

# Roślinne białka charakteryzujące się słodkim smakiem oraz modyfikujące smak

Maria Szwacka

Stefan Malepszy

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Warszawa

## 1. Wprowadzenie

Słodki smak jest ważną cechą wielu produktów roślinnych. Może być wyoływany, w różnym stopniu, przez szereg związków występujących w stężeniach rzędu  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  M, w tym mono- i disacharydy, niektóre aminokwasy, glicerol jak również syntetyczne związki słodzące (sacharyna, cyklaminiany, aspartam).

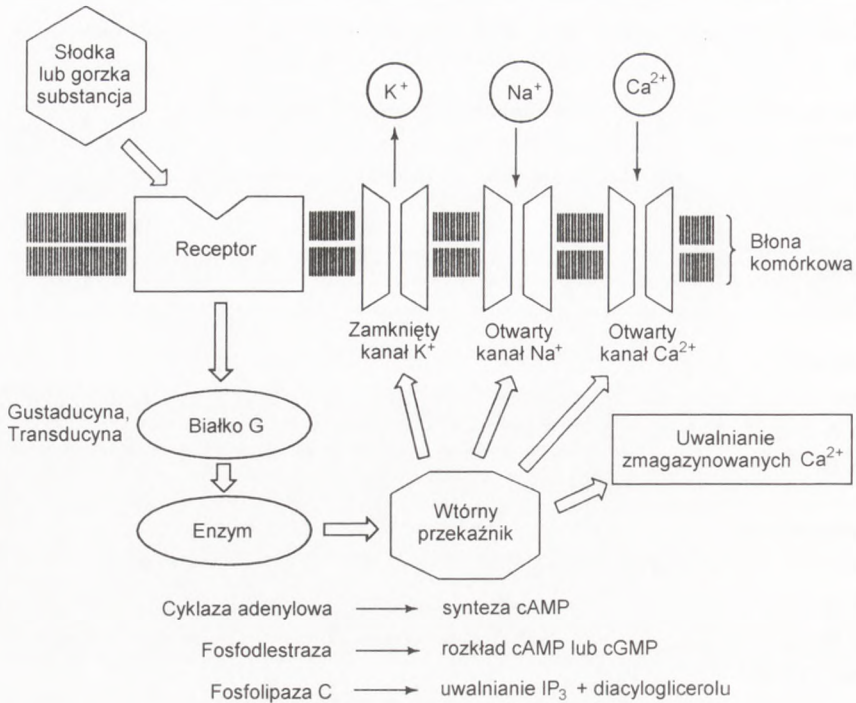
Na ogół substancje o masie cząsteczkowej powyżej 2,5 kDa, a tym bardziej makrocząsteczki takie jak białka, nie wykazują aktywności smakowej. Jednym z niezwykłych odkryć było stwierdzenie występowania, w owocach niektórych roślin tropikalnych, białek o słodkim smaku (BSS). Do chwili obecnej poznano ich pięć. Są to: brazzeina (ang. *brazzein*) (1), mabinlina (ang. *mabinlin*) (2), monellina (ang. *monellin*) (3), kurkulina (ang. *curculin*) (4) i taumatyna (ang. *thaumatin*) (3). Skrótowy przegląd BSS podano w tabeli 1. Niektóre, jak taumatyna i monellina, wykazują aktywność smakową u naczelnych (*Primates*), gdy występują w stężeniach podobnie niskich jak hormony ( $10^{-8}$  M) (5).

Badania nad mechanizmem działania BSS nie są zaawansowane, chociaż znane są inhibitory smaku słodkiego jak zyzifina (ang. *ziziphin*), gurmaryna (ang. *gummarin*) i związek z grupy O-glikozydów kwasu glikonowego (ang. *gymnemic acid*) (6). Istnieje dowód na to, że słodki i gorzki smak są przekazywane przez receptory związane z białkiem G (ang. *G-protein-coupled receptor*, GPCR) (7). GPCR stanowią liczną rodzinę receptorów; są wśród nich receptory stymulowane przez substancje smakowe i zapachowe. Receptory są białkami transbłonowymi i działają za pośrednictwem białek G (białka wiążące GTP). Jedno z nich, gustducyna (ang. *gustducin*), jest białkiem sprzęgającym sygnał z procesem pobudzania smaku; inne białko G, transducyna (ang. *transducin*) sprzęga sygnał z procesem pobudzania wzroku. Sygnał pier-

TABELA 1  
ZESTAWIENIE WŁAŚCIWOŚCI ROŚLINNYCH BIAŁEK CHARAKTERYZUJĄCYCH SIĘ SŁODKIM SMAKIEM  
I BIAŁEK MODYFIKUJĄCYCH SMAK (6)

Charakterystyka białka	Brazzeina	Mabinlina II	Monellina	Taumatyna I	Mirakulina	Kurkulina
smak białka	słodki	słodki	słodki	słodki	brak	słodki
smak kwasu po spożyciu białka	-	-	-	-	słodki	słodki
smak wody po spożyciu białka	-	-	-	-	-	słodki
liczba aminokwasów:						
monomer	54	105	94	207	191	114
łańcuch A	-	33	44	-	-	-
łańcuch B	-	72	50	-	-	-
masa cząsteczkowa [KD]:						
monomer	6,473	12,441	11,086	22,209	24,600	12,491
łańcuch A	-	4,147	5,251	-	-	-
łańcuch B	-	8,294	5,835	-	-	-
zawartość cukrów (%)	-	-	-	-	13,9	-
punkt izoelektryczny	brak danych	11,3	9,3	12,0	9,1	7,1

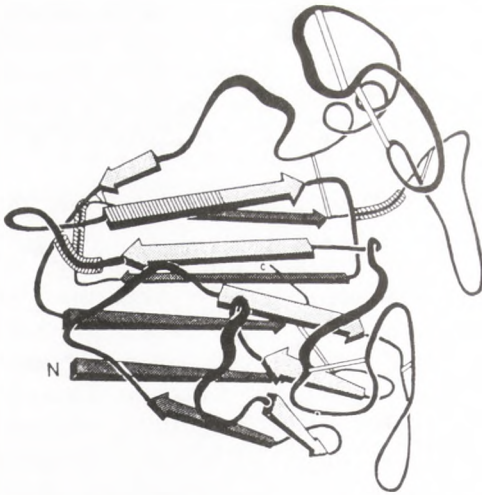
wotny dochodzący do komórki z przestrzeni pozakomórkowej powoduje zmianę konformacyjną receptora, co stymuluje białko G. Aktywne białko G uruchamia kaskadę enzymatyczną, rośnie stężenie cAMP i dochodzi do aktywacji fosfodiesterazy, co powoduje zmniejszenie poziomu cAMP lub cGMP. Obniżenie poziomu tych wtórnych przekaźników informacji bezpośrednio przyczynia się do zmiany przepuszczalności kanałów jonowych (rys. 1). Zamknięcie kanałów w błonie komórkowej powoduje powstanie sygnału nerwowego (8). Inny wtórny przekaźnik, 1,4,5-trifosforan inozytolu (IP<sub>3</sub>), jest odpowiedzialny za wewnątrzkomórkową mobilizację jonów Ca<sup>2+</sup> (9). W przenoszeniu wrażenia smaku słodkiego mogą być wykorzystane, IP<sub>3</sub> i jony Ca<sup>2+</sup>. Wykazano, że sacharoza i intensywnie słodkie substancje powodują wysokie poziomy wewnątrzkomórkowych Ca<sup>2+</sup> (10). Receptory smaku słodkiego nie zostały do tej pory wyizolowane. Shimazaki i wsp. (11) podjęli próbę izolacji receptora taumatyny I. Z kubków smakowych małpy, w których zlokalizowane są komórki smakowe, wyodrębnili kompleks: taumatyna I — białko o masie około 50 kDa. Do łączenia nie dochodziło, gdy taumatyna była acylowana (niesłodka), co dało podstawę do przypuszczania, że zidentyfikowali białkowy receptor.



