

Влияние ферментативного трансгликозилирования гликозидов стевии на их вкусовые характеристики

Чхан Кристина Викторовна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»
Адрес: 125080, город Москва, Волоколамское шоссе, д. 11
Научно-исследовательская лаборатория компании PureCircle Limited
Адрес: 50250, город Куала Лумпур, Малайзия
E-mail: ch.kristina84@gmail.com

Мойсеяк Марина Борисовна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»
Адрес: 125080, город Москва, Волоколамское шоссе, д. 11
E-mail: marina-mgupp@mail.ru

Ферментативное трансгликозилирование эффективно для структурной модификации биологически активных соединений, включая высокоинтенсивные подсластители.

Проведена ферментативная модификация гликозидов стевии. В качестве продуцентов цикломальтодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТаза) был использован *Bacillus stearothermophilus* St-88. ЦГТаза может быть эффективным биокатализатором в реакции трансгликозилирования Ребаудиозида А, Ребаудиозида D и Ребаудиозида М в присутствии циклодекстринов и крахмала в качестве доноров. Показана возможность получения гликозилированных гликозидов стевии с различной длиной боковых цепочек. Выделение и очистку индивидуальных производных РеbD-G1/G2 осуществляли на 10-ти колонках, соединённых друг с другом. Использовали макропористую смолу Diaion HP-20 (аналогично РеbD-G1/G2, проводили выделение и очистку РеbM-G1/G2, РеbA-G1/G2). Показано, что гликозилированные гликозиды стевии могут быть превосходными высокоинтенсивными подсластителями, а также подходящими высокоактивными ингредиентами для модуляции вкусовых качеств немодифицированных гликозидов.

Ключевые слова: высокоинтенсивные подсластители, цикломальтодекстрин глюканотрансфераза, Ребаудиозид D, Ребаудиозид М, Ребаудиозид А, стевииол гликозиды стевии, ферментативная модификация, модуляция вкусовых качеств

Стевия - род многолетних растений семейства Астровые, или Сложноцветные, включающий в себя около 260 видов трав и кустарников, произрастающих в Южной и Центральной Америке. Стевиол гликозиды представляют собой класс соединений, найденных в листьях *Stevia rebaudiana Bertoni*, многолетнем кустарнике семейства Asteraceae (Compositae) (Ohtani & Yamasaki, 2002). Стевиол гликозиды характеризуются структурно одним основанием, стевиолом, отличающимся наличием карбогидратных остатков в положениях C13 и C19. Они накапливаются в листьях стевии, составляя примерно 10-20% от сухого веса. В составе листа можно выделить четыре основных гликозида найденные в листьях Стевии ребаудиана, это

стевиозид (Stevioside) (9,1%), ребаудиозид А (RebA) (3,8%), ребаудиозид С (RebC)(0,6-1.0%) и дулкозид А (DulA) (0,3%) (Kinghorn & Soejarto, 1985). Другие известные стевиоловые гликозиды включают ребаудиозид В, С, D, E, F и М, стевиолбиозид и рубозозид, а также минорные гликозида стевии, содержащиеся в листе стевии в следовых количествах (Abelyan & Abelyan, 2012).

Среди природных высокоинтенсивных подсластителей, сладкие гликозиды *Stevia rebaudiana Bertoni* (Стевия) занимают особое место (Kohda, Kasai, Yamasaki, Murakami, & Tanaka, 1976). Они в среднем от 30 до 450 раз слаще, чем обычный сахар.

Они по существу некалорийные и в основном используются в диетических продуктах и продукты с пониженной калорийностью, включая продукты питания и напитки (Morita, Fujita, Matsuura, & Ota, 2010). Высокоинтенсивные подсластители не вызывают гликемического ответа, что делает их пригодными для использования в продуктах, предназначенных для диабетиков и других, заинтересованных в контроле за потреблением углеводов (Kitahata, 2001).

Однако сладкие стевииол гликозиды стевии обладают остаточными горечью и послевкусием, которые влияют на вкусовые качества конечных продуктов и делают несколько сложным их применение (Lipinski, Hanger, & Acesulfame, 2001). Эти недостатки можно устранить модификацией исходных соединений с помощью реакции межмолекулярного трансгликозилирования под действием различных ферментов. При этом происходит присоединение других углеводов в соответствующих положениях стевииола.

Цель работы - изучение влияния ферментативного трансгликозилирования гликозидов Стевии на их вкусовые характеристики. Для этого, были проделаны исследования по идентификации, очистки и характеристике новых гликозидов Стевии, присутствующих в следовых количествах, но обладающих более приемлемыми вкусовыми качествами.

Методика

В присутствии циклических или линейных мальтоолигосахаридов или крахмала в качестве доноров глюкозных единиц, ЦГТаза катализирует межмолекулярную реакцию трансгликозилирования, в результате которой происходит перенос α -глюкозильных единиц от углевода и присоединение в положениях C13 и C19 гликозидов стевии (α -1,4-трансгликозилирование). Именно количество углеводов единиц в указанных позициях определяет качество и степень сладости соединения (Soejarto, Compadre, Medon, Kamath, & Kinghorn, 1983).

ЦГТаза, продуцируемые термофильными микроорганизмами является наиболее эффективной для трансгликозилирования гликозидов Стевии. В качестве продуцентов

цикломальтодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТаза) был использован *Bacillus stearothermophilus* St-88 из коллекции культур микроорганизмов компании PureCircle Limited (Малайзия) (Abelyan, Ghochikyan, Markosyan, Adamyan, Abelyan, 2010).

Выбранная нами ЦГТаза из *Bacillus stearothermophilus* является очень эффективной не только для трансгликозилирования стевииозида, но также РебА, РебD и РебМ, которые обычно очень трудно поддается модифицированию. В присутствии циклодекстринов степень трансгликозилирования является более глубокой с образованием производных с более длинными боковыми цепочками. Применение циклодекстринов более целесообразно с целью получения низкомолекулярных производных, обладающих отменными вкусовыми качествами. Остаточный циклодекстрин дополнительно может замаскировать горечь и сделать сладость более мягкой и нежной (Prakash, DuBois, Clos, Wilkens, & Fosdick, 2008).

