Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա, Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Национальная Академия Наук Армении, Биологический Журнал Армении
National Academy of Sciences of Armenia, Biological Journal of Armenia

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

Биолог. журн. Армении, 1-2 (56), 2004

УДК 577.152.32

ТРАНСГЛЮКОЗИЛИРОВАНИЕ СТЕВИОЗИДА ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗАМИ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

В.А. АБЕЛЯН*, А.М. БАЛАЯН*, В.Т. КОЧИКЯН*, А.А. МАРКОСЯН**

**Институт микробиологии НАН Армении, 378510 Абовян, Армения*
***Биотехнологическая корпорация «Стевиан», 50450 Куала Лумпур, Малайзия*

Циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТаза, КФ 2.4.1.19) из мезофильных, термофильных, алкалофильных и галофильных бацилл использованы для трансгликозилирования стевиозида с целью устранения горечи и послевкусия, с использованием циклодекстринов (ЦД) в качестве донора. Показано, что ЦГТазы экстремофильных микроорганизмов могут быть эффективными биокатализаторами. Оптимальные pH и температура для всех ферментов находились в пределах 6,5-7,5 и 45° соответственно. Оптимальное соотношение стевиозида и ЦД и общая концентрация сухих веществ для получения продукта с наилучшими вкусовыми качествами были 1:1 (вес/вес) и 11,6% соответственно.

Մեզոֆիլ, թերմոֆիլ, ալկալոֆիլ և հալոֆիլ բացիլների ցիկլոդեքստրին գլյուկանոտրանսֆերազները (ՑԳՏ-ազ, ԵԴ 2.4.1.19) օգտագործվել են ստեվիոզիդի տրանսգլիկոզիդացման համար համային հատկանիշների բարելավման նպատակով, ցիկլոդեքստրինները (ՑԴ) որպես դոնոր կիրառելով: Ցույց է տրվել, որ էքստրեմոֆիլ միկրոօրգանիզմների ՑԳՏ-ազները կարող են հանդես գալ որպես արդյունավետ կենսակատալիզատորներ: Բոլոր ֆերմենտների համար pH-ի և ջերմաստիճանի օպտիմալ արժեքները գտնվել են համապատասխանաբար 6,5-7,5 և 45° սահմաններում: Լավագույն համային հատկություններով օժտված պրոդուկտի ստացման համար ստեվիոզիդի և ՑԴ-ների օպտիմալ հարաբերակցությունը և չոր նյութերի ընդհանուր կոնցենտրացիան կազմել են 1:1 (q/q) և 11,6%, համապատասխանաբար:

The cyclodextrin glucanotransferases (CGTase, EC 2.4.1.19) produced by mesophilic, thermophilic, alcalophilic and halophilic bacilli have been applied for the transglycosylation of stevioside to remove the bitterness and aftertaste, using the cyclodextrins (CDs) as donors. It was shown that the CGTases produced by extremophilic microorganisms can be used as efficient biocatalists. The optimum pH and temperature were in the range of pH 6,5-7,5 and 45°, respectively. The optimum ratio of stevioside to CD and total concentration of dry materials for the synthesis of the product with most better taste quality were 1:1 (w/w) and 11,6%, respectively.

Циклодекстринглюканотрансферазы - трансглюкозилирование - подсластители - стевиозид

Стевиозид является натуральным подсластителем, который выделяют из листьев растений *Stevia rebaudiana*. Он обладает низкой калорийностью

и широко используется в качестве натурального подсластителя - заменителя сахара [5, 6, 9, 10, 13, 14].

Водно-спиртовый экстракт содержит смесь различных дитерпеновых гликозидов, которые имеют единую основу – стевиол и отличаются содержанием углеводных остатков в положении С13 и С19. Были выделены и идентифицированы стевиозид, ребаудиозиды А, С, Е и D, дулкозид А, рубузозид и стевиобиозид. Основным компонентом среди них является стевиозид, который в 250-300 раз слаще сахара. При его регулярном употреблении снижается содержание сахара, радионуклидов и холестерина в организме, улучшается регенерация клеток и коагуляция крови, тормозится рост новообразований, укрепляются кровеносные сосуды. Он проявляет также желчегонное, противовоспалительное и диуретическое свойства, препятствует образованию язв в желудочно-кишечном тракте [3].

