

На правах рукописи

ЧХАН
Кристина Викторовна

**УЛУЧШЕНИЕ ВКУСОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ (*Stevia rebaudiana* Bertoni)
МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ БИОТРАНСФОРМАЦИИ**

**Специальность 05.18.07–Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных
веществ**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук**

Москва 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств» и на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории PureCircleLtd. (Малайзия).

Научный руководитель: Мойсеяк Марина Борисовна
кандидат технических наук, доцент

Официальные оппоненты: Лукин Николай Дмитриевич
доктор технических наук, профессор
директор Всероссийского научно-исследовательского института крахмалопродуктов – филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН
Кульнева Надежда Григорьевна
доктор технических наук, профессор кафедры технологии бродильных и сахаристых производств ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Ведущая организация: ФГБУН ФИЦ «Питания, биотехнологии и безопасности пищи»

Защита диссертации состоится « » 2019 года в часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Д212.148.11 на базе ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств» по адресу: 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11, корп. А.

Отзывы (в двух экземплярах) на автореферат, заверенные гербовой печатью учреждениями, просим направить в адрес диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств». Диссертация размещена в сети интернет на официальном сайте ФГБОУ ВО МГУПП <http://www.mgupp.ru/>.

Автореферат размещен на официальных сайтах ВАК Минобрнауки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств» (<http://www.mgupp.ru/>)

Автореферат разослан « » 2019 г

Ученый секретарь диссертационного совета
к.т.н., доцент И.У. Кусова



Общая характеристика работы

Актуальность работы. Чрезмерное потребление сахара при низкой физической активности оказывает негативное воздействие на организм благодаря его высокой калорийности и легкой усвояемости, что может привести к тяжелым нарушениям углеводного и жирового обмена, и развитию таких заболеваний как сахарный диабет, атеросклероз, ожирение и др. В настоящее время сахарным диабетом в мире болеет более 100 млн человек (Ляховкин и др., 1999; Семенова, 2004).

Перспективным направлением для решения этой проблемы является снижение быстрых углеводов в пищевых продуктах за счет применения природных сахарозаменителей. Известно много искусственных химических соединений, обладающих высокой степенью сладости, например, искусственные интенсивные подсластители: сахарин, цикламат, аспартами т.д. Они ограничены в применении из-за долгого послевкусия, посторонних привкусов и вторичных эффектов, которые оказывают отрицательное влияние на здоровье людей при употреблении их в количестве больше допустимого. В связи с этим получение натуральных низкокалорийных и безопасных заменителей сахара является насущной актуальной задачей.

Наиболее популярным источником среди природных высокоинтенсивных подсластителей являются сладкие гликозиды стевии. Они в среднем от 30 до 450 раз слаще, чем обычный сахар, но обладают остаточными горечью и послевкусием, которые влияют на вкусовые качества конечных продуктов и затрудняют их применение.

В этой связи биотрансформация гликозидов стевии для получения натуральных сахарозаменителей с улучшенными вкусовыми показателями для применения в пищевой промышленности является актуальным направлением. При этом, важно выявить взаимосвязь между структурными особенностями молекул и вкусовыми качествами этих веществ с целью создания целенаправленно модифицированных гликозидов с заранее прогнозируемыми сенсорными характеристиками потенциально имеющих существенный коммерческий потенциал.

Степень разработанности темы исследования. В теорию и практику разных аспектов ферментативной обработки экстрактов стевии и отдельных компонентов листа стевии с целью использования продуктов биотрансформации в пищевой промышленности внесли вклад российские и зарубежные ученые такие как, Mosettingetal., 1963; Kanedaetal., 1977; Kobayashietal., 1977; Kasaietal., 1981; Bakal, Nabors, 1986; Kinghorn, 2002; Zhangetal., 1999; Зубцов и др., 2002; Kennelly, 2002; Kinghorn, 2002; Geuns, 2003 и др.

Цели и задачи работы. Основной целью является получение гликозидов стевии улучшенного вкуса путём ферментативного трансгликозилирования и определение влияния модификации структуры гликозидов стевии на их вкусовые характеристики, а также идентификация, очистка, характеристика и ферментативная модификация новых гликозидов

стевию, присутствующих в следовых количествах, но обладающих более приемлемыми вкусовыми качествами для использования в различных напитках, а также других пищевых продуктах в качестве заменителей сахара.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- идентифицировать минорные сладкие гликозиды стевию методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и разработать методы их очистки;
- модифицировать ребаудиозид А (РебА), ребаудиозид D (РебD) и ребаудиозид М (РебМ) ферментами цикломальтодекстрин глюканорансфераза (ЦГТаза) и β -фруктофуранозидаза (ФФаза), и изучить вкусовые характеристики полученных производных в сравнении с не модифицированными гликозидами;
- разработать методы очистки их моно-, ди-, и три-гликозилированных производных на основе их сродства к макропористому носителю;
- разработать эффективные хроматографические и физические методы для получения очищенных препаратов наиболее перспективных гликозидов в лабораторных и пилотных условиях;
- изучить структуры гликозидов различными физико-химическими и ферментативными методами;
- выявить связь между структурой и вкусом модифицированных и не модифицированных гликозидов стевию;
- разработать рекомендации по применению полученных гликозидов в качестве заменителей сахара в пищевых продуктах (на примере йогурта и чая).