Для трансгликозилирования РебА с помощью ЦГТаза, в качестве донора глюкозных единиц использовали крахмал или гамма-циклодекстрин (γ -ЦД).

Для выявления оптимального значения pH процесса с использованием крахмала, 10 г крахмала суспендировали в 30 мл буферного раствора с соответствующим pH и разжижение осуществляли при 80-85°C в течение 20 мин после добавления 1 мл концентрированного ультрафильтрата культуральной жидкости *B. stearothermophilus* (около 2.0 единиц на 1 г крахмала). В полученном растворе растворяли 10 г высокочистого РебА, добавляли 7 мл раствора фермента и инкубировали при 55°C в течение 12 ч. Эффективность процесса оценивали по остаточному содержанию гликозидов (Abelyan & Abelyan, 2012).

Для выявления оптимальных значений pH процесса с использованием ЦД, по 5.8 г γ -ЦД и высокочистого РебА растворяли в 85 мл буферного раствора с соответствующим pH, добавляли раствор фермента с активностью 8.5 ед./г РебА и инкубировали при 55°C течение 12 ч. (Akimaru, Yagi, & Yamamoto, 1991).

Выявлено, что оптимальный pH для обоих процессов находится в пределах 5.5-7.0 (рисунок 1).

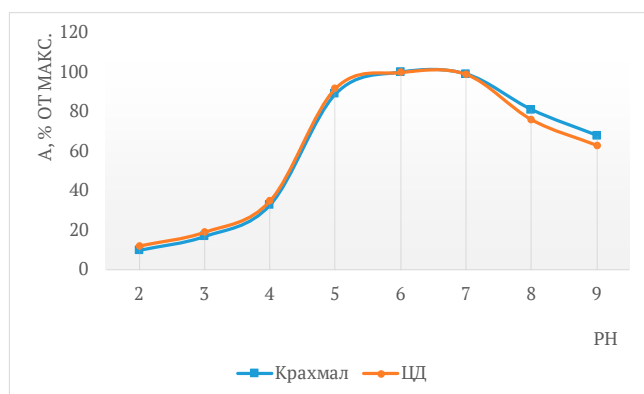


Рисунок 1. Влияние pH на трансферазную активность ЦГТазы *V.stearothermophilus* (A, % от максимальной) при трансгликозилировании РеБА. pH 3.0-3.5 – ацетатный буфер; pH 4.0-6.5 – фосфатно-цитратный буфер; pH 7.0-9.0 – натрий-фосфатный буфер.

Для определения оптимальной температуры, трансгликозилирование осуществляли аналогично описанному для оптимального pH при различных температурах. pH реакционной среды устанавливали 6.5 (Esaki, Tanaka, & Kamiya, 1984; Yamamoto, Yoshikawa, & Okada, 1994). Оптимальная температура процесса находилась в пределах 70-75°C, однако, чтобы обеспечить высокую стабильность ЦГТазы, 65°C было выбрана в качестве оптимальной (рисунок 2).

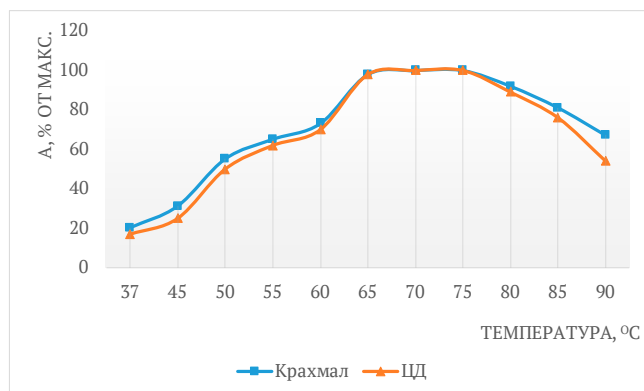


Рисунок 2. Влияние температуры на степень трансгликозилирования РеБА ЦГТазой *V.stearothermophilus* (A, % от максимальной).

Реакцию трансгликозилирования в присутствии γ -ЦД в соотношении 1:1 (вес/вес) осуществляли следующим образом.

50г γ -ЦД растворили в 300 мл воды, затем добавили 50 г РеБА ($\geq 97\%$) и нагрели для полного растворения. Охлаждали до 65°C и добавили 25

мл концентрированного фильтрат культуральной жидкости с ЦГТазной активностью. Реакцию осуществляли при 65°C в течении 24-48 часов при постоянном перемешивании (Yamamoto, 1998). Реакцию останавливали термообработкой при 100°C в течение 10 мин.

Для осуществления реакции при весовом соотношении РеБА : γ -ЦД=1:2 и 1:3, использовали 23-24% смесь 20 г γ -ЦД и 10 г РеБА и 30 г γ -ЦД и 10 г РеБА, соответственно.

Обработанный активированным углем раствор реакционной смеси пропускали через колонку с Diaion HP-20 или Amberlite XAD-4 (отношение гликозидов к гелю составляет 10% (вес/объем). Элюцию трансгликозилированных продуктов проводили 50% этиловым спиртом, растворы выпаривали и остаток высушивали досуха при 45-50°C под вакуумом (Абелян, 2001).

Полученный продукт обрабатывали β -амилазой, α -амилазой или глюкоамилазой. Такая обработка приводит к гидролизу длинных боковых цепочек производных до моно- и ди-глюкозилированных компонентов.

Обработку β -амилазой может производиться либо до очистки трансгликозилированной смеси на крупнопористой адсорбционных смолах, либо после хроматографического удаления остаточных мальтоолигосахаридов и присутствующих в реакционной смеси других примесей.

К 50 г исходного продукта добавляли 5.7 мл β -амилазы (Nagase, Япония) разбавленную в 10 раз и инкубировали при 40°C и в течении нескольких часов. Количество фермента и время обработки можно менять в соответствии с преследуемой цели, что будет влиять на соотношение отдельных производных в конечной смеси. Продукт очищали на специфической крупнопористой хроматографической смоле Diaion HP-20 (Dobberstein & Ahmed, 1982).

