

# Mirakulin

---

**Demeter, Dea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:135669>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Dea Demeter

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# MIRAKULIN

## Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2023.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

7. lipnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD .....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....	3
2.1. Put prijenosa signala slatkog okusa.....	3
2.2. Vežanje mirakulina.....	5
2.3. Utjecaj pH na efekt mirakulina .....	6
2.4. Primjena mirakulina.....	8
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	X
§ 4. POPIS KRATICA.....	XI



## § Sažetak

Mirakulin (MCL) je glikoprotein koji se nalazi u čudesnom voću (*Synsepalum dulcificum*). Nakon konzumacije čudesnog voća, kisela hrana privremeno ima sladak okus. Ono što daje ovom voću sposobnost modifikacije okusa je mirakulin. Efekt traje oko pola sata, dok je mirakulin prisutan na jeziku.

Informacija o slatkom okusu primarno se prenosi preko receptora za slatko. Za ovaj receptor karakteristično je da je spregnut s proteinom G. Kada se za njega veže ligand, pokreće se signalna kaskada. Mirakulin se veže za taj isti receptor, ali aktivira ga tek pri sniženom pH kada dolazi do promjene njegove konformacije koja dovodi do opisanog efekta. Stoga, mirakulin može samo kiselu hranu prividno učiniti slatkom, dok sam nema okusa i nema značajnog efekta na druge vrste okusa. Štoviše, može čak umanjiti intenzitet slatke hrane. Iako su potrebna daljna istraživanja, mirakulin ima potencijala u farmaceutskim proizvodima te kao zaslađivač.





## § 1. UVOD

U zapadnoj i centralnoj Africi rastu crvene bobice voća *Synsepalum dulcificum* („miracle fruit“). Ono je šire poznato već stotinjak godina, a ime „čudesno voće“ dali su mu Europljani kada su naišli na njega i otkrili njegovo zanimljivo svojstvo.<sup>7</sup> Ovo voće može privremeno promijeniti osjet okusa nakon što se prožvače njegova pulpa,<sup>4</sup> zbog čega se i naziva „čudesnim“. Nakon konzumacije, kisela hrana privremeno ima sladak okus. Samo kisela hrana može se prividno pretvoriti u slatku, dok primjerice kod slanijih proizvoda nema značajnog utjecaja. „Čudesno voće“ često se koristilo za zaslađivanje druge hrane, kao što su palmino vino i kukuruzni kruh. Ove bobice sadrže razne važne vitamine (kao što su A, C, E i K) te esencijalne i neesencijalne amino kiseline. Pokazalo se kako imaju pozitivan efekt na zdravlje i liječenje nekih kroničnih bolesti, primjerice rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, i artritis. Osim toga, imaju i antioksidativnu aktivnost.<sup>5,10</sup>

Mirakulin je aktivna tvar koja je zaslužna za efekt promjene okusa čudesnog voća i nalazi se u pulpi bobice. Dobio je ime po voću u kojem se nalazi, a prvi put su ga izolirali Kurihara i Beidler, 1968.<sup>4,10</sup> Do modifikacije okusa dolazi kada je jezik obložen mirakulinom. Efekt traje dok ne dođe do ispiranja ove molekule s jezika, za što je obično potrebno oko 30 minuta.<sup>10</sup> Mirakulin je glikoprotein koji tvori homodimerni kompleks (2 podjedinice se drže zajedno disulfidnim mostovima) i sastoji se od 191 aminokiseline te 2 šećera vezana za 2 Asn ogranka N – glikozidnom vezom.<sup>6,11</sup> U monomernom obliku ne pokazuje utjecaj na modifikaciju okusa.<sup>14</sup> Do promjene okusa ne dolazi pri neutralnom pH, već samo pri sniženom. Efekt je najjači pri pH 3.0.<sup>12</sup> Ponuđeno je više objašnjenja za modifikaciju okusa mirakulinom. Jedno objašnjenje je da mirakulin blokira receptore za kiselo i tako indirektno pojačava osjet slatkog. Daljnjim istraživanjem i otkrivanjem mehanizma vezanja mirakulina, vjerojatnijim se pokazalo da dominantan doprinos modifikaciji okusa ima drugo objašnjenje. Ono kaže da zbog sniženog pH dolazi do promjene konformacije koja omogućuje vezanje šećernog dijela mirakulina za receptor, čime se pokreće signal slatkog okusa. Dakle, mirakulin zapravo primarno dodaje slatki okus, zbog čega se čini da je kisela hrana slatka. Također, taj slatki okus donekle potiskuje osjet kiselosti, što doprinosi osjetu slatkog.<sup>7</sup>



