

奇异果甜蛋白及其基因工程

孔建强,赵琦,高音,祁晓廷,杨奇志

(首都师范大学生物系,北京 100037)

摘要: 奇异果甜蛋白(thaumatin)是迄今为止最甜的物质之一,对其研究具有很重要的意义。奇异果甜蛋白的生化性质基本清楚,基因序列和氨基酸序列都已测定。它的甜味可能是由奇异果甜蛋白上特定基团和受体结合引起的。对奇异果甜蛋白的生理功能知之甚少。近二十年来,在奇异果甜蛋白的基因工程上取得了一定进展,但仍然存在许多困难。

关键词: 甜味蛋白;奇异果甜蛋白;甜味机理;生理功能;基因工程

中图分类号:Q946

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)02-0232-05

Sweet Protein Thaumatin and It's Genetic Engineering

KONG Jian-Qiang,ZHAO Qi,GAO Yin,QI Xiao-Ting,YANG Qi-Zhi

(The Biological Department of the Capital Normal University,Beijing 100037,China)

Abstract: Thaumatin is one of the sweetest substances known to date, it is important to study the thaumatin. The biochemical properties of thaumatin have been clarified clearly. Thaumatin had been isolated and sequenced. The mechanism of the sweetness of thaumatin may be due to the combination of some special groups and the receptors. The exact function of thaumatin is still not clear. Although gene engineering of thaumatin has been carried out for 20 years, there are still some difficulties to be solved for using in the market.

Key words: sweet-tasting protein; thaumatin; mechanism of sweetness; physiological function; genetic engineering

自 20 世纪 70 年代以来,人们在寻找新型甜味剂方面取得了长足进展。到目前为止,已发现了 7 种甜味蛋白,他们分别是奇异果甜蛋白(thaumatin)、应乐果甜蛋白(monelin)、麦若可林(miraculin)、喷塔汀(pentadin)、仙茅甜蛋白(curculin)、马槟榔甜蛋白(mabinlin)和布鲁赛因(brazzein)^[1]。thaumatin 因其具有高甜度、低热量、无毒安全,不会引起龋齿和肥胖等优点而受到广泛的关注。三十年来,人们对其生化性质、甜味机理、生理功能、基因工程等进行了深入的研究,取得了显著的成就。同时,thaumatin 也被开发成商品,在欧美、日本等市场上销售。近年来,农业科学家试图在马铃薯、玉米、黄瓜和番茄等作物中转入甜味蛋白基因,得到转基因作物,以改善作物口味。

1 thaumatin 的发现历史及生化特性

thaumatin 是从一种叫 *Thaumatococcus daniellii* Benth

的竹芋科(Marabtaeae)植物的果实中提取出来的。1855 年,英国旅非医生 Daniell 首次描述了 *T. daniellii*^[1]。1972 年, van der Wel 等首先从 *T. daniellii* 果实的假种皮中分离出 thaumatin I、II、III^[2]。随后, thaumatin b, c 也被从果实中分离出来^[3]。1988 年, Jar-how Lee 等从 *T. daniellii* 的叶片中分离出 thaumatin A 和 B^[4]。这些蛋白由一个多基因家族编码,具有一些相似的性质,如都是一条多肽链;分子量约为 22kDa,差异很小;氨基酸组成是 207 个,7 种蛋白质在 5 个或更少的氨基酸上表现出差异,这些蛋白质都为碱性蛋白,等电点为 12.0。在这 7 种蛋白质中,含量最丰的是 thaumatin I 和 II,各占假种皮干重的 20%以上。thaumatin I 和 II 分子质量差异很小(thaumatin I, 22.209kDa; thaumatin II, 22.293kDa),氨基酸组成上只有 5 种差异。1979 年, Lyengar 首次对 thaumatin I 进行了测序^[5]。1982 年, Edens 等对 thaumatin II cDNA 进行了测序^[6]。在 thaumatin I

收稿日期:2002-04-03;修回日期:2002-07-16

基金项目:国家自然科学基金(A30070488)资助

作者简介:孔建强(1977-),男,硕士研究生,专业:植物生理生化。Tel:(010)68902375,E-mail:elitekong@sohu.com

通讯作者:赵琦(1949-),女,博士,副教授,专业:植物细胞生理生化。Tel:(010)68981191,E-mail:zhaoci@mail.cnu.edu.cn