Однако стевиозид обладает остаточной горечью и послевкусием, которые влияют на его качественные характеристики. Их можно снять реакцией межмолекулярного трансгликозилирования под действием различных ферментов, в течение которой происходит присоединение новых углеводов в вышеназванных положениях. Именно количество углеводных единиц в указанных позициях определяет качество и степень сладости компонента.

В качестве трансгликозилирующего фермента используют пуллуланазу, изомальтазу [12], β-галактозидазу [8] и декстрин сахаразу [17], а в качестве доноров – пуллулан, мальтозу, лактозу и частично гидролизованный крахмал соответственно. Однако они позволяют устранять горечь только частично из-за низкого выхода производных с требуемыми качественными характеристиками.

Наилучшие результаты получены трансгликозилированием с помощью циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТаза) из *Bacillus macerans* и крахмала в качестве донора [4]. При этом из полученных производных только два (4''-O-α-D-глюкозил-стевиозид и 4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозид) обладали соответствующими вкусовыми качествами, однако их выход достаточно низок и составлял 2,5 и 6,5% соответственно. Кроме того, очистка смеси производных стевиозида представляет собой достаточно сложную задачу из-за большого количества низкомолекулярных мальтоолигосахаридов.

Цель работы - изучение особенностей трансгликозилирования стевиозида с применением ЦГТаз различных групп микроорганизмов и циклодекстрина в качестве донора.

Материал и методика: В качестве продуцентов ЦГТаз использовали вновь выделенные мезофильные бациллы: *Bacillus macerans* ИНМИА-BIO-4m, *Bacillus circulans* ИНМИА-BIO-5m, термофильный штамм *Bacillus stearothermophilus* ИНМИА-В-4006, алкалофильный *Bacillus alcalophilus* ИНМИА-ВА-4229 и галофильный *Bacillus halophilus* ИНМИА-BIO-12H.

Выращивание штаммов в глубинных условиях и получение ЦГТаз осуществляли по ранее описанной схеме [1, 2]. Биомассу отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин. Ультрафильтрационное концентрирование осуществляли на приборе УПЛ-0,6 на колонке АР-0,2 (Россия). Количественное определение ЦД и производных стевиозида проводили с помощью ВЭЖХ согласно [11]. Белок определяли по Лоури, используя БСА в качестве стандарта; количество редуцирующих сахаров – по методу Сомоджи-Нельсона.

Определение циклизирующей активности ЦГТаз. Смесь 2 мл 2%-ного раствора картофельного крахмала в соответствующем буфере (оптимальный pH для каждого фермента) и 0,5 мл неочищенного фермента инкубировали при 50°. Через определенные интервалы времени (0,5-1,0 мин) отбирали 600 мкл пробы и добавляли 900 мкл фенолфталеинового [16] или бромкрезолового зеленого [7] реагента для идентификации β- или γ-ЦД соответственно. Количество α-ЦД определяли методом ВЭЖХ. За единицу активности принимали количество фермента, которое продуцировало 1 мкмоль ЦД в 1 мин.

Определение трансгликозилирующей активности ЦГТаз. Определение проводили согласно модифицированному методу [15]. Реакционная смесь. содержащая испытуемый препарат ЦГТазы (4,0 ед.), 10 мг растворимого крахмала, 50 ммоль сахарозы и 10 ммоль $CaCl_2$ в 1 мл 0,1 М буфера с оптимальным pH, инкубировали при 50° в течение 15 мин. Реакцию останавливали кипячением (10 мин) и после центрифугирования (10000 g, 10-15 мин) определяли количество мальтозилфруктозы методом ВЭЖХ. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль мальтозилфруктозы за 1 мин.

