

## Zlúčeniny vyvolávajúce sladkú chuť

### I. sladké bielkoviny

ALŽBETA KRUTOŠÍKOVÁ — MICHAL UHER — MILAN KOVÁČ — JAROSLAV KOVÁČ

Súhrn. V prehľade sú uvedené poznatky o troch známych sladkých bielkovinách: mirakulíne, monelíne a taumatínoch. Opisuje sa ich štruktúra, spôsob izolácie, predpokladaný mechanizmus pôsobenia, prípadne ich použitie ako sladidiel.

Nežiadúce účinky nadmernej konzumácie sacharózy spojené s výskytom artériosklerózy, tučnoty a narastajúcim počtom diabetikov si vynútilo hľadať náhradu — sladidlo.

V súčasnosti sa v literatúre uvádza množstvo sladkých látok — nie všetky sú však vhodné ako náhrada sacharózy. Zlúčeniny vyvolávajúce sladkú chuť možno rozdeliť do štyroch skupín: bielkoviny, dipeptidy, prírodné organické látky a syntetické organické látky. Otázka voľby druhu a množstva sladidla zaujíma výrobcov, spotrebiteľov a zdravotníkov z technologických, nutričných, toxikologických a ekonomických dôvodov.

V predloženej práci podávame prehľad o prvej skupine zlúčenín vyvolávajúcich sladkú chuť — sladkých bielkovinách. Sem patria tri proteíny pochádzajúce z ovocia západoafrických rastlín, a to:

Mirakulín — glykoproteín má proteínovú zložku s relatívnou molekulovou hmotnosťou  $42,000 \pm 3,000$ . Poradie aminokyselín nebolo stanovené, jej zloženie však je známe. Veľkosť a zloženie sacharidovej zložky ostávajú naďalej neznáme. Nie je skutočným sladidlom, ale mení chuť kyslých látok na sladkú.

Monelín — proteín obsahujúci 94 aminokyselín ( $M_r$  11,069), skladá sa z dvoch zvláštnych polypeptidických reťazcov označených A a B. Reťazec A obsahuje 44 aminokyselín a reťazec B 50. Reťazce samé nie sú sladké, avšak neporušený

---

Doc. Ing. Alžbeta Krutošíková, CSc., Ing. Michal Uher, CSc., Prof. Ing. Jaroslav Kováč, DrSc., Katedra organickej chémie Chemickotechnologickej fakulty SVŠT, Jánska 1, 812 37 Bratislava.

Ing. Milan Kováč, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

proteín má relatívnu sladkosť 1500—2000-krát vyššiu ako 7 % roztok sacharózy.

Taumatín I a Taumatín II — dva samostatné bielkovinové reťazce (každý s  $M_r$  21,000  $\pm$  600 a 1600-krát sladší ako sacharóza). Komplex taumatínov s hliníkom je Talín — sladidlo, ktoré bolo vyvinuté vo firme Tate and Lyle (Londýn). Taumatíny vykazujú sladkú chuť s príchutou sladkého dreva (lékořice), ktorá pretrváva až 1 h a môže sa zriedením znížiť.

Ďalej rozoberieme jednotlivé bielkoviny podrobnejšie.

### Mirakulín

Mirakulín sa získava zo „zázračného ovocia“, ktoré objavil anglický lekár W. F. Daniell [1] už pred 125 rokmi v niektorých oblastiach západnej Afriky. Hlbšie štúdium v oblasti mirakulínu sa začalo až po opätovnom objavení „zázračného ovocia“ Inglettom a Mayom [3], ktorí sledovali nebežné chuťové vlastnosti tropických rastlín. „Zázračné ovocie“ rastie na kríku *Richardella dulcifica* rodu *Sapotaceae*, predtým známy ako *Synsepalum dulcificum* Danielli v oblasti západnej Afriky. Je 2 cm dlhé, červenej farby, oválneho tvaru. Aktívna zložka sa nachádza v tenkej dužinatej vrstve obaľujúcej semeno tvaru olivy. Názov „zázračné“ je odrazom jeho vlastností, pretože zázračne mení chuťové pocity, napr. zmení chuť octu na chuť nápoja podobného portskému vínu a kyslú chuť citrónovej šťavy na chuť sladkého nápoja s jemnou citrónovou príchutou. Efekt pôsobenia je dlhotrvajúci, čo však môže byť pri jedení miešaných jedál nevýhodné.

