

O pożytkach z picia kawy



PIOTR KRAJEWSKI

Instytut Chemii Organicznej
Polska Akademia Nauk, Warszawa
LXIV Liceum Ogólnokształcące im. St. I. Witkiewicza
w Warszawie

bitex@gazeta.pl

Dr Piotr Krajewski współpracuje z IChO PAN. Zajmuje się edukacją młodzieży, jego uczniowie odnoszą sukcesy na krajowych i międzynarodowych olimpiadach chemicznych.

Badania ostatnich lat nie tylko wzbogaciły naszą wiedzę o mechanizmach słodkiego smaku, ale też o jego inhibitorach. Słodziki i inhibitory odkryte przez Polaków zostały opatentowane

Pewnego jesiennego popołudnia 1996 roku w jednym z laboratoriów Instytutu Chemii Organicznej PAN dwóch doktorantów zamiast pilnie pracować, piło kawę. Przy okazji gawędzili o chemii. Pierwszy z nich rozprawiał o sprytnych metodach spektroskopii NMR, jakie zastosował przy określaniu struktury pewnego skomplikowanego związku naturalnego, wyodrębnionego z jakiegoś grzyba. Drugi - Piotr sławił niesłychane korzyści jakie nauka światowa odniesie już wkrótce przy zastosowaniu proponowanej przez niego metody ustalania struktury przestrzennej związków organicznych. Pierwszy, znudzony przydługim opowiadaniem Piotra i wiedziony skandalicznym przyzwyczajeniem, otworzył stojącą na stole fiolkę z białą substancją. Włożył do niej pośliniony palec i zbadał smak przyklejonych do niego kryształków. Stwierdził z zaskoczeniem pomieszanym z entuzjazmem, że „badana” substancja jest bardzo słodka - wielokrotnie słodsza od zwykłego cukru. Piotr natychmiast powtórzył naganny i ryzykowny eksperyment kolegi, potwierdzając jego niespodziewaną, interesującą obserwację. „Badany” związek organiczny, oznaczony przez Piotra symbolem *LacBn*, był jednym z serii kilku związków otrzymanych przez niego w celu przeprowadzenia eksperymentów związanych z doktoratem. *LacBn* to związek znany,

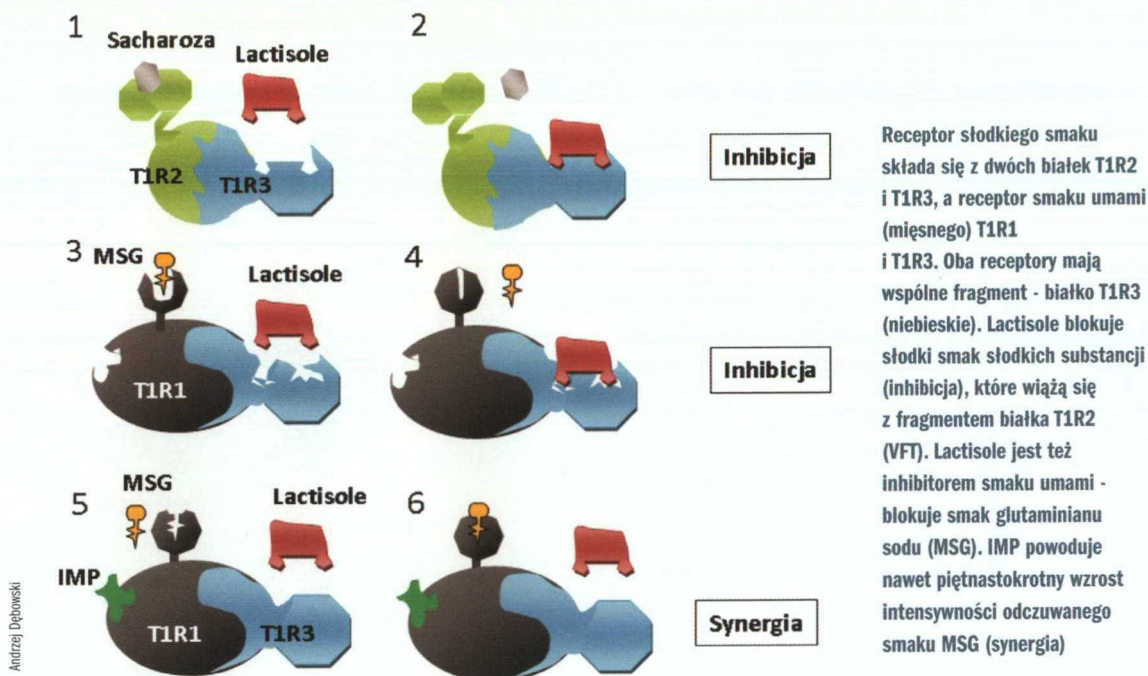
pierwszy raz otrzymany w 1982 roku przez dwóch Rosjan. Jak można się było spodziewać, doktoranci, pod wpływem niemożliwej do powstrzymania ciekawości, poddali gruntownemu „badaniu” pozostałe związki z serii. Stwierdzili, że niektóre z nich nie mają smaku, niektóre są gorzkie, ale słodki jest tylko *LacBn*. Tak oto kolejny raz powtórzyła się historia przypadkowego odkrycia nowego syntetycznego słodzika.