Для осуществления трансгликозилирования РеБА в присутствии крахмала, крахмал суспендировали в трех объемах (вес/об) воды с pH 6.0-6.5, добавляли ЦГТазу в количестве 2.0 ед/г крахмала, нагревали до 75-80°C, декстрозный эквивалент (ДЭ) в пределах 0,15-0,3. Раствор охлаждают до 60-65°C, добавляли РеБА в количестве 1:1 (вес/вес), ЦГТазу в количестве 8.0 ед/г крахмала и реакцию осуществляли при 65°C в течение 48 часов при постоянном перемешивании. Затем реакционную смесь обрабатывали активированным углем,

фильтровали и фильтрат высушивали на распылительной сушке.

Для гидролиза высокомолекулярных производных 30% раствор трансгликозилированного продукта обрабатывали 25 ед/г глюкоамилазы (Novozymes, Дания) при 50°C. Реакционную смесь очищали на крупнопористых смолах, как это описано в случае с ЦД в качестве донора глюкозных остатков. Элюцию осуществляли 50%-ным этанолом.

Определение гликозидов Стевии и их производных проводилось методом ВЭЖХ на приборе «Agilent 1100 series» (США) в следующих условиях: колонка – «Zorbax NH2» (5 мкм, 4.6 x 250 мм); подвижная фаза – ацетонитрил-вода (70:30, об/об); скорость потока 1 мл/мин; детектор – УФ-детектор при 210 нм (Purkayashta, Martin, Petit, & Chkhan, 2017; Purkayashta, Martin, Petit, & Chkhan, 2018).

Для анализа трансгликозилированных производных гликозидов Стевии ЦГТазой использовали колонку Zorbax-NH2 (5 мкм, 4.6 x 250 мм) с подвижной фазой ацетонитрил-вода метод градиента от 80:20 об/об (2 мин) до 50:50 об/об в течение 90 мин с использованием УФ-детектор при 210 нм.

Идентификация гликозидов методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс спектрометрии (ВЭЖХ/МС). Для осуществления ВЭЖХ-МС использовали настройки аппарата:

- Колонка: Agilent Poroshell 120 SB-C18 (2.7 мкм; 4.6мм x 150мм);
- Температура колонки: 40°C
- Мобильная фаза: Раствора заранее отфильтровывали и смешивали непосредственно перед анализом:
- Раствор А: 25% ацетонитрил - 75% раствор муравьиной кислоты (0.1%)
- Раствор Б: 32% ацетонитрил - 68% раствор муравьиной кислоты (0.1%)
- Время проведения полного анализа на ВЭЖХ-МС: 60 мин;
- Интервал после окончания анализа одной пробы и началом анализа следующей: 10 мин;
- Температура автоматического пробоотборника: 23-24°C.

Выделение и очистку индивидуальных производных осуществляли на 10-ти колонках со смолой Diaion HP-20, соединенных между собой параллельно. Принцип разделения основан на разнице в сродствах к носителю различных производных (Dobberstein & Ahmed, 1982; Morita,

Morita, & Kanzaki, 2011).

Через колонки пропускали 20% раствор модифицированного РеБА в 5% этиловом спирте после двукратной обработки глюкоамилазой и очистки на крупнопористой смоле. Количество вносимого гликозида составляло около 60-70% от общей адсорбционной емкости носителя.

Колонки последовательно промывали водой и 10% этанолом и элюцию гликозидов осуществляли 50% этанолом.

Из суммарного продукта, полученного из седьмой колонки, приготавливали 20% раствор и снова пропускали через систему из 10-ти колонок и процесс осуществляли аналогично вышеописанному. Получены продукты с 80%-ным содержанием моно- и ди-гликозилированных производных из четвертой и седьмой колонок.

Для трансгликозилирования РеБД с помощью ЦГТазы проводили с использованием крахмала или γ -ЦД в качестве донора глюкозных единиц.

10г 96% чистоты РеБД и 12 г γ -ЦД (мол/мол к РеБД) нагрели в 100 мл воды (pH 6.5-7.0) до полного растворения. Раствор охлаждали, суспензировали крахмал в соотношении 1:1 (вес/вес) к γ -ЦДи добавляли около 2ед/г крахмала ЦГТазу *V.stearothermophilus* и разжижение осуществляли при постепенном увеличении температуры до 80-85°C и выдерживали 20 мин при постоянном интенсивном перемешивании, затем добавляли вторую порцию ЦГТазы в количестве 10ед/г крахмала и реакцию трансгликозилирования осуществляли при 65°C в течение 48 часов при постоянном перемешивании. Фермент инактивировали нагреванием, реакционную смесь фильтровали, очищали на крупнопористой адсорбционной смоле Diaion HP-20, концентрировали и высушивали.

Трансгликозилирование РеБД успешно осуществляли также с использованием только γ -ЦД в качестве донора глюкозных остатков в различных весовых соотношениях: 1:1; 1:2 и 1:3 (вес/вес).

Выделение и очистку индивидуальных производных осуществляли на 10-ти колонках с смолой Diaion HP-20 (100 мл смолы), соединенных между собой параллельно. Процесс осуществляли аналогично вышеописанному для РеБА.

Результаты и их обсуждение

Соотношение и концентрация субстратов оказывает определенное влияние на трансгликозилирование РебА. Для выявления наилучшего варианта, реакции осуществляли в течение 12 ч при 65°C с 24%-ым раствором РебА и γ -ЦД или крахмала в различных соотношениях при pH 6.5 с использованием 9 ед/г РебА ЦГТазы. С увеличением количества γ -ЦД или крахмал существенно увеличивается степень трансформации. Однако, при этом падает степень сладости получаемого продукта, если ее измерить до его тонкой очистки. Вероятно, с коммерческой точки зрения соотношение компонентов 1:1 (вес/вес), приводящее к сладости продукта в пределах 120-130 в условиях газированных напитков и 170-180 в кисломолочных и кондитерских продуктах является наиболее приемлемой. Варьируя соотношение можно получить необходимый тип сладости и в некоторых случаях решить проблему с наполнителями (рисунок 3).