*Chemická štruktúra mirakulínu.* Aktívnu zložku — mirakulín bolo pomerne ťažko izolovať a stanoviť jeho štruktúru; v ovoci sa vyskytuje v nízkej koncentrácii a je veľmi citlivý na zmeny pH prostredia. Podarilo sa dokázať [4], že mirakulín je glykoproteín obsahujúci v proteínovej časti 373 aminokyselín (tab. 1) s izoelektrickým bodom okolo 9.

Percentuálne zastúpenie sacharidovej časti bolo však opísané rôzne: 6,7 % arabinózy a xylózy [5], v rozmedzí 7,5 a 21 % všetkých sacharidov, ako glukózy, arabinózy, galaktózy a ramnózy [6], kým čistejšie vzorky obsahovali 6,3 % fruktózy, xylózy, manózy a galaktózy [4]. Analytické rozdiely odrážajú odlišnosti v izolácii a čistení. Mirakulín je termostabilný v rozmedzí pH 3—12.

*Predpokladaný mechanizmus pôsobenia mirakulínu.* Mirakulín je doteraz najväčšou známou molekulou schopnou vyvolať sladký pocit. Bolo navrhnutých niekoľko mechanizmov jeho pôsobenia [7], napriek tomu skutočný spôsob ostáva naďalej záhadou. Kurohara a Beidler [8] predpokladali, že kyslé pros-

Tabuľka 1. Zastúpenie aminokyselín v sladkých bielkovinách  
Table 1. Proportion of amino acids in sweet proteins

Aminokyselina <sup>1</sup>		Počet zvyškov aminokyselín <sup>20</sup>						
		Miraku- lin <sup>21</sup>	Monelín <sup>22</sup>		Taumatíny <sup>25</sup>			
			retazec <sup>23</sup>		I	II	a, b, c	
			A	B				
kyselina asparágová <sup>2</sup>	Asp	42	4	6	10	21	19	21
kyselina glutamová <sup>3</sup>	Glu	24	4	8	12	10	10	10
serín <sup>4</sup>	Ser	24	2	—	2	12	10	10
treonín <sup>5</sup>	Thr	31	1	3	4	19	17	17
prolín <sup>6</sup>	Pro	26	4	2	6	12	12	12
glycín <sup>7</sup>	Gly	34	3	5	8	23	22	24
alanín <sup>8</sup>	Ala	13	2	1	3	15	14	15
valín <sup>9</sup>	Val	37	2	2	4	9	8	9
leucín <sup>10</sup>	Leu	20	4	2	6	9	9	9
izoleucín <sup>11</sup>	Ile	15	2	6	8	7	7	7
metionín <sup>12</sup>	Met	2	—	1	1	1	1	1
fenylalanín <sup>13</sup>	Phe	26	2(3)	3	5(6)	10	10	10
tyrozín <sup>14</sup>	Tyr	13	5	2	7	7	8	7
polovičný cystín <sup>15</sup>	Cys	—	—	1	1	14	14	14
histidín <sup>16</sup>	His	3	—	—	—	0	0	0
lyzín <sup>17</sup>	Lys	22	4	5	9	10	11	10
arginín <sup>18</sup>	Arg	20	5	2	7	11	12	11
tryptofán <sup>19</sup>	Trp	9	—	1	1	3	3	3
Spolu <sup>26</sup>		373	44	50	94	193	187	190