和 II 的 N 末端和 C 末端分别有一段长约 22 个氨基酸和 6 个氨基酸的额外多肽, thaumatin 成熟后, 这两段额外多肽都被切除掉了。因 thaumatin I 和 II 在 thaumatin 蛋白家族中具有代表性, 所以现在对 thaumatin 的研究主要集中在 thaumatin I 和 II 中。

thaumatin I 中有 8 个二硫键(9~204, 56~66, 71~77, 121~193, 126~177, 134~145, 149~158, 159~164)^[7]。在一种不大的蛋白质中存在这么多的二硫键, 对蛋白质的高级构象的保持和恢复具有很重要的意义, 这样 thaumatin 在沸水中煮 1 小时以后再冷却, 由于构象的恢复仍然具有甜味。

Etheridge 认为 thaumatin 具有热稳定性^[8]。但 van der Wel 和 Loeve 却发现 thaumatin 在 75℃ 以上加热几分钟后, 甜味会完全消失^[2]。Kaneko 和 Kitabatake 认为, 之所以出现两种互相矛盾的结论, 是因为他们加热的条件不一样, 通过实验他们得出: thaumatin 在酸性条件下的热稳定性比在碱性或中性条件下强^[9]。当 thaumatin 在 pH7 以上加热 15 分钟以后, 他的甜味阈值增加 10 倍以上, 半个小时后, 就检测不到甜味了。而在 pH6.5 以下加热 15 分钟对其甜度无影响, 在 pH2 时, 即便在 80℃ 加热到 4 小时, thaumatin 仍有甜味, 但当加热到 6 小时, 甜味有所下降, 出现了苦涩味。

2 thaumatin 的甜味机理

thaumatin 是一种超甜物质, 按重量计, 其甜度是蔗糖的 2000~3000 倍, 按摩尔计, 其甜度是蔗糖的 10^5 倍。thaumatin 的甜度阈值是 10^{-8} mol/L, 当 thaumatin 的浓度低于 10^{-8} mol/L 的阈值时, 尽管检测不到, 却能选择性地增强其他味道, 如加入 5×10^{-5} % w/v 的 Talin 时, 薄荷味的阈值能下降 90%, 而牛肉膏味 (beef - extract taste) 的阈值只下降 50%^[10]。

thaumatin 和别的甜味剂不一样, 它能在舌头的大部分部位都产生一种持续的甜味感觉, 这种甜味能持续大约 30 分钟, 这种性质使 thaumatin 可能不适合某些人的口味, 因此 Blair 等^[1]通过对 thaumatin 合成基因的定点诱变, 获得某些氨基酸发生替换使回味时间短的 thaumatin, 因而适合更多人的口味。

thaumatin 的阈值与激素和受体的结合阈值 ($10^{-8} \sim 10^{-11}$ mol/L) 相当, 于是有人推测可能是 thaumatin 上特定基团与口腔内的受体结合而引起甜味的。

thaumatin 中的 Lys 残基对 thaumatin 的甜味起着重要的作用。之所以如此, 一是因为影响 thaumatin 甜味的 Lys 残基在非甜类的甜蛋白 (thaumatin-like protein, TLP) 中没有发现; 二是对 thaumatin Lys 残基的 ϵ -NH₃⁺ 进行化学修饰能改变 thaumatin 的甜度。van der Wel 和 Bel 发现, 用乙酸酐将 Lys 残基的氨基乙酰化, 能引起 thaumatin 的甜度下降^[7]。当 thaumatin 中 11 个 Lys 残基中的 3 个被乙酰化时, thaumatin 的甜度会全部消失^[11]。用丁二酸酐去修饰 Lys

残基时, 只要出现一个琥珀酰基, thaumatin 的甜味便下降 50%, 用两个琥珀酰基修饰 Lys 残基时, thaumatin 的甜度便全部消失。Kaneko 也发现, 对 Lys 残基进行磷酸吡哆化 (phosphopyridoxylation), 能显著降低 thaumatin 的甜度^[12]。圆二色谱分析显示, 对 Lys 进行修饰, 并没有改变 thaumatin 的二级结构, 这表明 thaumatin 甜度的下降, 并不是结构破坏的结果。Suami 推测这可能是由于修饰后的 Lys 残基失去了质子供体 (proton donor) 的功能, 从而使 thaumatin 的甜度下降^[7]。而用环己二酮处理 12 个 Arg 残基中的 6 个时, thaumatin 的甜味并没有多少的变化, 看来 Arg 不参与基团与受体的结合^[7]。

