

Биолог. журн. Армении, 3-4 (56), 2004

УДК 577.152.32

## ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ СТЕВИОЗИДА И РЕБАУДИОЗИДА А С ПРИМЕНЕНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦГТаЗ

В.Т. КОЧИКЯН

*Республиканский Центр депонирования микробов и  
Институт микробиологии НАН Армении, 378510 г.Абовян*

Циклодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТаза, КФ 2.4.1.19) из мезофильных, термофильных, алкалофильных и галофильных бацилл использованы для трансгликозилирования стевиозида и ребаудиозида А с использованием крахмала в качестве донора. Наибольшей эффективностью обладают ЦГТазы из *Bacillus stearothermophilus* В-5076 и *Bacillus macerans* ВЮ-4м. Метод с успехом может быть использован для прямого трансгликозилирования экстракта стевии без очистки отдельных его компонентов.

Սեզոնֆիլ, թերմոֆիլ, ալկալոֆիլ և հալոֆիլ մանրէների կողմից արտադրված ցիկլոդեքստրին գլյուկանոտրանսֆերազ (ՑԳՏազ) ֆերմենտները փորձարկվել են ստեվիոզիդի եվ ռեբաուդիոզիդի А-ի տրանսգլյուկոզիլացման համար օսլան օգտագործելով որպես դոնոր: Լավագույն արդյունքները ստացված են *Bacillus stearothermophilus* В-5076 և *Bacillus macerans* ВЮ-4м ՑԳՏազների դեպքում: Եղանակը մեծ արդյունավետությամբ կարելի է օգտագործել ստեվիա բույսից ստացված էքստրակտի տրանսգլյուկոզիլացման համար՝ առանց նախնական մաքրման:

Cyclodextrin glucanotransferases (CGTase, EC 2.4.1.19) produced by mesophilic, thermophilic, alcalophilic and halophilic bacilli have been applied for the transglycosylation of stevioside and rebaudioside A in the presence of starch as donor. The CGTases produced by *Bacillus stearothermophilus* В-5076 and *Bacillus macerans* ВЮ-4m are the most efficient. The method can be applied for the transglycosylation of Stevia extract directly without any preliminary purification of individual compounds.

*Циклодекстрин глюканотрансфераза - стевиозид - ребаудиозид А -  
трансгликозилирование*

Стевиозид и ребаудиозид А - натуральные подсластители выделены из листьев растения *Stevia rebaudiana* Bertoni. Они обладают низкой калорийностью и широко используются в качестве заменителей сахара. Выделены и идентифицированы стевиозид, ребаудиозиды А, В, С, Е и D, дулкозид А, рубузозид и стевиолбиозид. Основным компонентом экстракта является стевиозид, ребаудиозид А, ребаудиозид С и дулкозид А [7, 9].

При их регулярном употреблении снижается содержание в крови сахара, радионуклидов и холестерина, улучшается регенерация клеток и коагуляция крови, тормозится рост новообразований, укрепляются кровеносные сосуды [6, 11]. Они проявляют также желчегонное, противовоспалительное и диуретическое свойства, препятствуют образованию язв в желудочно-кишечном тракте [5].

Из них наибольшим коммерческим потенциалом обладают стевииозид и ребаудиозид А. Однако они обладают остаточными горечью и вкусом, которые влияют на их качественные характеристики. Ферментативное трансгликозилирование стевииозид в присутствии соответствующих доноров позволяет частично или полностью решить эту проблему. Существуют определенные трудности при модификации ребаудиозид А, который очень медленно вовлекается в реакцию трансгликозилирования.

В наших предыдущих работах показана эффективность трансгликозилирования стевииозид с помощью циклодекстрин глюканотрансфераз (ЦГТаз) из различных групп микроорганизмов с использованием циклодекстринов (ЦД) в качестве доноров [3, 4].