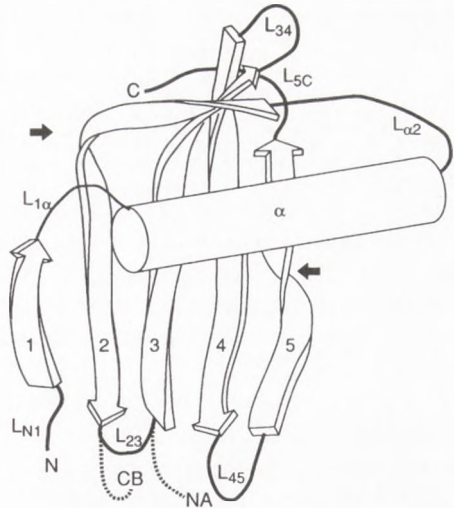
Rys. 1. Schematyczny rysunek systemu przenoszenia smaku słodkiego i gorzkiego;  $IP_3$  (1,4,5 — trifosforan inozytolu).

BSS mogą być wykorzystane w dwojaki sposób: 1) służyć do uatrakcyjniania smaku różnych produktów, w tym pochodzenia roślinnego; geny BSS wprowadzone do roślin nie wytwarzających BSS mogą zwiększyć walory użytkowe, np. słodkie owoce pomidora lub dyni lub 2) spowodować nowy sposób użytkowania rośliny, np. liście transgenicznych roślin tytoniu, u których następuje ekspresja BSS mogłyby być surowcem do ekstrakcji tych białek na cele przemysłu spożywczego.

Najbardziej rozpowszechnionym podejściem przy ocenie sensorycznej względnej słodyczy różnych produktów jest porównanie ich stężeń progowych. Próg rozpoznania jest minimalnym natężeniem bodźca sensorycznego pozwalającym na rozpoznanie odbieranego wrażenia. Do oceny sensorycznej produktów żywnościowych stosuje się m.in. tzw. metodę trójkątową na podstawie której uzyskuje się ocenę porównawczą. Metoda ta polega na jednoczesnej prezentacji trzech zakodowanych próbek, z których dwie są identyczne. Zadaniem oceniającego jest wskazanie losowej próbki różnej. W przypadku wykrycia różnic pomiędzy próbkami prezentuje się serię trójkątowych zestawów większej grupie oceniających. Każdy z nich ocenia jeden lub kilka zestawów. Próbka losowa nie jest zaznaczona. Zastosowanie większej liczby



Rys. 2. Struktura rdzeniowa taumatyny (5); równoległe linie symbolizują wiązania S-S; za-ciemnione strzałki symbolizują rejony homologiczne do monelliny, koniec aminowy i karboksylowy oznaczono N i C.



Rys. 3. Schemat przedstawiający elementy strukturalne kryształów monelliny i cystatyny (21);  $\alpha$ -heliks jest przedstawiony w postaci cylindra, a łańcuchy  $\beta$  w postaci ponumerowanych strzałek; pętle przedstawiono w postaci pogrubionych linii; pętle  $L_{23}$ ,  $L_{45}$  i  $L_{N1}$  występują wyłącznie w cząsteczkach cystatyn i stanowią miejsca wiązania; koniec aminowy łańcucha A monelliny (NA) i karboksylowy łańcucha B (CB) oznaczone są liniami przerywanymi.

powtórzeń pojedynczych elementów trójkątowych zmniejsza prawdopodobieństwo przypadkowego poprawnego wyniku.

Celem pracy jest przedstawienie niektórych cech BSS i podsumowanie obecnego stanu ich wykorzystania w biotechnologii.

## 2. Taumatyna i monellina

Selektywne wiązanie receptorów smaku słodkiego jest podstawową cechą taumatyny i monelliny. Jeśli wziąć za podstawę stężenie molarne, to słodycz obu białek jest około 100 tysięcy razy bardziej intensywna od słodyczy sacharozy (12), ogólnie przyjętego wzorca słodyczy. Choć oba są intensywnie słodkie, zawierają tylko pięć homologicznych tripeptydów. Pomimo bardzo ograniczonego podobieństwa sekwencji aminokwasów tych białek (8), przeciwciała wiążące się *in vitro* z taumatyną, oddziałują również z monelliną i *vice versa*, ale nie oddziałują z niesłodką monelliną, uzyskaną po modyfikacji chemicznej (13). Wskazuje to na obecność w cząsteczkach tych białek identycznych grup rozpoznawanych przez przeciwciała (determinant, epito-

pów) utworzonych być może z więcej niż jednego z homologicznych tripeptydów, bowiem pojedynczy jest zbyt krótkim fragmentem by mógł stanowić kompletną antygenową determinantę. Dla pełniejszego zrozumienia krzyżowego reagowania antygenów, określono struktury krystaliczne taumatyny i monelliny, ale nie stwierdzono podobieństwa przestrzennych struktur tych białek (5,14) (rys. 2 i 3).

Białka funkcjonują poprzez selektywne wiązanie się do innych cząsteczek. Mogą to być krótkotrwałe oddziaływania z innymi białkami, w wyniku których zachodzi przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki (receptory komórkowe). Innym przykładem swoistego oddziaływania między białkami jest wiązanie antygenu białkowego do przeciwciała. Podstawą do zrozumienia funkcjonowania białka jest określenie konformacji miejsca wiążącego inne cząsteczki. Dość dobrze zostały poznane miejsca wiązania przeciwciała. Taumatyna i monellina mają właściwości immunogenne (13). Badania z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko tym białkom mogą dostarczyć informacji o oddziaływaniu pomiędzy słodkimi substancjami i ich receptorami. Przy użyciu monoklonalnych przeciwciał do taumatyny i monelliny, w cząsteczce taumatyny, zidentyfikowano grupy rozpoznawane przez przeciwciała; wyróżniono epitopy wiążące się swoiście z przeciwciałami do taumatyny oraz reagujące krzyżowo (15). Reagujące krzyżowo stanowiły prawdopodobnie centra wiążące receptor smaku, a reagujące swoiście mogą być bardzo przydatne do oznaczeń ilościowych taumatyny w ekstraktach roślinnych.

## 2.1. Taumatyna

Choć pierwsze informacje na temat walorów smakowych owoców roślin *T. daniellii* sięgają zeszłego wieku, to taumatyna jako białko została zidentyfikowana stosunkowo niedawno. Obecnie wyróżnia się pięć form taumatyny: I, II, III (16), b i c (17). Są to monomeryczne białka zasadowe (pI 12) o masie około 22 kDa (17), które występują wyłącznie w owocach zachodnioafrykańskiej bezpędowej byliny *Thaumatococcus daniellii* Benth (3) i charakteryzują się słodkim smakiem (16-18). Wykazują szczególnie wysoką intensywność słodczy. Wywoływane przez nie wrażenie smaku słodkiego pojawia się z niewielkim opóźnieniem (15 s) i zanika powoli (30 min) (19). Taumatyna w stężeniach niższych niż  $10^{-8}$  M obniża próg rozpoznania innych słodkich substancji, jak sacharozy i sztucznych środków słodzących, a także intensyfikuje smakowitość niektórych produktów żywnościowych (20).