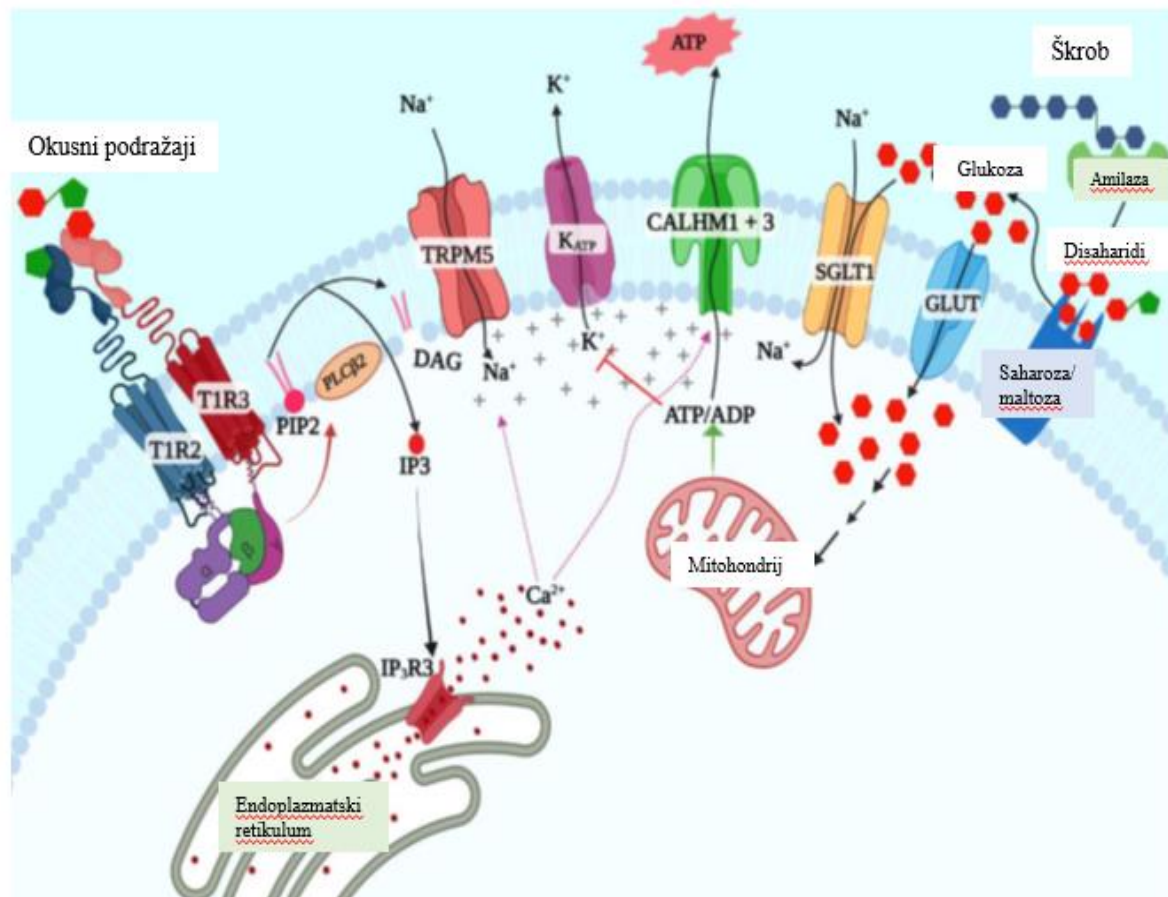
Slika 1. Čudesno voće, preuzeto iz reference 5

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Put prijenosa signala slatkog okusa