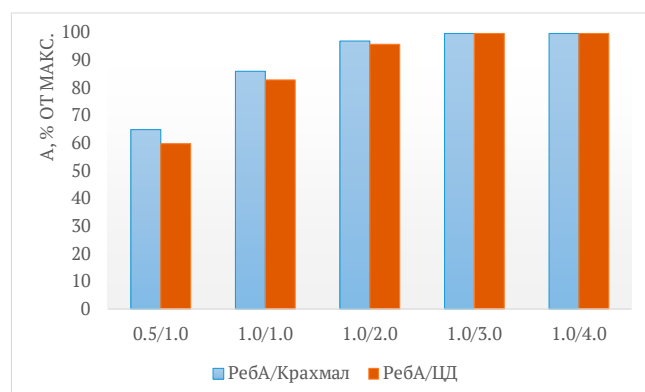


Рисунок 3. Степень трансгликозилирования (А,%) в зависимости от соотношения РебА и доноров глюкозных единиц.

Продуктом реакции трансгликозилирования является смесь немодифицированного РебА и его моно- (РебА-G1), ди- (РебА-G2), три- (РебА-G3) и более гликозилированных производных (Prakash, DuBois, Miguel, & Clos, 2010) (рисунок 4).

Выявлено, что при повышенных концентрациях ЦД увеличивается степень трансгликозилирования и снижается количество нетрансформированного РебА.

В таблице 1 представлены результаты изучения трансгликозилирования РебА с помощью ЦГТазы, в качестве донора глюкозных единиц использовали гамма-циклодекстрин (γ -ЦД).

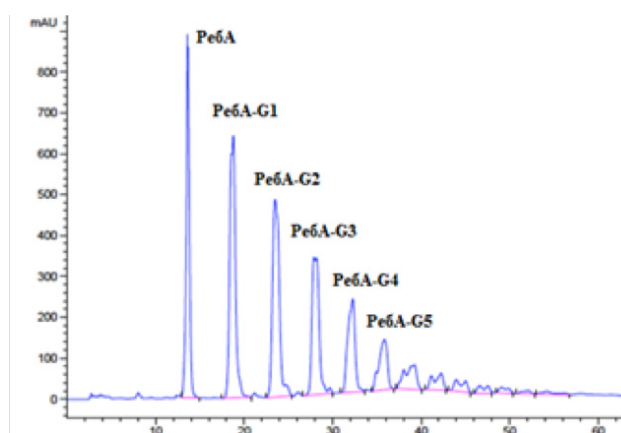


Рисунок 4. ВЭЖХ-грамма исходной реакционной смеси при 1:1 (а); 1:2 (б) и 1:3 (с) весовом соотношении РебА и γ -ЦД через 48 часов реакции.

Таблица 1

Соотношение гликозилированных производных РебА с ЦГТазой с использованием γ -ЦД в качестве донора глюкозных единиц

Продукты	Количество производных, %				
	РебА: γ -ЦД (1:1, 2/2)		РебА: γ -ЦД (1:2) (в/в)		РебА: γ -ЦД (1:3) (в/в)
	48 часов	24 часа	48 часов	24 часа	48 часов
РебА	17.14	12.28	8.15	7.84	6.50
РебА-G1	21.57	14.96	14.02	18.22	14.60
РебА-G2	19.38	14.52	13.90	16.03	12.00
РебА-G3	14.61	13.62	13.38	12.25	10.67
РебА-G4	9.68	11.30	13.40	10.43	10.73
РебА-G5	6.13	9.25	11.71	9.33	9.50
РебА-G6	4.29	6.77	7.85	6.80	6.73
РебА-G7	2.42	5.13	5.86	5.85	6.31
РебА-G8	1.79	3.90	3.43	4.38	4.75
РебА-G9	1.11	3.30	2.82	3.65	4.24
РебА-G10	0.80	2.14	2.04	2.52	2.96
РебА-G11	0.43	1.72	1.81	1.70	2.54
РебА-G12	0.65	1.11	1.63	1.00	1.86
РебА-G13					1.76
РебА-G14					1.27
РебА-G15-G19					3.58

На рисунке 5 показано, что эффективность трансгликозилирования повышается пропорционально увеличению общей концентрации субстратов.

С целью повышения количества моно-, ди- и три-гликозилированных производных, полученный продукт обрабатывали β -амилазой, α -амилазой

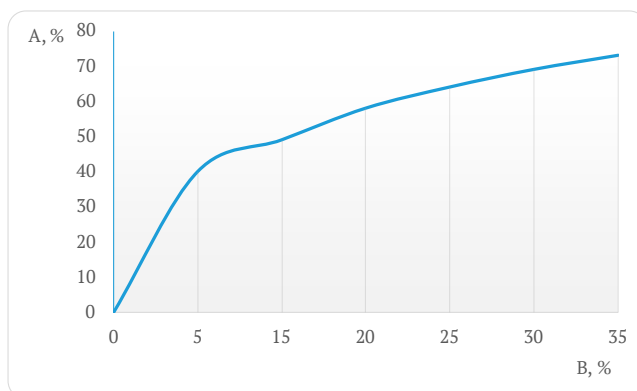


Рисунок 5. Влияние общей концентрации субстратов (В, %) на степень трансгликозилирования (А, % от максимальной) при соотношении РеБА к γ -ЦД 1:1(в/в), 65°C через 24 часов реакции.

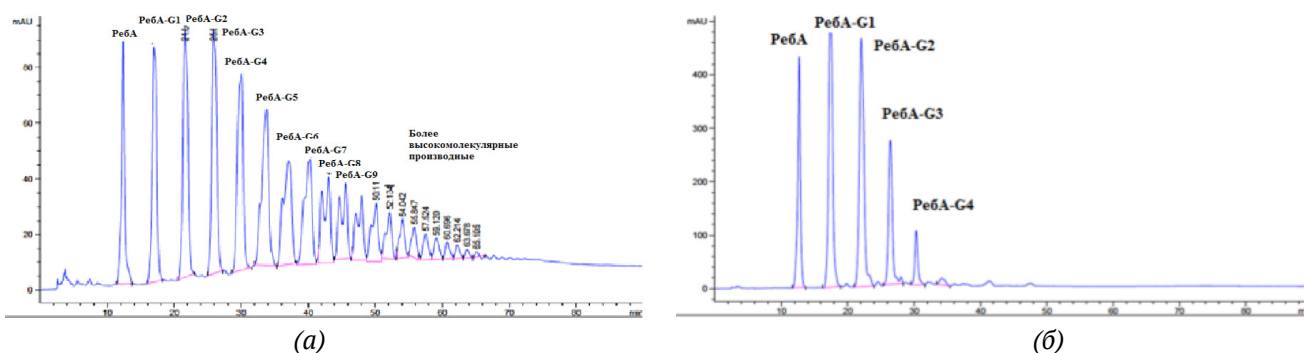


Рисунок 6. ВЭЖХ-граммы трансгликозилированного РеБА в присутствии ЦД до (а) и после обработки β -амилазой (б).