Spośród pięciu form taumatyn, pierwsza i druga występują w znamiennej przewodzie. Zostały one dobrze scharakteryzowane fizykochemicznie. Obie są pojedynczymi łańcuchami polipeptydowymi zbudowanymi z 207 reszt aminokwasów (12), a różnią się tylko pięcioma resztami (12,18). Taumatyna jest syntetyzowana w postaci dłuższego łańcucha polipeptydowego, preprotauumatyny (rys. 4) (18) i zawiera od strony końca N sekwencję sygnałową zbudowaną z 22 reszt hydrofobowych (presekwencja), podobnie jak białka sekrecyjne. Sekwencje sygnałowe decydują o translokacji białka poprzez błonę retikulum endoplazmatycznego. Od strony końca karboksylowego cząsteczka



Rys. 4. Schemat budowy preprotaumatyny II (30), N i C oznaczają odpowiednio koniec aminowy i karboksylowy łańcucha polipeptydowego.

preprotaumatyny zawiera odcinek o długości 6 reszt (prosekwencja). Przypuszcza się, że ten C-końcowy fragment stanowi sygnał dla transportu białka do ostatecznego miejsca przeznaczenia (sygnał kompartmentacji) — organelli podobnych do pęcherzyków (18). W strukturze rdzeniowej taumatyny I można wyróżnić trzy domeny (5). Główna, zbudowana jest z jedenastu łańcuchów  $\beta$ ; sąsiadujące ze sobą łańcuchy są ułożone w przeciwnych kierunkach (antyrownoległa harmonijka  $\beta$ , rys. 2). Pozostałe dwie domeny są bogate w mostki dwusiarczkowe. Każdy z łańcuchów  $\beta$  zawiera średnio 6 aminokwasów. Szesnaście cystein, występujących w cząsteczce taumatyny, bierze udział w tworzeniu wiązań dwusiarczkowych. Jedno wiązanie pozycji 145 i 158, jest labilne, a jego redukcja wyzwala właściwości enzymatyczne taumatyny (3). Cząsteczka taumatyny z częściowo zredukowanymi wiązaniami dwusiarczkowymi podlega autotrawieniu, a w obecności odpowiednich substratów wykazuje aktywności proteazy, amidazy i esterazy (3). Acylacja grupy aminowej lizyny przy atomie węgla w pozycji  $\epsilon$  obniżając zasadowość podwyższa jego aktywność hydrolityczną w sposób skorelowany z liczbą wprowadzonych grup acetylowych (3). Acylowana monellina zachowuje się podobnie i w środowisku redukującym wykazuje aktywność amidazy (3). Wprowadzenie grup acetylowych do cząsteczki taumatyny redukuje słodycz tego białka również w sposób skorelowany z liczbą wprowadzonych grup (20).

## 2.2. Monellina

Monellina występuje w owocach afrykańskiej liany *Dioscoreophyllum cumminsii* Diels (21). Cząsteczka tego białka składa się z dwóch podjednostek: łańcucha A o długości 45 reszt i łańcucha B o długości 50 reszt (22). Przy wykorzystaniu techniki krystalografii rentgenowskiej ustalono strukturę przestrzenną monelliny (21) (rys. 3). Cząsteczka monelliny zawiera układ antyrownoległych  $\beta$ -struktur i prostopadły  $\alpha$ -heliks. Każdy z łańcuchów  $\beta$  zawiera średnio 10 reszt. Koniec karboksylowy łańcucha B sąsiaduje z końcem aminowym łańcucha A. Murzin sugeruje, że oba łańcuchy dojrzałej cząsteczki monelliny mogą pochodzić od pojedynczego prekursorowego polipeptydu (21). Ponieważ nie zsekwencjonowano ani genu ani cDNA monelliny, to brak molekularnego poparcia tej sugestii. Elementy strukturalne monelliny, heliksu-harmonijki, zaobserwowano w kryształach dwóch białek zwierzęcych z rodziny inhibitorów proteinaz cysteinowych: 1) cystatyny białka jaja kurzego

i 2) ludzkiej stefiny B (23) (rys. 3). Poza podobieństwem struktur, białka te łączy podobieństwo sekwencji aminokwasów (21). Pojawiło się zatem pytanie, czy monellina może pełnić funkcję inhibitora proteinazy? Okazało się jednak, że centra aktywne cząsteczki monelliny i cząsteczki cystatyny nie mają identycznych sekwencji aminokwasowych.

Przekonstruowano natywny gen kodujący monellinę w ten sposób, że syntetyzowany jest jeden łańcuch polipeptydowy o długości równej sumie dwóch podjednostek monelliny. Dojrzałe białko tak przekonstruowanego genu okazało się intensywnie słodkie (24).

### 3. Inne BSS

Mabinlina jest białkiem nasion chińskiej rośliny *Capparis masaiikai* Lévl. (25). Występuje w formie heterodimeru. Znanych jest 5 homologów mabinliny, z których mabinlina II jest najbardziej termostabilna, a zatem najatrakcyjniejsza dla przemysłu spożywczego. Jest odporna na działanie temperatury +80°C przez okres przynajmniej 48 h (25). W niedużej cząsteczce mabinliny (12,4 kDa) występują aż 4 wiązania dwusiarczkowe, którym przypisuje się tworzenie termostabilnej struktury. Pozostałe BSS, poza opisaną w dalszej części podrodziału brazzeiną (1), nie są odporne na działanie wysokich temperatur. Po ustaleniu sekwencji aminokwasów mabinliny II wskazano na brak znaczącego podobieństwa w sekwencji aminokwasów mabinliny II i pozostałych BSS oraz mirakuliny (25), przeciwnie do białek zapasowych nasion, szczególnie 2S albuminy AT2S3 *Arabidopsis thaliana*, chociaż białko to nie charakteryzuje się słodkim smakiem (26).

Przykładem BSS o ciekawych właściwościach jest brazzeina występująca w owocach *Pentadiplandra brazzeana* Baillon (1). Jest 2000 razy słodsza od 2% roztworu sacharozy. Stanowi najmniejsze (6,473 kDa) i najlepiej rozpuszczalne w wodzie (50 mg/l) z dotychczas poznanych BSS (1). Różni się smakiem od taumatyny (27). Oznaczono sekwencję aminokwasową tego białka (1). Zawiera aż 8 cystein na ogólną liczbę 54 aminokwasów. Przypuszczalnie termostabilną strukturę brazzeiny stabilizują liczne, jak na tak małą cząsteczkę, mostki dwusiarczkowe. Produkcja brazzeiny na większą skalę może być uzasadniona z następujących powodów: 1) termostabilności, 2) znacznej zawartości reszt lizyny oraz 3) wywoływania długotrwałego wrażenia smaku słodkiego tak, że może ono stanowić wartościowy dodatek do sztucznych substancji słodzących, które na ogół wywołują efekt krótkotrwały. Z 200 g owoców można otrzymać 720 mg brazzeiny (1). Dla wytwarzania większych ilości przygotowano gen syntetyczny, który wstawiono do wektora plazmidowego pGEMEX-1. Wektor pochodny wprowadzono do komórek szczepu *Escherichia coli* JM109 (28). Nie podano informacji na temat ekspresji rekombinacyjnej brazzeiny w komórkach tych bakterii.

## 4. Taumatyna w biotechnologii

Na atrakcyjność taumatyny jako dodatku do żywności składają się przede wszystkim następujące właściwości: 1) polepszanie walorów smakowych żywności, 2) wywoływanie wrażenia smaku słodkiego u człowieka po spożyciu mikrogramowych ilości, 3) brak toksycznego i mutagenicznego działania, 4) wyjątkowa trwałość termiczna. Cechy te czynią taumatynę atrakcyjną w hodowli tych gatunków transgenicznych, u których ceni się słodkie owoce. Obecnie przemysł spożywczy wykorzystuje jedynie ekstrakty z owoców *T. daniellii*. Częściowo oczyszczona taumatyna stanowi ofertę handlową firmy Sigma. Na rynku pojawiła się pod nazwą talin. Od 1973 r. jej dystrybucją zajmuje się firma Tate & Lyle, a od 1992 r. również firma Hays Ingredients. Rośliny *T. daniellii* uprawiane poza tropikiem zawiązują owoce partenokarpiczne, które nie mają słodkiego smaku. Z jednego owocu (od 6 do 30 g) można otrzymać do 12 mg taumatyny (29). Biorąc pod uwagę popularność talinu na rynku, ilość ta nie zaspokaja potrzeb handlowych. Ponadto taumatyna jest droga, pomimo że procedura jej izolacji i oczyszczania jest stosunkowo prosta (16). Wobec tego podjęto prace nad wytwarzaniem taumatyny przez inne organizmy. W komórkach bakterii i drożdży, z wyjątkiem *Aspergillus oryzae* (30), nie udało się jednak otrzymać taumatyny charakteryzującej się słodkim smakiem. Wydajność biosyntezy taumatyny w komórkach *A. oryzae* była niska.