此外, 对 thaumatin 的羧基进行酯化, 能消除 thaumatin 的甜味, 而用 NH₄Cl 或碳二亚氨衍生物将羧基酰氨化后, 能显著地增加 thaumatin 的甜度 6 倍, 即相当于蔗糖的 12000 倍, 推测这可能是酯化消除了羧基接受质子的能力, 而酰氨化增强了羧基接受质子的能力^[7]。

1995 年, Sloodstra 发现, 在 thaumatin 的 19~29 和 77~84 两个区域包含一个在空间互相靠近的由 Asp-21 和 Phe-80 形成的类天冬苯丙二肽脂位点^[13]。这是一个重要的甜味决定位点, 这个位点在类甜蛋白中没发现。

除了以上的氨基酸外, 无机盐离子也影响 thaumatin 的甜味, 尤其是 Ca²⁺。一定浓度的 NaCl、磷酸盐或 EDTA 会抑制 thaumatin 的甜味。而且过高或过低的 Ca²⁺ 也都会抑制 thaumatin 的甜味, 推测这可能与 Ca²⁺ 通道或 Ca²⁺ 中介的阳离子通道有关^[14]。而 Ca²⁺ 在甜味传导中发挥十分重要的作用^[15, 16]。

3 thaumatin 的生理功能

现在对 thaumatin 的生理功能还知之甚少, 只能从一些现象来推导出 thaumatin 可能的生理功能。thaumatin 在体内首先翻译成具有 N 末端和 C 末端额外多肽的前体蛋白 (preprothaumatin)。尔后通过翻译后加工, 切除 N 末端和 C 末端额外多肽, 形成成熟的 thaumatin。thaumatin 储存于假种皮类囊状 (vesicle-like) 细胞器中, C 末端的额外多肽可能是进入囊状细胞器的信号肽, 在进入后这一段额外多肽再被切除^[17]。目前只发现少数蛋白, 如虹豆球蛋白 (vicilin) 前体, 烟草中的碱性几丁质酶等蛋白质中有 C 端额外多肽, 推测可能与蛋白质在细胞内的区室化有关^[10]。

thaumatin 在果实成熟过程中会逐渐积累到假种皮干重的 50%, 推测 thaumatin 可能在植物发育过程中发挥作用^[10]。

在 thaumatin 研究的同时, 人们又从小麦、马铃薯、番茄、小麦、大豆等作物中发现了许多和 thaumatin 具很高同源性的类似蛋白, 即所谓的 PR-5 蛋白家族 (pathogenesis-related group 5 proteins), 也叫类甜蛋白^[1]。类甜蛋白受到的诱导因素虽然不同, 但都在植物受到胁迫时表达, 从而增

强植物对逆境的抗性^[1,4]。

4 thaumatin 的基因工程

因 thaumatin 生长条件苛刻,在原产地之外不能结实。因此,通过从 *T. daniellii* 中提取 thaumatin 远远不能满足市场的需要,也使得 thaumatin 的市场价格居高不下。于是人们便把希望寄托在 thaumatin 的基因工程上。迄今为止, Thaumatin 基因已被用来转化了数种微生物、真菌和高等植物,都取得了一定进展。

4.1 thaumatin 在原核生物中的表达

1982年,Edens 等将 preprothaumatin cDNA 基因克隆到大肠杆菌(*E. coli*)中,在半乳糖启动子(lactose)和色氨酸启动子(tryptophan)调控下进行表达,但表达产物不仅产量低(500分子/细胞),且分子质量比预期大,没甜味^[6]。估计是 *E. coli* 不能对前体 thaumatin 进行正确的加工,保留了 N 末端和 C 末端的额外多肽。2000年,Daniell 等通过谷胱甘肽氧化系统(reduced/oxidized glutathione system)对 *E. coli* 中的 thaumatin 重组蛋白进行复性,得到了具有甜味活性的,浓度为 40mg/L 的成熟蛋白^[18]。一般来说,通过基因工程在 *E. coli* 中表达的蛋白常以无活性的,难溶的包含体形式存在。从这个方面来说,Daniell 实验的意义不言而喻。