Научная новизна работы. Впервые проведены целенаправленные и сравнительные исследования по трансгликозилированию гликозидов стевию РебА, РебD и РебМ с помощью ферментов цикломальтодекстрин глюканорансферазы (ЦГТаза) и β -фруктофуранозидазы (ФФазы). Выявлены оптимальные условия трансгликозилирования.

Методы выделения, очистки моно-, ди- и три-гликозилированных производных РебА, РебD и РебМ, получен и очищен фруктозил-РебА и охарактеризованы их вкусовые качества.

Выявлены особенности очистки минорных гликозидов стевию РебD и РебМ и изучены их сенсорные характеристики.

Установлена взаимосвязь между структурными особенностями молекул гликозидов и качеством вкуса.

Теоретическая и практическая значимость работы:

- Усовершенствована схема выделения и очистки сладких минорных гликозидов стевию РебD и РебМ, для использования их в различных сферах пищевой промышленности в качестве заменителей сахара.

- Разработаны методы трансгликозилирования сладких гликозидов стевии РебА, РебD и РебМ различными трансферазами.
- Показаны технологические особенности получения моно-, ди- и три-гликозилированных производных, обладающих лучшими вкусовыми качествами, которые можно использовать как самостоятельный сахарозаменитель.
- Показана взаимосвязь между содержанием типа и количества углеводов и положением их связи с основной молекулой, а также со вкусовыми характеристиками соединений.
- Усовершенствована схема выделения и очистки сладких минорных гликозидов стевии РебD и РебМ, для использования их в различных сферах пищевой промышленности в качестве сахарозаменителя.
- Разработаны рекомендации по получению оптимизированных смесей, содержащих наиболее перспективные гликозиды и их производные.

Методология и методы исследования. В основе методологии данной диссертационной работы лежат труды российских и зарубежных ученых, посвященные изучению стевии как растения, и труды по биотрансформации стевии для улучшения вкусовых характеристик.

В работе применялись методы ВЭЖХ, как препаративного так и аналитического методов исследования, физико-химические методы очистки, микробиологические для получения ферментов и органолептические методы для оценки полученных подсластителей. Лаборатория, где проводились все исследования и применялись вышеперечисленные методы, соответствует стандарту ISO9001:2015 и ISO22000:2018.

Научные положения, выносимые на защиту.

- Трансгликозилирование РебА и РебD с применением ЦГТаза и β -фруктофуранозидазы.
- Трансгликозилирование на определенных позициях углерода как эффективный способ для создания новых высокоинтенсивных подсластителей с улучшенными вкусовыми и коммерческими характеристиками.
- Взаимосвязь между вкусовыми характеристиками и структурой гликозидов стевии.
- Способ выделения и очистки из экстракта лист стевии минорных гликозидов РебD и РебМ, обладающие лучшими вкусовыми характеристиками, для использования их как самостоятельных сахарозаменителей так и в оптимизированных смесях.

Личный вклад соискателя заключается в решении основных задач исследований, анализе и обобщении литературы по разрабатываемым вопросам, выполнении экспериментальных работ, обобщении результатов исследований и оформлении диссертации, апробации результатов работы на конференциях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует пунктам 4,5,7,11,12 паспорта специальности 05.18.07 – «Биотехнология»

пищевых продуктов и биологически активных веществ».

Апробация работы. Основные положения работы и результаты исследований представлены на конкурсах и конференциях: Regional conference on culture collection «Culture Collections – The Challenge and the Future» (Куала Лумпур, Малайзия -17-18 августа 2015); XII Международная конференция «Кондитерские изделия XXI века» (Москва, 25-27 февраля 2019); XIII Международный биотехнологический Форум-Выставка «РосБиоТех-2019» International biotechnology forum and exhibition “ROSBIOTECH” (Москва, 24-26 апреля 2019).

Результаты работы отмечены дипломом и золотой медалью в рамках конкурса молодых учёных по улучшению вкусовых характеристик гликозидов стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) методом ферментативной биотрансформации (Москва, 2019).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 печатная статья (Малайзия), 2 печатных статьи других изданий, 2 печатных статьи в сборниках конференций (Москва); 4 опубликованных патента (США).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части из 4 глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 178 источников, и 4 приложений. Общий объем диссертации 145 страницы, включая 19 таблиц и 60 рисунков.

Список литературы содержит 178 источников, в том числе 160 зарубежных авторов.

Содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность диссертационной работы, показана необходимость получения разработки новых природных заменителей сахара. Определены основные задачи исследования.

