



Potencial de las proteínas dulces para su uso en alimentos

Mariana Muñoz Santacruz*, Jocksan I. Morales Camacho y Silvia Luna Suárez

*Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos

Correos electrónicos: mariana.munozsz@udlap.mx • jocksan.morales@udlap.mx

RESUMEN

El incremento de enfermedades crónico-degenerativas ha llevado a buscar alternativas de edulcorantes. Las proteínas dulces constituyen un grupo interesante de edulcorantes de origen natural; actualmente se han identificado seis: taumatina, monelina, mabinlina, brazeína, pentadina, y neoculina. Cada proteína posee diferentes características fisicoquímicas, por lo que su aplicación en alimentos dependerá de la estabilidad que presenten. Sin embargo, la extracción de proteínas dulces de su fuente natural produce bajos rendimientos. La obtención de estas proteínas dulces mediante la expresión heteróloga es una solución alternativa para la producción de proteínas recombinantes. Organismos como bacterias, levaduras y plantas, entre otros, se han estudiado para llevar a cabo esta expresión. La selección del sistema de expresión repercutirá en el rendimiento y los costos de producción. En esta revisión, se analizan varias estrategias de bioingeniería que han sido utilizadas para obtener proteínas dulces con altos rendimientos. Asimismo, este artículo presenta estudios recientes relacionados con las proteínas dulces, exponiendo sus características fisicoquímicas, efectos sobre la salud y posibles aplicaciones como edulcorantes no calóricos en la industria alimentaria.

Palabras clave: edulzante natural, proteínas dulces, proteínas recombinantes, expresión heteróloga, biorreactor.

ABSTRACT

The increase in chronic degenerative diseases has led to the search for alternative sweeteners. Sweet proteins constitute an interesting group of sweeteners of natural origin; currently six have been identified (thaumatin, monellin, mabinlin, brazzein, pentadin, and neoculin), each of which has different physicochemical characteristics, so their application in food will depend on their stability. However, when extracting sweet proteins from their natural source, low yields are obtained. Obtaining sweet proteins by heterologous expression is an alternative solution for the production of recombinant proteins. Organisms such as bacteria, yeast, plants, among others, have been studied to carry out heterologous expression. The selection of the expression system will have an impact on yield and production costs. Several bioengineering strategies that have been used to obtain sweet proteins with high yields are analyzed in this review. Moreover, this article presents recent studies related to sweet proteins, exposing their physicochemical characteristics, health effects and possible applications, as non-caloric sweeteners, in the food industry.

Keywords: natural sweetener, sweet proteins, recombinant proteins, heterologous expression, bioreactor.

INTRODUCCIÓN

El aumento global de enfermedades como la obesidad y diabetes *mellitus* ha llevado a la búsqueda de edulcorantes naturales saludables, que tengan un bajo o nulo aporte calórico y que posean un alto poder edulcorante. En la actualidad se han identificado seis proteínas de sabor dulce: brazeína, taumatina, monelina, neoculina, mabinlina y pentadina (Neiers *et al.*, 2016; Sharififar *et al.*, 2022). Así, el uso de proteínas dulces como edulcorantes naturales representa una nueva oportunidad para el consumo en pacientes diabéticos y aquellos con requerimientos nutricionales especiales, gracias a lo cual se pueden evitar los posibles efectos no deseados que se presentan al consumir azúcares naturales. Sin embargo, la extracción de proteínas dulces de su fuente natural resulta difícil, ya que estas fuentes a menudo son limitadas y la concentración del producto deseado generalmente es baja; por ello, se ha optado por hacer uso de la ingeniería genética (Tripathi y Shrivastava, 2019). Una de las ramas más importantes de la ingeniería genética es la expresión de proteínas recombinantes mediante sistemas de expresión biológica (Karbalaei *et al.*, 2020), los cuales se utilizan para la síntesis de proteínas heterólogas con importancia en diversos campos industriales (Gomes *et al.*, 2016). Distintos estudios encaminados a la producción de proteínas recombinantes han logrado que el rendimiento de la producción de proteínas se incremente, lo que permite su producción a escala industrial, utilizando como sistema de expresión bacterias, células de mamíferos, levaduras, células de insectos, plantas y animales transgénicos. Por ejemplo, la bacteria *Escherichia coli* ofrece una tasa de crecimiento rápida con un alto rendimiento del producto. Sin embargo, las bacterias tienen una maquinaria postraducciona muy limitada, lo cual puede afectar la estructura y, por tanto, la funcionalidad de las proteínas obtenidas. En contraste, las levaduras son capaces de realizar modificaciones postraduccionales (PTM) y de obtener proteínas recombinantes a gran escala con bajos requerimientos de crecimiento. Actualmente, las levaduras *Sac-*

charomyces cerevisiae y *Pichia pastoris* son los sistemas más utilizados para la producción de proteínas. Las líneas celulares de mamíferos son otro tipo de sistema de expresión que se han utilizado para la producción de fármacos; desafortunadamente, representan una alternativa de producción de proteínas costosa debido a los procesos de extracción y purificación requeridos. Por lo tanto, es muy importante llevar a cabo la evaluación de cada una de las condiciones de expresión de cada proteína recombinante en conjunto con el desarrollo de bioprocesos efectivos (Tripathi y Shrivastava, 2019).