Okus se percipira preko nakupina stanica koje zovemo okusnim stanicama. One se nalaze većinom na površini jezika u nakupinama koje se zovu okusni pupoljci. Postoji više vrsta takvih stanica i svaki od 6 osnovnih okusa prenosi se određenim stanicama. Mogu se podijeliti u 3 kategorije: I, II i III. Skupina II zadužena je za nekoliko okusa koji svi imaju sličnu unutarstaničnu signalnu kaskadu – slatko, umami i gorko. Ova grupa stanica ima receptore spregnute s proteinom G za sve okuse za koje je zadužena, pa tako i za slatko.<sup>1</sup>

Funkcionalni receptor za slatko sastoji se od dvije podjedinice, odnosno on je heterodimer TAS1R2 i TAS1R3. Homodimer TAS1R3 također može prenositi signal iz prirodnih šećera, ali TAS1R2 ne može sam prenositi nikakav signal za slatko. Kada se glasnik veže za receptor, to pokreće kaskadu signala. Gvanozin trifosfat (GTP) se hidrolizira u gvanozin difosfat (GDP) na  $G\alpha$  podjedinici. Zbog toga dolazi do odvajanja  $G\alpha$  od  $G\beta\gamma$  podjedinice koja aktivira fosfolipazu  $C\beta 2$  (PLC $\beta 2$ ). Ona fosforilira fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>) te nastaju inozitol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) i diacilglicerol (DAG). Nakon toga, IP<sub>3</sub> se veže na receptor ITPR3 koji se nalazi na endoplazmatskom retikulumu, zbog čega Ca<sup>2+</sup> ioni mogu izaći iz njega kroz kanal te se povećava koncentracija kalcijevih iona u unutarstaničnom prostoru.<sup>2,8</sup> Ti ioni aktiviraju kanal TRPM5 koji je selektivan za natrijeve ione. Na<sup>+</sup> ioni ulaze u stanicu i dolazi do depolarizacije membrane koja uzrokuje izlazak adenozin trifosfata (ATP) iz stanice. On je neurotransmiter i otpušta se kroz kanal tipa CALHM. Postoji 6 kanala u ovoj skupini (CALHM1-6). CALHM1, CALHM2 i CALHM3 sudjeluju u fiziološkim i patološkim procesima. Neki od tih procesa su ekscitabilnost neurona, depresija i neurotransmisija okusa. Kod prijenosa slatkog okusa, neurotransmiter ATP prenosi se kroz heterodimerni kanal koji se sastoji od CALHM1 i CALHM3 podjedinica.<sup>1,8</sup> Tada ATP aktivira receptore P2X2 i P2X3 u neuronima i tako se prenosi informacija o slatkom okusu.<sup>15</sup>



Slika 2. Signalni put slatkog okusa, preuzeto i prilagođeno iz reference 8.

Postoje još i dva mehanizma prijenosa signala slatkog okusa koji ne idu preko receptora za slatko, a nalaze se u drugim tkivima.<sup>8</sup>

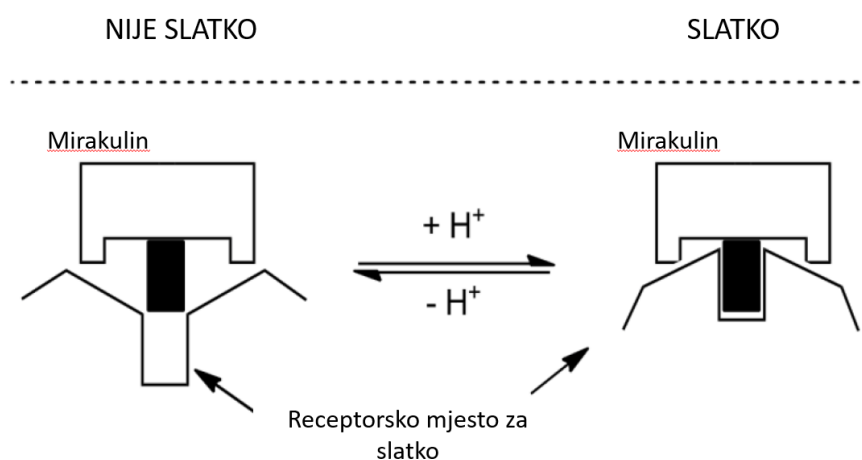
Prvi je put koji ovisi o kanalu za kalij, osjetljivom na ATP (K<sub>ATP</sub> kanal). Bitan je u beta stanicama gušterače, gdje je prvobitno i otkriven. Za ovaj put prijenosa ključan je nastanak ATP-a. On se generira iz glukoze koja se transportira u beta stanice. Glikolizom i ciklusom limunske kiseline metabolizira se fosforilirana glukoza što dovodi do povećanja koncentracije ATP-a. Zbog toga se zatvori K<sub>ATP</sub> kanal. Zatvaranjem ovog kanala dolazi do depolarizacije stanične membrane i otpušta se inzulin.<sup>8</sup>

