

变味蛋白神秘果素研究进展

潘丽萍, 余丝莉, 李海航

华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

摘要 神秘果素(miraculin)是从一种原产于西非的植物神秘果(*Synsepalum dulcificum*)中分离的、具有味觉改变功能的特异糖蛋白。它能改变人的味觉,使酸味转变为甜味。神秘果素是由 191 个氨基酸组成的单一肽链,其单体无活性,二聚体和四聚体在酸性环境下发挥功能。位于三级结构突出位点的两个组氨酸残基是其功能的重要活性位点。神秘果素除了味觉改变功能外,还可改善糖尿病动物对胰岛素的敏感性。神秘果素的提取分离主要有透析法、离心分离法、溶剂沉淀法和色谱法。目前已有研究者利用微生物和植物生产神秘果素。本文就神秘果素的结构性质、功能及其作用机理,提取分离,转基因研究等方面的进展进行综述。

关键词 神秘果素;变味蛋白;糖蛋白;转基因

中图分类号 Q554

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)03-0099-03

Studies on Miraculin, a Taste-modifying Protein

PAN Liping, YU Sili, LI Haihang

College of Life Sciences, South China Normal University,
Guangzhou 510631, China

Abstract Miraculin is a glycoprotein with taste-modifying activity and is isolated from miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*), a shrub native to West Africa. The protein can modify human's taste and turn a sour taste to a sweet taste. The mature peptide of miraculin consists of 191 amino acids and has taste-modifying activity in the forms of dimers or tetramers, but not in monomers. Two histidine residues, exposed on the outside of the protein, are the main functional groups. In addition to the taste-modifying activity, it can also improve sensitivity of diabetic animals to insulin. Several methods have been developed for the purification of miraculin, including dialysis, centrifugation, solvent precipitations and chromatographic separation. Recently, genetic engineering approaches have been applied to its production in transgenic microbes and plants. This paper reviews recent studies on its structure, function, extraction and biosynthesis in transgenic organisms.

Keywords miraculin; taste-modifying protein; glycoprotein; transgenic

0 引言

神秘果(*Synsepalum dulcificum*)属于山榄科神秘果属^[1],是生长在西非的一种热带植物,具有很高的观赏价值,是一种稀有的种质资源。自从 20 世纪 60 年代引入中国之后,在云南、广东、广西、福建等地小面积种植。神秘果果肉中含有丰富的维生素、柠檬酸、钾、碘等物质,其种子含有丰富的天然矿物元素,如钙、镁、钾等^[2]。神秘果之所以引起人们的重视,主要是因为其体内含有一种特异的糖蛋白——神秘果素(miraculin)。这种神秘果素不能改变食物的味道,但能够改变人的味觉。食用神秘果后,再食用原本酸味强烈的食物,如柠檬等,都会变得芳香甜美。因此,神秘果素可以作为添加剂,在食品和医药等行业应用,可以解决不能进食糖类的糖尿病人和不愿意进糖食的减肥者的饮食瓶颈。早在 20 世纪 60 年代,国内外学者对其进行过广泛的研究。早期的研究主要集中在其理化性质以及提取分离方面。近年来,科学家对其作用机理及分子生物学方面进行了深入的研究。为促进神秘果素的进一步研究和开发利用,本文就神秘果素的结构性质、功能、作用机理、提取及转基因研究等各个方面的进展进行综述。

1 神秘果素的结构与性质

神秘果素是一种碱性蛋白,它不溶于水,其等电点约为 $pI=9$ ^[3]。神秘果素的性质不稳定,但是有研究表明^[4-5],神秘果素在低温、酸性环境下能够稳定存在。在 -20°C 下能够保存 12 个月不失活,在醋酸盐缓冲溶液中($pH=4$), 5°C 下能够保存 6 个月而不失活。神秘果素的特征吸收波长为 278 nm,吸光度

收稿日期: 2009-01-06

基金项目: 广东省科技攻关项目(2006B20101005)

作者简介: 潘丽萍,研究方向为植物化学与分子生物学,电子信箱: panliping2006@gmail.com; 李海航(通信作者),教授,研究方向为植物化学与分子生物学,电子信箱: li_haihang@yahoo.com