ТСХ продуктов проводили в системе растворителей этилацетат-этанол-вода (8:2:1) на пластинках "Silufol" (ЧССР).

В работе использовали стевиозид "Shandong Huaxian Stevian Co., LTD" (КНР) и реактивы производства «Wako Pure Chemical Industries», LTD (Япония).

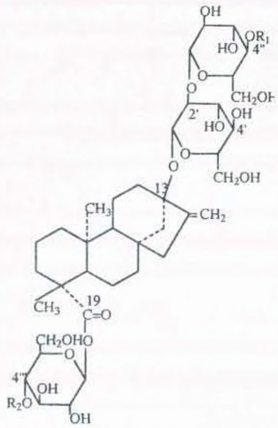
Результаты и обсуждение: Исследовали трансглюкозилирующую активность ЦГТаз из различных групп микроорганизмов для получения глюкозилированных производных стевиозида в присутствии различных циклодекстринов (ЦД) в качестве доноров. Полученные соединения очищали методом ВЭЖХ, а их вкусовые качества оценивали органолептически в ГНУ ВНИМИ и ВНИИ кондитерской промышленности (Москва).

Получение трансгликозилированного стевиозида. β-Циклодекстрин (β-ЦД) в количестве 58 или 116г растворяли в 600мл воды, добавляли 58 или 116 г стевиозида соответственно и раствор выдерживали при 45° в течение 15 мин до полного растворения компонентов (конечная концентрация субстратов составляет 11,6 и 23,2%; pH реакционной среды был оптимальным для каждого фермента). Добавляли 5,0; 8,5; 17,0; 34,0 или 68 единиц ЦГТазы на 1г стевиозида, количество раствора доводили до 1л дистиллированной водой и трансформацию осуществляли при вышеназванной температуре в течение 8 ч и дополнительно 12 ч при 32°.

Для приготовления растворов 40- и 60%-ной концентрации вместо β-ЦД использовали α-ЦД.

По истечении этого времени реакционную смесь подвергали термообработке при 100° в течение 10 мин для инактивации фермента, обрабатывали активированным углем (1%) при 70° в течение 20 мин, отработанный уголь отделяли фильтрованием и фильтрат выпаривали при 45-50° под вакуумом до содержания сухих веществ 60%.

Очистка трансгликозилированных продуктов. Концентрированную реакционную смесь выдерживали в течение 10-12 ч при 10-12° для осаждения остаточного ЦД, фильтровали и фильтрат пропускали через колонку с DIAION HP-20 (1,6 x 50 см) в количестве 10% (вес/объем). Колонку промывали тремя объемами дистиллированной воды, элюцию трансгликозилированных продуктов проводили последовательно двумя объемами 20-, 40-, 80- и 96%-ного этилового спирта и растворы высушивали досуха при 45-50° под вакуумом



	R1	R2	Наименование
1.	α-Glc	H	4''-O-α-D-глюкозил-стевиозид
2.	H	α-Glc	4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозид
3.	α-Glc$^4_\alpha$ ^{1}Glc	H	4''-O-α-мальтозил-стевиозид
4.	α-Glc	α-Glc	4'',4''-ди-O-α-D-глюкозил-стевиозид
5.	H	α-Glc$^4_\alpha$ ^{1}Glc	4'''-O-α-мальтозил-стевиозид
6.	α-Glc$^4_\alpha$ ^{1}Glc$^4_\alpha$ ^{1}Glc	H	4''-O-α-мальтотриозил-стевиозид
7.	α-Glc$^4_\alpha$ ^{1}Glc	α-Glc	4''-O-α-мальтозил-4''-O-a-D-глюкозил-стевиозид
8.	α-Glc	α-Glc$^4_\alpha$ ^{1}Glc	4''-O-α-D-глюкозил-4''-O-α-мальтозил-стевиозид
9.	H	α-Glc$^4_\alpha$ ^{1}Glc$^4_\alpha$ ^{1}Glc	4'''-O-α-мальтотриозил-стевиозид

Рис.1. Продукты α-1,4-трансгликозилирования стевиозида.