Drugi put ide preko obitelji natrij-glukoza kotransportera (SGLT). Isprva je otkriven u stanicama u tankom i debelom crijevu. Ovaj mehanizam koristi SGLT1. On kotransportira  $\text{Na}^+$  ione i glukozu iz unutrašnjosti crijeva u enteroendokrine stanice. Taj proces dovodi do depolarizacije i stvaranja akcijskog potencijala. Tada dolazi do lučenja peptidnih hormona, kao što je hormon sličan glukagonu tipa 1 (GLP1).<sup>8</sup>

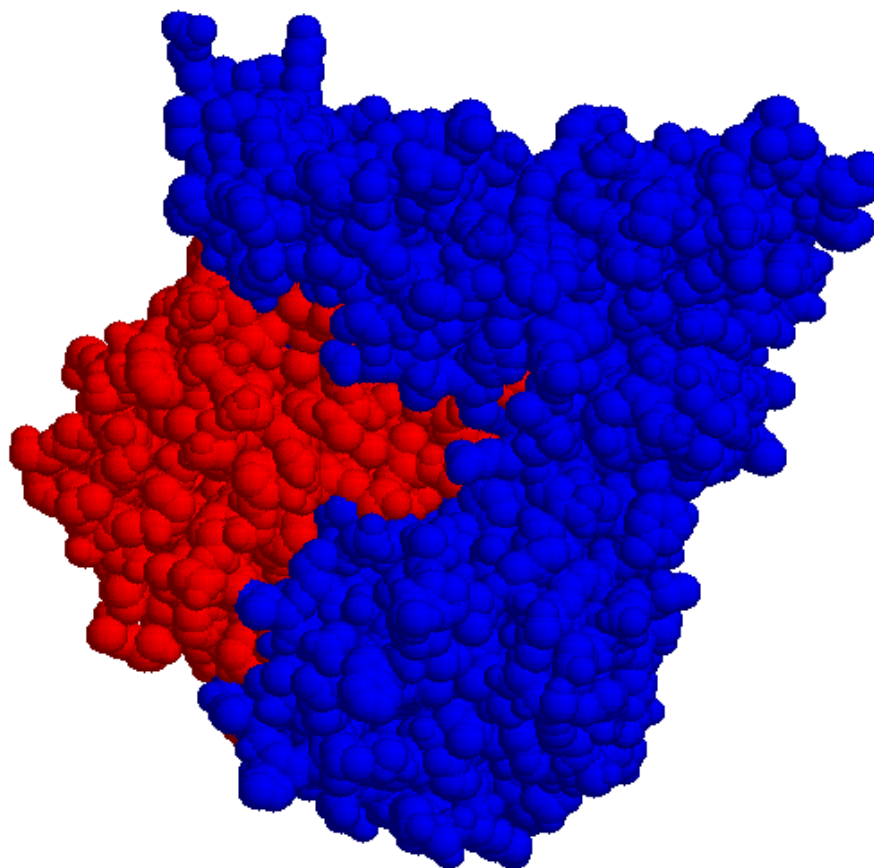
S vremenom su otkrivene informacije koje ukazuju na to da se ovi prijenosni putevi možda nalaze i uokusnim stanicama, ali slatki okus se primarno prenosi signalnom kaskadom uz receptor okusa.<sup>8</sup>