El presente artículo aborda diversos estudios realizados sobre las proteínas dulces, en el que se describen sus características fisicoquímicas, sus efectos en la salud y sus posibles aplicaciones como endulzantes no calóricos en la industria de los alimentos. Asimismo, se describirán diversas estrategias de bioingeniería que se han empleado para obtener proteínas dulces con altos rendimientos.

1. Proteínas dulces

El consumo excesivo de azúcar ha ocasionado varios efectos indeseables para la salud de los consumidores, lo que ha llevado a sectores industriales alimenticios y a las autoridades reguladoras a realizar esfuerzos conjuntos para reducir las prácticas de consumo de azúcar en todo el mundo (Murasugi, 2010). Esto ha originado la necesidad de buscar sustitutos del azúcar que puedan reducir la ingesta de calorías. Asimismo, los edulcorantes bajos en calorías resultan ser una nueva oportunidad para el consumo en pacientes diabéticos y pacientes con requerimientos dietéticos específicos (Neiers *et al.*, 2016), ya que no provocan una demanda de insulina, a diferencia de la sacarosa, que sí lo requiere (Rega *et al.*, 2015). Además, este tipo de edulcorantes no se han asociado con el desarrollo de caries dental (García-Almeida *et al.*, 2013).

Los productos generados para reemplazar el uso de carbohidratos son conocidos como edulcorantes o sustitutos del azúcar (Stephens-Camacho *et al.*, 2018). Sin embargo, para que un edulcorante sea considerado eficiente, requiere cumplir

varios criterios: ser efectivos a bajas concentraciones, mantener su estabilidad y dulzor a diferentes temperaturas, tener un valor calórico bajo o nulo, ser compatible con las formulaciones, no mostrar variaciones de un lote a otro y, finalmente, ser baratos y fácilmente disponibles (Sharififar *et al.*, 2022).

La investigación y el desarrollo de nuevos edulcorantes bajos en calorías son de gran interés para la sociedad debido al aumento de enfermedades ligadas al alto consumo de azúcar, como la obesidad, la hiperglucemia y enfermedades metabólicas (Gramazio *et al.*, 2022). Esto ha conducido al desarrollo y síntesis de edulcorantes no nutritivos (ENN), mismos que poseen un mayor poder dulzor y un menor contenido calórico en comparación con los edulcorantes calóricos, como la sacarosa o el jarabe de maíz (García-Almeida *et al.*, 2013; Stephens-Camacho *et al.*, 2018). Existen dos tipos de ENN: los artificiales, que son sintetizados químicamente, como la sacarina, el aspartame y la sucralosa; y los de origen natural, como el esteviol y la taumatina, que son derivados de plantas y presentan una elevada

capacidad para conferir sabor dulce en contraste con el azúcar de mesa o sacarosa (Stephens-Camacho *et al.*, 2018). Desgraciadamente, el uso de edulcorantes artificiales se ha relacionado con el desarrollo de trastornos metabólicos y la síntesis de potentes precursores cancerígenos (Sharififar *et al.*, 2022). Por otra parte, las proteínas dulces son moléculas con alto poder endulzante, que constituyen un grupo interesante de edulcorantes naturales (Szwacka *et al.*, 2012; Neiers *et al.*, 2016) que pueden ser utilizados en la industria de bebidas carbonatadas, *snacks*, confitería, entre otros alimentos (Kant, 2005).

En la actualidad, se han identificado seis proteínas dulces aisladas de fuentes vegetales naturales: brazeína, taumatina, monelina, neoculina, mabinlina y pentadina (véase la tabla I), las cuales son mucho más dulces que la sacarosa y son extraídas de plantas que crecen en las selvas tropicales (Neiers *et al.*, 2016; Sharififar *et al.*, 2022). Estas plantas constan de alrededor de 50 a 200 aminoácidos y poseen un rango de peso molecular aproximado de 6,500 a 30,000 Da. (Szwacka *et al.*, 2012).

Tabla I. Características de diferentes proteínas dulces

Proteína dulce	Dulzura	Aminoácidos	Fuente natural	Distribución geográfica
Taumatina	2,000 x	207	<i>Thaumatococcus daniellii</i> Benth	África occidental
Monelina	3,000 x	44 (Cadena A) / 50 (Cadena B)	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>	África occidental
Mabinlina	100 x	33 (Cadena A) / 72 (Cadena B)	<i>Capparis masaikai</i> Levi	China
Brazeína	2,000 x	54	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon	África occidental
Pentadina	500 x	54	<i>Pentadiplandra brazzena</i> Baillon	África occidental
Neoculina	550 x	114	<i>Curculigo latifolia</i>	Malasia

Fuente: elaboración propia, con información de Szwacka *et al.* (2012) y Joseph *et al.* (2019).

Sin duda alguna, el alto poder edulcorante que poseen las proteínas dulces en conjunto con su estabilidad, son dos de las razones por las que dichas proteínas resultan sumamente interesantes para su posible aplicación industrial (Szwacka *et al.*, 2012).

De acuerdo con la FDA, en Estados Unidos y Japón, en conjunto con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la taumatina se ha comercializado desde la década de 1990 como edulcorante bajo en calorías y modificador del sabor con varios nombres comerciales como Talin® y San Sweet T-100®. Asimismo, el acuerdo sobre el uso de aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, publicado en 2012 en el Diario Oficial de la Federación, emitido por la Secretaría de Salud, reconoce a la taumatina como un edulcorante permitido en México. A continuación, se describirán las propiedades fisicoquímicas de las proteínas dulces.