Дополнительную очистку осуществляли с помощью ТСХ.

В результате было выделено девять производных (рис.1), которые существенно отличались своими вкусовыми качествами. Лучшими были признаны 4''-O-α-D-глюкозил-стевиозид и 4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозид (табл.1). Эти результаты согласуются с данными, полученными при использовании в качестве донора крахмала [4].

Таблица 1. **Сравнительная сладость различных гликозидов**

Гликозиды	Относительная сладость к сахарозе	Вкус	Соотношение глюкозных единиц в положениях 13-OH и 19-COOH
Стевиозид	160	Похож на сахарозу	2:1
	Производные стевиозида (см. рис.1)		
1	190	приятный, очень вкусный	3:1
2	210	приятный, очень вкусный	4:1
3	140	плохое послевкусие	3:2
4	140	плохое послевкусие	2:3
5	125	послевкусие	5:1
6	150	горький	4:2
7	150	плохое послевкусие	3:3
8	130	освежающий вкус	2:4
9	140	горькое послевкусие	3:2

Влияние pH и температуры. Для выявления оптимальных значений pH и температуры процесса по 5,8г β-ЦД и стевиозида растворяли в 85мл буферного раствора с соответствующим pH, добавляли 8,5 единиц ферментного раствора на 1г стевиозида и проводили наблюдения при 37°; 45°; 50° и 55° течение 8 ч и при 32° – 12 ч.

Эффективность процесса оценивали по выходу 4''-O-α-D-глюкозил-стевиозида и 4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозида и по вкусовому качеству реакционной смеси после обработки активированным углем, отделения остаточного ЦД и высушивания досуха.

Оптимальный pH для всех исследованных ферментов находился в пределах 6,5-7,5 (рис.2).

Оптимальная температура для ферментов, продуцируемых мезофильным и галофильным штаммами находилась в пределах 45-50°, а для ЦГТаз термофильного и алкалофильного штаммов - 50-55° (рис.3). Однако по выходу 4''-O-α-D-глюкозил-стевиозида и 4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозида и по вкусовым качествам реакционных смесей наилучшей температурой для проведения процесса признали 45° для всех изучаемых ферментов.

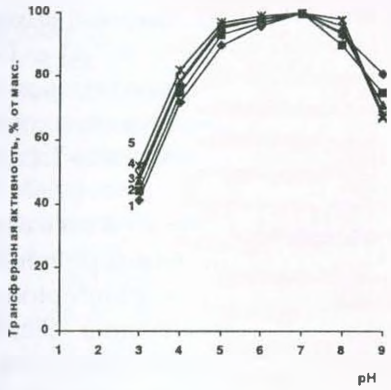


Рис.2. Влияние pH на трансферазную активность ЦГТаз. (1), *B.alcalophilus*; (2), *B.halophilus*; (3), *B.stearothermophilus*; (4), *B.circulans*; (5), *B.macerans*.

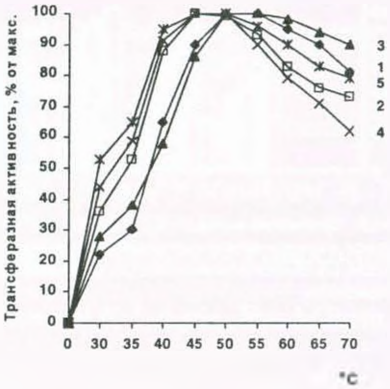


Рис.3. Влияние температуры на трансферазную активность ЦГТаз. (1), *B.alcalophilus*; (2), *B.halophilus*; (3), *B.stearothermophilus*; (4), *B.circulans*; (5), *B.macerans*.