## 2.2. Vežanje mirakulina

Na membrani okusnih stanica nalaze se receptori za slatko (T1R2/T1R3) u svojoj inaktivnoj formi, za koje se mirakulin veže pri neutralnom pH. Pretpostavlja se kako se receptor T1R2/T1R3 nalazi u dinamičkoj ravnoteži između dvije forme, a vežanje liganda stabilizira aktivnu formu.<sup>17</sup> Dok se veže, mirakulin ne aktivira receptor sve dok pH ne padne. Odnosno, pri neutralnom pH receptor ostaje inaktivan.<sup>5</sup> Za funkcionalnost mirakulina bitni su histidinski ogranci H29 i H59, uz posebnu važnost H29. Ova aminokiselina nalazi se na mjestu susreta dvaju monomera i okružena je drugim pozitivnim ograncima, što čini pozitivno nabijeno područje. Koncentracija pozitivnog naboja omogućava interakciju mirakulina s negativno nabijenom šupljinom koja se nalazi na površini T1R2/T1R3.<sup>13</sup>



Slika 3. Mehanizam modifikacije okusa mirakulinom, preuzeto i prilagođeno iz reference 5.

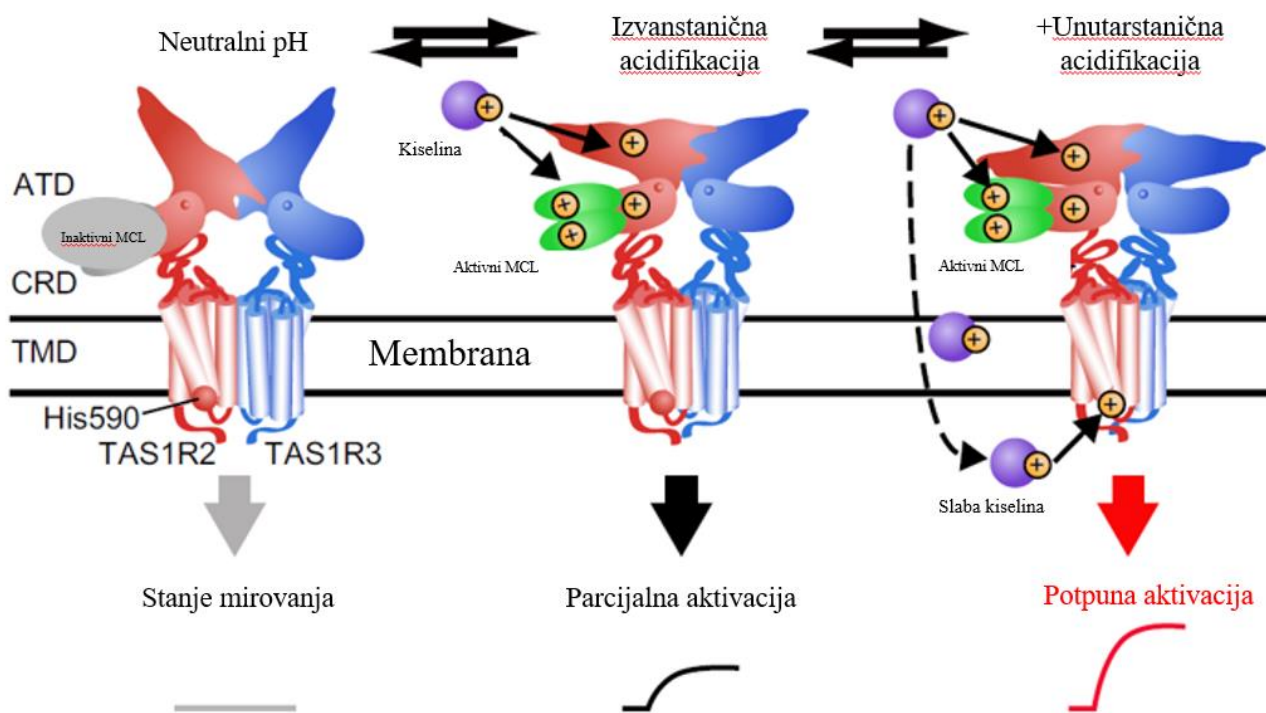


Slika 4. Reprezentacija modela T1R2/T1R3 receptora s vezanim mirakulinom (mirakulin je prikazan crveno), preuzeto iz reference 17.

