna pri kuhanju in pečenju.
- Steviozid: Je 200 do 300-krat bolj sladek od saharoze. Pridobiva se iz južnoameriške rastline *Stevia rebaudiana*. Njegova uporaba je prepovedana v EU, v ZDA pa se lahko uporablja kot prehranski dodatek. Ugotovljeno je, da metabolit steviozida povzroča maligne spremembe pri živalih, ni pa znano, ali lahko do tega pride tudi pri ljudeh (13).
- Taumatina (E957) in proteini sladkega okusa: Alternativna sladila velike intenzitete in makromolekularne strukture, ki bodo podrobneje predstavljena v nadaljevanju.

## 2 Proteini sladkega okusa

Proteine sladkega okusa so odkrili v plodovih nekaterih rastlin, ki rastejo v tropskem pasu (Afrika, Kitajska, Malezija). Domačini plodove teh

rastlin uporabljajo za slajenje hrane že stoletja. Danes poznamo šest sladkih in en okus spreminjajoči protein. Proteini sladkega okusa so taumatina, monelin, mabinlin, pentadin, brazein in kurkulina. Mirakulina je okus spreminjajoči protein. Povzroča, da snovi, ki običajno izzovejo kisel okus (citronska, očetna, askorbinska kislina), okusimo kot sladke (14).

Proteini sladkega okusa so ob primerjavi iste mase od nekaj sto do nekaj tisočkrat bolj sladki od saharoze. Aminokislinska zaporedja šestih proteinov sladkega okusa ne kažejo nobenih značilnih medsebojnih podobnosti. Enako velja tudi za tridimenzionalne strukture proteinov sladkega okusa, ki jih poznamo (taumatina, monelin, brazein), kar otežuje identifikacijo determinante za sladek okus. So pa nekateri proteini sladkega okusa po aminokislinskem zaporedju podobni proteinom iz drugih skupin, ki niso sladki (npr. obrambnim proteinom), kar kaže na to, da so ti proteini pridobili novo, evolucijsko zaželeno lastnost. Sladek okus plodov namreč privablja živali, ki nato razširjajo njihova semena (14).

Večina proteinov sladkega okusa je termično dokaj obstojna in kemijsko stabilna, kar je posledica disulfidnih vezi, ki omejujejo konformacijske spremembe in porušitev terciarne strukture, ki je nujna za sladek okus. Nekateri proteini sladkega okusa so sestavljeni iz več podenot, kar pa njihovo stabilnost zmanjšuje. Nekatere lastnosti proteinov sladkega okusa so prikazane v preglednici 2 (14–16).

Danes se komercialno uporablja samo taumatina, ki se pridobiva z izolacijo iz rastline *Thaumatococcus daniellii* Benth. Pridobivanje proteinov sladkega okusa z izolacijo iz naravnih virov je lahko zelo kompleksno, saj je potrebno upoštevati, da rastline, v katerih se proteini sladkega okusa nahajajo, ne rodijo plodov izven svojega naravnega okolja. Edino možnost za masovno proizvodnjo proteinov sladkega okusa v količinah, ki bi lahko zadovoljile tržišče, predstavlja rekombinantna DNA tehnologija, ki je v nekaterih primerih že razvita.

Preglednica 2: Primerjava lastnosti proteinov sladkega okusa.

Table 2: Comparison of sweet-tasting proteins characteristics.

Protein sladkega okusa	Taumatina	Monelin	Mabinlin	Pentadin	Brazein	Kurkulina	Mirakulina
Vir	<i>Thaumatococcus daniellii</i> Benth	<i>Dioscorea ophyllum cumminsii</i> Diels	<i>Capparis masakai</i> Levl	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon	<i>Curculigo latifolia</i>	<i>Rachidella dulcifica</i>
Število aminokislin	207	45 (ver. A) 50 (ver. B)	33 (ver. A) 72 (ver. B)	?	54	114	191
Molekulska masa	22200	10700	12400	12000	6500	24900	98400
Geografska porazdelitev	Zahodna Afrika	Zahodna Afrika	Kitajska	Zahodna Afrika	Zahodna Afrika	Malezija	Zahodna Afrika
Faktor sladkosti (m/m)	3000	3000	100	500	2000	550	-
Aktivna oblika	Monomer	Dimer (A+B)	Dimer (A+B)	?	Monomer	Dimer (A+A)	Tetramer (A+A+A+A)