1988年,Illingworth 将 α -淀粉酶(α -amylase)基因和 thaumatin II cDNA 基因在枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)中进行融合表达,结果不仅产量低,而且表达产物没有活性^[19]。

4.2 thaumatin 在真菌中的表达

thaumatin 在真菌中的表达,主要集中在酵母和丝状真菌。经过研究人员几十年的努力,thaumatin 在真菌中,尤其是在丝状真菌中的产量及蛋白活性都得到了很大提高。

Edens 等将 preprothaumatin cDNA 在甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)启动子调控下转化酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[20]和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)^[21],表达量虽很低(3000分子/细胞),但酵母能准确地切掉 preprothaumatin 的氨基端信号肽。1988年, Lee 根据酵母偏爱密码子,合成了 thaumatin II 基因,转化酵母,在 3-磷酸甘油酸激酶启动子和终止子调控下表达,尽管产量很高(占不溶蛋白的 20%),但不溶^[4]。推测可能是细胞内的还原性环境阻止了二硫键的形成。

此后, Illingworth 在变铅青霉菌(*Streptomyces lividans*)中融合表达 thaumatin^[22], Hahm 在曲霉(*Aspergillus oryzae*)中表达了 thaumatin^[23],遗憾的是产物不仅产量低,而且没有甜味。随后,由于人们对生产重组 thaumatin 的丝状真菌表达系统逐步优化,使得 thaumatin 在丝状真菌中的产量逐步上升。

1997年, Faus 在萎地青霉(*Penicillium roquefortii*)中获得单产为 2mg/L 的 thaumatin^[24]。

1998年, Faus 等将人工合成的 thaumatin II 基因构建表达载体,转入丝状真菌黑曲霉(*Aspergillus niger var. awamori*),获得具甜味的 thaumatin,浓度为 5~7mg/L^[25]。

1999年, Moralejo 等在黑曲霉中,构建不同的 thaumatin 表达盒(expression cassettes),获得的 thaumatin 最高单产能达到 15mg/L^[26]。

2000年, Moralejo 等在黑曲霉中获得单产为 105mg/L 的 thaumatin^[27]。其实,分泌到胞外的 thaumatin 只占 thaumatin 表达总量的一部分。相当一部分重组 thaumatin 积累在胞内。已有试验表明, PDIA (protein disulfide isomerase, 蛋白二硫键异构酶)在蛋白折叠和分泌过程中起重要的作用, Moralejo 把 *pdi* 基因和 *thaumatin* 基因在黑曲霉中进行共表达,得到了单产为 150mg/L 的重组 thaumatin^[28]。

4.3 thaumatin 在植物中的表达

thaumatin 基因除了转化微生物和真菌外,也被用来转入各种植物,从而改进植物的口味。1990年, Witty 首先将 thaumatin II cDNA 克隆到 CaMV 35S 作启动子的穿梭载体 pWIT2 中,然后用毛根转化技术(the hairy root transformation technique),利用 Ri 质粒介导,将 thaumatin II cDNA 转入马铃薯(*Solanum tuberosum* cv. *Iwa*)中获得再生植株,随后的味觉实验表明,整个植株均是甜的,但表达量很低,只有 3×10^{-8} mol/L^[10]。尽管如此, Witty 的工作却具有很深远的意义。首先,这是 *T. daniellii* 的甜味特性第一次在一个高产的温带作物中表达,这使得通过转基因植物大量提取 thaumatin 成为可能。其次, thaumatin 转化马铃薯成功,表明其他作物如草莓、西瓜、猕猴桃、黄瓜和苹果也适于外源 thaumatin 的表达,这为改善各种作物口味提供了可能。此后, thaumatin 基因被成功地转入了黄瓜^[29]、苹果、胡萝卜、桃和草莓等^[30]植物中。在国内,也有人进行了将外源 thaumatin 基因转入国产马铃薯^[31]、烟草^[32,33]等的研究,取得了一些成果。还有人正尝试将 thaumatin 基因转入绞股蓝^[34]和玉米等。