Przypadkowe smakowe odkrycia

W 1879 roku Ira Remsen na Uniwersytecie Johnsa Hopkinsa w Baltimore przypadkowo odkrył sacharynę. W 1937 roku Michael Sveda na Uniwersytecie Illinois przypadkowo stwierdził słodki smak cyklamianu sodu. W 1965 roku James Schlatter z firmy G. D. Searle przypadkowo odkrył słynny aspartam. Dwa lata później Karl Clauss i Harald Jensen z Hoechst AG przypadkowo odkryli acesulfam K. Sukraloza, bardzo słodka pochodna sacharozy, została odkryta w szczególnie zabawnych okolicznościach. W 1976 roku w Queen Elisabeth College w Londynie badacz pochodzący z Indii, Shashikant Phadnis, dostał od swojego szefa polecenie przetestowania kilku otrzymanych substancji. Zamiast przeprowadzić odpowiednie testy (ang. test), zrozumiał, że ma je spróbować (*ang.* test) i w skutek tego nieporozumienia językowego odkrył nowy syntetyczny słodzik. Wszystkie wymienione słodziki, może poza cyklamianem, stosowane są powszechnie do dziś i to na olbrzymią skalę.

Słodkość a struktura chemiczna

Piotr, człowiek ciekawski, postanowił zbadać w jaki sposób słodki smak pochodnych *LacBn* zależy od struktury chemicznej. Szczęśliwie, nowe pochodne można otrzymać w dość łatwy sposób z tanich odczynników. Związek wiodący, *LacBn*, zawiera fragment $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$. Piotr postanowił nieco zmodyfikować ten fragment zastępując jeden z atomów wodoru w grupie CH_2 grupą metylową. Otrzymany tak związek jest chiralny, to znaczy może występować w postaci dwóch rodzajów cząsteczek będących wzajemnymi odbiciami lustrzanymi, których



Andrzej Dębowski

nie można na siebie nałożyć. Coś tak jak prawy i lewy but. Otrzymał tak zwaną mieszaninę racemiczną, czyli mieszaninę zawierającą taką samą liczbę cząsteczek „lewych” i „prawych”. Ku jego rozczarowaniu nowa pochodna, *rac-LacFea*, nie była słodka. Ostudziło to trochę jego zapał w „odkrywaniu” nowych słodzików. Ale na krótko. Wiadomo bowiem od dawna, że enancjomery mogą mieć odmienne właściwości biologiczne. Piotr otrzymał więc „lewą” pochodną, czyli (*S*)-*LacFea*, która okazała się bez smaku i „prawą”, czyli (*R*)-*LacFea*, która okazała się bardzo słodka! Skoro *rac-LacFea* nie jest słodki, a (*R*)-*LacFea* jest, to jego enancjomer, (*S*)-*LacFea*, musi hamować w jakiś sposób odczuwanie słodkiego smaku, a więc być inhibitorem receptora czy też receptorów słodkiego smaku. Inhibicję potwierdzono serią prostych eksperymentów, w których do roztworów różnych słodkich substancji lub ich mieszanin dodawano inhibitor. Żadna ze zbadanych do tej pory słodkich substancji nie oparła się inhibitorowi. Były to: sacharoza, glukoza, słodkie aminokwasy, miód pszczeli, kilka słodzików dostępnych handlowo, zawierających aspartam, sorbitol, cyklamian sodu, sacharynę i wszystkie słodziki, które Piotr otrzymał sam. Słowem, wszystko co słodkie, stawało się niesłodkie. To bardzo ciekawy przypadek, chyba pierwszy taki w historii – jeden enancjomer jest słodki, a drugi jest inhibitorem słodkiego smaku.