A 为 10.7^[4]。Theerasilp 等^[5-6]成功提取了神秘果素, HPLC 分析得到单一的峰, 并测出了其全部氨基酸组成, 证明神秘果素是由 191 个氨基酸残基组成, 分子量为 21 257 Da。由于糖基的存在, 使得分子量达到 24 600 Da。与前人所报道的 40 000~48 000 Da 的分子量有较大差异, 可能是因为之前的提取物存在着其他非蛋白成分。Masuda 等^[7]克隆到一条编码神秘果素蛋白(MIR)的 cDNA, 通过测序证明这条 cDNA 能够编码 220 个氨基酸, 其中包括 29 个氨基酸的信号肽和 191 个氨基酸的成熟肽。这与 Theerasilp 等的研究吻合。他们还通过 Northern blot 证明编码 MIR 的 mRNA 在传粉 3 周后在果肉中的表达。

Paladino 等^[8]近期研究指出, 神秘果素的单体在任何 pH 下均无活性, 而其二聚体和四聚体在酸性 pH 下表现出使味觉改变的活性。在不同 pH 下的分子动态模拟显示, 酸性 pH 下其二聚体表现出高度的开放构型, 这与其他研究者的推测相符。他们还通过突变实验, 证明在组成神秘果素的所有氨基酸残基中, 两个位于蛋白结构突出部位的组氨酸残基是其功能的活性位点。Ito 等^[9]也通过突变试验证明, Histidine-30 是神秘果素活性的重要位点。神秘果素虽然是一种甜味蛋白, 但研究表明, 其氨基酸序列和蛋白结构与其他甜味蛋白(thaumatin, monelin, mabinlin 等)均不相同。Nakajo 等^[10]也通过酶联免疫实验证明抗仙毛甜蛋白的抗体对神秘果素几乎无抗性。Theerasilp 等^[6]提取的神秘果素的氨基酸序列与大豆胰蛋白酶抑制剂的氨基酸序列却有高相似性。Tsukuda 等^[11]克隆到两种类型的神秘果素蛋白, 其氨基酸序列与神秘果素氨基酸序列相似, 都拥有大豆胰蛋白酶抑制剂家族模块, 但是蛋白功能与神秘果素蛋白相比却是大相径庭。

2 神秘果素的功能及其作用机理

神秘果之所以被称为“味觉魔术师”, 是因为含有神秘果素这一独特的糖蛋白。神秘果素具有使味觉改变的功能, 食用神秘果后, 再食用任何酸性食物, 都会品尝到甜味, 这种甜味可以持续 3 h 之久。Brouwer 等^[3]提取的神秘果素只需 0.1 mg 就具有变味功能。Giroux 等^[4]得到的浓缩物只需 0.02 mg 就能引发甜味。Kurihara 等^[12]提取的神秘果素浓缩物在浓度为 17.6 $\mu\text{g/mL}$ 时能引发最大甜味。Theerasilp 等^[5]提取的浓缩物在 10^{-6} mol/L 时就可诱发 0.02 mol/L 的柠檬酸溶液产生与 0.5 mol/L 的葡萄糖溶液相当的甜度。由于各研究者提取的浓缩物成分和浓度不同, 提取方法和提取过程中所用试剂不同, 使得测得变味程度表现出不同。但这些研究都明确表明, 神秘果素的变味功能非常灵敏, 只需要很小的剂量就能表现出高度的味觉改变功能。神秘果素味觉改变功能是一种天然的和安全的变化, 可以用于食品工业, 作为一种低能量的新型甜味剂, 也可以作为酸性食品的助食剂。

神秘果素并不是改变食物本身的味道, 而是改变人的味觉。这种味觉改变的作用机理, 目前存在着几种解释^[13-15], 一种是在食用神秘果素后, 并没有直接关闭酸味受体, 而

是酸性物质受到了甜味物质的减效作用。也有人认为神秘果素的变味功能是因为遇酸后改变了自身构象并与甜味受体发生键合, 使人感受到甜味。而 Yamamoto 等的实验却发现, 在食用神秘果后再食用柠檬酸, 大脑皮层对柠檬酸的反应时间与蔗糖相同, 柠檬酸中酸性成分在脑皮层下的传播显著消失, 脑磁波图只检测出甜味信号。因此他们认为在食用神秘果后, 酸性物质引起的味觉在传输过程中被处理了, 只有甜味信号到达了中枢系统。酸味变甜可能源于这种中枢系统中的味道信号传输。