### 2.3. Utjecaj pH na efekt mirakulina

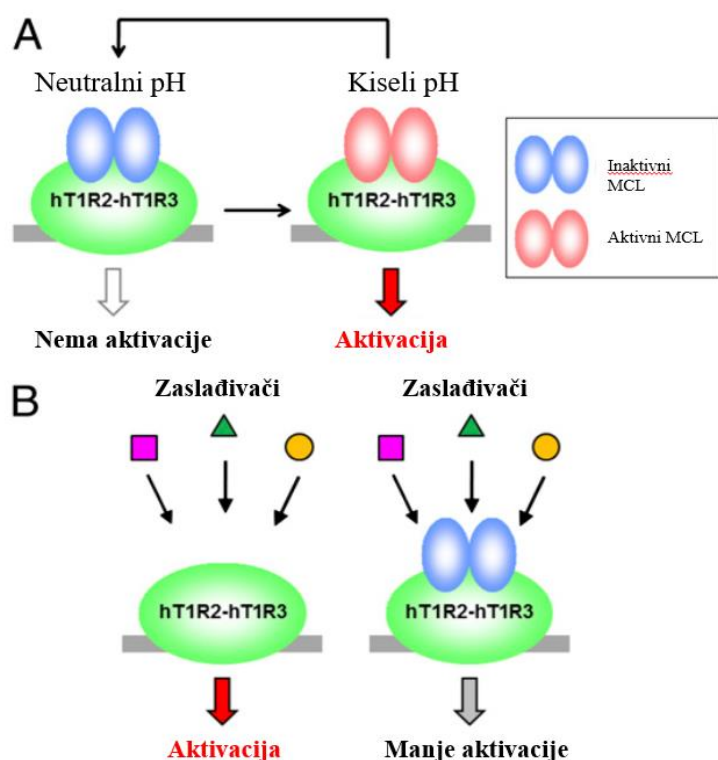
Pri sniženom pH, nabijeni histidinski ogranci mirakulina H29 i H59 zaslužni su za pokretanje strukturne promjene mirakulina.<sup>13</sup> Na to ukazuje to što zamjenom histidina alaninom nestaje efekt mirakulina na percepciju okusa.<sup>3</sup> Zbog ove strukturne promjene mirakulin poprima manje kompaktnu formu koja lakše ostvaruje interakciju s T1R2/T1R3. Također, H29 i H59 zajedno stabiliziraju ovaj oblik te se pokazalo kako postoji efekt kooperativnosti u tome. Sniženje pH dovodi do protonacije bočnih ogranaka čime nastaje otvorenija (manje kompaktna) forma mirakulina koja se može bolje prilagoditi veznom mjestu receptora. Kada se to dogodi, mirakulin se veže za receptor pomoću svog šećernog dijela i time pokreće signal za slatko.<sup>13</sup>

Dodatno, slabe kiseline imaju jači utjecaj na modifikaciju okusa koju uzrokuje mirakulin. Primjerice, limunska kiselina jače pojačava efekt mirakulina u usporedbi s klorovodičnom kiselinom. Istraživanja ukazuju na to da je razlog mogućnost unutarstanične acidifikacije koju imaju slabe kiseline. Jake kiseline zakiseljavaju izvanstanični prostor što dovodi do protonacije izvanstanične regije hTAS1R2 i mirakulina te se pokreće signalna kaskada unutar stanice. Slabe kiseline se nalaze u svojoj nedisociranoj formi u znatno većoj mjeri od jakih kiselina. Nedisocirane kiseline mogu ući u stanicu kroz membranu i potaknuti zakiseljavanje unutarstaničnog prostora. Odnosno, slabe kiseline mogu puno jače zakiseliti unutarstanični prostor od jakih kiselina, zbog čega se protonira i unutarstanična regija hTAS1R2. Tada interakcijom posve aktiviranog (potpuno protoniranog) hTAS1R2 i protoniranog mirakulina dolazi do jačeg efekta modifikacije okusa.<sup>3</sup>



Slika 3. Utjecaj pH na efekt mirakulina, preuzeto i prilagođeno iz reference 3.

Ako se ponovno uspostavi neutralan pH, mirakulin i dalje može zauzimati mjesto na receptoru. Tada zapravo umanjuje doživljaj slatkog jer inhibira aktivaciju receptora za slatko od drugih tvari.<sup>3</sup>



Slika 5. Utjecaj mirakulina pri neutralnom pH, preuzeto i prilagođeno iz reference 9.