Цель работы - изучение особенностей трансгликозилирования стевииозид и ребаудиозид А с применением ЦГТаз различных групп микроорганизмов и крахмала в качестве донора.

**Материал и методика.** В качестве биокатализатора использованы ЦГТазы термофильных и мезофильных штаммов с выраженной способностью к межмолекулярному трансгликозилированию. Это *Bacillus stearothermophilus* ИНМИА-В-5076, *B. stearothermophilus* ИНМИА-В-4019, *B. circulans thermophilus* ИНМИА-В-4024, а также мезофильные бациллы *B. macerans* ИНМИА-В10-4м, *B. macerans* ИНМИА-В10-2м и *B. macerans* ИНМИА-В10-12м. Выращивание штаммов в глубинных условиях и получение ЦГТаз осуществляли по ранее описанной схеме [1,2]. Биомассу отделяли центрифугированием при 5000 г в течение 20 мин.

Определение трансгликозилирующей активности ЦГТаз проводили согласно модифицированному методу [10]. Реакционную смесь, содержащую испытуемый препарат ЦГТазы (4,0 ед.), 10 мг растворимого крахмала, 50 ммоль сахарозы и 10 ммоль  $\text{CaCl}_2$  в 1 мл 0,1 М буфера с оптимальным рН, 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.

Стевиозид, ребаудиозид А и их производные определяли методом ВЭЖХ (Agilent Technologies 1100 Series, США) с применением колонки Zorbax-NH<sub>2</sub> и подвижной фазы ацетонитрил-вода (70 : 30 об/об или 80 : 20 об/об) со скоростью протока 1 мл/мин. В качестве детектора использовали УФ при 210 нм. Для окончательного анализа продукта использовали метод градиента от 80:20 об/об (2 мин) до 50:50 об/об в течение 70 мин.

В работе использовали смесь стевииозид и ребаудиозид А в весовом соотношении 1:1 "Shandong Huaxian Stevia Co., LTD" (КНР) и реактивы производства «Wako Pure Chemical Industries», LTD (Япония).

**Результаты и обсуждение.** Исследовали трансгликозилирующую активность ЦГТаз из различных групп микроорганизмов для получения глюкозилированных производных стевииозид и ребаудиозид А в присутствии крахмала в качестве донора. Полученные соединения очищали, идентифицировали различными методами и оценивали их вкусовые свойства.

**Соотношение и концентрация субстратов.** Для выявления оптимальной концентрации реакционной смеси были приготовлены 10, 20, 30, 40, 50 и 60%-ные растворы крахмала и смеси стевииозид с ребаудиозидом А в соотношении 1:1 в/в (рН 6,5-7,0). Разжижение крахмала было осуществлено бактериально разжижающей  $\alpha$ -амилазой до декстрозного эквивалента в пределах 15-20. Количество ЦГТазы равнялось 50 ед/г крахмала. В случае с ЦГТазами термофильных штаммов реакцию осуществляли при постоянном

перемешивании в течение 24 ч при 55°, в то время как для ферментов мезофилов температуру устанавливали 50°.

Выявлено, что с увеличением исходной концентрации скорость реакции существенно ускоряется и увеличивается количество трансферных продуктов. Причем, со временем с увеличением концентрации исходного раствора существенно повышается количество высокомолекулярных производных. В примененных условиях реакции ЦГТазы термофильных штаммов являются более предпочтительными.

С увеличением соотношения крахмал:гликозиды уменьшается сладость конечного продукта и увеличивается выход трансферных продуктов. Так, если при соотношении крахмала и гликозидов 1:1 (в/в) сладость полученного продукта без дополнительной очистки превосходит сладость сахара в 150-170 раз, то при 10:1 – всего 15-30.

**Влияние pH и температуры.** Для выявления оптимальных значений pH и температуры процесса 50 г крахмала по абсолютной массе и смесь стевииозидов с ребаудиозидом А в количестве 50 г растворяли в 150 мл буферного раствора с соответствующим pH, добавляли раствор фермента с активностью 10 ед/г гликозидов и инкубировали при 55-60° течение 24 ч.