## 2.1 Taumatin

Taumatin je najbolj poznan protein sladkega okusa. Izoliran je bil leta 1972 iz zahodnoafriške rastline *Thaumatococcus daniellii* Benth (17). Njegova varnost je bila dokazana na živalih in na ljudeh (18). Taumatin predstavlja družino zelo podobnih proteinov, med katerimi prevladujeta taumatin I (molekulska masa 22209) in taumatin II (molekulska masa 22293). Terciarna struktura taumatina je bila določena. Sestavljata jo dve domeni z maloštevilnimi  $\alpha$ -vijačnicami in številnimi  $\beta$ -verigami in  $\beta$ -pasovi (19). Elemente med seboj povezuje 8 disulfidnih vezi. Taumatin nad 70°C agregira (20), kar pa je odvisno od pH (21). Stabilnejši je v kislem okolju. Taumatin je visoko homologen (65%) s proteini družine PR-5, pri čemer je ohranjena postavitev vseh cisteinov. Ti »taumatinu-podobni« proteini so vključeni v obrambnih mehanizmih rastlinskih tkiv pred glivnimi infekcijami. Taumatin je 100000-krat bolj sladek od saharoze na molarni ravni in 3000-krat na masni ravni. Sladek okus nastopi z zakasnitvijo in pušča rahel likorizen pookus.

Taumatin so z različno uspešnostjo izrazili tudi v drugih organizmih: bakterijah (*Escherichia coli* (22), *Bacillus subtilis* (23), *Streptomyces lividans* (24)), glivah (*Saccharomyces cerevisiae* (25), *Kluyveromyces lactis* (26), *Penicillium roquefortii* (27), *Aspergillus niger* (28), *Pichia pastoris* (29)) in rastlinah (krompir (*Solanum tuberosum*) (30), paradižnik (*Lycopersicon esculentum*) (31)).

## 2.2 Monelin

Monelin so odkrili v zahodnoafriški rastlini *Dioscoreophyllum cumminsii* Diels. Monelin je 100000-krat bolj sladek od saharoze na molarni ravni in 3000-krat na masni ravni. Protein sestavljata dve nekovalentno povezani polipeptidni verigi: veriga A (45 aminokislin) in veriga B (50 aminokislin). Tridimenzionalno strukturo monelina tvori 5 antiparalelnih  $\beta$ -površin (tri na verigi A, dve na verigi B) in  $\alpha$ -vijačnica (na verigi B). V molekuli ni nobene disulfidne vezi (33). Monelin izgubi sladek okus pri inkubaciji na 50°C v kislem pH-ju. Da bi zvečali stabilnost, so pripravili enoverižni analog z združitvijo N-terminalnega konca verige A in C-terminalnega konca verige B, ki sta v strukturi blizu skupaj. Enoverižni monelin je ohranil sladek okus, pridobil pa je večjo pH- in termostabilnost (34).

Monelin so izrazili v bakterijah (*Escherichia coli* (34, 35)), glivah (*Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* (36)) in rastlinah (paradižnik (*Lycopersicon esculentum*), zelena solata (*Lactuca sativa*) (37)).

## 2.3 Brazein in pentadin

Leta 1994 so v zahodnoafriški rastlini *Penatadiplandra brazzeana* Baillon odkrili nov protein sladkega okusa in ga po rastlini poimenovali brazein (38). Iz iste rastline so izolirali še en protein sladkega okusa, pentadin (39), za katerega pa domnevajo, da je premrežena, nenaravna oblika brazeina.

Brazein je monomer, molekulo pa sestavlja 54 aminokislinskih preostankov. Molekulska masa brazeina znaša 6473 in je najmanjši do sedaj odkriti protein sladkega okusa. V molekuli je osem cisteinov, ki so med seboj povezani s štirimi disulfidnimi vezmi. Te so odgovorne za visoko termo- in pH-stabilnost molekule (pri inkubaciji na 80 °C za 4 ure ali na 98 °C za 2 uri se ohrani sladek okus) (40). Z določitvijo

tridimenzionalne strukture so ugotovili, da brazein sestavlja ena  $\alpha$ -vijačnica in tri antiparalelne  $\beta$ -površine (41). Brazein je homologen nekaterim obrambnim proteinom (strupi škorpionov, defenzini žuželk, rastlinski  $\gamma$ -tionini).