Влияние количества фермента. Для выявления количества вносимого фермента на эффективность процесса готовили 11,6%-ный раствор (pH 7,0) стевиозида и β-ЦД в соотношении 1:1 (вес/вес), добавляли различные количества ферментов, реакцию осуществляли в течение 8 ч при 45° и дополнительно 12 ч при 32°.

В случае всех исследованных ферментов с увеличением количества биокатализатора повышалась степень трансферазной реакции. Однако суммарный выход 4''-O-α-D- и 4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозидов достигает максимума при использовании 8-9 единиц фермента на 1г стевиозида для ЦГТаз *B.macerans* и *B.stearothermophilus*, 11-11,5 единиц для фермента *B.circulans* и 15-16 единиц для ЦГТаз, продуцируемых *B.halophilus* и

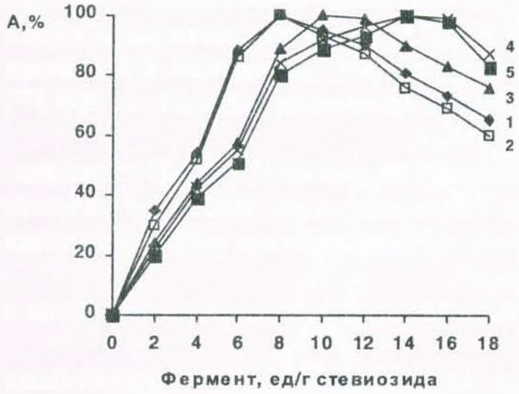


Рис.4. Суммарный выход (A,%) 4''-O-α-D- и 4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозидов в зависимости от количества добавляемой ЦГТазы. (1), *B.macerans*; (2), *B.stearothermophilus*; (3), *B.circulans*; (4), *B.halophilus*; (5), *B.alcalophilus*.

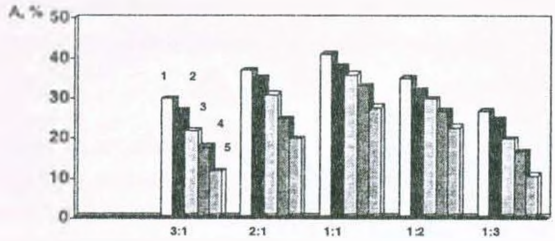


Рис.5. Суммарный выход (A,%) 4''-O-α-D- и 4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозидов в зависимости от соотношения стевиозида и бета-ЦД. (1), *B.macerans*; (2), *B.stearothermophilus*; (3), *B.circulans*; (4), *B.halophilus*; (5), *B.alcalophilus*.

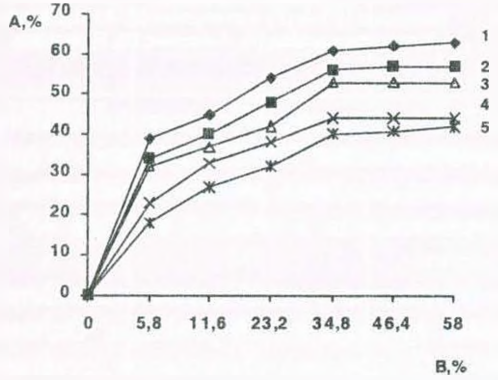


Рис.6. Влияние общей концентрации субстратов (B,%) на трансферазную активность (A,%) ЦГТаз. (1), *B.macerans*; (2), *B.stearothermophilus*; (3), *B.circulans*; (4), *B.halophilus*; (5), *B.alcalophilus*.

B.alcalophilus (рис.4).

Влияние соотношения и концентрации субстратов. На трансгликозилирование стевиозида определенное влияние оказывает также соотношение исходных компонентов в реакционной смеси. Для выявления оптимального варианта, готовили 11,6%-ный раствор стевиозида и циклодекстрина в различных соотношениях, добавляли оптимальные количества ЦГТаз. Реакцию осуществляли в течение 8 ч при 45° и дополнительно 12 ч при 32°. Выявлено, что в данных условиях эксперимента суммарный выход 4''-O-α-D- и 4'''-O-α-D-глюкозил-стевиозидов достигает максимума при соотношении субстратов 1:1 в/в (рис.5).