5 研究意义

虽然重组 thaumatin 的研究开发还处在实验室阶段,但对其作进一步的研究有着重要的理论意义和应用价值。

首先, thaumatin 优点多,有望在未来取代蔗糖成为一种新型的甜味剂。

天然 thaumatin 具有蔗糖等其他甜味剂无法比拟的优点:(1) thaumatin 是一种蛋白质,包含多种人体必需氨基酸,营养价值高;(2) thaumatin 甜度高,为等重蔗糖的 3000 倍,用其代替蔗糖用于生产,可大大降低产品的包装、运输费用;(3) thaumatin 代谢产生的热量少,适合于肥胖症、糖尿病、高血压、心血管患者食用;(4) thaumatin 对细菌作用稳定性高,多食不会导致龋齿;(5) thaumatin 能够增进其他食品的口味,可以用来作为食品添加剂;(6) 经过基因改造的 thauma-

tin 回味时间短, 无毒安全, 适合一部分人的口味; (7) thaumatin 还被用来作为猪饲料的添加剂, 显著地增加猪的重量。综上所述, thaumatin 具有很高的营养价值、应用价值和经济价值, 是一种很有前途的甜味剂。

其次, thaumatin 市场前景广阔, 蕴含无限商机^[35]。

thaumatin 产品的开发, 具有很大的商业价值。按甜度计算, 1g thaumatin 相当于 2~3kg 的蔗糖, 以目前市售每 kg 蔗糖 4 元的价格换算, 1kg 的 thaumatin 的价值是 8000~12000 元, 那么 1 t thaumatin 的价值就高达 800~1000 万元。通过基因工程菌得到的表达产物只要达到 1g/L, 就与天然提取的 thaumatin 的生产成本持平。现在的产量达到了 150mg/L 以上, 相信在不久的将来, thaumatin 的产量便会达到 1g/L, 这样, 市场上的 thaumatin 价格便会因为提取成本的降低而下降, 而 thaumatin 便会以其无法比拟的优点吸引更多的人消费。

第三, thaumatin 基因还可以作为标记基因^[10]。

因 thaumatin 的甜味在极短的时间能检测到, 不像传统的标记基因如 NOS、NPT II、CAT、GUS 等那样需要复杂的组培技术和耗时费钱。尤其是应用于大田转基因植物和它们后代时, 这种方法不仅不用制备样品, 而且只要 0.1g 的植物组织便可以测定, 更难得的是未来转基因植物的实际运用者——农民也可运用此法。因此, thaumatin 基因能够用来作为一个快速、简单地检测田间转基因作物的标记基因。

第四, thaumatin 与甜味受体互相结合的研究可深入指示其作用机理, 从而为开发新型甜味剂建立理论基础。thaumatin 与其它甜味蛋白结构明显不同, 却都能产生甜味, 这说明 thaumatin 和受体作用的功能部位是局部的。通过对作为配体的 thaumatin 分子和受体分子互补结构的研究, 可以建立一个互补结构模型, 从而为药物设计和开发建立理论基础。

6 挑战与前景

毋庸置疑, 由于 thaumatin 具有的特点, 国内外对这项研究投入了大量的人力和物力, 取得了长足的进展, 天然提取的 thaumatin 也已被制成商品 (Talin) 投入了市场。但是从 thaumatin 最终被廉价地推向市场, 还面临许多挑战。首先, *T. daniellii* 的生长条件极其苛刻, 不仅要求热带气候, 还要求间作在湿的土壤中; 即便如此, 75% 的花是不结果的, 而且 *T. daniellii* 在原产地之外不能结果, 这些均使得 thaumatin 的提取成本十分昂贵, 也就使得市场上的 thaumatin 价格居高不下, 从而限制了 thaumatin 的广泛使用。其次是生产重组 thaumatin 的技术问题。迄今为止, thaumatin 已在几十种微生物、真菌和植物中进行了重组表达, 表达产物不是产量太低, 就是没有甜味。即便是在表达外源 thaumatin 较好的丝状真菌表达系统中也存在许多诸如外源蛋白分泌、纯化等技术问题。第三, 重组 thaumatin 最终推向市场还必