Brazein je 2000-krat bolj sladek od saharoze na masni ravni. Njegov profil sladkosti je v primerjavi z drugimi proteini sladkega okusa bolj podoben saharoznemu. Glavnina brazeina (80 %), izoliranega iz naravnega vira vsebuje piroglutaminsko kislino (pGlu) na N-terminalnem delu. Preostanek brazeina (20 %) ne vsebuje piroglutaminske kisline (des-pGlu brazein). Ugotovljeno je, da je des-pGlu brazein dvakrat bolj sladek od starševskega proteina. Njegova topnost v vodi znaša 50 mg/ml (več kot 7,7 mol/l) in je med proteini sladkega okusa najboljše topen v vodi.

Na podlagi mutageneze so ugotovili, kateri aminokislinski preostanki odločilno prispevajo k sladkemu okusu. Pri tem so pripravili tudi bolj sladke analoge brazeina (42, 43).

Brazein so uspešno izrazili v bakteriji *E. coli* (44), mlečnokislinski bakteriji *Lactococcus lactis* (45) in koruzi (*Zea mays*) (46).

## 2.4 Mabinlin

V Kitajski rastlini *Capparis masikai* Levl so leta 1993 odkrili protein sladkega okusa mabinlin (47). V rastlini se nahajajo vsaj štiri proteini iz družine mabinlinov: mabinlin I-1, mabinlin II, mabinlin III in mabinlin IV. Najbolj proučevan je mabinlin II, ki je sestavljen iz dveh polipeptidnih verig (33 in 72 aminokislin), medsebojno povezanih s štirimi disulfidnimi vezmi. Termostabilnost mabinlinov se med seboj precej razlikuje, za kar naj bi bil odgovoren samo en aminokislinski preostanek. Mabinlini so stabilni 1 uro pri 80 °C z izjemo mabinlina 1-I, ki pri teh pogojih izgubi sladek okus (48). Mabinlin II pa naj bi ohranil sladek okus celo po inkubaciji na 100 °C za 48 ur. Mabinlin II je visoko homologen skladiščnim proteinom 2S.

Mabinlin je na začetku grenek in adstringenten, sladek okus nastopi z zakasnitvijo. Je 400-krat bolj sladek od saharoze (49).

O rekombinantnem izražanju mabinlina ni poročil.

## 2.5 Kurkulin

Kurkulin so izolirali iz rastline *Curculigo latifolia*, ki raste v nekaterih predelih Malezije. Med proteini sladkega okusa je svojevrsten posebnost. Poleg sladkega okusa (je 550-krat bolj sladek od saharoze na masni ravni) namreč izkazuje tudi lastnost modificiranja okusa in zato mu lahko rečemo tudi okus spreminjajoči protein. To pomeni, da kisle snovi po ali ob zaužitju kurkulina zaznamo kot sladke (50).

Kurkulin ima molekulska masa 12491 in je sestavljen iz 114 aminokislin. Kurkulin je dimer, sestavljen iz dveh identičnih podenot, ki sta povezani z dvema disulfidnima vezema. Kurkulin je homologen (65 %) lektinu GNA iz zvončka (*Galanthus nivalis*), na podlagi katerega so naredili model tridimenzionalne strukture (51). Kurkulin je stabilen 1 uro na 50 °C v območju pH od 3 do 11.

Rekombinantno izražanje kurkulina v funkcionalni obliki ni bilo uspešno. Nedavno so odkrili izoobliko kurkulina, ki so jo poimenovali neokulin in je visoko homologna podenoti kurkulina. Ugotovili so, da v *Escherichia coli* nastane funkcionalen protein sladkega okusa samo v

obliki heterodimera med podenoto kurkulina in neokulinom (52, 53). Verjetno je, da se protein v tej obliki nahaja tudi v rastlini.

### 2.6 Mirakulin

Mirakulin je edini predstavnik skupine okus spreminjajočih proteinov. Sam po sebi ni sladek, povzroči pa, da po zaužitju okušamo kisle snovi kot sladke. Odkrili so ga v zahodnoafriški rastlini *Richadella dulcifera*. Mirakulin je glikoprotein iz 191 aminokislin z molekulska maso 24600 (13,9 % predstavljajo ogljikovi hidrati). Sestavljen je iz štirih podenot, ki so med sabo povezane z disulfidnimi vezmi (54, 55).

Mirakulin so pred kratkim izrazili v funkcionalni obliki v rekombinantni zeleni solati (*Lactuca sativa*) (56).