1.1. Taumatina

La taumatina es una mezcla de dos proteínas (taumatina I y II) que son aisladas de la fruta de Katemfe (*Thaumatococcus daniellii* Benth) (DuBois y Prakash, 2012), la cual pertenece a la familia Marantaceae (Joseph *et al.*, 2019) y se encuentra comúnmente en las selvas tropicales de África occidental, desde Sierra Leona hasta la República Democrática del Congo (Joseph *et al.*, 2019). Posee un dulzor aproximado 2,000 veces mayor que el de la sacarosa (en peso) (DuBois y Prakash, 2012) y está conformada por 207 aminoácidos. En su estructura presenta ocho puentes disulfuro que le confieren estabilidad en medios ácidos (DuBois y Prakash, 2012; Joseph *et al.*, 2019). Su peso molecular es de 22 kDa (DuBois y Prakash, 2012). Actualmente, la taumatina es la única proteína dulce aprobada por la FDA y es comercializada bajo los nombres de Talin® y San Sweet T-100® (DuBois y Prakash, 2012; Sharififar *et al.*, 2022).

Una vez extraída, se presenta como un sólido con una solubilidad en agua del 60 % a 25 °C. Se ha reportado que es estable en polvo seco o en solución acuosa en un rango de pH de 3.0 a 6.0 (DuBois y Prakash, 2012). De acuerdo con Joseph-Jewel *et al.* (2019), la proteína se mantiene estable durante procesos térmi-

cos como la pasteurización, el enlatado, el horneado y el procesamiento a temperaturas ultraaltas en valores de pH inferiores a 5.0. Sin embargo, al calentar la proteína por encima de 70 °C en un pH de 7.0, existe una pérdida de dulzor (Joseph *et al.*, 2019), lo que reduce sus posibles aplicaciones en alimentos procesados térmicamente o en alimentos ácidos. La taumatina exhibe sabores amargos y similares al regaliz, así como un inicio marcadamente tardío y una persistencia de la dulzura muy pronunciada (DuBois y Prakash, 2012).

Estudios realizados por la FAO y la OMS afirman que la proteína dulce está libre de efectos tóxicos, mutagénicos, genotóxicos o teratogénicos; asimismo, no ha mostrado reacciones adversas en estudios con animales y humanos, por lo que ya ha sido aprobada por la FDA para su uso como aditivo alimentario (Joseph *et al.*, 2019; Sharififar *et al.*, 2022).

1.2. Monelina

La monelina es una proteína aislada de frutas u hojas de la planta *Dioscoreophyllum cumminsii* (Frag *et al.*, 2022), conocida como la baya de la serendipia, originaria de África occidental. La monelina tiene un peso molecular de 11.4 kDa (Frag *et al.*, 2022) y se compone de dos subunidades (A y B) unidas de forma no covalente; la cadena A contiene 44 residuos de aminoácidos y la cadena B, 50. Al desnaturalizar dicha unión ocurre una pérdida de dulzor (Sharififar *et al.*, 2022). El poder endulzante de la monelina es 3,000 veces mayor que la sacarosa, pero es menos dulce que la taumatina y la brazeína (Frag *et al.*, 2022). La sensación dulce de la proteína llega lentamente hacia los receptores y posee un sabor persistente. Sin embargo, se ha observado una pérdida significativa de dulzura al encontrarse en un pH inferior a 2.0 y superior a 9.0; por ello, el uso de la monelina está limitado debido a su baja estabilidad y alta propensión a la agregación en pH neutro (Frag *et al.*, 2022). En consecuencia, se han realizado modificaciones estructurales con la finalidad de mantener la estabilidad y mejorar moderadamente la resistencia en pH alcalino y temperaturas elevadas, aunque no lo suficiente para emplearse en procesos que requieran altas temperaturas (Frag *et al.*, 2022).

1.3. Mabinlina

La mabinlina es una proteína que se deriva de las semillas maduras de la planta china de *Capparis masai* kai Levi, comúnmente conocida como *mabinlang* (Sharififar *et al.*, 2022). Está formada por dos cadenas polipeptídicas A y B; la primera contiene 33 aminoácidos y la segunda, 72, las cuales están estrechamente unidas mediante una interacción no covalente. La mabinlina tiene cuatro isoformas (MBL I, II, III, IV) (Faray *et al.*, 2022); la forma II se considera la isoforma más dulce (400 veces más que la sacarosa en peso) (Sharififar *et al.*, 2022).

En comparación con las seis proteínas dulces caracterizadas, la mabinlina es la molécula que posee la mayor termoestabilidad, pues tolera hasta 80 °C por periodos superiores a una hora, además de presentar una alta resistencia a los ácidos (Sharififar *et al.*, 2022). Su estabilidad térmica difiere de la de otras proteínas de sabor dulce, lo cual se atribuye a la presencia de cuatro puentes disulfuro (Faray *et al.*, 2022). La mabinlina tiene un sabor astringente-dulce, lo que permite enmascarar el amargor de los compuestos vegetales; asimismo, es fácilmente soluble en agua (Sharififar *et al.*, 2022). En la actualidad, la mabinlina no se utiliza como edulcorante en la producción de alimentos ya que no ha sido aprobada por la FDA (Sharififar *et al.*, 2022).