须经过安全检验, 在审批过程中, 除了对重组 thaumatin 进行毒理学检测之外, 还必须将重组 thaumatin 与天然 thaumatin 进行广泛的比较, 以确定这两类蛋白是否完全一致。最后, 即便重组 thaumatin 最后能够进入市场, 也存在和其他甜味剂争夺市场的问题。重组 thaumatin 的竞争对手不仅有天然的蛋白和其他甜味蛋白, 而且还有一些非蛋白类甜味剂, 如蛇菊苷 (stevioside) 和甘草皂苷 (glycyrrhizin), 这些非蛋白类甜味剂不仅性能好, 而且被广泛使用了许多年^[1]。因此, 最终将重组 thaumatin 廉价安全地推向市场, 任重而道远; 但也必须看到, 现在, 更多的人力和物力已投入到 thaumatin 的研究, 取得了许多成就。相信在不久的将来, 世界上将不会出现因食用含糖甜食而引发的龋齿和肥胖。

参 考 文 献 (References):

- [1] Faus I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(2): 145~151.
- [2] van der Wel H, Loeve K. Isolation and Characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth[J]. Eur J Biochem., 1972, 31: 221~225.
- [3] Higginbotham J D, Hough C A M. In Sensory properties of foods[M]. (Birch G C, Brennan J G, Parker K J, Eds), London. Elsevier Applied Science Press, 1977, pp. 129~149.
- [4] Lee J H, Weickmann J L, Koduri R K, et al. Expression of synthetic thaumatin genes in yeast[J]. Biochemistry, 1988, 27: 5101~5107.
- [5] Lyengar K B, Smits P, van der Ouderaa F J, et al. The complete amino acid sequence of the sweet-tasting protein thaumatin I [J]. Eur J Biochem., 1979, 96: 193~204.
- [6] Edens L, Heslinga L, Klok R, et al. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*[J]. Gene, 1982, 18: 1~12.
- [7] Suami T, Hough L, Machinami T, et al. Molecular mechanisms of sweet taste7: The sweet protein, Thaumatin I [J]. Food Chemistry, 1997, 60(3): 277~285.
- [8] Etheridge K. The sales and marketing of talin. In "Thaumatin" [M]. eds, Witty M. and Higginbotham J D, Boca Raton, Florida. CRC Press, 1994, pp. 47~59.
- [9] Kaneko R, Kitabatake N. Sweetness of sweet-protein thaumatin is more thermoresistant under acid conditions than under neutral or alkaline conditions[J]. Biosci Biotechnol Biochem., 2001, 65(2): 409413.
- [10] Witty M. Thaumatin II - a palatability protein[J]. Trends in Biotechnology, 1990, 8(5): 113~116.
- [11] van der Wel H. Structure-activity relationships in the thaumatin molecule. In "Thaumatin" [M]. eds, M Witty, J D Higginbotham, Boca Raton. CRC Press, 1994, pp. 115~122.