Таблица 2
Соотношение гликозилированных производных РеБА до и после обработки β -амилазой

Продукты	Количество производных, %	
	РеБА: γ -ЦД (1:3) (в/в); 24 часа. До β -амилазы	РеБА: γ -ЦД (1:3) (в/в); 24 часа. После β -амилазы
РеБА	7.84	17.08
РеБА-G1	18.22	30.51
РеБА-G2	16.03	31.26
РеБА-G3	12.25	15.53
РеБА-G4	10.43	4.57
РеБА-G5	9.33	1.04
РеБА-G6	6.80	
РеБА-G7	5.85	
РеБА-G8	4.38	
РеБА-G9	3.65	
РеБА-G10	2.52	
РеБА-G11	1.70	
РеБА-G12	1.00	

Таблица 3
Соотношение гликозилированных производных РеБА до и после обработки глюкоамилазой

Продукты	Количество производных, %	
	РеБА:крахмал (1:1) (в/в); 48 ч. До глюкоамилазы	РеБА:крахмал (1:1) (в/в); 48 ч. После глюкоамилазы
РеБА	15.8	18.7
РеБА-G1	20.6	33.0
РеБА-G2	19.3	26.8
РеБА-G3	15.1	15.6
РеБА-G4	9.9	5.9
РеБА-G5	6.8	
РеБА-G6	6.0	
РеБА-G7	2.7	
РеБА-G8	1.7	
РеБА-G9	2.1	
РеБА-G10		
РеБА-G11	Малые количества	
РеБА-G12	Малые количества	

или глюкоамилазой. Это приводит к гидролизу длинных боковых цепочек производных до моно- и ди-гликозилированных компонентов (рисунок 6).

Обработку β-амилазой может производиться либо до очистки трансгликозилированной смеси на крупнопористой адсорбционных смолах, либо после хроматографического удаления остаточных мальтоолигосахаридов и присутствующих в реакционной смеси других примесей.

Соотношение гликозилированных производных РеБА до и после обработки β-амилазой, а также соотношение производных РеБА до и после обработки глюкоамилазой приведены в Таблицах 2 и 3.

Выделение и очистка гликозилированных производных РеБА проводилась по принципу разделения на адсорбционной смоле, основанном на разнице в сродствах к носителю раличных

производных. В первых колонках преобладающим является непрореагировавший РеБА, количество которого постепенно снижается от колонки к колонке. В то же время, распределение производных имеет обратную зависимость. Причем, сродство производных к носителю уменьшается с молекулярной массой (Таблица 4).

Для выделения производных РеБА, продукт, полученный из седьмой колонки, пропускали через систему из 10-ти колонок и процесс осуществляли аналогично вышеописанному. Как результат, получены продукты с 80%-ным содержанием моно- и ди-гликозилированных производных (Таблица 5).

Трансгликозилирование РебD и РебM ЦГТазой

Высокоочищенный РебD представляет собой белый порошок без запаха с молекулярной массой в 1129.15 и молекулярной формулой C₅₀H₈₀O₂₈. В 180-200 раз слаще сахара по сравнению с 10% раствором

Таблица 4
Соотношение гликозидов в различных секциях

Гликозид	Количество гликозидов в разных колонках, %							
	Исходный	#-1	#-2	#-3	#-4	#-5	#-6	#-7
РеБА	25.1	33.0	31.9	28.4	21.5	11.0	-	0
РеБА-G1	40.5	35.7	40.0	41.3	42.8	41.7	29.4	0
РеБА-G2	26.6	27.2	24.1	25.5	28.7	35.7	48.1	51.3
РеБА-G3	7.8	4.1	4.0	4.8	6.9	11.6	22.5	48.7

Таблица 5
Разделение моно и ди-гликозилированных РеБА на колонке с Diaion HP-20

Гликозид	Количество гликозидов в разных колонках, %							
	#-1	#-2	#-3	#-4	#-5	#-6	#-7	
РеБА-G1	65.7	69.3	73.6	80.3	56.0	30.1	20.2	
РеБА-G2	34.3	30.7	26.4	19.7	44.0	69.9	79.8	

Таблица 6
Соотношение РебD и производных в различных колонках

Гликозид	Количество гликозидов в разных колонках, %						
	Исходный	#-1	#-2	#-3	#-4	#-5	
РебD	22.6	36.1	31.2	10.2	1.5	1.0	
РебD-G1	32.1	28.9	26.5	25.3	10.2	8.1	
РебD-G2	24.9	21.8	21.6	29.3	20.0	17.8	
РебD-G3	12.4	9.8	17.0	22.4	29.6	14.1	
РебD-G4	4.2	3.4	3.7	4.1	15.4	14.7	
РебD-G5	2.1			8.7	11.7	25.1	
РебD-G6	1.3				7.0	11.9	
РебD-G7	1.1				4.6	7.3	