1.4. Brazeína

La brazeína es la proteína aislada más pequeña (Faray *et al.*, 2022); se deriva del fruto de la planta trepadora *Pentadiplandra brazzeana* Baillon, originaria de África occidental (Sharififar *et al.*, 2022). Esta planta produce bayas globulares rojas de aproximadamente dos pulgadas de diámetro, que contienen de una a cinco semillas rodeadas por una gruesa capa de pulpa (Faray *et al.*, 2022). La brazeína se encuentra en la pulpa que rodea las semillas. Una vez extraída, se presenta como un sólido blanco con buena solubilidad en agua; además, es estable como polvo seco y en un amplio rango de pH, de 2.5 a 8.0 (DuBois y Prakash, 2012). Posee una masa molecular de 6.4 kDa y un punto isoeléctrico de 5. Es una proteína monomérica que consta de 54 residuos de aminoácidos con ocho cisteínas y cuatro enlaces disulfuro que le confieren la estabilidad térmica (Faray *et al.*, 2022).

Su sabor es similar al de la sacarosa y carece de regusto metálico, lo que reduce eficazmente el resabio de otros sustitutos del azúcar cuando se usan en combinación (Sharififar *et al.*, 2022). Sin embargo, la detección inicial del sabor es significativamente lenta (Sharififar *et al.*, 2022). La brazeína es 500 veces más dulce que la solución de sacarosa al 10 % y 2,000 veces más dulce que la solución de sacarosa al 2 % (Neiers *et al.*, 2021). Asimismo, presenta alta hidrosolubilidad y alta termoestabilidad, y es capaz de mantener su dulzor ante diferentes condiciones de temperatura y pH; dichas propiedades la convierten en una proteína altamente compatible con diferentes matrices alimentarias (Neiers *et al.*, 2016).

En consecuencia, la brazeína resulta ser una de las proteínas con mayor valor y potenciales aplicaciones industriales debido a su estabilidad, potencia de sabor y propiedades fisicoquímicas, entre otras. Sin embargo, actualmente no está aprobada por la FDA para ninguna aplicación en alimentos o bebidas (DuBois y Prakash, 2012; Faray *et al.*, 2022; Sharififar *et al.*, 2022).

1.5. Pentadina

La pentadina es una proteína que se obtiene de la misma planta de la que se extrae la brazeína (*Pentadiplandra brazzeana* Baillon), con la diferencia de que la pentadina se extrae del fruto deshidratado por calor, mientras que la brazeína se extrae del fruto fresco (Faray *et al.*, 2022). Tiene un peso molecular de 12 kDa y su intensidad de dulzura se estima 500 veces la de la sacarosa, con una similitud a la monelina (Faray *et al.*, 2022); asimismo, es soluble en agua (Kashani-Amin *et al.*, 2021; Sharififar *et al.*, 2022). Debido a su relación con la brazeína, la pentadina parece ser la forma reticulada no nativa de la brazeína, aunque difiere en su peso molecular (que es casi el doble). Sin embargo, su dulzor se reduce significativamente en comparación con el de la brazeína (Faus, 2000; Faray *et al.*, 2022). La estabilidad de la pentadina se debe principalmente a la presencia de ciertos aminoácidos como el ácido aspártico, el ácido glutámico, la tirosina, la lisina, la arginina y la prolina, en su mayoría. En consecuencia, esta proteína es altamente resistente a una temperatura de 100 °C por periodos de aproximadamente cinco horas

(Kashani-Amin *et al.*, 2021; Sharififar *et al.*, 2022). Del mismo modo, es capaz de conservar su sabor aun cuando se desnaturaliza químicamente, por lo que puede resultar más estable en comparación con otras proteínas dulces como la taumatina y la brazeína (Farag *et al.*, 2022).

1.6. Neoculina

La neoculina, también llamada curculina, se aísla de los frutos de *Curculigo latifolia* (Farag *et al.*, 2022). Se compone de 114 residuos de aminoácidos, posee un peso molecular de 12 kDa y un poder endulzante hasta 550 veces superior al de la sacarosa (Farag *et al.*, 2022; Sharififar *et al.*, 2022). Esta proteína tiene dos subunidades diferentes con dos puentes disulfuro que son necesarias para su actividad (Sharififar *et al.*, 2022); es decir, si dichas estructuras llegasen a desnaturalizarse, la proteína perdería su nivel de dulzor y su estabilidad. La neoculina resiste temperaturas de hasta 50 °C por periodos cortos de aproximadamente una hora; asimismo, es estable en un amplio rango de pH, de 3 a 11 (Farag *et al.*, 2022; Sharififar *et al.*, 2022). Aunque no ha sido aprobada en Estados Unidos, está reconocida como un aditivo alimentario seguro en Japón, por lo que se ha incluido en la lista de aditivos alimentarios permitidos por el Ministerio de Salud y Bienestar de ese país (Bahadur y Pal, 2020).

2. Proteínas y su efecto endulzante

Entre las cinco modalidades básicas de sabor (dulce, umami, amargo, salado y ácido), el dulce es uno de los principales determinantes en la elección de la dieta (Laffitte *et al.*, 2014). A principios de la década de los 2000, se descubrió que la detección del dulce está mediada por un solo receptor compuesto por dos subunidades: T1R2 y T1R3 (Laffitte *et al.*, 2014). Estas fungen como receptores específicos para la detección del sabor dulce con una acción amplia; es decir, son capaces de responder a todos los estímulos de sabor dulce producidos por moléculas como azúcares naturales (glucosa y sacarosa), aminoácidos dulces (como la glicina), edulcorantes artificiales (sacarina y

acesulfame) y proteínas de sabor dulce (Calderón, 2011; Puebla, 2011; Liu *et al.*, 2012; Laffitte *et al.*, 2014). Dichos receptores gustativos convierten la estructura química de una molécula dulce en una respuesta bioquímica que se propaga a la corteza cerebral, donde la actividad de las neuronas refleja la percepción cognitiva (Max y Meyerhof, 2008).