## 2.4. Primjena mirakulina

Trenutno korišteni umjetni zaslađivači, kao što su aspartam ili saharin, imaju neželjene nuspojave, primjerice rak mjehura, tumore mozga ili otkazivanje srca. Stoga, postoji potreba za zamjenom ovakvih zaslađivača, što bi posebice pomoglo pacijentima koji boluju od bolesti povezanih s konzumacijom šećera koji ih koriste kao zamjenu za saharozu. Mirakulin ima potencijala kao zaslađivač jer je niskokaloričan (kao i umjetni zaslađivači koji se trenutno koriste), ali ne potiče potrebu za inzulinom.<sup>17</sup> Osim toga, mogao bi poslužiti kao izvor farmaceutskih proizvoda te kao lijek za kontrolu dijabetesa.<sup>10</sup>

Čudesno voće demonstriralo je pozitivan učinak u liječenju raka, kardiovaskularnih, ali i drugih bolesti. Pokazalo se uspješnim u poboljšanju okusa niskokalorične prehrane, dok istovremeno smanjuje unos kalorija. Zbog svog pozitivnog efekta na zdravlje, čudesno voće već sada je popularno u Japanu među oboljelima od dijabetesa i prekomjerne tjelesne težine.<sup>10</sup>



Pokazalo se kako čudesno voće ima antidijabetički efekt te se njegovo svježe lišće već sad koristi za tretiranje dijabetesa. Čini se kako mehanizam ovog učinka uključuje povećanu sintezu inzulina, modulaciju enzima koji metaboliziraju ugljikohidrate te smanjenje upale. Kako bi se iz ove biljke mogao formulirati lijek za tretiranje dijabetesa, potrebno ju je još istražiti te razjasniti mehanizam njezinog antidijabetičkog učinka.<sup>18</sup>

Jedna od poteškoća u primjeni mirakulina je njegova proizvodnja. Potrebno je pronaći način dobivanja mirakulina u laboratoriju ili metodu koja je prikladna za izoliranje većih količina tvari te koja neće narušiti strukturu mirakulina, budući da on nema mogućnost modifikacije okusa u monomernom obliku. Mirakulin je u početku izoliran ekstrakcijom uz karbonatni pufer. Nažalost, ova metoda narušava aktivnost mirakulina. Primjenjene su i druge metode, ali su uglavnom bile skupe ili dugotrajne.<sup>14</sup>

Budući da je za modifikaciju okusa ključan histidin, pretpostavilo se kako se on nalazi na površini jer tako omogućuje vezanje mirakulina za receptor. Ova pretpostavka iskorištena je u osmišljavanju prikladne metode za izoliranje mirakulina iz čudesnog voća. Istražena je mogućnost korištenja imobilizirane metal-afinitetne kromatografije (IMAC) na koloni napunjenoj niklom. Ovom metodom mirakulin je uspješno izoliran uz čistoću veću od 95 % i bez smanjenja aktivnosti. To bi moglo biti rješenje za masovnu izolaciju mirakulina, a time i širu primjenu.<sup>14</sup> Ipak, mana ove metode je to što je čudesno voće tropska biljka koju je teško uzgojiti izvan njenog prirodnog staništa. To otežava mogućnost izolacije mirakulina iz njegovog prirodnog izvora kao opciju za širu proizvodnju jer količina možda ne bi bila dostatna za potražnju.<sup>16</sup>

Stoga, kao moguće rješenje pojavilo se genetičko inženjerstvo. Bilo je pokušaja uzgoja rekombinantnog mirakulina u raznim organizmima, kao što su *Escherichia coli* i kvasac. Nažalost, mirakulin koji je tako uzgojen uglavnom nije imao mogućnost modifikacije okusa. Ipak, uspješno je provedena ekspresija aktivnog mirakulina u zelenoj salati. To bi moglo potencijalno riješiti problem proizvodnje mirakulina, budući da je zelena salata biljka koja se uspješno uzgaja širom svijeta.<sup>16</sup>