## 3 Sklep

Sladke jedi ostajajo pomembna sestavina človeške prehrane. Namizni sladkor, ki ga najpogosteje uporabljamo za slajenje, povezujejo z določenimi zdravstvenimi tveganji, najbolj nedvoumno s kariesom. Na pomenu pridobivajo alternativna sladila, ki pa so pogosto umetno pridobljena in jim javno mnenje zato ni naklonjeno. Zanimiv razred alternativnih sladil predstavljajo proteini sladkega okusa, ki so varni in naravnega izvora in bi z rekombinantno proizvodnjo v prihodnosti lahko igrali pomembnejšo vlogo.

## 4 Literatura

1. Lindemann B. Taste reception. *Physiol Rev* 1996; 76: 718-766.
2. Lindemann B. Receptors and transduction in taste. *Nature* 2001; 413: 219-225.
3. Ellis JW. Overview of Sweeteners. *Journal of Chemical Education* 1995; 72: 671-675.
4. Kinghorn AD, Kennelly EJ. Discovery of Highly Sweet Compounds from Natural Sources. *Journal of Chemical Education* 1995; 72: 676-680.
5. Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *J Am Diet Assoc* 2004; 104: 255-275.
6. Weihrauch MR, Diehl V. Artificial sweeteners--do they bear a carcinogenic risk? *Ann Oncol* 2004; 15: 1460-1465.
7. Directive 2003/115/EC of the european parliament and of the council of 22 December 2003 amending Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 2004; L 24: 65-71.
8. Ahmed Z, Banu H, Akhter F et al. Concept on Sugar- A Review. *OnLine Journal of Biological Sciences* 2001; 1: 883-894.
9. Price JM, Biava CG, Oser BL et al. Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin. *Science* 1970; 167: 1131-1132.
10. Bopp BA, Sonders RC, Kesterson JW. Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine. *Crit Rev Toxicol* 1986; 16: 213-306.
11. Hicks RM, Chowanec J. The importance of synergy between weak carcinogens in the induction of bladder cancer in experimental animals and humans. *Cancer Res* 1977; 37: 2943-2949.
12. Saccharin. Review of safety issues. Council on Scientific Affairs. *Jama* 1985; 254: 2622-2624.
13. Pezzuto JM, Compadre CM, Swanson SM et al. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 2478-2482.
14. Faus I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 53: 145-151.
15. Gibbs BF, Alli I, Mulligan C. Sweet and taste-modifying proteins: A review. *Nutrition Research* 1996; 16: 1619-1630.
16. Kant R. Sweet proteins--potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutr J* 2005; 4: 5.
17. van der Wel H, Loeve K. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur J Biochem* 1972; 31: 221-225.
18. Higginbotham JD, Snodin DJ, Eaton KK et al. Safety evaluation of thaumatin (Talin protein). *Food Chem Toxicol* 1983; 21: 815-823.
19. Ogata CM, Gordon PF, de Vos AM et al. Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution. *J Mol Biol* 1992; 228: 893-908.
20. 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: 4950-4955.
21. Kaneko R, Kitabatake N. Sweetness of sweet protein thaumatin is more thermoresistant under acid conditions than under neutral or alkaline conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 409-413.
22. Edens L, Heslinga L, Klok R et al. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* 1982; 18: 1-12.
23. Illingworth C, Larson G, Hellekant G. Secretion of the Sweet-Tasting Plant Protein Thaumatin by *Bacillus-Subtilis*. *Biotechnology Letters* 1988; 10: 587-592.
24. Illingworth C, Larson G, Hellekant G. Secretion of the Sweet-Tasting Plant Protein Thaumatin by *Streptomyces-Lividans*. *Journal of Industrial Microbiology* 1989; 4: 37-42.
25. Lee JH, Weickmann JL, Koduri RK et al. Expression of synthetic thaumatin genes in yeast. *Biochemistry* 1988; 27: 5101-5107.
26. Edens L, Vanderwel H. Microbial Synthesis of the Sweet-Tasting Plant Protein Thaumatin. *Trends in Biotechnology* 1985; 3: 61-64.
27. Faus I, Patino C, del Rio JL et al. Expression of a synthetic gene encoding the sweet-tasting protein thaumatin in the filamentous fungus *Penicillium roquefortii*. *Biotechnology Letters* 1997; 19: 1185-1191.
28. Faus I, del Moral C, Adroer N et al. Secretion of the sweet-tasting protein thaumatin by recombinant strains of *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998; 49: 393-398.
29. Masuda T, Tamaki S, Kaneko R et al. Cloning, expression and characterization of recombinant sweet-protein thaumatin II using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 2004; 85: 761-769.
30. Witty M, Harvey WJ. Sensory Evaluation of Transgenic *Solanum-Tuberosum* Producing R-Thaumatin-Ii. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 1990; 18: 77-80.
31. Bartoszewski G, Niedziela A, Szwacka M et al. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from