En la figura 1 se puede observar el modelo del receptor de sabor dulce y las subunidades T1R2 y T1R3. Ambos poseen un dominio Venus atrapamoscas (VFT) conectado a un dominio helicoidal transmembrana (TMD). El VFT se compone de dos lóbulos separados por una gran hendidura, en la que se unen la mayoría de los edulcorantes; asimismo, posee un dominio corto rico en cisteína, que conecta la depleción aguda de triptófano (ATD) con la característica del dominio transmembrana α -helicoidal (Laffitte *et al.*, 2014).

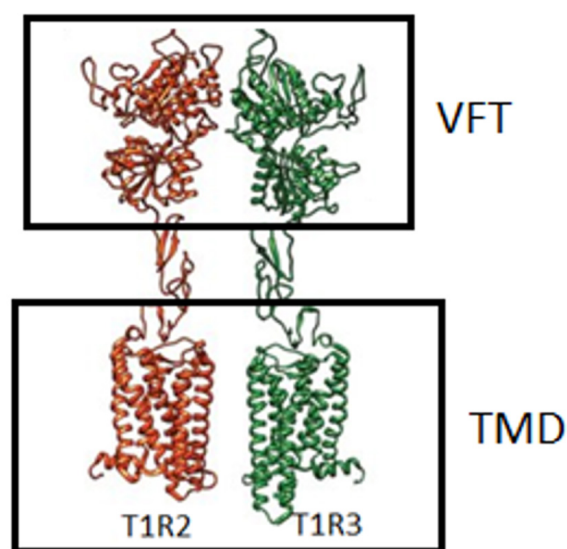


Figura 1.

Modelo del receptor de sabor dulce. Adaptada de Laffitte *et al.* (2014).

La activación del receptor del sabor dulce en las papilas gustativas induce una cascada de transducción intracelular que conduce a la despolarización de las células receptoras del gusto; esto genera un potencial de acción y da lugar a la liberación de trifosfato de adenosina (ATP) como transmisor para activar las aferentes gustativas (Laffitte *et al.*, 2014; Calderón, 2019). Experimentos realizados por Behrens-Maik (2011) demostraron que las proteínas dulces son capaces de activar los receptores T1R2 y T1R3, por lo que pueden ser percibidas por humanos, simios y monos (Liu *et al.*, 2012).

3. Producción biotecnológica de proteínas dulces

La producción de proteínas recombinantes surgió a principios de la década de 1980 con el desarrollo de herramientas de ingeniería genética. Esta tecnología representa una alternativa eficiente a la extracción de proteínas a partir de fuentes naturales, pues el aislamiento de proteínas, especialmente de fuentes vegetales, puede resultar costoso, complejo y prolongado. En este sentido, la expresión heteróloga proporciona una alternativa conveniente que permite la producción a gran escala de proteínas vegetales en diferentes organismos (Yesilirmak y Sayers, 2009; Karbalaee *et al.*, 2020).

Las proteínas recombinantes han alcanzado un mercado sustancioso, con un valor de 1,654 millones de dólares en 2016. Entre los sistemas disponibles para realizar la expresión heteróloga, las levaduras se han utilizado para producir una amplia variedad de proteínas aplicadas a productos químicos, combustibles, alimentos y productos farmacéuticos; por ello, constituyen uno de los huéspedes más utilizados para la producción de proteínas recombinantes (Vieira Gomes *et al.*, 2018). Las técnicas de ingeniería genética se aplican en la biosíntesis de proteínas a gran escala para su uso en las industrias biofarmacéutica, alimentaria, de diagnóstico y médica. Sin embargo, es necesario emprender un trabajo extenso para abordar los desafíos técnicos en la producción microbiana de proteínas de sabor dulce a granel (Murasugi, 2010).

3.1. Sistemas de producción de proteínas dulces

La producción de alto nivel de proteínas a partir de huéspedes modificados proporciona una alternativa a la extracción de proteínas desde fuentes naturales, puesto que estas suelen ser limitadas y la concentración del producto deseado generalmente es baja; esto hace que su obtención sea muy costosa o, incluso, imposible. Además, la extracción puede conllevar el peligro de contaminación tóxica o infecciosa, dependiendo del origen natural de la proteína (Mattanovich *et al.*, 2012). La expresión heteróloga implica la identificación de genes y la transferencia de los fragmentos de ADN correspondientes a huéspedes distintos de la fuente original que son modificados genéticamente para la síntesis de las proteínas codificadas (Yesilirmak y Sayers, 2009).

Algunas proteínas recombinantes aprobadas hasta mediados de 2018 incluyen anticuerpos monoclonales, hormonas, enzimas, vacunas y una proteína dulce. Asimismo, los avances en el área de producción de proteínas recombinantes han cambiado, permitiendo la producción de tales proteínas a escala industrial (Porro *et al.*, 2005; Mattanovich *et al.*, 2012; Tripathi y Shrivastava, 2019). La producción de proteínas recombinantes se lleva a cabo mediante sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos, tales como células de mamíferos, bacterias, levaduras, células de insectos y plantas transgénicas, que son capaces de generar estas proteínas tanto a escala de laboratorio como a gran escala (Joseph *et al.*, 2019; Tripathi y Shrivastava, 2019).