### 4.1. Synteza taumatyny w komórkach bakteryjnych

Dla uzyskania ekspresji genu kodującego taumatynę II w komórkach *E. coli* przygotowano cDNA otrzymany w reakcji odwrotnej transkrypcji mRNA preprotaumatyny II (18). Wyznaczono jego sekwencję nukleotydową. Fragmenty DNA, które stanowiły cDNA preprotaumatyny II, pretaumatyny II, protaumatyny II bądź dojrzałej taumatyny II (pozbawionej końców: N i C) sklonowano w dwóch wektorach, pochodnych pBR322; pod promotorem *trp* operonu biosyntezy tryptofanu (wektor pUR538), w drugim — pod promotorem *lac* operonu laktozowego (wektor pUR528). Rekombinacyjne plazmidy wprowadzono do komórek *E. coli*. Dostępne są wyłącznie dane dotyczące wydajności biosyntezy preprotaumatyny II w komórkach bakteryjnych — maksymalnie 500 cząsteczek na komórkę (18). Prawdopodobnie białka heterologiczne nie były wydzielane do otoczenia. Aby zachodził transport tych białek poza obręb komórki bakteryjnej powinny zawierać bakteryjny peptyd sygnałowy (31).

Bakterie z rodzaju *Bacillus* wytwarzają szereg pozakomórkowych enzymów, głównie  $\alpha$ -amylazę. *B. subtilis* zastosowano do produkcji różnych białek rekombinacyjnych zawierających wiązania dwusiarczkowe. W tym gospodarzu udało się uzyskać syntezę białek eukariotycznych, między innymi interferonu  $\alpha$ -2 (32). Dla wytworzenia aktywnej biologicznie taumatyny do komórek tego gospodarza wprowadzono wektory ekspresyjne zawierające fuzję cDNA taumatyny II z regionem kodującym peptyd przewodni (ang. *leader*)  $\alpha$ -amylazy (33). Fuzja genowa była pod kontrolą promotora genu  $\alpha$ -amylazy



*B. subtilis*. Dla uzyskania maksymalnej ekspresji, cDNA taumatyny II wprowadzono bardzo blisko silnego promotora bakteryjnego z zachowaniem poprawnej ramki odczytu, a dla zapewnienia efektywnej translacji w mRNA wektora ekspresyjnego przed kodonem inicjującym znajdowało się miejsce wiązania mRNA z rybosomami. Stężenie rekombinacyjnej taumatyny w pożywce wzrostowej *Bacillus* mierzono przy użyciu odczynków przeciwciał specyficznych w stosunku do taumatyny i techniki *Western blotting*. Poziom ekspresji obcego białka zależał od rodzaju szczepu bakteryjnego. Maksymalną wydajność biosyntezy (1 mg/l pożywki wzrostowej) taumatyny uzyskano w szczepie, dla którego stwierdzono mniej niż 4% aktywności proteolitycznej szczepu dzikiego *B. subtilis*. Brak jest danych na temat oceny sensorycznej heterologicznego białka.

Klonowanie genów do celów biotechnologicznych jest także możliwe w komórkach *Streptomyces lividans* i jest często podobnie korzystne jak w *B. subtilis*. Przygotowano konstrukt genowy kodujący fuzję: taumatyna-peptyd przewodni (ang. *leader*)  $\beta$ -galaktozydazy. Gospodarzem klonowanej fuzji genowej były komórki *S. lividans*. Bakterie wydzielały około 0,2 mg białka fuzyjnego na litr pożywki wzrostowej, za mało do przeprowadzenia oceny sensorycznej.

#### 4.2. Synteza taumatyny w komórkach drożdży

*Saccharomyces cerevisiae* jest organizmem niepatogennym dla człowieka, stosowanym do wytwarzania białek o biotechnologicznym znaczeniu. Jako eukariotyczny jest zdolny do przeprowadzenia posttranskrypcyjnych modyfikacji (tworzenie wiązań dwusiarczkowych, acylacja, fosforylacja, O-glikozylacja), których wymaga wiele białek eukariotycznych, w tym taumatyna, dla osiągnięcia pełnej aktywności biologicznej.

Wektory drożdżowe, pozwalające na wydajną syntezę białek heterologicznych, powinny występować w dużej liczbie kopii na komórkę i wykazywać znaczną stabilność mitotyczną w warunkach nieselekcyjnych. Dla osiągnięcia stabilności klonowanego genu stosuje się wektory integrujące do genomu drożdży, w locus rDNA. U drożdży geny kodujące rDNA powtórzone są od 100 do 200 razy w obrębie haploidalnego genomu (34). Gwarantuje to zdolność komórki do wytwarzania odpowiedniej ilości rybosomów potrzebnych do syntezy białka.

Przygotowano wektor plazmidowy pMIRY2 (ang. *Multiple Integration into the Ribosomal DNA of Yeast*), który zawierał kilka tysięcy par zasad rDNA i występował w 100-200 kopiach na komórkę (34). Około 80-100% jego kopii utrzymało się w warunkach nieselekcyjnych przez ponad 70 generacji. W miejsca Bgl II-Hind III, wstawiono, pod kontrolą promotora drożdżowego genu dehydrogenazy 3-fosfoglicerynianu (GAPDH), gen kodujący preprotaumatynę II (2,1 kbp). Otrzymano transformowane komórki zawierające 140 kopii klonowanego genu. Pojedyncza transformowana komórka drożdży syntetyzowała około  $10^5$  cząsteczek preprotaumatyny (test ELISA). Była to niska wydajność biosyntezy tego białka.

Celem doświadczenia Edensa i wsp. (35) było sprawdzenie czy w komórkach drożdży może zachodzić procesowanie preprotaumatyny. Gen strukturalny preprotaumatyny II sklonowano pod promotorem GAPDH w wektorach wahadłowych, pochodnych wektora pUR528 (18). Stosując metodę elektroforezy w żelu porównano masę taumatyny syntetyzowanej w komórkach drożdży i wyizolowanej z owoców *T. danielli*. Oba białka miały masy podobne, co wskazywało na zachodzenie w komórkach drożdży odcinania przynajmniej dłuższego N-końcowego peptydu preprotaumatyny.

Lee i wsp. (36) skonstruowali trzy wektory wahadłowe niosące geny syntetyczne trzech form taumatyny, w tym taumatyny I, i uzyskali wysokie wydajności produkcji w komórkach drożdży (20% ogólnej puli nierozpuszczalnych białek) poszczególnych form rekombinacyjnych białek. Uzyskanie tak wysokiej wydajności biosyntezy taumatyny u drożdży wynikało z wprowadzenia do syntetycznych genów kodonów preferowanych przez tego gospodarza. Przyczyną występowania taumatyny we frakcji białek nierozpuszczalnych mogło być środowisko wewnątrz komórki gospodarza niesprzyjające tworzeniu mostków dwusiarczkowych, niezbędnych do utworzenia prawidłowej struktury przestrzennej białka.