<sup>1</sup>Amino acid; <sup>2</sup>Aspartic Acid; <sup>3</sup>Glutamic acid; <sup>4</sup>Serine; <sup>5</sup>Threonine; <sup>6</sup>Proline; <sup>7</sup>Glycine; <sup>8</sup>Alanine; <sup>9</sup>Valine; <sup>10</sup>Leucine; <sup>11</sup>Isoleucine; <sup>12</sup>Methionine; <sup>13</sup>Phenylalanine; <sup>14</sup>Tyrosine; <sup>15</sup>half-cystine; <sup>16</sup>Histidine; <sup>17</sup>Lysine; <sup>18</sup>Arginine; <sup>19</sup>Tryptophane; <sup>20</sup>Number of amino acid residues; <sup>21</sup>Miraculine; <sup>22</sup>Monelline; <sup>23</sup>Chain; <sup>24</sup>Native; <sup>25</sup>Taumatines; <sup>26</sup>Total.

tredie dostatočne mení tvar molekuly, čo umožní sacharidovým zvyškom, arabinóze a xylóze stimulovať sladké receptorové centrá. Keďže protolytická modifikácia viedla k strate aktivity mirakulínu, je evidentné, že bielkovinová časť je dôležitá pri mechanizme jeho pôsobenia.

Iný mechanizmus, ktorý uvádza Dzendolet [9], predpokladá, že mirakulín blokuje kyslé receptorové centrá, čím sa umožní aniónovej časti kyslej molekuly vyvolať sladkú chuť. Tieto a iné teórie podrobnejšie opísal Bartushuk a kol. [10], ktorí okrem iného usúdili, že mirakulín v kyslom prostredí zvyšuje sladkosť. Nijaká z teórií nevysvetlila umocňujúci chuťový efekt mirakulínu, ktorý predurčuje jeho použitie do žuvačiek, ústnych vôd a pod. Pri aplikácii mirakulínu sa môžu použiť dva spôsoby. Prvý navrhuje prijať prípravky z mirakulínu tesne pred konzumom nesladkých potravín, druhý odporúča bezprostredné dávkovanie do potravín. Miralin Corporation (USA) rozvinula začiatkom sedem-

desiatych rokov v širokom rozsahu pestovanie *S. dulcificum* na plantážach v Indii a Brazílii a pripravovala koncentrát zo zázračného ovocia (MFC — miracle fruit concentrate) na trh. V USA boli však roku 1977 všetky výrobky z *S. dulcificum* ako prídavky do potravín zákonne zakázané.

## Monelín

Prvý dokumentovaný údaj o intenzívne sladkých bobuliach rastúcich na západoafrickej rastline *Dioscoreophyllum cumminsii* je z roku 1895, detailnejšie ich opísal Irvine [11].

Rastlina má dlhé, vlasovite popínavé byle, pripomínajúce vínnu révu a srdcovité listy. Gélovitá hmota, ktorá má ohromujúco sladkú chuť, sa nachádza okolo ostňovitej kôstky, ktorá je súčasťou červených bobuliek nachádzajúcich sa na dlhých strapcoch. Získanie sladkej hmoty vyžaduje opatrnú náročnú operáciu.

*Chemická štruktúra monelínu.* Inglett a May [12] uverejnili nesprávny údaj, keď prisúdili monelínu, že je vysokomolekulárny polysacharid ( $M_r$  10,000).

Už roku 1972 dve nezávislé skupiny [13, 14] charakterizovali monelín ako bielkovinu. Autori [13] nazvali vyčistenú bielkovinu ako sladidlo „monellin“ podľa ich ústavu. Súčasné extrakčné techniky produkujú 3—5 g čistej bielkoviny na 1 kg ovocia, sladkosti 1500—2000-krát (resp. 2000—2500-krát<sup>14</sup>) väčšej ako sacharóza.