Dalsze badania wykazały, że jeśli w *LacBn* atom tlenu w pierścieniu pięcioczłonowym zastąpi się grupą CH_2 , otrzymuje się pochodną *CpBn*, która jest nawet trochę słodsza (> 250 razy słodsza od cukru) od związku wodącego. Bardzo istotna jest obecność pierścienia fenyłowego (C_6H_5) – pochodne nie zawierające tego pierścienia nie są słodkie. Również podstawnienie któregośkolwiek z atomów wodoru

w pierścieniu fenyłowym dowolną grupą (np. metylową, nitrową, hydroksylową, czy atomem chloru) powoduje zanik słodkiego smaku. Istotne jest, żeby pomiędzy atomem azotu a grupą fenyłową znajdował się dokładnie jeden atom węgla. Gdy znajdują się tam dwa atomy węgla, pochodna nie jest słodka. Gdy ten atom węgla zostanie usunięty, słodkość również zanika. Zmiana pierścienia pięcioczłonowego *LacBn* na pierścień sześcioczłonowy (*6-LacBn*) także powoduje zanik słodkiego smaku.

Słodkość pod lupą

Do 1999 roku nie udało się wyizolować i scharakteryzować receptorów słodkiego smaku. Przy projektowaniu, czy wyjaśnianiu działania słodkich substancji nie można było postępować tak jak na przykład przy projektowaniu inhibitorów enzymów o znanej strukturze przestrzennej. Z konieczności musiano opierać się więc na modelach, które pozostaną spekulacjami do momentu scharakteryzowania struktury receptora. Powstało już wiele teorii dotyczących słodkiego smaku. Pierwsza poważna teoria, oparta na założeniu istnienia specyficznego receptora na powierzchni komórek smakowych, została opublikowana w *Nature* w 1967 roku przez Roberta Schallengerera i Terry’ego Acree. Według tej teorii wszystkie słodkie substancje organiczne zawierają donor (AH, zwykle grupa OH lub NH) i akceptor (B, zwykle atom tlenu grupy $\text{C}=\text{O}$) wiązania wodorowego w odległości od 2,5 do 4,0 Å (10^{-10} m), które oddziałują z komplementarną parą AH-B receptora tworząc dwa wiązania wodorowe.

W latach osiemdziesiątych Jean-Marie Tinti i Claude Nofre, badacze z uniwersytetu w Lyonie, sformułowali teorię strukturalną słodkiego smaku, zwaną multi-point attachment theory (MPA). Umożliwiła im

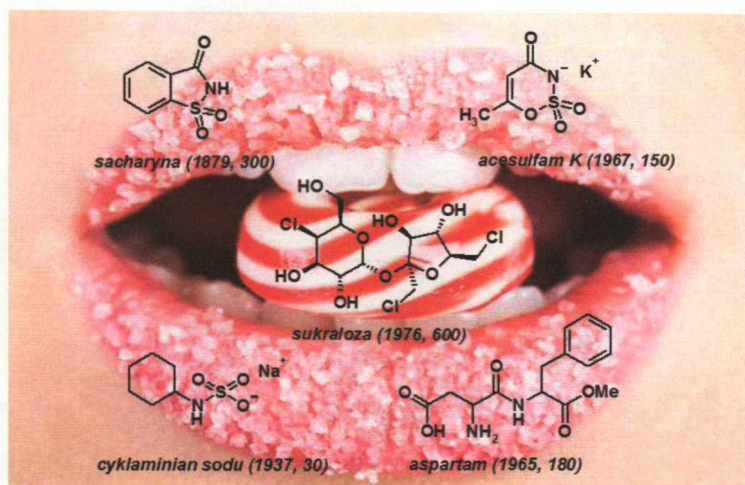
Słodziki i inhibitory słodkiego smaku

ona zaprojektowanie struktury *lugdunamu* najśłodszej znanej substancji (220 000-300 000 razy słodszej od cukru).

Piotr z kolegami z IChO PAN próbował ustalić jak bardzo słodkie są otrzymane przez niego związki. Zasada takiego pomiaru jest prosta. Przygotowano 10% roztwór badanego słodzika i każdy badający porównał jego smak z referencyjnym 10% roztworem cukru. Wszyscy zgodnie stwierdzili, że słodzik jest wielokrotnie słodszy od cukru. Następnie przygotowano kilka roztworów słodzika o mniejszych stężeniach, które podano osobom badającym w losowej kolejności. Celem było znalezienie takiego stężenia słodzika, dla którego roztwór badany jest tak samo słodki jak roztwór cukru. Słodkość oblicza się następnie dzieląc stężenie roztworu cukru przez stężenie roztworu słodzika, na przykład $10\%/0,05\% = 200$. Wyniki otrzymane w ten sposób interpretuje się bardzo ostrożnie, żeby nie zawyżyć zmierzonej słodkości. Zbadano w ten sposób kilka substancji i ustalono, że niektóre z nich są co najmniej 200-250 razy słodsze od 10-procentowego roztworu cukru. Dla porównania, popularny słodzik aspartam jest około 180 razy słodszy od cukru.