Аналогично трансгликозидированию с использованием ЦД в качестве донора [4] для исследованных ферментов оптимальный pH находился в пределах 6.5-7.5.

Оптимальная температура ферментов термофильных штаммов при использовании 30-40%-ных растворов субстратов находилась в пределах 55-65°, а для ЦГТаз мезофилов- 50-55°.

**Влияние количества фермента.** Для выявления количества вносимого фермента на эффективность процесса приготавливали 40%-ный раствор (pH 7.0) гликозидов и крахмала в соотношении 1:1 (в/в), добавляли различное количество ферментов и реакцию осуществляли в течение 24 ч при 55°.

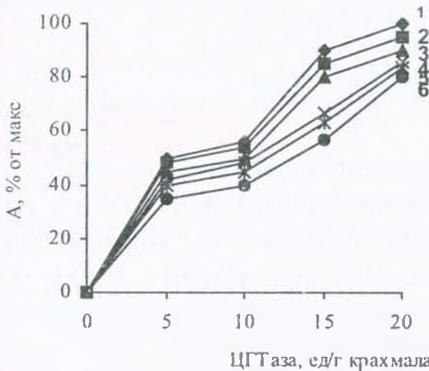


Рис.1. Суммарный выход (А, % от максимального) трансферных продуктов в зависимости от количества добавляемой ЦГТазы. 1 - *B.stearothermophilus* В-5076; 2 - *B.stearothermophilus* В-4019; 3 - *B.circulans* В-4024; 4 - *B.macerans* В10-4m; 5 - *B.macerans* В10-2m; 6 - *B.macerans* В10-12m. Общая концентрация стевииозидов/ребаудиозидов А и крахмала 40% (1:1, вес/вес) (pH 7,0), 55°, 24 ч.

С увеличением количества вносимого фермента во всех случаях наблюдалось определенное увеличение скорости реакции и выхода трансферных продуктов. Причем, количество гликозидированных производных было существенно выше в случае с термофильными ферментами (рис.1).

**Продолжительность реакции** также играет важную роль с точки зрения получения большего количества гликозидированных производных. При соотношении крахмал : гликозиды 1:1 (в/в) и использовании 10 ед/г крахмала ЦГТазы *B.stearothermophilus* В-5076 реакция трансгликозидирования практически завершается за 48 ч при

температуре 55-60°.

Первые 24 ч реакция трансгликозилирования протекает в основном с участием стевииозида, и после снижения его концентрации до примерно 10-15% во взаимодействие вступает ребаудиозид А, что показано на примере термофильного фермента из *B. stearotherophilus* В-5076.

Для трансгликозилирования гликозидов стевии 100г крахмала суспендировали в 300 мл дистиллированной или деионизированной воды с рН 6,5-7,0, добавляли ЦГТазу в количестве 2 ед/г крахмала и смесь постепенно при постоянном перемешивании нагревали до 75-80° до получения однородной разжиженной массы крахмала с декстрозным эквивалентом в пределах 0,15-0,3. Раствор охлаждали до 50-60°, добавляли 100г стевииозида или ребаудиозида А или экстракт стевии с весовым содержанием этих компонентов 1:1 и перемешивали до полного растворения. Далее вносили ЦГТазу в количестве 8 ед/г крахмала и реакцию осуществляли при 55-60° в течение 48 ч при постоянном перемешивании. Реакционную смесь обрабатывали активированным углем, фильтровали и фильтрат высушивали на распылительной сушке.

С целью улучшения вкусовых характеристик полученный продукт до или после очистки дополнительно обрабатывали β-амилазой (5 ед/г общих гликозидов) при 50° в течение 22-24 ч. При этом высокомолекулярные производные гликозидов стевии превращаются преимущественно в моно- и дигликозилированные формы, сладость которых выше, чем у высокомолекулярных, а вкус более тонкий (рис.2).

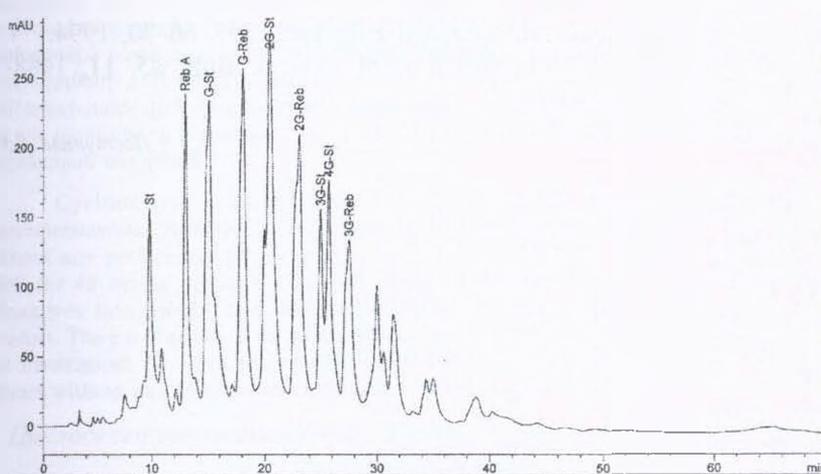


Рис.2. Типичная ВЭЖХ-грамма трансферных продуктов реакции с помощью ЦГТазы *B. stearotherophilus* В-5076 за 48 ч после обработки β-амилазой, идентифицированных методом градиента.

Таким образом, в результате сравнительных исследований показано, что ЦГТазы, продуцируемые *B. stearotherophilus* В-5076 и *B. macerans* ВЮ-4т, могут быть эффективными биокатализаторами при ферментативном

трансгликозилировании гликозидов стевии с использованием крахмала в качестве донора. Полученные ЦГТазы проявляют высокую активность не только к стевиозиду, но также к ребаудиозиду А, степень модификации которого можно варьировать, меняя технологические параметры реакции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелян В.А., Ямамото Т., Африкян Э.Г.* Биохимия. 59, 6, 778-788, 1994.
2. *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.
3. *Абелян В.А., Балаян А.М., Кочикян В.Т., Маркосян А.А.* Биолог. журн. Армении. 56, 1-2, 3-9, 2004.
4. *Абелян В.А., Балаян А.М., Кочикян В.Т., Маркосян А.А.* Прикл. биохимия и микробиология. 40, 2, 129-134, 2004.
5. *Зубцов В.А., Осипова Л.Л., Лебедева Т.И., Антипова Н.В.* Мат-лы 1-ой Междунар. научно-практической конф. «Растительные ресурсы для здоровья человека», Москва-Сергиев-Посад, «Арес», 356-358, 2002.
6. *Jeppesen P.B., Gregersen S., Alstrup K.K., Hermansen K.* Phytomedicine. 9, 9-14, 2002.
7. *Kinghom A.D., Soejarto D.D.* In Economic and Medicinal Plant Research. Eds. Wagner H, Hikino H. and Farnsworth N.R. London: Academic Press. 1, 1- 52, 1985.
8. *Kinghom A.D.* In Stevia, the Genus Stevia. Eds. Kinghom A.D. New York: Taylor and Francis. 1-17, 2002.
9. *Kolb N., Herrera J.L., Ferreyra D.J., Uliana R.F.* J.Agric. Food Chem. 49, 4538-4541, 2001.
10. *Nakamura A., Hega K., Yamane K.* FEBS Lett. 337, 66-70, 1994.
11. *Yasukawa K., Kitanaka S., Seo S.* Biol. Pharm. Bull. 25, 11, 1488-1490, 2002.

Поступила 8.XI.2004