Primárnu štruktúru riešili dve nezávislé skupiny [13, 14]. Relatívnu molekulovú hmotnosť (10,700), zloženie a zastúpenie jednotlivých aminokyselín a izoelektrický bod (9,03) uvádza práca [15] (tab. 1). Hudson a Biemann [16] zistili, že monelín má dve nekovalentne viazané subjednotky, ktoré sa im podarilo oddeliť. Neskôr bola stanovená sekvencia aminokyselín v obidvoch subjednotkách, ktoré označili ako reťazce A a B obsahujúce 44 a 50 aminokyselínových zvyškov.

### Poradie aminokyselín v reťazci A:

0	5	10	15
Phe-Arg-Glu-Ile-Lys-Gly-Tyr-Glu-Tyr-Gln-Leu-Tyr-Val-Tyr-Ala-Ser-Asp-			
20	25	30	
-Lys-Leu-Phe-Arg-Ala-Asp-Ile-Ser-Glu-Asp-Tyr-Lys-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-			
35	40	44	50
-Leu-Leu-Arg-Phe-Asn-Gly-Pro-Val-Pro-Pro-Pro			

Poradie aminokyselín v refazci B:

	5	10	15	
Gly-Glu-Trp-Glu-Ile-Ile-Asp-Ile-Gly-Pro-Phe-Thr-Gln-Asn-Leu-Gly-Lys-Phe-				
		15		
20	25	30	35	
-Ala-Val-Asp-Glu-Glu-Asn-Lys-Ile-Gly-Gln-Tyr-Gly-Arg-Leu-Thr-Phe-Asn-				
	40	45	50	
-Lys-Val-Ile-Arg-Pro-Cys-Met-Lys-Lys-Thr-Ile-Tyr-Glu-Asn-Glu				

Podľa výpočtov relatívne molekulové hmotnosti sú: A — 5,232, B — 5,836 a celková — 11,069, asi 10 % molekúl má zvlášť *N*-terminálny fenylalanín na refazci A. Monelín sa získal v kryštalickej forme [7].

*Vplyv modifikácie štruktúry monelínu na sladkú chuť.* Je zaujímavé sledovať vlastnosti monelínu s cieľom určiť tie časti proteínovej molekuly, ktoré sa zúčastňujú na vyvolaní sladkej chuti, čo by mohlo slúžiť ako model syntetického analógu. Prvé štúdie ukázali, že na vyvolanie sladkej chuti bola nevyhnutná celá molekula v jej natívnej konformácii. Zahrievanie na 55—65 °C [14] a enzymatická hydrolýza (trypsínom a chymotrypsínom) spôsobovali stratu sladkej chuti [17]. Podobne aj oddelenie jednotlivých subjednotiek A a B spôsobuje stratu sladkej chuti a ani jedna samostatne ju nevyvoláva.

Monelín je termolabilný a stály pri pH 2—9. Konformačné štúdie [18] ukázali, že menšia časť molekuly má závitnicovú štruktúru a väčšia časť  $\beta$ -konformáciu. Molekula monelínu má aj určitú terciárnu štruktúru, ktorá je dôležitá pre efekt sladkej chuti.

*Fyziologická reakcia na monelín.* Ukázalo sa, že ľudská reakcia na monelín je rozličná, avšak ešte väčší rozdiel sa zistil v reakcii jednotlivých druhov cicavcov. Napriek tomu, že niektoré cicavce reagujú na sladkú chuť sacharózy, monelín u nich pocit sladkosti nevyvoláva [19, 20]. Z toho možno usúdiť, že sladké proteíny majú oddelené receptorové centrá na vyvolanie sladkej chuti, ktoré sú neprítomné v niektorých druhoch cicavcov [7]. Monelín nie je toxický, ale kvôli jeho tepelnej nestálosti a obťažnosti pestovania nie je pravdepodobné jeho komerčné využitie.