Receptory odkryte!

W ciągu ostatnich kilkunastu lat dokonano przełomowych odkryć naukowych, które znakomicie wzbogaciły wiedzę na temat słodkiego smaku. W 1999 roku połączone siły naukowców z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Diego i Narodowych Instytutów Zdrowia zidentyfikowały trzy geny, kodujące białka receptorów słodkiego smaku i smaku *umami* (smaku mięsnego – piątego obok 4 znanych podstawowych smaków), który został odkryty przez profesora Kikunae Ikedę w 1908 na Cesarskim Uniwersytecie w Tokio. Ikeda wykazał także, że substancją chemiczną odpowiedzialną za odczuwanie smaku *umami* jest glutaminian sodu, czyli sól monosodowa kwasu L-glutaminowego, aminokwasu kodowanego przez DNA. Okazało się, że odkryte receptory należą do znanego wcześniej typu tak zwanych receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR, G Protein Coupled Receptors). Rodzinę tych białek oznaczono symbolem hT1R, gdzie litera h oznacza *human*, T *taste*, czyli smak, a R receptor. W toku późniejszych badań wykazano, że w pełni funkcjonalny receptor słodkiego smaku musi składać się z dwóch białek hT1R2 i hT1R3, a receptor *umami* z hT1R1 i hT1R3. Jak widać



oba receptory mają wspólny element - białko hT1R3. Wyspecjalizowane receptory umieszczone są w błonie komórkowej komórek smakowych, które w grupach po 50 do 100 znajdują się głównie w jamie ustnej, ale także w jelitach. Receptor słodkiego smaku wiąże się z substancją pasującą do niego jak klucz do zamka, na przykład cząsteczką sacharozy, czyli zwykłego cukru, lub cząsteczką aspartamu. Prowadzi to do zmiany kształtu białka receptorowego, która uruchamia kaskadę reakcji biochemicznych, prowadzących, między innymi, do uwolnienia jonów wapnia z rezerwuarów wewnątrzkomórkowych. Powoduje to depolaryzację komórki, czyli zmianę wartości różnicy potencjałów elektrycznych na granicy błona komórkowa - zewnętrzne komórki. Z grupami wyspecjalizowanych komórek smakowych połączone są wyspecjalizowane neurony, które przewodzą powstały sygnał elektryczny do odpowiednich obszarów mózgu. Podobnie działa receptor smaku *umami*, aktywują go jednak cząsteczki o innej strukturze chemicznej niż te, które pobudzają receptor słodkiego smaku. Jest to na przykład wspomniany wyżej glutaminian sodu.

Inhibitory słodkiego smaku

W wyrobach cukierniczych zwykły cukier pełni nie tylko rolę substancji słodzącej, ale także niezbędnego składnika strukturalnego. W dżemach, galaretkach i konfiturach wysokie stężenie cukru ma funkcję przeciwbakteryjną. Niektórzy ludzie z powodu kłopotów z nerkami muszą pić silnie stężony syrop glukozowy. Sorbitol, słodki alkohol wielowodorotlenowy, dodawany jest do różnych produktów żywnościowych jako substancja utrzymująca wilgotność. Nadmierna słodkość stwarza czasami problem. Rozwiązaniem może być dodawanie inhibitorów słodkiego smaku. Inhibitory mogą też poprawiać smak syntetycznych słodzików charakteryzu-

Struktury chemiczne cząsteczek niskokalorycznych słodzików syntetycznych są zaskakująco różnorodne. Obok nazwy słodzika w nawiasie rok odkrycia i słodkość względem cukru

jących się „ciągnącym się” uporczywym smakiem lub nieprzyjemnym posmakiem. Można wyobrazić sobie zastosowanie inhibitorów słodkiego smaku w dietach odchudzających. Osoba „uzależniona” od słodczy, w chwili nieodpartej potrzeby zjedzenia czegoś słodkiego, sięgałaby po inhibitor i smak upragnionego ciastka czy czekolady nie byłby już tak atrakcyjny.