La brazeína se ha obtenido mediante diversos sistemas de expresión como *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces fragilis*. Sin embargo, la expresión en la bacteria *E. coli* dificultó la purificación; en la bacteria *L. lactis* se obtuvo un bajo rendimiento, mientras que en la levadura *P. pastoris* se requirió de un procedimiento de purificación más complejo (Hung *et al.*, 2019). Asimismo, la expresión de la taumatina se ha llevado a cabo en diferentes microorganismos como *E. coli*; no obstante, el rendimiento de la proteína

fue bajo y el producto obtenido no logró estimular al receptor de sabor dulce debido a la ausencia de modificaciones postraduccionales y a un mal plegamiento. Se logró obtener un rendimiento de 100 mg/L de taumatina a partir de la levadura *Hansenula polymorpha*, aunque la levadura *P. pastoris* también demostró capacidad para producir altas concentraciones de brazeína (Joseph *et al.*, 2019). Así, para la selección de un sistema de expresión se deben conocer las propiedades estructurales necesarias para que la proteína ejerza su función biológica, puesto que las modificaciones postraduccionales —como la glicosilación, la formación de enlaces disulfuro, la fosforilación o el procesamiento proteolítico— están involucradas en los procesos de plegamiento, estabilidad y función correcta de la proteína. En consecuencia, generalmente se eligen sistemas de expresión eucarióticos, ya que las bacterias actualmente no pueden incorporar tales modificaciones (Porro *et al.*, 2005; Overton, 2014; Neiers *et al.*, 2016; Tripathi y Shrivastava, 2019).

Las levaduras son organismos capaces de realizar modificaciones postraduccionales (Tripathi y Shrivastava, 2019), así como características eucarióticas que incluyen una vía secretora que conduce al correcto procesamiento de proteínas y modificaciones postraduccionales (Mattanovich *et al.*, 2012). La existencia de sistemas de expresión eucariotas, como el tabaco, proporciona un sistema económico. Lamphear-Barry *et al.* (2005) obtuvieron una alta expresión de brazeína, con acumulación de hasta 4 % de proteína soluble total en semilla de maíz, con una alta intensidad de dulzura (hasta 1,200 veces la de la sacarosa en peso). Sin embargo, el rendimiento es mucho menor en comparación al obtenido en las levaduras, en especial *P. pastoris*.

En la tabla II se pueden observar algunos sistemas de expresión que han sido utilizados para la obtención de las proteínas dulces taumatina y brazeína; además, se observa que el sistema de expresión, en conjunto con las condiciones de crecimiento y expresión (nutrimentales o ambientales), repercuten en el rendimiento de la proteína obtenida; por lo tanto, es fundamental evaluar cada una de las condiciones de cultivo para la expresión de cada proteína recombinante y el desarrollo de bioprocesos efectivos (Tripathi y Shrivastava, 2019).

Tabla II. Expresión heteróloga de proteínas dulces en diversos sistemas

Proteína	Sistema de expresión	Referencias
Taumatina	<i>Pichia pastoris</i>	Joseph <i>et al.</i> (2022)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Illingworth <i>et al.</i> (1988)
	<i>Escherichia coli</i>	Daniell <i>et al.</i> (2000)
Brazeína	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hung <i>et al.</i> (2019)
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Jo <i>et al.</i> (2013)
	<i>Pichia pastoris</i>	Neiers <i>et al.</i> (2016)

Fuente: elaboración propia.

3.2. Bioprocesos para la producción de proteínas dulces
Existen varios parámetros de cultivo como la composición del medio, el pH, la agitación, la aireación, la temperatura, la densidad celular, la concentración de inductores, el tiempo de inducción, así como las estrategias de alimentación, los cuales pueden afectar el nivel de expresión de la proteína según los sistemas de expresión (Tripathi y Shrivastava, 2019). Debido a que los rendimientos se correlacionan en gran medida con la densidad celular, la fermentación es esencial para las proteínas secretadas, y puede realizarse en pequeña escala (en matraz) o en escala industrial (biorreactor) en algunos casos. Sin embargo, el cambio de la expresión en matraces a fermentadores ocasiona un aumento en el rendimiento, que puede ser hasta diez veces más alto que en los matraces (Li *et al.*, 2007). Lo anterior se debe a que

el diseño de los biorreactores asegura la homogeneidad entre los componentes del sistema (medio de cultivo, agente antiespumante, aireación y soluciones amortiguadoras), lo que genera condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado (Ruíz-Leza *et al.*, 2007).
No obstante, las condiciones óptimas de expresión dependerán del huésped y la proteína a expresar. Por ejemplo, en la tabla III se pueden observar las condiciones de cultivo bajo las cuales se ha llevado a cabo la expresión heteróloga de dos proteínas dulces en diferentes sistemas de expresión (bacterias y levaduras); así como el rendimiento que se ha obtenido, recordando que este depende de factores como la composición del medio de cultivo, el tipo de organismo, factores no nutricionales y ambientales.