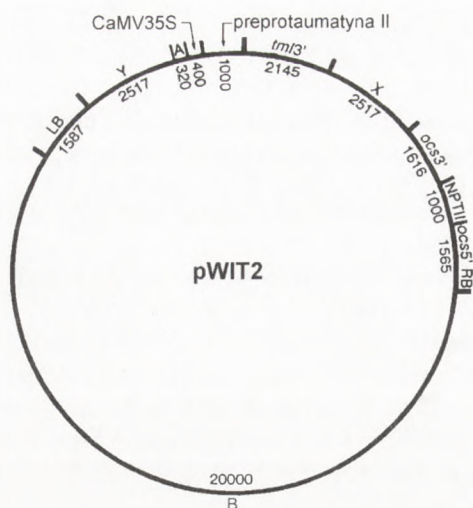
*Aspergillus* jest powszechnie stosowany w biotechnologii, szczególnie do produkcji wtórnych metabolitów i enzymów. Także i w tym organizmie opracowano system klonowania taumatyny (30). Do ekspresji genu taumatyny wykorzystano promotor GAPDH. Tylko niewielka ilość (50 ng/ml pożywki) obcego białka była wydzielana do otoczenia; po oczyszczeniu charakteryzowało się słodkim smakiem, a zatem stanowiło formę dojrzałą taumatyny. W ekstraktach komórkowych zidentyfikowano natomiast białko, którego masa (25 kDa) wskazywała, że stanowi niedojrzałą formę taumatyny.

## 5. BSS w transgenicznym roślinach wyższych

Podwyższenie zawartości słodkich substancji w jadalnych częściach rośliny można osiągnąć przez wprowadzenie do jej genomu genu kodującego BSS zaopatrzonego w organoswoisty promotor. Obecnie znane są sekwencje cDNA niektórych BSS. Modyfikowanie smaku owocu tymi fragmentami DNA może być szczególnie pożądane w uprawach prowadzonych w strefach klimatycznych o słabszym nasłonecznieniu i/lub niższej temperaturze.

### 5.1. Transgeneza roślin kasetami ekspresyjnymi zawierającymi cDNA genu monelliny

Do transgenezy pomidora i sałaty przygotowano dwa wektory plazmidowe zawierające syntetyczny gen monelliny kodujący pojedynczy polipeptyd. Syntetyczny gen był pod kontrolą promotora organoswoistego z genu E8 pomidora bądź promotora genu 35S RNA z wirusa mozaiki kalafiora CaMV35S (37). Pierwszy z wymienionych promotorów wykazuje specyficzność tkankową; jest aktywny w dojrzewającym owocu pomidora i zastosowano go do



Rys. 5. Schemat organizacyjny obszaru T-DNA plazmidu pWIT2 (19); LB-lewa sekwencja skrajna; Y-region kodujący funkcje replikacji plazmidu colE1; A-DNA TNS; CaMV35S-promotor 35S RNA z wirusa CaMV; preprotaumatyny II; tml3'-region terminacyjny oncogenu *tml* *A. tumefaciens*; X-gen oporności na ampicilinę; NPTII-sekwencja kodująca genu *nptII* (neomycynowej fosfotransferazy II); ocs5'-region promotorowy oncogenu *A. tumefaciens* kodującego syntazę oktopinową; RB-prawa sekwencja skrajna; B-region kodujący funkcje replikacji plazmidu pRK290.

ukierunkowanej transfekcji, a drugi do uzyskania ekspresji transgenu w obrębie całej rośliny. W wyniku transgenezy pomidora za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* kasetą ekspresyjną zawierającą cDNA monelliny pod kontrolą promotora E8 uzyskano 30 roślin, z których 50% wykazywało obecność mRNA monelliny specyficznie w dojrzałym owocu. Tego transkryptu nie wykryto w niedojrzałym owocu i liściu roślin transgenicznym oraz w dojrzałym owocu rośliny nietransgenicznej. Stężenie mRNA monelliny w transgenicznym owocu było podobne do stężenia mRNA natywnego białka E8 w dojrzałym owocu pomidora. Na podstawie uzyskanych wyników przypuszcza się, że ekspresja chimerycznego genu jest, podobnie jak natywnego genu E8, specyficzna dla owocu i aktywowana przy transkrypcji podczas jego dojrzewania. Od dawna wiadomo, że rozwijające się owoce wytwarzają etylen; stwierdzono, że jego działanie powoduje wcześniejsze dojrzewanie. Traktowanie niedojrzałych owoców transgenicznych roślin pomidora etylenem spowodowało podwyższenie stężenia zawartej w nich monelliny do poziomu przekraczającego dziesięciokrotnie próg wykrywalności. Tylko owoce traktowane etylenem wywoływały u człowieka wrażenie smaku charakterystyczne dla monelliny. W wyniku transfekcji pomidora i sałaty (druga kasetka ekspresyjna) uzyskano rośliny transgeniczne obu gatunków. Obecność mRNA monelliny potwierdzono w tkankach zielonych sałaty i dojrzałym owocu pomidora. Nie zamieszczono danych o występowaniu rekombinacyjnej monelliny w innych tkankach transgenicznych roślin pomidora.

Wyniki omówionych doświadczeń wskazują na kontrolę ekspresji chimerycznego genu monelliny przy transkrypcji i na trwałość transkryptu tego genu w różnych organach transgenicznych roślin.

## 5.2. Transgeneza ziemniaka kasetą ekspresyjną zawierającą cDNA genu taumatyny

Do transgenezy ziemniaka *Solanum tuberosum* L. cv. *Iwa*, za pomocą *A. rhizogenes*, genem taumatyny II zastosowano konstrukt genowy zawierający gen chimeryczny: promotor CaMV35S5'-c DNA kodujący preprotaumatynę II — terminator *tml3'* (38) (rys. 5). Przy użyciu techniki *Western blotting* wykazano, że tumorowate korzenie oraz tkanki zregenerowanych z nich roślin (liść, łodyga, korzeń, stolon, bulwa) wytwarzały taumatynę. Ocenę smaku słodkiego tumorowatych korzeni przeprowadzono stosując metodę trójkątową; każdy z 12-osobowego zespołu testujących otrzymał do oceny trzy identycznie rozdrobione próbki tkanki o masie 0,1 g.

Rośliny ziemniaka wykazujące ekspresję genu taumatyny II stanowią przykład kombinacji ciekawych cech użytkowych: słodkości i wysokiej zdolności do plonowania odmiany, którą w przeciwieństwie do *T. daniellii*, można uprawiać z powodzeniem w różnych strefach klimatycznych. W przeprowadzonych doświadczeniach nie było jednak zamiaru wytworzenia nowej odmiany ziemniaka. Chodziło raczej o model badawczo-biotechnologiczny, który mógłby być przydatny w pracach nad doskonaleniem walorów smakowych i dietetycznych części jadalnych komercyjnie użytecznych roślin dwuliściennych tym bardziej, że istnieją obecnie odmiany, dla których opracowano systemy transfekcji wektorowej, jak jabłoń (39), truskawka (40) czy też kiwi (41). Doniesienie o transgenezie kiwi (*Actinidia deliciosa*) (41) jest pierwszym dotyczącym efektów genów *rol A. rhizogenes* w drzewach. Inny z wymienionych przykładów dotyczy wprowadzenia genu markerowego *npII* do truskawki (40) i uzyskania pierwszego pokolenia transgenicznych roślin, w których wprowadzona cecha segreguje w sposób mendlowski. Podobne doświadczenie wykonane na jabłoni było ograniczone do uzyskania pokolenia  $T_0$  (39).