- Thaumatococcus daniellii Benth. Plant Breeding 2003; 122: 347-351.
32. Morris JA, Cagan RH. Purification of monellin, the sweet principle of Dioscoreophyllum cumminsii. Biochim Biophys Acta 1972; 261: 114-122.
33. Ogata C, Hatada M, Tomlinson G et al. Crystal structure of the intensely sweet protein monellin. Nature 1987; 328: 739-742.
34. Kim SH, Kang CH, Kim R et al. Redesigning a sweet protein: increased stability and renaturability. Protein Eng 1989; 2: 571-575.
35. Chen Z, Cai H, Lu F et al. High-level Expression of a Synthetic Gene Encoding a Sweet Protein, Monellin, in Escherichia coli. Biotechnol Lett 2005; 27: 1745-1749.
36. Kondo K, Miura Y, Sone H et al. High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast Candida utilis. Nat Biotechnol 1997; 15: 453-457.
37. Penarrubia I, Kim R, Giovanoni J et al. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. Biotechnol 1992; 10: 561-564.
38. Ming D, Hellekant G. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from Pentadiplandra brazzeana B. FEBS Lett 1994; 355: 106-108.
39. Vanderwel H, Larson G, Hladik A et al. Isolation and Characterization of Pentadin, the Sweet Principle of Pentadiplandra-Brazzeana Baillon. Chemical Senses 1989; 14: 75-79.
40. Izawa H, Ota M, Kohmura M et al. Synthesis and characterization of the sweet protein brazzein. Biopolymers 1996; 39: 95-101.
41. Caldwell JE, Abildgaard F, Dzakula Z et al. Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. Nat Struct Biol 1998; 5: 427-431.
42. Assadi-Porter FM, Aceti DJ, Markley JL. Sweetness determinant sites of brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein. Arch Biochem Biophys 2000; 376: 259-265.
43. Jin Z, Danilova V, Assadi-Porter FM et al. Critical regions for the sweetness of brazzein. FEBS Lett 2003; 544: 33-37.
44. Assadi-Porter FM, Aceti DJ, Cheng H et al. Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin. Arch Biochem Biophys 2000; 376: 252-258.
45. Berlec A, Jevnikar Z, Majhenic AC et al. Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in Escherichia coli and Lactococcus lactis: a path toward sweet lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 2006.
46. Lamphear BJ, Barker DK, Brooks CA et al. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener. Plant Biotechnology Journal 2005; 3: 103-114.
47. Liu X, Maeda S, Hu Z et al. Purification, complete amino acid sequence and structural characterization of the heat-stable sweet protein, mabinlin II. Eur J Biochem 1993; 211: 281-287.
48. Nirasawa S, Nishino T, Katahira M et al. Structures of heat-stable and unstable homologues of the sweet protein mabinlin. The difference in the heat stability is due to replacement of a single amino acid residue. Eur J Biochem 1994; 223: 989-995.
49. Guan RJ, Zheng JM, Hu Z et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the thermostable sweet protein mabinlin II. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2000; 56 (Pt 7): 918-919.
50. Yamashita H, Theerasilp S, Aiuchi T et al. Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein taste-modifying activity, curculin. J Biol Chem 1990; 265: 15770-15775.
51. Barre A, Van Damme EJ, Peumans WJ et al. Curculin, a sweet-tasting and taste-modifying protein, is a non-functional mannose-binding lectin. Plant Mol Biol 1997; 33: 691-698.
52. Shirasuka Y, Nakajima K, Asakura T et al. Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of Curculigo latifolia. Biosci Biotechnol Biochem 2004; 68: 1403-1407.
53. Suzuki M, Kurimoto E, Nirasawa S et al. Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities. FEBS Lett 2004; 573: 135-138.
54. Theerasilp S, Hitotsuya H, Nakajo S et al. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. J Biol Chem 1989; 264: 6655-6659.
55. Theerasilp S, Kurihara Y. Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit. J Biol Chem 1988; 263: 11536-11539.
56. Sun HJ, Cui ML, Ma B et al. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. FEBS Lett 2006; 580: 620-626.