### Taumatíny (T, T,,)

V poslednom čase sa najviac študuje sladká prírodná bielkovina, ktorú objavil W. F. Daniell už roku 1839 v ovoci *Thaumatococcus daniellii* (Benth.) [1, 2], rodu *Marantaceae* (ktoré nazval „zázračné ovocie zo Sudanu“). Rastie v západnej Afrike od Sierra Leone k Zaire, v Ghane, Nigérii a Angole. Rastlina

má široké, oválne, papierovité listy na dlhých, 3 m vysokých byliach. Ovocie je mäsité, trojuholníkového tvaru, po dozretí jasne červenej farby. Sladká bielkovina je uložená v membránou oddelenej časti semena. Rastlinu sa podarilo preniesť do iných častí sveta, pestuje sa napr. v skleníkoch vo Veľkej Británii.

*Chemické vlastnosti taumatínov.* Van der Wel a Loeve [21] izolovali bielkoviny sladkej chuti, ktoré nazvali taumatín I a II (T, a T<sub>II</sub>). Úplný výťažok bol 0,9 g sladkej bielkoviny na 1 kg ovocia sladkosti 1600-krát väčšej ako sacharózy (t. zn. 0,9 g taumatínu je ekvivalentné 1,5 kg sacharózy). Tieto údaje podnietili rozsiahly výskum v oblasti ich izolácie a stanovenia štruktúry. Zistilo sa [7], že výťažok sa môže zvýšiť v prítomnosti nízkej koncentrácie solí, najmä hliníka, ktorého prítomnosť zlepšuje farbu, stálosť, filtrovateľnosť, čistotu a sladkosť extraktu. Výťažok z 1 kg čerstvého ovocia sa zvýšil na 6 g bielkoviny. Ukázalo sa, že taumatíny sa navzájom veľmi podobajú v relatívnej molekulovej hmotnosti v zastúpení jednotlivých aminokyselín (tab. 1), zásaditosti a sladkosti, majú tú istú *N*-terminálnu aminokyselinu (alanín), odlišujú sa iba rozličnou amidickou substitúciou (izoelektrický bod T<sub>I</sub> = T<sub>II</sub> = 12, relatívna molekulová hmotnosť T<sub>I</sub> = 21,000 ± 600, T<sub>II</sub> = 20,500 ± 600).

Pri opatrnom frakcionovaní sa zistili ešte tri ďalšie sladké bielkoviny označené T<sub>a</sub>, T<sub>b</sub> a T<sub>c</sub>, ktoré boli eluované a rozlíšené pred T<sub>I</sub> a T<sub>II</sub>. Všetky majú podobný obsah aminokyselín a relatívnu molekulovú hmotnosť (18,000—20,000), ale sú menej sladké ako T<sub>I</sub> a T<sub>II</sub>.

*Vplyv fyzikálnej a chemickej modifikácie na chuť taumatínov.* Zistilo sa, že zásaditosť má vplyv na ich sladkú chuť. Van der Wel a Bel [22] dokázali, že substitúciou lyzínových skupín v T, so vzrastajúcim počtom acetylových skupín má za následok pokles sladkosti, ktorá úplne zmizne, ak štyri z desiatich jednotiek lyzínových zvyškov boli acetylované. Vplyv teploty na sladkú chuť taumatínov je zložitý a závislý od koncentrácie sladidla, prítomnosti kyslíka, solí a pH. Korver a kol. [23] ukázali, že nevratná tepelná denaturácia sa vyskytovala pri teplotách 75 °C, pH 5 a 55 °C, pH 3. Sladkosť sa stráca, ak niektoré z disulfidických mostíkov sú oxidačne a redukčne štiepené, čo potvrdzuje, že podobne ako pri monelíne je celková terciárna štruktúra bielkovinovej molekuly určujúcim faktorom sladkej chuti.

Najvýraznejší vplyv na intenzitu sladkosti má interakcia taumatínov s hliníkovým kationómom [7]. Napríklad iónový adukt taumatíny—hliník, zvaný talín, predstavuje pravdepodobne doteraz najintenzívnejšie známe sladidlo. Talín je 3500-krát sladší ako sacharóza (na molekulovom základe je to 200 000-krát vyššia sladivosť v porovnaní so sacharózou).