## 6. Białka podobne do taumatyny

Dzisiejszy stan wiedzy nie pozwala na jednoznaczną odpowiedź na pytanie jaką inną rolę *in vivo*, poza wywoływaniem i/lub modyfikowaniem smaku, mogą pełnić BSS. Próba znalezienia odpowiedzi są poszukiwania białek homologicznych, o poznanych funkcjach biologicznych. Najwięcej danych literaturowych, jak dotąd, dotyczy białek podobnych do taumatyny (ang. *thaumatin-like*, TL). Do rodziny TL zalicza się białka wykazujące od 40 do 70% homologii w sekwencji aminokwasów do taumatyny (42). Zostały one zidentyfikowane w różnych gatunkach roślin jedno- i dwuliściennych. Podobnie do taumatyny mają masę około 22 kDa i zawierają 16 konserwowanych reszt cysteiny. Żadne z dotychczas poznanych nie charakteryzuje się słodkim smakiem. Wiedza na temat białek TL pochodzi z następujących obszarów badań: 1) odpowiedzi roślin na atak patogenów, 2) odpowiedzi roślin na stres osmotyczny oraz 3) białek nasion zbóż o antygrzybowej aktywności. Wynikiem tych badań jest identyfikacja wielu białek TL.

### 6.1. Białka TL w patogenezie zakażenia grzybami i wirusami

W swoim naturalnym środowisku rośliny narażone są na oddziaływanie stresów biotycznych. Jedną ze strategii jaką stosują broniąc się przed atakiem patogenów jest synteza białek PR (ang. *Pathogenesis Related*) (43). Białka PR zostały usystematyzowane w pięć rodzin, z których PR-5 obejmuje białka homologiczne do taumatyny (44,45). Białka TL zostały zidentyfikowane w różnych gatunkach roślin, w liściach oraz nasionach, pierwotnie w liściach roślin tytoniu (*Nicotiana tabacum*). W tym gatunku zostały zidentyfikowane jako białka kwaśne, zaangażowane w odpowiedzi typu HR (ang. *hypersensitive response*) (46). Infekowanie liści roślin tytoniu Samsun NN wirusem mozaikowatości tytoniu (TMV) indukuje syntezę *de novo* białka (226 reszt), wykazującego 65% homologii w sekwencji aminokwasów z taumatyną (44). Białko to, podobnie do taumatyny, zawiera peryferyczną sekwencję sygnałową (25 reszt) i 16 reszt cysteiny. Z liści roślin tytoniu zainfekowanych TMV i pomidora — grzybem *Pytophthora infestans* wyizolowano inne białko TL, AP24 (45); podobnie do innych zasadowych białek TL zawiera przy końcu C sekwencję spełniającą rolę sygnału kierującego to białko do wakuoli, gdzie jest przechowywane. Z dojrzałych liści roślin soi (*Glycine max*) wykazujących objawy infekcji i stresu wyizolowano inne kwaśne białko TL, P21. Po zsekwencjonowaniu okazało się białkiem TL (47).

Białka PR syntetyzowane są również w roślinach jednoliściennych. W liściach jęczmienia (*Hordeum vulgare*) infekowanych niekompatybilną rasą grzyba *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* dochodzi do akumulacji kwaśnego białka (pI 3,4), Hv-1 (19 kDa), zaangażowanego w odpowiedzi typu HR. Stopień homologii w sekwencji aminokwasów białka Hv-1 z taumatyną pozwala na zakwalifikowanie tego białka do rodziny TL (42). U pszenicy (*Triticum aestivum*) został opisany cDNA kodujący kwaśne białko TL, PWIR2 (15,6 kDa). Ekspresja mRNA białka PWIR2 zachodzi w odpowiedzi na nabytą odporność (48). Znaczące jest podobieństwo (97%) w sekwencji nukleotydów cDNA kodujących białka: Hv-1 i PWIR2.

Białka TL zostały zidentyfikowane również w nasionach. W ekstraktach z nasion roślin takich jak: kukurydza, jęczmień, pszenica, owies, len i sorgo stwierdzono występowanie białek o aktywności chitynaz degradujących ściany komórkowe grzybów (49). Rodzinę tych białek nazwano permatynami (ang. *permatin*). Okazało się, że wykazują one podobieństwo w sekwencji aminokwasów z taumatyną (49). Do rodziny permatyn należy białko o masie 22 kDa, zeamatyna (ang. *zeamatina*), występująca w nasionach *Zea mays* (50). Zeamatyna hamuje *in vitro* wzrost takich grzybów chorobotwórczych jak: *Neurospora crassa*, *Trichoderma resei* i *Candida albicans*, gdy jest zastosowana w stężeniach fizjologicznych (kilka  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (42). Identyczne działanie wykazuje osmotyna, małe (24 kDa) zasadowe białko z rodziny PR-5, pierwotnie wyizolowane z komórek tytoniu przystosowujących się do stresu zasolenia (51,52). Inne białko TL, PR-S, zidentyfikowane w roślinach tytoniu zainfekowanych TMV, wykazuje *in vitro* silniejsze działanie hamujące wzrost grzyba *Cercospora beticola* niż zeamatyna i osmotyna, a nie hamuje, niepodobnie do tych

dwóch białek, wzrostu trzech gatunków grzybów, na które działa zeamatyna hamując ich wzrost (46). Być może aktywność skierowaną przeciw grzybom wykazują wszystkie białka TL, ale jest ona swoista dla gatunku grzyba.

## 6.2. Białka TL związane ze stresem osmotycznym

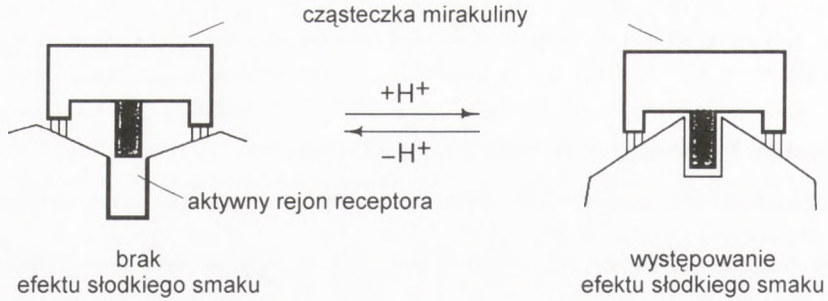
W warunkach stresu rośliny syntetyzują i akumulują specyficzne białka (białka stresowe). Przykładem jest osmotyna (51). Istnieje ponad dziesięć rodzajów bodźców indukujących ekspresję genu osmotyny, w tym zasolenie, infekcje wirusowe czy zranienie. Sekwencje aminokwasów osmotyny i taumatyny wykazują wysoki stopień homologii (52% identyczności aminokwasów). Podobnie do taumatyny i innych zasadowych białek TL, cząsteczka osmotyny, przy końcu aminowym zawiera peptyd sygnałowy i przy końcu karboksylowym, jako białko importowane do wakuoli, sekwencję kierującą ją do tego przedziału komórkowego (42,53). Osmotyna wykazuje aktywność skierowaną przeciwko grzybom chorobotwórczym (52). Uzyskano zwiększenie odporności na infekcję *P. infestans* roślin ziemniaka i tytoniu, do których wprowadzono gen kodujący osmotynę (54). Transgeniczne białko stanowiło 2% z całkowitej puli białek.

Innym przykładem białka indukowanego przez różne czynniki stresowe jest białko P23 (23 kDa), wyizolowane z liści roślin pomidora zainfekowanych wirioidem CEVd (*citrus exocortis virioid*) (55). Okazało się, że w warunkach stresu osmotycznego rośliny pomidora syntetyzują białko (NP24) o sekwencji aminokwasów identycznej z sekwencją białka P23 (56). Białko NP24 syntetyzowane jest także w korzeniu roślin pomidora nie poddanych stresowi (56).