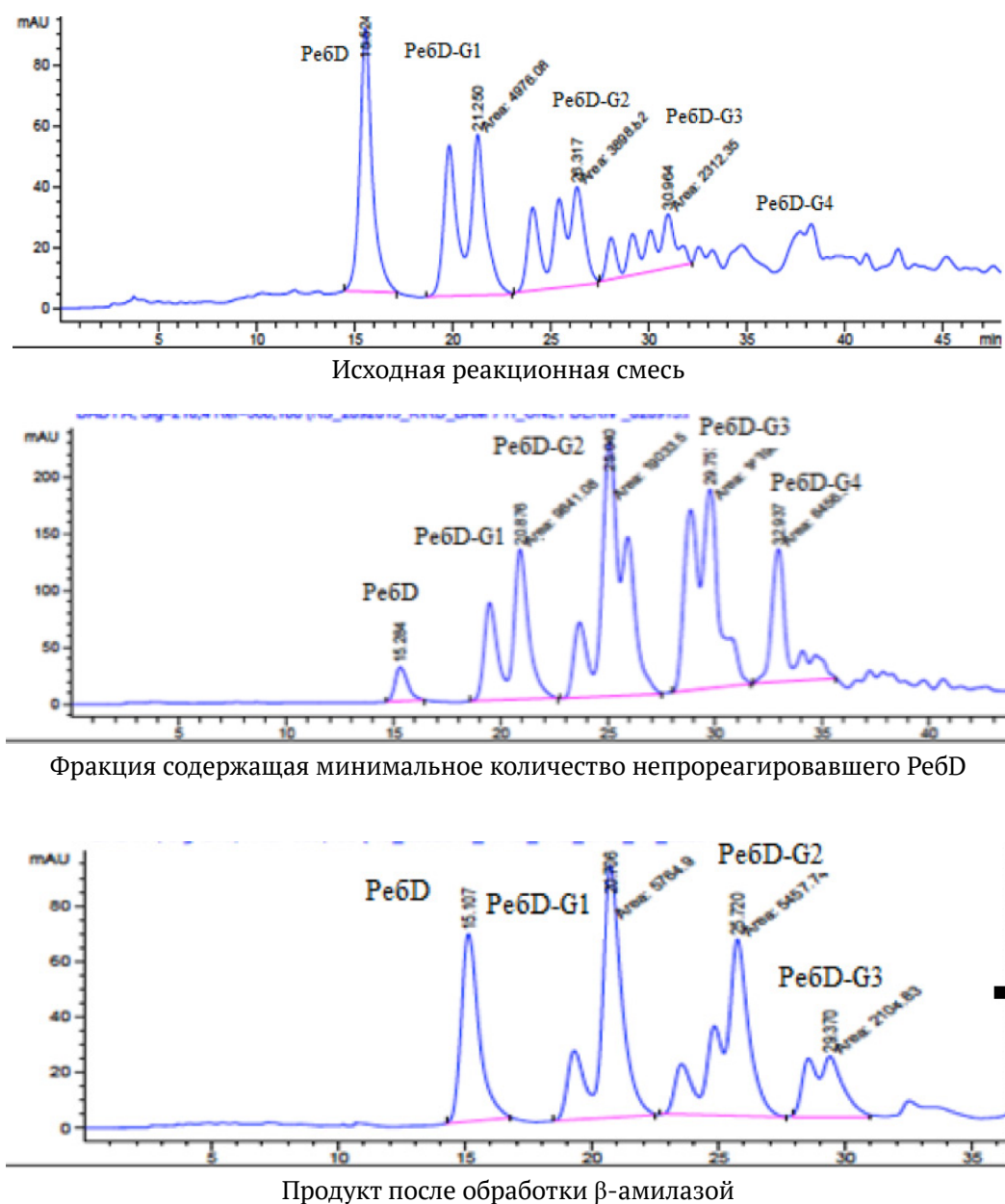


Рисунок 6. ВЭЖХ-граммы накопления Ре6D и его производных в различных колонках с Diaion HP-20.

Таблица 7

Соотношение гликозидов после трансгликозилирования Ре6D в присутствии различных количеств γ -ЦД

Гликозиды	Количество гликозидов, %		
	Ре6D/ γ -ЦД=1:1 (2/2)	Ре6D/ γ -ЦД=1:2 (2/2)	Ре6D/ γ -ЦД=1:3 (2/2)
Ре6D	36.8	28.4	23.8
Ре6D-G1	31.2	27.6	24.1
Ре6D-G2	16.7	15.8	16.4
Ре6D-G3	9.5	11.8	12.7
Ре6D-G4	5.8	12.7	17.2
Ре6D-G5		3.7	5.8

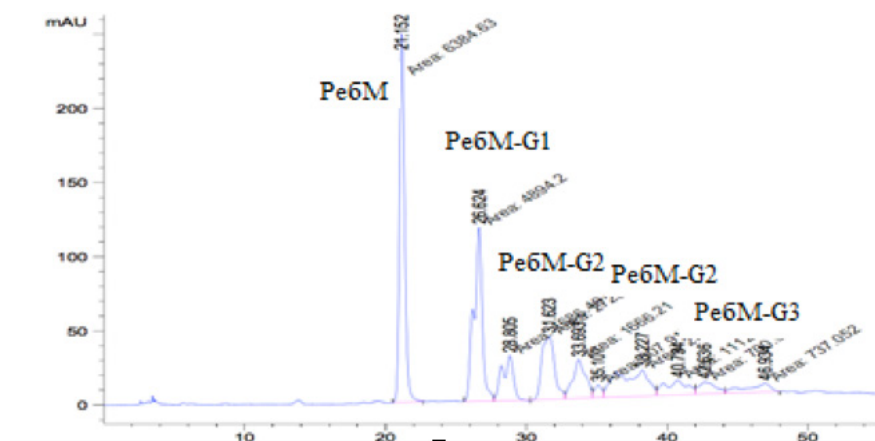


Рисунок 7. ВЭЖХ-грамма трансгликозилированного РебМ ЦГТазой и в присутствии γ -ЦД.

сахарозы, растворимость в воде около 0.2%, которая увеличивается при нагревании. Растворим в разбавленных растворах метанола, этанола, 1-пропанола и изопропанола. Не растворим в ацетоне, хлороформе, бензоле и эфирах. РебD стабилен при различных pH и нагревании (Abelyan & Abelyan, 2012). Он может служить в качестве натурального высокоинтенсивного подсластителя в продуктах питания, напитках, фармацевтических композициях, косметике, жевательные резинки, зубных пастах и т.д. (Chaturvedula & Prakash, 2011; Kitahata, 2001).