Эффективность трансгликозилирования повышается пропорционально увеличению общей концентрации субстратов, однако это не приводит к полному устранению горечи и послевкусия. По вкусовым качествам конечного продукта наилучшей выбрана концентрация 11,6% при весовом соотношении стевиозида и циклодекстрина 1:1 (рис.6).

Таким образом, в результате проведенных сравнительных исследований впервые показано, что ЦГТазы экстремофильных микроорганизмов, помимо

ферментов, продуцируемых B.macerans, могут быть эффективными биокатализаторами в реакциях трансгликозилирования стевиозида. Причем, вместо крахмала в качестве донора могут быть использованы различные ЦД. При этом существенно облегчается процесс очистки конечного продукта, а также уменьшается суммарное количество производных стевиозида с более длинными углеводными цепочками и линейных олигосахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелян В.А., Балаян А.М., Манукян Л.С., Афян К.Б., Меликсетян В.С., Андреасян Н.А., Маркосян А.А.* Прикл. биохимия и микробиология. *38*, 6, 616-624, 2002.
2. *Абелян В.А., Ямамото Т., Африкян Э.Г.* Биохимия. *59*, 6, 778-788, 1994.
3. *Зубцов В.А., Осипова Л.Л., Лебедева Т.И., Антипова Н.В.* Мат-лы I Междунар. научно-практической конференции «Растительные ресурсы для здоровья человека», 23-27 сентября 2002, Москва-Сергиев-Пасад, «Арес», 356-358.
4. *Fukunaga Y., Miyata T., Nakayasu N., Mizutani K., Kasai R., Tanaka D.* Agric. Biol. Chem. *53*, 1603-1607, 1989.
5. *Kaneda N., Kasai R., Yamasaki K., Tanaka O.* Chem. Pharm. Bull. 25, 2466-2472, 1977.
6. *Kasai R., Kaneda N., Tanaka O., Yamasaki K., Sakamoto I., Murimoto K., Okada S., Kitahata S., Furukawa H.* Nippon Kagaku Kaishi. P. 726, 1981.
7. *Kato T., Horikoshi K.* Anal. Chem. *56*, 1738-1740, 1984.
8. *Kitahata S., Ishikawa H., Miyata T., Tanaka O.* Agric. Biol. Chem. *53*, 11, 2923-2928, 1989.
9. *Kobayashi S., Horikawa S., Degrandi I.H., Ueno J., Mitsuhashi H.* Phytochemistry. *16*, 1405-1411, 1977.
10. *Kohda H., Kasai R., Yamasaki K., Murakami K., Tanaka O.* Phytochemistry. *15*, 981-986, 1981.
11. *Kolb N., Herrera J.L., Ferreyra D.J., Uliana R.F.* J. Agric. Food Chem. *49*, 4538-4541, 2001.
12. *Lobov S.V., Kasai R., Ohtani K., Tanaka O., Yamasaki K.* Argic.Biol.Chem. Dec 55, 2959-2965, 1991.
13. *Mosetting E., Beglinger U., Dolder F., Lichiti H., Quitt P., Waters J.A.* J. Am. Chem. Soc. *85*, 2303-2305, 1963.
14. *Nabeta K., Ito K., Sugisawa H.* Nippon Nogeikagaku Kaishi. *51*, 179-184, 1977.
15. *Nakamura A., Hega K., Yamane K.* FEBS Lett. *337*, 66-70, 1994.
16. *Vikmon M.* Proc. first intern. symp. on cyclodextrins / Ed. Szejtli J. Budapest: D.Reidel. 69-74, 1982.
17. *Yamamoto K., Yoshikawa K., Okada S.* Biosci. Bioterchnol. Biochem. *58*, 9, 1657-1661, 1994.

Поступила 07.X.2003