## 6.3. Białka TL o aktywności inhibitora $\alpha$ -amylazy/proteinazy

Tkanki roślinne zawierają enzymy proteolityczne o różnym mechanizmie działania. Uszkodzenia mechaniczne (57), infekcje mikrobiologiczne (58) oraz atak żerujących owadów (59) prowadzą do znacznego podwyższenia w tkankach stężenia niektórych inhibitorów proteaz. Inhibitory proteaz i amylaz stanowią białka obronne i są rozpowszechnione w królestwie roślin, w tym w zbożach (60). Taumatyna II okazała się białkiem homologicznym (52% homologii sekwencji aminokwasów) do dwufunkcyjnego inhibitora proteinazy/ $\alpha$ -amylazy z ziarna kukurydzy (61). Ten dwufunkcyjny enzym stanowi białko o masie 22 kDa (206 reszt, w tym 16 reszt cysteiny). W doświadczeniach *in vitro* hamował aktywność enzymów trawiennych:  $\alpha$ -amylazy chrząszcza *Tribolium castaneum* i trypsyny wołowej (42). Wynik uzyskany dla *T. castaneum* sugeruje ochronną rolę białek TL przed atakiem żerujących owadów. Okazało się, że działanie hamujące aktywność inhibitora  $\alpha$ -amylazy/proteinazy wykazują tylko niektóre białka TL. Tej aktywności nie wykazują ani zeamatyna, ani permatyny występujące w nasionach jęczmienia (42,49).

Występowanie często znacznej homologii do sekwencji aminokwasów taumatyny w różnych białkach zaangażowanych w mechanizmach obronnych



Rys. 6. Schemat przedstawiający łączenie mirakuliny z miejscem aktywnym receptora smaku słodkiego (65).

roślin sugeruje, że poza wywoływaniem wrażenia smaku słodkiego białko to może pełnić inne funkcje biologiczne.

## 7. Białka o właściwościach modyfikowania smaku

W królestwie roślin występują dwa gatunki, *Richadella dulcifica* i *Curculigo latifolia*, których owoce zawierają białka zdolne do modyfikowania smaku. Jednym z tych białek jest mirakulina będąca glikoproteina występująca w owocach zachodnioafrykańskiej rośliny *R. dulcifica* (62). Mirakulina nie należy do BSS i w stanie natywnym występuje w formie tetrameru. Znana jest sekwencja cDNA kodującego białko prekursorowe (prepromirakuline) oraz pełna sekwencja aminokwasowa prepromirakuliny (63).

Dla ustalenia funkcji biologicznej mirakuliny podjęto, na większą skalę, jej syntezę w komórkach *E. coli*. Syntetyzowany chemicznie gen kodujący mirakulinę (601 pz) wprowadzono do wektora ekspresyjnego zawierającego promotor/operator operonu biosyntezy tryptofanu *E. coli* wraz z „rejonem liderowym” (ang. *leader*) *trpL*, dla uzyskania fuzji: mirakulina-peptyd przewodni *TrpL* (64). Transformowane tym wektorem komórki *E. coli* wytworzyły białko o masie 28 kDa oddziałujące z przeciwciałami do mirakuliny. Trwają prace nad biochemiczną i biologiczną charakterystyką tego białka.

Mirakulina ma niezwykłą właściwość modyfikowania smaku kwaśnego do słodkiego. Kurihara i Beidler (65) zaproponowali mechanizm działania, według którego zachodzi ten efekt. W środowisku obojętnym mirakulina nie tworzy kompleksu z receptorem. Przy niskim pH środowiska dochodzi do zmiany konformacji receptora błony i centrum aktywne cząsteczki mirakuliny wiąże się z komplementarnym obszarem receptora (rys. 6). Usunięcie kwasów powoduje powrót receptora do stanu charakteryzującego się brakiem powinowactwa do mirakuliny.

Drugim z białek modyfikujących smak jest kurkulina. Występuje w owocach bezpędowych roślin *C. latifolia*, rosnących w zachodniej Malezji (66).

Działanie kurkuliny modyfikujące smak jest podobne jak dla mirakuliny. Kurkulina, podobnie do pozostałych BSS, ma właściwości antygenowe i wywołuje wytworzenie swoistych przeciwciał. Okazało się, że przeciwciała specyficzne w stosunku do kurkuliny nie wiążą się z innymi BSS i *vice versa* (66). Wynik ten sugeruje brak wspólnych epitopów w cząsteczkach białek modyfikujących smak i BSS. Kurkulina w stanie natywnym występuje w formie dimeru (66). Z owoców *C. latifolia* przygotowano bibliotekę cDNA (67). Sklonowano go w wektorze fagowym  $\lambda$ gt10 i przeszukano bibliotekę mieszaniną trzech zestawów sond hybrydyzacyjnych. Z wyselekcjonowanych dwudziestu klonów dwa, zawierające dłuższe fragmenty cDNA, sekwencjonowano. W obu znaleziono pojedyncze ramki odczytu o identycznej długości i sekwencji nukleotydów. Sekwencja aminokwasowa białka określona na podstawie budowy cDNA tych klonów była prawie identyczna z sekwencją oznaczoną przy użyciu chemicznej analizy samego białka (67), co wskazywało, że oba klony kodują kurkulinę. W wydedukowanej, na podstawie budowy cDNA, sekwencji aminokwasów można było wyróżnić, przy obu końcach, krótkie fragmenty o identycznej długości (22 reszty). Fragment od strony końca N, podobnie jak w cząsteczce taumatyny, może pełnić funkcję sekwencji sygnałowej. Warto zwrócić uwagę, że nie znaleziono homologii sekwencji aminokwasów preprokurkuliny do znanych białek (baza danych NBRF).

## 8. Podsumowanie

W niektórych roślinach występują białka o unikatowych właściwościach wywoływania wrażenia smaku słodkiego. Białka te są poszukiwanymi produktami na rynku spożywczym skąd powstała potrzeba ich wytwarzania w większych ilościach niż dostarczają źródła naturalne. Nie powiodły się, jak dotychczas próby wytworzenia BSS w komórkach mikroorganizmów. Duże zainteresowanie i nadzieje wiąże się z ich produkcją w transgenicznym roślinach wyższych, tym bardziej, że doświadczenia z wprowadzeniem cDNA taumatyny do genomu *S. tuberosum* i cDNA monelliny do pomidora dowiodły możliwości uzyskania cechy smaku słodkiego u gatunków systematycznie odległych od naturalnych gospodarzy słodkich białek. Te udane doświadczenia świadczą o możliwości przeniesienia cechy smaku słodkiego, wywołanego przez określone białko, do innych gatunków, które mają znaczenie gospodarcze i u których byłoby to pożądane albo ze względu na wzrost atrakcyjności lub nowy sposób użytkowania. Najbardziej wartościowymi z punktu widzenia przemysłu spożywczego, jak się wydaje, są: mabinlina, brazzeina i kurkulina.

Autorzy dziękują Pani Zofii Orłowskiej za pomoc w przygotowaniu ilustracji.  
Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 227/P06/96/11.