Tabla III. Obtención de proteínas dulces mediante expresión heteróloga bajo diferentes condiciones de expresión

Proteína	Rendimiento	Sistema de expresión	Condiciones de cultivo	Referencias
Taumatina	67.43 mg/L	<i>Pichia pastoris</i>	Medio BMGY, pH 6.0	Joseph <i>et al.</i> (2022)
	1 mg/L	<i>Bacillus subtilis</i>	4 °C	Illingworth <i>et al.</i> (1988)
	40 mg/L	<i>Escherichia coli</i>	30 °C	Daniell <i>et al.</i> (2000)
Brazeína	57 mg/L	<i>Bacillus licheniformis</i>	Tiempo de expresión: 36 horas	Hung <i>et al.</i> (2019)
	104 mg/L	<i>Kluyveromyces lactis</i>	pH 5.5, 30 °C	Jo <i>et al.</i> (2013)
	345 mg/L	<i>Pichia pastoris</i>	pH 6.0, 29 °C, tiempo de expresión: 96 horas	Neiers <i>et al.</i> (2016)

Fuente: elaboración propia.

4. Aplicaciones potenciales en alimentos

Las posibles aplicaciones alimentarias de las proteínas dulces dependen, en gran medida, de las características fisicoquímicas que presentan, como la estabilidad térmica y la estabilidad ante diferentes valores de pH.

La taumatina actualmente es utilizada como potenciador del sabor, endulzante natural y para enmascarar sabores. Se aplica en productos farmacéuticos para ocultar el sabor amargo de jarabes y soluciones; asimismo, su aplicación puede extenderse a bebidas carbonatadas (Sharififar *et al.*, 2022), productos lácteos fermentados, golosinas en gelatina, helados, productos de cacao y chocolate, productos de confitería, dulces para refrescar el aliento, chicles, edulcorantes de mesa (en forma líquida, en polvo o en tabletas), bebidas saborizadas, *snacks* a base de patata, cereal, harina o almidón, así como complementos alimenticios suministrados en forma sólida, con excepción de los complementos alimenticios para lactantes y niños pequeños (Younes *et al.*, 2021).

Por otro lado, la isoforma II de la mabinlina posee un sabor astringente-dulce, por lo que puede emplearse para enmascarar el amargor de compuestos vegetales (Sharififar *et al.*, 2022). Además, puede utilizarse en alimentos sometidos a procesamiento térmico, como lácteos, alimentos enlatados y preparados farmacéuticos, debido a su alta termoestabilidad.

Otra de las proteínas con múltiples aplicaciones es la brazeína (código de patente: U5326580A). De acuerdo con Hellekant *et al.* (1994), puede emplearse como endulzante en productos como café, té, bebidas carbonatadas, o bien combinarse con otro edulcorante. Además, es posible expresar a la brazeína en embriones de semillas de maíz, lo que abre la posibilidad de

producir cereales preendulzados sin azúcares añadidos (Sharififar *et al.*, 2022).

Debido a que la pentadina es una proteína con características fisicoquímicas similares a la brazeína, se puede deducir que sus aplicaciones pueden ser las mismas. La neoculina tiene una actividad modificadora del sabor, ya que, tras el consumo de soluciones ácidas, se presentará un sabor dulce. Esto permite su uso como agente enmascarador en preparados farmacéuticos (como jarabes, soluciones o emulsiones) (Sharififar *et al.*, 2022). De igual manera, la neoculina ha sido considerada como posible agente endulzante por la empresa The Coca-Cola Company®, de acuerdo con la patente EP1971228A1 (Prakash *et al.*, 2008).

Sin embargo, la monelina posee una limitada aplicación en alimentos procesados debido a la pérdida significativa de dulzura ante diferentes valores de pH (Sharififar *et al.*, 2022). Aunque se han realizado modificaciones estructurales para mantener su estabilidad y resistencia en diferentes valores de pH y temperaturas elevadas, aún no se ha logrado mantener dicha estabilidad (Farag *et al.*, 2022).

CONCLUSIONES

En conclusión, el uso de proteínas dulces como edulcorantes naturales representa una opción viable para la industria. En comparación con la sacarosa, presentan un alto poder endulzante incluso a bajas concentraciones, mantienen su estabilidad fisicoquímica, aportan menos calorías en comparación con la sacarosa y no favorecen la aparición de caries dental, entre otros beneficios.

De igual manera, a lo largo de este artículo de revisión se demostró que es posible obtener proteínas dulces mediante técnicas de bioingeniería, lo que permite incrementar el rendimiento a través del uso de biorreactores. No obstante, se requieren más estudios sobre las condiciones de expresión óptimas, considerando tanto el sistema de expresión como los factores ambientales y nutricionales. En este sentido, resulta necesario emplear modelos de optimización que sean capaces de mejorar el rendimiento obtenido, tomando en consideración los factores antes mencionados para la producción en gran escala de endulzantes proteicos.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) —hoy Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)— y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) por financiar sus estudios de doctorado.

REFERENCIAS

- Daniell, S., Mellits, K. H., Faus, I. y Connerton, I. (2000). Refolding the sweet-tasting protein thaumatin II from insoluble inclusion bodies synthesised in *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 71(1), 105-110. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00151-5)
- DuBois, G. E. y Prakash, I. (2012). Non-caloric sweeteners, sweetness modulators, and sweetener enhancers. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 353-380. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101236>
- Farag, M. A., Rezk, Mona. M., Hamdi Elashal, M., El-Araby, M., Khalifa, S. A. M. y El-Seedi, H. R. (2022). An updated multifaceted overview of sweet proteins and dipeptides as sugar substitutes; the chemistry, health benefits, gut interactions, and safety. *Food Research International*, 162, 111853. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111853>
- Faus, I. (2000). Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(2), 145-151. <https://doi.org/10.1007/s002530050001>
- García-Almeida, J. M., Casado Fdez, G. M. y García Alemán, J. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 17-31.
- Gomes, A., Byregowda, S., B M, V. y Vinayagamurthy, B. (2016). An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4, 346-356. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>
- Gramazio, S., Trauth, J., Bezold, F., Essen, L.-O., Taxis, C. y Spadaccini, R. (2022). Light-induced fermenter production of derivatives of the sweet protein monellin is maximized in prestationary *Saccharomyces cerevisiae* cultures. *Biotechnology Journal*, 17(8), 2100676. <https://doi.org/10.1002/biot.202100676>
- Hellekant, B. G. y Ming, D. (1994). *Brazzein sweetener* (United States Patent N.º US5326580A). <https://patents.google.com/patent/US5326580A/en>