近期研究发现, 神秘果素除了能够改变味觉外, 还具有改善胰岛素阻抗的功能。Chen 等^[16]以高果糖饲料喂食大白鼠, 诱发其胰岛素阻抗。然后喂食单一的神秘果素, 发现在喂食 150 min 后血糖会显著下降。其作用随着神秘果素用量的增加而增加, 呈现正相关的降血糖效果。同时, 他们给胰岛素阻抗的大白鼠连续喂食神秘果素 3 d, 每天喂 3 次, 每次 0.2 mg/kg, 再腹腔注射降糖药物, 发现神秘果素能够延长降糖药物的作用时间。综合这些实验结果, 他们认为神秘果素具有改善动物对胰岛素敏感性的功能。神秘果素这一新功能的发现, 为糖尿病患者的治疗开辟了一条新的途径。它不仅可以作为一种甜味剂, 解决糖尿病人无法进食甜食的问题, 同时还可能作为糖尿病人的辅助治疗药物。

3 神秘果素的提取

由于神秘果素的特殊性质, 许多学者早在 20 世纪 60 年代就开始了其活性成分的提取工作。常用的方法有透析法、离心分离法、溶剂沉淀法和色谱法等^[17]。透析法仅在研究的早期被人使用过, 这种方法简单, 但回收量太低。由于神秘果素不溶于水, 有人利用这一特点, 用离心法获得神秘果素。但这种方法难以得到大量的神秘果素, 而且提取物杂质太多。Inglett 等^[18]利用这种方法从 14 颗神秘果中得到了 0.31 g 含有活性成分的物质。用有机溶剂沉淀, 能够浓缩活性成分, 提高提取物中神秘果素的含量, 但这种方法需要用多种有机溶剂反复萃取, 过程非常繁琐。可以使用的有机溶剂有乙醚、氯仿、乙酸乙酯、无水乙醇、丙酮等。Inglett 等^[18]用这种方法从 20 g 冻干果肉中提取到 5 g 浓缩物。色谱法相对于前几种方法, 具有更好的分离效果, 而且得到的神秘果素的含量也相对较高, 且易于操作。Kurihara 和 Beidler^[12]首次利用离子交换色谱分离得到神秘果素, 并表明它是一种碱性糖蛋白。他们用该方法得到了 100 mg/kg 的神秘果素。也有人将几种方法联用, 来提高提取物中神秘果素的纯度和含量。Theerasilp 等^[5]成功地联用多种方法从 20 g 冻干果肉中得到 36 mg 神秘果素, 回收率为 75%, 提取出的神秘果素为无色, HPLC 分析为单一的峰, 说明提取的神秘果素纯度较高。

4 神秘果素的转基因研究

神秘果素的独特功能越来越受到人们的重视, 虽然现在已经能够从神秘果中提取到神秘果素。但是神秘果果实小、



产量低、资源非常有限,提取过程非常繁琐,且提取的神秘果素含量不高,总是伴随有其他的杂质存在。因此利用转基因技术,获得能够生产神秘果素的转基因植物或微生物,成为了研究者们又一关注的焦点。

早在 20 世纪,研究者们已经克隆到了神秘果素的基因。目前关于神秘果素的转基因研究还处在初期阶段,仅在米曲霉、番茄和莴苣中获得成功。Ito 等^[9]将神秘果素基因导入米曲霉中,获得了分泌神秘果素的转基因米曲霉,其产量为 2 mg/L。这种重组神秘果素与天然神秘果素在二级结构和功能活性上保持一致。这一结果显示通过微生物来生产神秘果素是可能的。Sun 等^[19-20]将神秘果素基因连同上游组成性启动子导入莴苣中,获得了转基因莴苣,在莴苣叶中检测到神秘果素的积累。这种神秘果素同样具备使酸性物质变甜的功能。随后,他们又将神秘果素基因转入番茄中,获得了高含量神秘果素的转基因番茄。Western blot 和酶联免疫分析证实,在转基因番茄中神秘果素基因能够高水平地稳定表达。他们在转基因番茄的叶子和果实中检测到了高含量的神秘果素,分别为 102.5 和 90.7 $\mu\text{g/g}$ 鲜重。纯化的重组蛋白与天然神秘果素相似,具有高度的味觉改变活性。生产高含量神秘果素的转基因莴苣和转基因番茄的获得,表明重组神秘果素蛋白在转基因植物中可以正确折叠,合成有完整功能的活性蛋白。因此,利用可食用性植物生产神秘果素是替代神秘果,生产神秘果素的一条有效途径。