Jednym z często stosowanych inhibitorów słodkiego smaku jest lactisole, sól sodowa pochodnej kwasu propionowego, który został odkryty przez Michaela Lindleya z Tate and Lyle na początku lat osiemdziesiątych. Niewielki dodatek lactisolu obniża słodkość cukru i innych słodkich substancji o ponad 80%, jednocześnie poprawia walory potraw „wydobywając” z nich różne smaki. Co ciekawe, enancjomer (S) lactisolu jest inhibitorem, a enancjomer (R) jest nieaktywny. Innym znanym inhibitorem słodkiego smaku jest gymnemic acid, substancja wyizolowana z liści *Gymnema Sylvestre*, krzewu występującego w lasach tropikalnych subkontynentu indyjskiego. Żucie liści tej rośliny powoduje, że posłodzone napoje smakują jak woda.

Badanie inhibitorów słodkiego smaku przyczynia się do lepszego zrozumienia oddziaływania różnych cząsteczek z receptorem słodkiego smaku. Udowodniono, że lactisole i jego analogi strukturalne wiążą się z białkiem hT1R3 ludzkiego receptora.

Zielone szczytce

Lactisole blokuje słodki smak słodkich substancji, które wiążą się z fragmentem białka hT1R2 nazywanym Venus Fly Trap (VFT, zielone „szczytce”). Swoją nazwę fragment ten zawdzięcza owadożernej roślinie zwanej po polsku rosiczką. Roślina ta poluje na muchy i inne owady wykorzystując do tego celu specjalne pułapki. VFT receptora słodkiego smaku działa podobnie. Jeśli odpowiednia, dopasowana kształtem cząsteczka znajdzie się w „pułapce”, ta się zamyka i receptor ulega aktywacji. Przyłączenie lactisolu powoduje, że nie mogą złapać się nowe cząsteczki-muchy. Lactisole jest również inhibitorem smaku *umami*, to znaczy blokuje smak glutaminianu sodu, za co odpowiada analogiczny mechanizm. Inhibitory odkryte w IChO PAN prawdopodobnie wiążą się z obydwojema receptorami w podobny sposób.

Wzmacniacze słodkiego smaku

Jeśli substancja A wykazuje słodkość X, a substancja B słodkość Y, to spodziewamy się,

że mieszanina tych substancji będzie wykazywać słodkość X+Y. Często jednak słodkość mieszaniny jest większa. Takie zjawisko nazywamy efektem synergicznym. Jest on wykorzystywany w praktyce w przemyśle spożywczym, bo prowadzi do zmniejszenia kosztów na jednostkę słodkości. Mieszaniny słodzików mogą mieć smak o wiele przyjemniejszy niż każdy ze słodzików osobno. Taki efekt wykorzystano np. w Coca-Coli Zero, gdzie aspartam zmieszany jest z innym słodzikiem. Podobne zjawisko występuje w przypadku smaku umami. Niedawno zaproponowano wyjaśnienie efektu synergicznego na poziomie molekularnym. Cząsteczki aktywujące receptor umami wiążą się z fragmentem VFT, a IMP i GMP wiążą się z cząsteczką tego samego białka, bardzo blisko VFT, stabilizując zamkniętą konformację. Dzięki osiągnięciom biologii molekularnej odkryto cząsteczki zdolne do wzmocnienia słodkiego smaku cukru, podobnie jak IMP i GMP wzmacniają smak glutaminianu. Substancja oznaczona symbolem S6419 wzmacnia smak zwykłego cukru około czterokrotnie, pozwala więc osiągnąć ten sam efekt smakowy przy tylko 25 procentowej zawartości cukru, a więc na zmniejszenie kosztów produkcji i co ważniejsze powinno mieć bardzo korzystny wpływ na zdrowie konsumentów.

Na początku 2009 roku zostało złożone zgłoszenie w Urzędzie Patentowym RP. Ochronę patentową udało się rozszerzyć na kraje europejskie, USA i Chiny. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

- Li X., Staszewski L., Xu H., Durick K., Zoller M., Adler E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *PNAS*, 99, 4692-4696.
- Zhang F., Klebansky B., Fine R. M., Xu H., Pronin A., Liu H., Tachdjian C., Li H. (2008). Molecular mechanism for the umami taste synergism. *PNAS*, 105, 20930-20934.
- Zhang F., Klebansky B., Fine R. M., Liu H., Xu H., Servant G., Zoller M., Tachdjian C., Li H. (2010). Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *PNAS*, 107, 4752-4757.

Rosiczka poluje na muchy i inne owady wykorzystując do tego celu specjalne pułapki. VFT receptora słodkiego smaku działa podobnie. Jeśli odpowiednia, dopasowana kształtem cząsteczka znajdzie się w „pułapce”, pułapka się zamyka i receptor ulega aktywacji



David Webb, The Botanical Society of America