Vlastnosti jedinečne umocňujúce chuť talínu dávajú perspektívu použitia v oblasti výroby žuvačiek, zubných pást, ústnych vôd a pod.

V poslednom čase boli patentované kompozície sladidiel pripravené rozpustným sladkými proteínmi (taumatíny, monelín) vo vode, zmiešaním so slabokyslými polysacharidmi (napr. arabská guma) a takto pripravené asi 20 % roztoky sa vysušili. Získané prášky sa použili na sladenie nealkoholických nápojov [24].

#### Literatúra

1. DANIELL, W. F.: *Pharm. J.*, 11, 1852, s. 445.
2. DANIELL, W. F.: *Pharm. J.*, 10, 1855, s. 158.
3. INGLET, G. E. — MAY, J. F.: *Econ. Bot.*, 22, 1968, s. 326.
4. GIROUX, E. L. — HENKIN, R. I.: *J. Agric. Food Chem.*, 22, 1974, s. 595.
5. KURIHARA, K. — BEIDLER, L. M.: *Science*, 161, 1968, s. 1241.
6. BROUWER, J. N. — Van der WEL, H. — FRANCKE, A. — HENNING, G. J.: *Nature*, 220, 1968, s. 373.
7. HIGGINBOTHAM, J. D.: *Dev. Sweeteners*, 1, 1979, s. 87; *Chem. Abstr.*, 92, 1980, s. 39902.
8. KURIHARA, K. — BEIDLER, L. M.: *Nature*, 222, 1969, s. 1176.
9. DZENDOLET, E.: *Percept. Psychophys.*, 5, 1969, s. 187.
10. BARTUSHUK, L. M. — GENTILE, R. L. — MOSKOWITZ, H. R. — MEISELMAN, H. L.: *Physiol. Behavior*, 12, 1974, s. 449.
11. IRVINE, F. R.: *Woody Plants of Ghana*. London, Oxford University Press 1961, 256 s.
12. INGLET, G. E. — MAY, J. F.: *J. Food Sci.*, 30, 1969, s. 408.
13. MORRIS, J. A. — CAGAN, R. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 261, 1972, s. 114.
14. Van der WEL, H.: *FEBS Lett.*, 21, 1972, s. 88.
15. MORRIS, J. A. — MARTENSON, R. — DEIBLER, G. J. — CAGAN, R. H.: *J. Biol. Chem.*, 248, 1983, s. 534.
16. HUDSON, G. — BIEMANN, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 1976, s. 212.
17. MORRIS, J. A. — CAGAN, R. A.: *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1976, s. 1075.
18. JIRGENSONS, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 445, 1976, s. 255.
19. BROUWER, J. N. — HELLEKANT, G. — KASAHARA, Y. — Van der WEL, H. — ZOTTERMAN, A.: *Acta physiol. scand.*, 89, 1973, s. 550.
20. HELLEKANT, G.: *Chem. Senses Flavor*, 2, 1976, s. 97.
21. Van der WEL, H. — LOEVE, K.: *Eur. J. Biochem.*, 31, 1972, s. 221.
22. Van der WEL, H. — BEL, W. M.: *Chem. Senses Flavor*, 2, 1976, s. 221.
23. KORVER, O. — Van GORKOM, M. — Van der WEL, H.: *Eur. J. Biochem.*, 35, 1973, s. 554.
24. *Brit. UK Pat. Appl. GB 2123672 (1984); Chem. Abstr.*, 101, 1984, 22240.

## Соединения, вызывающие сладкий вкус

### I. Сладкие белки

#### Резюме

В обзоре приводятся данные о трех известных сладких белках: миракулине, монелине и тауматинах. Описывается их структура, способ изоляции, предполагаемый механизм воздействия, их возможное использование в качестве веществ, придающих сладкий вкус.

## Compounds inducing sweet taste

### I. Sweet proteins

#### Summary

This paper supplies information on the three hitherto known sweet proteins: miraculine, monelline and taumatococins, inducing also their structure, way of separation, assumed mechanism of action as well as their use as sweeteners.