Аналогично с РебА, в первых колонках преобладающим является непрореагировавший РебD, количество которого постепенно снижается от колонки к колонке. В то же время, распределение производных имеет обратную зависимость. Причем, сродство производных к носителю уменьшается с молекулярной массой. В колонках 6-10 гликозидов не обнаружили (Таблица 6, Рисунок 6) (Abelyan & Abelyan, 2012).

Для обогащения его моно- и ди-гликозилированными производными, смесь обрабатывали глюкоамилазой, и повторно очищали колонках с Diaion HP-20. Элюаты из колонок дополнительного гидролиза глюкоамилазой и очистки на крупнопористом адсорбенте содержали более 70% РебD-G1 и РебD-G2, соответственно.

Трансгликозилирование РебD успешно осуществляли также с использованием только γ -ЦД в качестве донора глюкозных остатков в различных весовых соотношениях: 1:1; 1:2 и 1:3 (вес/вес) (Purkayashtha, Martin, Petit, & Chkhan, 2017; Purkayashtha, Martin, Petit, & Chkhan, 2018) (Таблица 7).

Аналогичным с РебD способом реализовывали

трансгликозилирование РебМ (Chaturvedula & Prakash, 2011; Prakash, Markosyan, & Bunders, 2014) с помощью ЦГТазы *V.stearothermophilus* и с использованием γ -ЦД. Через 48 часов реакции реакционная смесь содержал РебМ, РебМ-G1, РебМ-G2 и РебМ-G3 в соотношении 3.8/2.9/1.6/1.0 (Рисунок 7).

ЦГТаза термофильного штамма *Bacillus stearothermophilus* St-88 является эффективным биокатализатором для гликозилирования различных гликозидов стевии. Показана возможность трансгликозилирования РебD и РебМ и очищены их различные фракции, улучшены их вкусовые характеристики, позволяющие использовать их в качестве высокоинтенсивных подсластителей и модификаторов вкуса. Ферментативное трансгликозилирование эффективно для структурной модификации биологически активных соединений. При этом, в результате модификации можно изменять структуру, характеристики и биологическую доступность, можно создавать новые функции, и открыть новые области и возможности их применения.

Литература

- Абелян, В.А. Циклодекстрины: получение и применение // Ереван: Изд. "Ван Арьян". - 2001. - 519 с.
- Кочиян В.Т., А.А.Маркосян, Л.А.Абелян, А.М.Балаян, В.А.Абелян. (2006) Совместная ферментативная модификация стевииозидов и ребаудиозидов А. Прикл. Биохим и Микробиол. 42(1). 31-37.
- Abelyan V.H., Abelyan L.A. (2012) The Art of Stevia. PureCircle. Kuala Lumpur. 876 стр.

- Abelyan V.H., Ghochikyan V.T., Markosyan A.A., Adamyan M.O., Abelyan L.A. (2010) Extraction, separation and modification of sweet glycosides from the stevia rebaudiana plant. US Pat 7,838,044.
- Akimaru e K, Yagi T, Yamamoto S. Purification and properties of Bacillus coagulans cyclomaltodextrin glucanotransferase. J Ferment Bioeng. 1991; 71:322–328.
- Bakal A. and O'Brien Nabors, L. (1986) Stevioside. In: Alternative Sweeteners, L. O'Brien Nabors and R.C. Gelardi (Eds), Marcel Dekker, New York, pp. 295-307
- Chaturvedula V.S.P. and Prakash I. (2011c) Journal of Carbohydrate Chemistry. 30.16-26.
- Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I. // Carbohydrate Research. – 2011b. - V. 346. – P. 1057-1060.
- Dobberstein, R.H., Ahmed, M.S. Extraction, separation and recovery of diterpene glycosides from Stevia rebaudiana plants // US Patent 4,361,697. - 1982.
- Esaki, S., Tanaka, R., Kamiya, S. Synthesis and taste of certain steviol glycosides // Agric. Biol. Chem. – 1984. – V. 48. - №7. – P. 1831- 1834.
- Kinghorn, A.D., Soejarto, D.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: Economic and medicinal plant research. Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth, N.R. (eds). Academic Press: London. – 1985. - V. 1. - P. 1-52.
- Kitahata, S. Current industrial production and application of saccharides in Japan. Kasai Research Institute. – 2001. - 202 p.
- Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K., Tanaka, O. New sweet diterpene glucoside from Stevia rebaudiana // Phytochemistry. – 1976a. – V. 15. – P. 981-983.
- Lipinski, G.W.R., Hanger, L.Y. Acesulfame K. In: Alternative sweeteners. O'Brien Nabors, Lyn (ed.), Marcel Dekker: N.-Y. – 2001. – P. 13-31.
- Morita, T., Fujita, I., Matsuura, F., Ota, M. New steviol glycoside // WO2010/038911. – 2010.
- Morita, T., Morita, K., Kanzaki, S. Novel stevia variety and method of producing sweetener // US Patent Appl. 201110023192. – 2011.
- Ohtani, K., Yamasaki, K. Methods to improve the taste of the sweet principles of Stevia rebaudiana. In: Stevia: the genus Stevia, Kinghorn, A.D. (ed.), London: Taylor and Francis. – 2002. – P. 138--159.
- Prakash I., Markosyan A., Bunders C. (2014b) Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. Foods. 3. 162-175.
- Prakash, I., DuBois, G.E., Clos, J.F., Wilkens, K.L., Fosdick, L.E. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener // Food and Chemical Toxicology. - 2008. – V. 46. – P. 75–82.
- Prakash, I., DuBois, G.E., Miguel, R.I.S., Clos, J. Rebaudioside A derivative products and methods for making // US Patent Appl. 2010/0278993. – 2010.
- Purkayashta, S., Martin, J., Petit, M., Chkhan, K. Steviol glycoside compositions // US Patent US 2018/0317534 A1. – 2018.
- Purkayashta, S., Martin, J., Petit, M., Chkhan, K. Steviol glycoside compositions // US Patent, WO 2017/075034. – 2017.
- Soejarto, D.D., Compadre, C.M., Medon, P.J., Kamath, S.K., Kinghorn, A.D. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting stevia species // Economic Botany. – 1983. – V. 37. – P. 71-79.
- Yamamoto, K., Yoshikawa, K., Okada, S. Effective production of glycosyl-steviosides by α -1,6-transglucosylation of dextrin dextranase // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 1994. – V. 58. - №9. – P. 1657-1661.
- Yamamoto, T. (ed.). Handbook of amylases and related enzymes. Pergamon Press: Tokyo. - 1988.