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se mogle zadovoljiti sigurnosne mjere prije primjene ovakvih lijekova. Osim toga, poželjno bi bilo sintetizirati spojeve analogne mirakulinu zbog očuvanja vrste čudesnog voća, ali i zbog potencijalnog pronalaska spojeva s boljom aktivnošću od mirakulina.<sup>10</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. Akiyuki Taruno, Kengo Nomura, Tsukasa Kusakizako, Zhongming Ma, Osamu Nureki, J. Kevin Foskett, *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* **473** (2021) 3-13.
2. Dan Liu, Emily R. Liman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 15160-15165.
3. Keisuke Sanematsu, Masayuki Kitagawa, Ryusuke Yoshida, Satoru Nirasawa, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya, *Sci Rep.* **6** (2016) 22807.
4. Yoshie Kurihara, Shizu Terasaki, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj. - General Subject* **719** (1982) 444-449.
5. Bharti Mangla, Kanchan Kohli, *Trop. J. Nat. Prod. Res.* **2** (2018) 12-17.
6. Sarroch Theerasilp, Hiromu Hitotsuya, Shigeo Nakajo, Kazuyasu Nakaya, Yasuharu Nakamura, Yoshie Kuriharall, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 6655 – 6659.
7. Linda M. Bartoshuk, Robert L. Gentile, Howard R. Moskowitz, Herbert L. Meiselman, *Physiol. Behav.* **12** (1974) 449-456.
8. Sunil Kumar Sukumaran, Salin Raj Palayyan, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 8225.
9. Ayako Koizumi, Asami Tsuchiya, Ken-ichiro Nakajima, Keisuke Ito, Tohru Terada, Akiko Shimizu-Ibuka, Loïc Briand, Tomiko Asakura, Takumi Misaka, Keiko Abe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 16819-16824.
10. Afolabi Clement Akinmoladun, Aanuoluwapo Ruth Adetuyi, Kayode Komolafe, Oluwafemi Omoniyi Oguntibeju, *Heliyon* **6** (2020) 1-8.
11. Takumi Misaka, *ScienceDirect* **24** (2013) 222-225.
12. Antonella Paladino, Susan Costantini, Giovanni Colonna, Angelo M. Facchiano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367** (2008) 26-32.
13. Antonella Paladino, Giovanni Colonna, Angelo M. Facchiano, Susan Costantini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396** (2010) 726-730.
14. Narendra Duhita, Kyoko Hiwasa-Tanase, Shigeki Yoshida, Hiroshi Ezura, *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 5148-5151.
15. Sue C. Kinnamon, Thomas E. Finger, *Front. Cell. Neurosci.* **7** (2013) 1.
16. Hyeon-Jin Sun, Min-long Cui, Biao Ma, Hiroshi Ezura, *FEBS Lett.* **580** (2006) 620-626.
17. Ravi Kant, Mohan Babu Rajasekaran, Ramakumar Suryanarayananarao, *Internet Electron. J. Mol. Des.* **4** (2005) 106-123.

18. T. Olabisi Obafemi, M. Tolulope Olaleye, Afolabi C. Akinmoladun, *Journal of Ethnopharmacology* **244** (2019) 112124.

## § 4. POPIS KRATICA

MCL – mirakulin

T1R2 – drugi receptor okusa, tipa 1

T1R3 – treći receptor okusa, tipa 1

TAS1R2 – gen za drugi receptor okusa, tipa 1

TAS1R3 – gen za teći receptor okusa, tipa 1

GTP – gvanozin trifosfat

GDP – gvanozin difosfat

PLC $\beta$ 2 – fosfolipaza C $\beta$ 2

PIP<sub>2</sub> – fosfatidil-inozitol-4,5-bisfosfat

IP<sub>3</sub> – inozitol-1,4,5-trifosfat

DAG – diacilglicerol

ITPR3 – receptor tipa 3 za inozitol-1,4,5-trifosfat

TRPM5 – kanal TRPM5

ATP – adenzin trifosfat

CALHM – modulator 1 homeostaze kalcija

SGLT – natrij – glukoza kotransporter

IMAC – imobilizirana metal-afinitetna kromatografija

GLP1 – hormon sličan glukagonu tipa 1

P2X2 – receptor na osjetnim živčanim vlaknima

P2X3 – receptor na osjetnim živčanim vlaknima