5 问题与展望

食用神秘果素后,再吃其他任何东西,都可以品尝到甜美的味道,这对于无法进食糖类的糖尿病患者和不希望食糖类的减肥者等来说,无疑是一束曙光。目前对于神秘果素的研究虽然取得了一定的进展,但对于它的味觉改变功能仅停留在定性方面,其作用的分子机理还不甚明确。要想在食品和临床上应用,还要进一步通过实验对其定量,并进行相应的毒性实验和临床实验。此外,目前对神秘果素的提取分离还仅局限在小量操作范围,要想将它作为食品添加剂应用到工业生产上,需要大量种植神秘果或通过转基因生物来获得大量的生产神秘果素的原料和进一步完善其提取分离工艺。

参考文献 (References)

- [1] 成翠兰. 神秘果的生物学特性及提取物的应用 [J]. 云南热作科技, 2000, 23(1): 34-36.
Chen Cuilan. *Journal of Yunnan Tropical Crops Science and Technology*, 2000, 23(1): 34-36.
- [2] 陈萍, 杨通顺, 王欢. 神秘果基因组 DNA 提取方法比较研究 [J]. 广东农业科学, 2008(3): 26-28.
Chen Ping, Yang Tongshun, Wang Huan. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2008(3): 26-28.
- [3] Brouwer J N, van der Wel H, Francke A, et al. Miraculin, the sweetness-inducing protein from miracle fruit[J]. *Nature*, 1968, 220(10): 373-374.
- [4] Girous E L, Henkin R I. Purification and some properties of miraculin, a

- glycoprotein from *Synsepalum dulcificum* which provokes sweetness and blocks sourness[J]. *J Agr Food Chem*, 1974, 22(4): 595-601.
- [5] Theerasilp S, Kurihara Y. Complete purification and characterization of the taste-modifying Protein, miraculin, from miracle fruit[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(23): 11536-11539.
- [6] Theerasilp S, Hitotsuya H, Nakajo S, et al. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(4): 6655-6659.
- [7] Masuda Y, Nirasawa S, Nakaya K, et al. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein, miraculin[J]. *Gene*, 1995, 161(2): 175-177.
- [8] Paladino A, Costantini S, Colonna G, et al. Molecular modeling of miraculin: Structure analysis and functional hypotheses [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(1): 26-32.
- [9] Ito K, Asakura T, Morita Y, et al. Microbial production of sensory-active miraculin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(2): 407-411.
- [10] Nakajo S, Akabane T, Nakaya K, et al. An enzyme immunoassay and immunoblot analysis for curculin, a new type of taste-modifying protein: cross-reactivity of curculin and miraculin to both antibodies[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1118(3): 293-297.
- [11] Tsukuda S, Gomi K, Yamamoto H, et al. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like protein and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60: 125-136.
- [12] Kurihara K, Beidler L M. Mechanism of the action of taste-modifying protein[J]. *Nature*, 1969, 222(6): 1176-1179.
- [13] Bartoshuk L M, Gentile R L, Moskowitz H R, et al. Sweet taste induced by miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*)[J]. *Physiology and Behavior*, 1974, 12(3): 449-456.
- [14] Hajime N, Chizuko Y, Kayo T, et al. Analysis of gustatory-related brain magnetic fields induced by taste sensation [C]. International Congress Series, Baker & Taylor Books, 2002.
- [15] Yamamoto C, Nagai H, Takahashi K, et al. Cortical representation of taste-modifying action of miracle fruit in humans[J]. *Neuroimage*, 2006, 33(4): 1145-1151.
- [16] Chen C C, Liu I M, Cheng J T. Improvement of insulin resistance by miracle fruit (*synsepalum dulcificum*) in fructose-rich chow-fed rats[J]. *Phytother Res*, 2006, 20(11): 987-992.
- [17] 刘成伦, 梁廷霞. 神秘果素的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 147-150.
Liu Chenglun, Liang Tingxia[J]. *Food Research and Development*, 2008, 20(3): 147-150.
- [18] Inglett G E, Dowling B, Albrecht J J, et al. Taste-modifying properties of miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*)[J]. *J Agr Food Chem*, 1965, 13(3): 284-287.
- [19] Sun H J, Cui M L, Ma B, et al. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(2): 620-626.
- [20] Sun H J, Kataoka H, Yano M, et al. Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants[J]. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(6): 768-777.

(责任编辑 王芷)