- Hung, C.-Y., Cheng, L. H. y Yeh, C. M. (2019). Functional expression of recombinant sweet-tasting protein brazzein by *Escherichia coli* and *Bacillus licheniformis*. *Food Biotechnology*, 33(3), 251-271. <https://doi.org/10.1080/08905436.2019.1618323>
- Illingworth, C., Larson, G. y Hellekant, G. (1988). Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 10(8), 587-592. <https://doi.org/10.1007/BF01027135>
- Jo, H. J., Noh, J. S. y Kong, K. H. (2013). Efficient secretory expression of the sweet-tasting protein brazzein in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expression and Purification*, 90(2), 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.05.001>
- Joseph, J. A., Akkermans, S., Nimmegeers, P. y Van Impe, J. F. M. (2019). Bioproduction of the recombinant sweet protein thaumatin: current state of the art and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00695>
- Joseph, J. A., Akkermans, S. y Van Impe, J. F. M. (2022). Effects of temperature and pH on recombinant thaumatin II production by *Pichia pastoris*. *Foods*, 11(10), article 10. <https://doi.org/10.3390/foods11101438>
- Kant, R. (2005). Sweet proteins-Potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutrition Journal*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-4-5>
- Karbalaeei, M., Rezaee, S. A. y Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), 5867-5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Kashani-Amin, E., Faraji, H., Nouriyengejeh, S. y Ebrahim-Habibi, A. (2021). Structure-sweetness relationship of sweet proteins: a systematic review on «sweet protein» studies as a sub-group of «sweetener» investigations. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 76(4), 175-190. <https://doi.org/10.3103/S0096392521440012>
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X., Ilangoan, K., Suzara, V., Duzgunes, N. y Renu-gopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 142, 105-124. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0003-x>
- Murasugi, A. (2010). Secretory expression of human protein in the Yeast *Pichia pastoris* by controlled fermentor culture. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(2), 153-166. <https://doi.org/10.2174/187220810791110679>
- Neiers, F., Belloir, C., Poirier, N., Naumer, C., Krohn, M. y Briand, L. (2021). Comparison of different signal peptides for the efficient secretion of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Pichia pastoris*. *Life*, 11(1), article 1. <https://doi.org/10.3390/life11010046>
- Neiers, F., Naumer, C., Krohn, M. y Briand, L. (2016). The recent development of a sweet-tasting brazzein and its potential industrial applications, 1-20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26478-3_2-1
- Prakash, I., Dubois, G. E., Jella, P., King, G. A., Miguel, R. I. S., Sepcic, K. H., Weerasinghe, D. K. y White, N. R. (2008). *Natural high-potency sweetener compositions with improved temporal profile and/or flavor profile, methods for their formulation, and uses* (European Union Patent N.o EP1971228A1). <https://patents.google.com/patent/EP1971228A1/en>
- Rega, M. F., Di Monaco, R., Leone, S., Donnarumma, F., Spadaccini, R., Cavella, S. y Picone, D. (2015). Design of sweet protein based sweeteners: hints from structure-function relationships. *Food Chemistry*, 173, 1179-1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.151>
- Sharififar, F., Ashrafzadeh, A. y Khanaman, M. (2022). A review of natural peptide

- sweeteners. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28. <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10464-4>
- Stephens-Camacho, N., Valdez-Hurtado, S., Zavala, G. e Ibarra, L. (2018). Consumo de edulcorantes no nutritivos: efectos a nivel celular y metabólico. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 20, 185-202. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.v20n2a06>
- Szwacka, M., Burza, W., Zawirska-Wojtasiak, R., Gośliński, M., Twardowska, A., Gajc-Wolska, J., Kosieradzka, I. y Kielkiewicz, M. (2012). Genetically modified crops expressing 35S-thaumatococcus II transgene: sensory properties and food safety aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00178.x>
- Tripathi, N. K. y Shrivastava, A. (2019). Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00420>
- Vieira Gomes, A. M., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F. y Parachin, N. S. (2018). Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms*, 6(2), article 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020038>
- Yesilirmak, F. y Sayers, Z. (2009). Heterologous expression of plant genes. *International Journal of Plant Genomics*, 2009, 296482. <https://doi.org/10.1155/2009/296482>
- Younes, M., Aquilina, G., Castle, L., Engel, K., Fowler, P., Frutos Fernandez, M. J., Fürst, P., Gürtler, R., Gundert-Remy, U., Husøy, T., Manco, M., Mennes, W., Passamonti, S., Moldeus, P., Shah, R., Waalkens-Berendsen, I., Wölfl, D., Wright, M., Batke, M. y Boon, P. (2021). Re-evaluation of thaumatococcus (E 957) as food additive. *EFSA Journal*, 19(11), 1-72. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6884>