- [12] Kaneko R, Kitabatake N. Structure—sweetness relationship in thaumatin; importance of lysine residues [J]. *Chem Senses*, 2001, 26: 167~177.
- [13] Sloomstra J W, de Geus P, *et al.* Possible active site of the sweet—tasting protein thaumatin [J]. *Chem Senses*, 1995, 20: 535~543.
- [14] 施建科, 叶蕴华, 田桂玲. 有甜味的蛋白质 [J]. *化学通报*, 1998, 8: 21~25.
- [15] Lindemann B. Receptors and transduction in taste [J]. *Nature*, 2001, 413: 219~225.
- [16] Margolskee R F. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction [J]. *J Bio Chem*, 2002, 277(1): 1~4.
- [17] 张初, 吴光耀. 甜蛋白与抗虫蛋白 [J]. *生物学通报*, 1996, 31(9): 8~11.
- [18] Daniell S, Mellits K H, *et al.* Refolding the sweet—tasting protein thaumatin II from insoluble inclusion bodies synthesized in *Escherichia coli* [J]. *Food Chemistry*, 2000, 71: 105~110.
- [19] Illingworth C, Larson G, Hellekant G. Secretion of the sweet—tasting plant protein thaumatin by *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnol. Lett.* 1988, 10: 587~592.
- [20] Edens L, Born I, *et al.* Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast [J]. *Cell*, 1984, 37: 629~633.
- [21] Edens L, van der Wel H. Microbial synthesis of the sweet—tasting plant protein thaumatin [J]. *Trends in Biotechnology*, 1985, 3: 61~63.
- [22] Illingworth C, Larson G, Hellekant G. Secretion of the sweet—tasting plant protein thaumatin by *Streptomyces lividans* [J]. *J Ind Microbiol*, 1989, 4: 37~42.
- [23] Hahn Y T, Batt C A. Expression and secretion of thaumatin in *Aspergillus oryzae* [J]. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(10): 2513~2520.
- [24] Faus I, Patiño C, Del Río J L, *et al.* Expression of a synthetic gene encoding the sweet—tasting protein thaumatin in the filamentous fungus *Penicillium roquefortii* [J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19: 1185~1191.
- [25] Faus I, del Moral C, *et al.* Secretion of the sweet—tasting protein thaumatin by recombinant strains of *Aspergillus niger var. awamori* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49: 393~398.
- [26] Moralejo F J, Cardoza R E, Gutierrez S, *et al.* Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 1168~1174.
- [27] Moralejo F J, Cardoza R E, Gutierrez S, *et al.* Overexpression and lack of degradation of thaumatin in an aspergillopepsin A—defective mutant of *Aspergillus awamori* containing an insertion in the *pepA* gene [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54: 772~777.
- [28] Moralejo F J, Watson A J, Jeenes D J, *et al.* A defined level of protein disulfide isomerase expression is required for optimal secretion of thaumatin by *Aspergillus awamori* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, 266: 246~253.
- [29] Malepszy S, Szwacka M, Hrazdina G. Evaluation of transgenic cucumbers expressing the thaumatin gene, use of agriculturally important genes in biotechnology [C]. *Proceeding of the NATO Advanced Research Workshop, Szeged, Hungary, 17—21 October 1999*, 2000: 131~134.
- [30] Dolgov S V, Lebedev V G, Firsov A P, *et al.* Expression of thaumatin II gene in horticultural crops. Genetics and breeding for crop quality and resistance [C]. *Proceedings of the X V EUCARPIA Congress, Viterbo, Italy, September 20 ~ 25, 1998*, 1999: 165~172.
- [31] 杨美珠, 潘乃穰, 陈章良. 高效马铃薯遗传转化体系的建立及甜蛋白基因的导入 [J]. *植物学报*, 1992, 34(1): 31~36.
- [32] 周平, 潘乃穰, 等. 外源甜蛋白 Thaumatin 基因转入烟草的研究 [J]. *植物学通报*, 1994, 11(4): 17~20.
- [33] 刘秋云, 贺竹梅, 曹俊, 等. 利用农杆菌系统将超甜基因导入烟草 [J]. *遗传*, 1998, 20(1): 24~27.
- [34] 杨成丽, 刘德立, 等. 植物甜蛋白 thaumatin 研究进展 [J]. *武汉植物学研究*, 2001, 19(2): 153~157.
- [35] 范长胜, 陈永春, 李爽, 等. 超甜蛋白的基因工程及开发研究进展 [J]. *工业微生物*, 1999, 29(1): 29~33.

第六届国际科技产业博览会生物医药论坛 暨第七届北京生物医药产业发展论坛会讯

第七届北京生物医药产业发展论坛以“融合与发展”为主题。从生物医药产业发展宏观环境、全球新药研发热点和趋势、新型医疗服务市场经营模式、制药行业面临的主要问题及其发展趋势等方面展开讨论。并以专题讲座、卫星会等形式开展深层次、多侧面的互动交流, 以为当前生物医药企业的发展提供可资借鉴的思路和模式, 从而快速提高核心竞争力, 振兴我国生物医药产业。

论坛组委会将特别邀请国内医药工业企业 300 强、100 家著名医院和世界 500 强企业中的医药企业在华投资总部的董事长或总经理参加会议(论坛负责全部参会费用, 名单和具体事宜详见新生命网站)。

会议时间: 2003 年 5 月 22 日~24 日; 会议地点: 北京友谊宾馆友谊宫

主办单位: 北京市科学技术委员会; 北京市生物工程和生物医药产业领导小组办公室; 第六届国际科技产业博览会组委会; 北京生物技术和新医药产业促进中心

联系方式: 62092490, 62092492 有关本次会议详细信息, 请访问“新生命”网站(<http://www.newlife.org.cn>)。