Effects of Enzymatic Transglycosylation of Steviol Glycosides on Their Taste Profile

Kristina V. Chkhan

*Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
Scientific- Research laboratory of PureCircle. Limited
Kuala Lumpur, 50250 Malaysia
E-mail: ch.kristina84@gmail.com*

Marina B. Moiseyak

*Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: marina-mgupp@mail.ru*

Enzymatic transglycosylation is an effective method for structural modification of biologically active compounds, including high-intensity sweeteners. Enzymatic transglycosylation of Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* was studied. *Bacillus stearothermophilus* St-88 was used as producer for cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase). CGTase can be an effective biocatalyst in the transglucosylation reaction of Rebaudioside A, Rebaudioside D, Rebaudioside M in the presense of cyclodextrins or/and starch as donors. The possibility of obtaining steviol glycosides with different length of side chains was demonstrated. Isolation and purification of individual derivatives (RebD-G1 / G2, RebM-G1 / G2, RebA-G1 / G2) was performed on 10 chromatographic columns connected to each other, Diaion HP-20 resin was used. It is shown that transglycosylated steviol glycosides are excellent high intensity sweeteners that can act as taste modulators for unmodified steviol glycosides.

Keywords: high-intensity sweeteners, cyclomaltodextrin glucanotransferase, Rebaudioside D, Rebaudioside M, Rebaudioside A, steviol glycosides of *Stevia*, enzymatic modification, modulation of taste profile.

Reference

- Abelyan V.A. Cyclodextrins: production and use. // Erevan:Van.Aryan. 2001. p. 519
- Abelyan V.H., Abelyan L.A. (2012) The Art of Stevia. PureCircle. Kuala Lumpur. 876 стр.
- Abelyan V.H., Ghochikyan V.T., Markosyan A.A., Adamyan M.O., Abelyan L.A. (2010) Extraction, separation and modification of sweet glycosides from the stevia rebaudiana plant. US Pat 7,838,044.
- Akimaru e K, Yagi T, Yamamoto S. Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclomaltodextrin glucanotransferase. J Ferment Bioeng. 1991; 71:322–328.
- Bakal A. and O'Brien Nabors, L. (1986) Stevioside. In: Alternative Sweeteners, L. O'Brien Nabors and R.C. Gelardi (Eds), Marcel Dekker, New York, pp. 295-307
- Chaturvedula V.S.P. and Prakash I. (2011c) Journal of Carbohydrate Chemistry. 30.16-26.
- Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I. // Carbohydrate Research. – 2011b. - V. 346. – P. 1057-1060.
- Dobberstein, R.H., Ahmed, M.S. Extraction, separation and recovery of diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* plants // US Patent 4,361,697. - 1982.
- Esaki, S., Tanaka, R., Kamiya, S. Synthesis and taste of certain steviol glycosides // Agric. Biol. Chem. – 1984. – V. 48. - №7. – P. 1831- 1834.
- Kinghorn, A.D., Soejarto, D.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: Economic and medicinal plant research. Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth, N.R. (eds). Academic Press: London. – 1985. - V. 1. - P. 1-52.
- Kitahata, S. Current industrial production and application of saccharides in Japan. Kasai Research Institute. – 2001. - 202 p.
- Kochikyan, V. T., Markosyan, A. A., Abelyan, L. A., Balayan, A. M., & Abelyan, V. A. (2006). Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A. Applied Biochemistry and Microbiology. <https://doi.org/10.1134/s0003683806010030>.
- Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K., Tanaka, O. New sweet diterpene glucoside from *Stevia rebaudiana* // Phytochemistry. – 1976a. – V. 15. – P. 981-983.

- Lipinski, G.W.R., Hanger, L.Y. Acesulfame K. In: Alternative sweeteners. O'Brien Nabors, Lyn (ed.), Marcel Dekker: N.-Y. – 2001. – P. 13-31.
- Morita, T., Fujita, I., Matsuura, F., Ota, M. New steviol glycoside // WO2010/038911. – 2010.
- Morita, T., Morita, K., Kanzaki, S. Novel stevia variety and method of producing sweetener // US Patent Appl. 201110023192. – 2011.
- Ohtani, K., Yamasaki, K. Methods to improve the taste of the sweet principles of *Stevia rebaudiana*. In: *Stevia: the genus Stevia*, Kinghorn, A.D. (ed.), London: Taylor and Francis. – 2002. – P. 138-159.
- Prakash I., Markosyan A., Bunders C. (2014b) Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. *Foods*. 3. 162-175.
- Prakash, I., DuBois, G.E., Clos, J.F., Wilkens, K.L., Fosdick, L.E. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener // *Food and Chemical Toxicology*. - 2008. – V. 46. – P. 75-82.
- Prakash, I., DuBois, G.E., Miguel, R.I.S., Clos, J. Rebaudioside A derivative products and methods for making // US Patent Appl. 2010/0278993. – 2010.
- Purkayashta, S., Martin, J., Petit, M., Chkhan, K. Steviol glycoside compositions // US Patent US 2018/0317534 A1. – 2018.
- Purkayashta, S., Martin, J., Petit, M., Chkhan, K. Steviol glycoside compositions // US Patent, WO 2017/075034. – 2017.
- Soejarto, D.D., Compadre, C.M., Medon, P.J., Kamath, S.K., Kinghorn, A.D. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting stevia species // *Economic Botany*. – 1983. – V. 37. – P. 71-79.
- Yamamoto, K., Yoshikawa, K., Okada, S. Effective production of glycosyl-steviosides by α -1,6-transglucosylation of dextrin dextranase // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1994. – V. 58. - №9. – P. 1657-1661.
- Yamamoto, T. (ed.). *Handbook of amylases and related enzymes*. Pergamon Press: Tokyo. - 1988..