## Literatura

1. Ming D., Hellekant G., (1994), FEBS Lett., 355, 106-108.
2. Hu Z., Min H., (1983), Chem. Abstr., 99, 85103c.
3. van der Wel H., Bel W. J., (1980), Eur. J. Biochem., 104, 413-418.
4. Kurihara K., Beidler L. M., (1968), Science, 161, 1241.
5. de Vos A. M., Hatada M., van der Wel H., Krabbendam H., Peerdeman A. F., Kim S.-H., (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1406-1409.
6. Kurihara Y., (1992), C. Rev. F. Sci. Nutr., 32, 231-252.
7. Walters D. E., (1996), Trends F. Sci. Technol., 7, 399-404.
8. McLaughlin S. K., McKinnon P. J., Margolskee R. F., (1992), Nature, 357, 563-569.
9. Hwang P. M., Verma A., Brecht D. S., Smyder S. H., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 7395-7399.
10. Bernhardt S. J., Naim M., Zehavi U., Lindemann B., (1996), J. Physiol., 490, 325-336.
11. Shimazaki K., Sato M., Nakao M., (1986), BBActa, 884, 291-298.
12. Iyengar R. B., Smits P., van der Ouderaa F., van der Wel H., van Brouwershaven J., Ravenstein P., Richters G., (1979), Eur. J. Biochem., 96, 193-204.
13. Hough C. A. M., Edwardson J., (1978), Nature, 271, 381-383.
14. Ogata C., Hatada M., Tomlinson G., Shin W.-C., Kim S.-H., (1987), Nature, 328, 739-742.
15. Mandal Ch., Shirley F., Anchin J. M., Mandal Ch., Linthicum D. S., (1991), Hybridoma, 10, 459-466.
16. van der Wel H., Loeve K., (1972), Eur. J. Biochem., 31, 221-225.
17. Higginbotham J. D., Hough C. A. M., (1977), in: *Sensory Properties of Foods*, Eds. Birch G. C., Brennan J. G., Parker K. J., Applied Sciences, London, 129-149.
18. Edens L., Heslinga L., Klok R., Ledebouer A. M., Maat J., Toonen M. Y., Visser Ch., Verrips C. T., (1982), Gene, 18, 1-12.
19. Witty M., (1990), TIBTECH, 8, 113-116.
20. van der Wel H., Bel W. J., (1976), Chem. Senses Flavour, 2, 211-218.
21. Murzin A. G., (1993), J. Mol. Biol., 230, 689-694.
22. Hudson G., Biemann K., (1976), Biophys. Biochem. Res. Commun., 71, 212-220.
23. Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J. B., Meyer E. F. Jr., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M., (1977), J. Mol. Biol., 112, 535-542.
24. Kim S.-H., Kang C.-H., Kim R., Cho J. M., Lee Y.-B., Lee T.-K., (1989), Protein Eng., 2, 571-575.
25. Liu X., Maeda S., Hu Z., Aiuchi T., Nakaya K., Kurihara Y., (1993), Eur. J. Biochem., 211, 281-287.
26. Krebbers E., Herdies L., Clercq A. D., Seurinck J., Leemans J., Damme J. V., Segura M., Gheysen G., Montagu M. V., Vandekerckhove J., (1988), Plant Physiol., 859-866.
27. Hellekant G., (1994), in: *Thaumatococcus*, Eds. Witty M., Higginbotham J. D., 99-113.
28. Patent: US 5346998; 13.09.1994 XR.
29. Adesina S. K., (1994), in: *Thaumatococcus*, Eds. Witty M., Higginbotham J. D., 19-34.
30. Witty M., (1994), in: *Thaumatococcus*, Eds. Witty M., Higginbotham J. D., 171-181.
31. Devereux J., Haerberli P., Smithies O., (1984), NAR, 12, 387-395.
32. Palva I., Lehtovaara P., Kaariainen L., Sibakov M., Cantell K., Schein C. H., Kashiwagi K., Weissmann C., (1983), Gene, 22, 229-235.
33. Illingworth Ch., Larson G., Hellekant G., (1988), Biotechnol. Lett., 10, 587-592.
34. Lopes T. S., Klootwijk J., Veenstra A. E., van der Aar P. C., van Heerikhuizen H., Raue H. A., Planta J., (1989), Gene, 79, 199-206.
35. Edens L., Bom I., Ledebouer A. M., Maat J., Toonen M. Y. Visser Ch., Verrips C. T., (1984), Cell, 37, 629-633.
36. Lee J.-H., Weickmann J. L., Koduri R. K., Ghosh-Dastidar P., Saito K., Blair L. C., Date T., Lai J. S., Hollenberg S. M., Kendall R. L., (1988), Biochemistry, 27, 5101-5107.
37. Peñarrubia L., Kim R., Giovannoni J., Kim S.-H., Fischer R. L., (1992), Bio/Tech., 10, 561-564.

38. Witty M., (1992), *Methods Enzymol.*, 216, 441-447.
39. Matheswaran G., Welander M., Hutchinson J. F., Graham M. W., Richards D., (1992), *J. Plant Physiol.*, 139, 560-568.
40. James D. J., Passey A. J., Barbara D. J., (1990), *Plant Science*, 69, 79-94.
41. Rugini E., Pellegrineschi A., Mencuccini M., Mariotti D., (1991), *Plant Cell Rep.*, 10, 291-295.
42. Dudler R., Mauch F., Reimann C., (1994), in: *Thaumatococcus*, Eds. Witty M., Higginbotham J. D., 193-199.
43. van Loon L. C., (1985), *Plant. Mol. Biol.*, 4, 111-116.
44. Bol J. F., Linthorst H. J. M., Cornelissen B. J. C., (1990), *Annu. Rev. Phytopath.*, 28, 113-138.
45. Woloshuk C. P., Meulenhoff J. S., Sela-Buurlage M., van den Elzen P. J. M., Cornelissen B. J. C., (1991), *Plant Cell*, 3, 619-628.
46. van Loon L. C., van Kammen A., (1970), *Virology*, 40, 199-211.
47. Graham J. S., Burkhart W., Xiong J., Gillikin J. W., (1992), *Plant Physiol.*, 98, 163-165.
48. Rebmann G., Mauch F., Dudler R., (1991), *Plant. Mol. Biol.*, 17, 283-285.
49. Hejgaard J., Jacobsen S., Svendsen I., (1991), *FEBS Lett.*, 291, 127-131.
50. Roberts W. K., Selitrennikoff C. P., (1990), *J. Gen. Microbiol.*, 136, 1771-1778.
51. Singh N. K., Handa A. K., Hasegawa P. M., Bressan R. A., (1985), *Plant Physiol.*, 79, 126-137.
52. Vigers A. J., Wiedemann S., Roberts W. K., Legrand M., Selitrennikoff C., Fritig B., (1992), *Plant Sci.*, 83, 155-161.
53. Sato F., Koiwa H., Sakai Y., Kato N., Yamada Y., (1995), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211, 909-913.
54. Liu D., Raghothama K. G., Hasegawa P. M., Bressan R. A., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1888-1892.
55. Rodrigo I., Vera P., Frank R., Conejero V., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 931-934.
56. King G. J., Turner V. A., Hussey C. E., Wurtele E. S., Lee M., (1988), *Plant Mol. Biol.*, 10, 401-412.
57. Cleveland T. E., Black L. L., (1982), *Plant Physiol.*, 69, 537-542.
58. Peng J. H., Black L. L., (1876), *Phytopathology*, 66, 958-963.
59. Green T. R., Ryan C. A., (1972), *Science*, 175, 776-777.
60. Richardson M., (1977), *Phytochemistry*, 16, 159-169.
61. Richardson M., Valdes-Rodriguez S., Blanco-Labra A., (1987), *Nature*, 327, 432-434.
62. Theerasilp S., Kurihara Y., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 11536-11539.
63. Masuda Y., Nirasawa S., Nakaya K., Kurihara Y., (1995), *Gene*, 161, 175-177.
64. Kurihara Y., (1994), in: *Thaumatococcus*, Eds. Witty M., Higginbotham J. D., 1-18.
65. Kurihara K., Beidler L. M., (1969), *Nature*, 222, 1176-1179.
66. Yamashita H., Theerasilp S., Aiuchi T., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 15770-15775.
67. Abe K., Yamashita H., Arai S., Kurihara Y., (1992), *BBActa*, 1130, 232-234.
68. Walters D. E., (1996), *Trends F. Sci. Tech.*, 7, 399-403.

## Plant sweetness-inducing proteins and taste-modifying proteins

### Summary

This work reviews the plant proteins which stimulate the sweet receptor in humans and primates. Identification of the sweet site of thaumatococin is a promising target. Thaumatococin as a sweetener and flavor enhancer has been used in a wide range of foods. Some of recombinant sweet proteins have been expressed in microbes below economically viable levels. Significance of high-quality production of sweet proteins in higher plant is discussed. Thaumatococin and thaumatococin-related family have been characterized.

**Key words:**

sweet proteins, taste-modifying proteins, thaumatin-like proteins.

*Adres do korespondencji:*

Maria Szwacka, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW,  
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa.