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

Биолог. журн. Армении, 3-4 (56), 2004

УДК 577.152.32

ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ЦГТаз

В.Т. КОЧИКЯН

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

Циклодекстрин глюканотрансфераза термофильной культуры *Bacillus stearothermophilus* B-5076 использована для трансгликозилирования гликозидов стевии без предварительной их очистки. Эффективная модификация наблюдалась в присутствии крахмала при 55-60° в течение 48 ч. Превращение синтезированных высокомолекулярных производных в моно- и дигликозилированные формы существенно улучшает вкусовые качества полученного продукта. Изучены особенности сорбции и десорбции гликозидов на смоле типа Amberlite XAD-7HP. Метод с успехом может быть использован для прямого трансгликозилирования экстракта стевии без очистки отдельных его компонентов.

Թերմոֆիլ *Bacillus stearothermophilus* B-5076 մանրէի կողմից արտադրված ցիկլոդեքստրին գլյուկանոտրանսֆերազ ֆերմենտը փորձարկվել է ստևիա բույսի գլիկոզիդների խառնուրդի տրանսգլիկոզիլացման համար: Լավագույն արդյունքները ստացված են, երբ ռեակցիան իրականացվում է 55-60°-ում 48 ժ ընթացքում: Բարձրամոլեկուլային ածանցյալների փոխարկումը մոնո- և դիգլիկոզիլացած ձևերի բավականին բարելավում է վերջնամյութի համային հատկանիշները: Ուսումնասիրվել է գլիկոզիդների սորբցիայի և դեսորբցիայի առանձնահատկությունները Amberlite XAD-7HP տիպի խեժի վրա: Եղանակը մեծ արդյունավետությամբ կարելի է օգտագործել ստևիա բույսի տերևներից ստացված էքստրակտի տրանսգլիկոզիլացման համար առանց նախնական մաքրման:

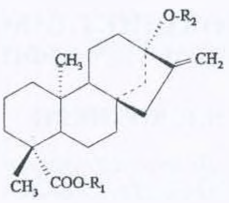
Cyclodextrin glucanotransferase produced by the thermophilic *Bacillus stearothermophilus* B-5076 has been applied for the transglycosylation of Stevia extract without any preliminary purification. The efficient transglycosylation is observed at 55-60°C for 48 hrs in presence of starch as donor. Conversion of high molecular weight derivatives into mono- and di-forms considerably improved the taste quality of the product. The peculiarities of sorption and desorption of glycosides on Amberlite XAD-7HP are investigated. The method can be applied for the direct transglycosylation of Stevia extract without any preliminary purification of the individual compounds.

Циклодекстрин глюканотрансфераза - стевиозид - ребаудиозид А - трансгликозилирование

Водно-спиртовый экстракт стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) содержит смесь различных дитерпеновых гликозидов, которые имеют единую основу – стевиол и отличаются содержанием углеводных остатков в положении С13 и С19. Основным компонентом среди них является стевиозид (5-10% м/м), ребаудиозид А (2-4% м/м), ребаудиозид С (1-2% м/м) и дулкозид А (0,4-0,7% м/м) [9]. Все выделенные продукты обладают повышенной

сладостью по отношению к сахару, которая для ребаудиозида А составляет 400-450; ребаудиозида В -300-350; ребаудиозида С-50-120; ребаудиозида D-250-450; ребаудиозида Е-150-300; дулкозида А-50-120 и для стевиолбиозида −100-125. Сладость стевиозида превышает таковую сахара в среднем в 200-280 раз [6]. Однако они обладают остаточными горечью и вкусом, которые влияют на их вкусовые качества [5].

Их строения приведены на рис.1.



Название	R_1	R_2
1. Стевиол	H	H
2. Стевиолбиозид	H	β-Glc-β-Glc(2→1)
3. Стевиозид	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2→1)
4. Ребаудиозид А	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
5. Ребаудиозид В	H	β-Glc-β-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
6. Ребаудиозид С (Дулкозид В)	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2→1) β-Glc(3→1)
7. Ребаудиозид D	β-Glc-β-Glc(2→1)	β-Glc-b-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
8. Ребаудиозид Е	β-Glc-β-Glc(2→1)	β-Glc-β-Glc(2→1)
9. Ребаудиозид F	β-Glc	β-Glc-β-Xyl(2→1) β-Glc(3→1)
10. Дулкозид А	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2→1)

Рис.1. Строение основных гликозидов листьев *Stevia rebaudiana* Bertoni [7].

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

Цель работы - изучение особенностей трансгликозилирования экстракта стевии без предварительной очистки под действием ЦГТазы и крахмала в качестве донора, что позволит существенно снизить себестоимость продукта без стадии преварительной тонкой очистки гликозидов и их сушки.

Материал и методика. В качестве биокатализатора использована ЦГТаза термофильного штамма *Bacillus stearothermophilus ИНМИА-В-5076.* 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.

Определение трансгликозилирующей активности ЦГТаз проводили согласно модифицированному методу [2]. Реакционную смесь, содержащую 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.

Стевиозид, ребаудиозид А и их производные определяли методом ВЭЖХ (Agilent Technologies 1100 Series, США) с применением колонки Zorbax-NH_2 и подвижной фазы ацетонитрил-вода (70 : 30 V/V или 80 : 20 V/V) со скоростью протока 1 мл/мин. В качестве детектора использовали УФ при 210 нм. Для окончательного анализа продукта использовали метод градиента от 80:20 V/V (2 мин) до 50:50 V/V в течение 70 мин.

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

Результаты и обсуждение. Экстракция гликозидов из листьев. Экстракцию сладких гликозидов из листьев *S. rebaudiana* Bertoni осуществляли дистиллированной водой. Перед этим листья оставляли при комнатной температуре в течение 24 ч, очищали от стеблей и высушивали в вакуум-сушильном шкафу в течение 24 ч при 70°. Сушка предотвращает гниение листьев, способствует разрушению клетчатки и тем самым повышает эффективность экстракции. После высушивания листья измельчали, в количестве 1 кг смешивали с 10 л воды (pH 2,0-3,0; фосфорная кислота), при постоянном перемешивании подогревали до 70-80° и выдерживали в течение 3-4 ч. Листья отделяли фильтрованием и подвергали вторичной экстракции. Фильтраты объединяли, pH устанавливали в пределах 10,5-11,0 с помощью $Ca(OH)_2$, выдерживали при 65-70° 60 мин и осадок отделяли центрифугированием.

Дальнейшую очистку осуществляли на микрофильтрах (трубчатые керамические фильтры с размерами пор в 0,45 mμ) и ультрафильтрах (5 кДа фильтрующей способностью, Milipore, США), в течение которой освобождались от мелких механических примесей, микробных клеток, эмульгированных веществ, пигментов и других высокомолекулярных соединений. Полученный практически бесцветный раствор концентрировали до 25%-ного содержания гликозидов (600-700 мл).

Он содержит в среднем 3,6-4,0% дулкозида А, 60-70% стевиозида, 7-8% ребаудиозида С и 21-25% ребаудиозида А.

Трансгликозилирование экстракта и очистка продукта. На 1 кг полученного раствора с содержанием 25% сухих веществ добавляли 250г крахмала. После получения гомогенной суспензии добавляли ЦГТазу *B.stearothermophilus* B-5076 в количестве 2,0 ед/г крахмала и при постоянном перемешивании температуру постепенно поднимали до 75-80° до достижения декстрозного эквивалента около 0,2. Раствор охлаждали до 55-60°, дополнительно вносили 8,0 ед/г крахмала, ЦГТазу и реакцию трансгликозилирования осуществляли при 55° в течение 48 ч. Конец реакции определяли по количеству остаточных гликозидов и полученных гликозилированных производных методом ВЭЖХ.

После окончания реакции температуру реакционной смеси поднимали

до 105° и выдерживали под избыточным давлением 0,2 ати в течение 10 мин для инактивирования фермента.

Очистка продуктов реакции. Очистку полученного продукта осуществляли обработкой активированным углем при температуре 60-70° в течение 20 мин с использованием 1% угля и хроматографированием на Amberlite XAD-7HP. Для этого колонку (2 х 20 см) заполняли предварительно обработанной водой, изопропанолом, метанолом и снова водой, смолой и раствор экстракта пропускали сверху-вниз при удельной скорости SV=0,5 час$^{-1}$.

Выявлено, что адсорбционная способность смолы существенно увеличивается с повышением pH и достигает 24,6 мг/г при значении pH 10,0 (табл.1) при использвании 40%-ного исходного раствора.

Таблица 1. **Влияние pH на адсорбционную способность Amberlite XAD-7HP при 25°**

pH	Адсорбционная способность, мг/г носителя
6,0	64,6
8,0	80,7
9,0	98,4
10,0	98,6
11,0	90,4

Обратная картина наблюдается для температуры, с увеличением которой происходит существенное уменьшение адсорбции гликозидов на смоле.

Таким образом, установлено, что 100 мл геля может адсорбировать около 10 г гликозидов.

Изучение элюции адсорбированных гликозидов различными растворителями показало эффективность 70% этанола и 50% метанола. Аналогичные результаты получены также в случае Diaion HP-20 [8] и AB-8 [10].

Таким образом, для очистки гликозидов и их производных на колонку с Amberlite XAD-7HP наносили концентрированный раствор реакционной смеси в количестве 1 V% от смолы при pH 9-10 и температуре 20-25° с удельной скоростью SV=0,5 час$^{-1}$. Колонку промывали 3-4 объемами дистиллированной воды и элюцию осуществляли 70%-ным этанолом. Полученную этаноловую фракцию обрабатывали активированным углем, фильтровали и фильтрат высушивали досуха.

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.

Результаты анализа полученного продукта в динамике методом ВЭЖХ приведены на рис.2.

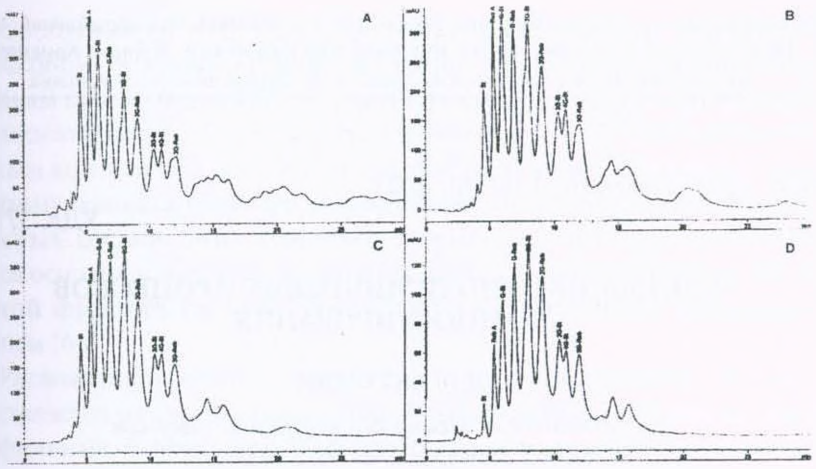


Рис.2. Типичная ВЭЖХ-грамма трансферных продуктов реакции с помощью ЦГТазы *B.stearothermophilus* B-5076 за 48 ч (A) и после обработки β-амилазой в течение 2-х (B), 4-х (C) и 22 ч (D).

Общая концентрация стевиозида/ребаудиозида и крахмала 40% (1:1, вес/вес) (pH 7,0), 60°, ЦГТаза, 10 ед/г крахмала. β-Амилаза в количестве 5ед/г гликозидов, 50°.

Таким образом, разработана эффективная технология получения гликозидов *S. rebaudiana* и их ферментативного модифицирования с применением ЦГТаз с получением низкомолекулярных производных. Данная технология позволяет исключить стадию предварительной тонкой очистки стевиозида и ребаудиозида А, а также их сушку. Это позволит существенно снизить себестоимость продукта и сразу получить продукт, не обладающий горечью и послевкусием.

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. *Bakal A.I., Nabors L.O., Gelardi R.C.* Alternative Sweeteners. New York: Marcel Dekker. 295-307, 1986.
6. *Crammer B., Ikan R.* In Developments in Sweeteners. Eds. Grenby, T.B. London: Elsevier. 45-64, 1987.
7. *Genus J.M.C.* Phytochemistry. 64, 913-921, 2003.
8. *Fukunaga Y., Miyata T., Nakayasu N., Mizutani K., Kasai, Rand Tanaka O.* Agricultural and Biological Chemistry. 53, 1603-1607, 1989.
9. *Kinghom A.D., Soejarto D.D.* In Economic and Medicinal Plant Research. Eds. Wagner H, Hikino H. and Famsworth N.R. London: Academic Press. *1*, 1-52, 1985.
10. *Shi R., Xu M., Shi Z., Fan Y., Guo X., Liu Y., Wang C., He B.* Reactive & Functional polymers. 50, 107-116, 2002.

Поступила 8.XI.2004