В главе 1 «Обзор литературы» систематизированы результаты анализа материалов научно-технической информации, затрагивающие вопросы решения проблемы. Экстракт стевии содержит смесь различных дитерпеновых гликозидов, которые имеют единую основу – стевииол и отличаются содержанием углеводных остатков в положении С-13 и С-19. Выделены и идентифицированы стевииозид, РебА, В, С, D и Е, дулкозид-А, рубузозид и стевииолбиозид. Основным компонентом среди них является стевииозид, РебА, РебС и дулкозид-А (Kinghom, Soejarto, 1985). Все они обладают повышенной сладостью и имеют остаточную горечь и послевкусие, которые лимитируют сферы их применения и делают затруднительными создание рецептур пищевых продуктов и напитков (Bakal, Nabors, 1986). Рассмотрены способы выделения и очистки гликозидов стевии.

Определены основные свойства гликозидов стевии РебА, РебD и РебM их стабильность и биологические свойства. Часть гликозидов, присутствующих в следовых количествах, были выделены препаративным ВЭЖХ и идентифицированы.

На основании изученной научно-технической литературы установлено, что несмотря на широкое распространение стевии и ее использования взамен сахара, вкус стевииолигосахаридов растения изучен недостаточно; выделены далеко не все соединения этой группы, поэтому следовало изучить вкус сладких минорных гликозидов, изменить молекулы выбранных из известных гликозидов путем биотрансформации; исследовать взаимосвязь между строением молекул указанных веществ и их вкусовыми характеристиками.

Экспериментальная часть

В главе 2 «Материалы и методы исследования» Работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории PureCircleLtd (Малайзия) и Московского государственного университета пищевых производств (Москва). Вкусовые характеристики полученных подсластителей определялись дегустационной группой Центральной научно-исследовательской лаборатории PureCircle Ltd. (Малайзия).

Объектом исследований служила стевия. В качестве продуцента ЦГТазы был использован *Geobacillus stearothermophilus* St-88 из коллекции культур микроорганизмов компании PureCircle Ltd. (Малайзия), продуцента β -фруктофуранозидазы штамм *Arthrobactersp.* (K-1) FERM BP-3192 из коллекции культур NBRC (IPOD), Япония. Трансгликозилирующую активность β -фруктофуранозидазы определяли по Зинченко и др. (1994). Также использовали ферментный препарат (ФП) β – amylase #1500S (Nagase, Япония), активность 1500 ед/г. ФП Glucoamylase AMG 300L, активность 300 ед/см³, Novozyme, Дания.

Выращивание штаммов в глубинных условиях осуществляли на следующих питательных средах **Культура-продуцент ЦГТаз *Geobacillus stearothermophilus*** (г/см³): Крахмал – 7,0; кукурузный экстракт – 5,0; NH₄Cl – 5,3; CaCO₃ – 2,5 (pH 6,5; 56°C) (Абелян и др., 2002). **Культура-продуцент β -фруктофуранозидазы *Arthrobacter sp.*** K-1(г/см³): Кукурузный экстракт – 5,0; сахароза – 3,0; (NH₄)₂HPO₄– 0,4; MgSO₄·7H₂O – 0,1 (pH 7,0; 37°C) (Fujita et al., 1990). Трансгликозилирующую активность ЦГТазы определяли по количеству мальтозилфруктозы методом ВЭЖХ на колонке Zorbax-NH₂ («Agilent 1100 Series», США) с использованием подвижной фазы ацетонитрил-вода (70:30) и дифференциального рефрактометра в качестве детектора.

ЦГТазы, продуцируемые термофильными микроорганизмами, являются наиболее эффективными для трансгликозирования гликозидов стевии. Исследовали влияние температуры, pH на трансферазную активность ЦГТазы.

Трансгликозилирующую активность β -фруктофуранозидазы определяли: за единицу активности принимали количество фермента, необходимое для переноса 1 мкМ фруктозы за 1 мин в условиях эксперимента. Степень трансгликозирования (А) определяли по формуле:

$$A (\%) = (\text{Присоединённая фруктоза} / \text{Высвобожденная глюкоза}) \times 100,$$

где количество присоединённой фруктозы вычислялась по разнице между содержанием

глюкозы и свободной фруктозы. Также определялась β -фруктофуранозидазная активность. Определение фруктозилированного РебА (фруктозил-РебА) проводилось методом ВЭЖХ на колонке Poroshell 120 SB-C18 (2,7 мкм, 4,6x150 мм) с подвижной фазой фосфатный буфер-ацетонитрил =75:25 (объем/объем) в течение 40 мин, а затем ацетонитрил-вода=68:32 (объем/объем) в течение 20 мин. Скорость протока 1,8 см³/мин, температура колонки 40°C с использованием УФ-детектора при 210 нм.

Схема трансгликозилирования смеси гликозидов стевии, по которой проводилась биотрансформация в данной работе приведена на рисунке1.



Рисунок 1- Трансгликозилирование гликозидов стевии ЦГТазой и с крахмалом в качестве донора (Кочикян и др., 2006)

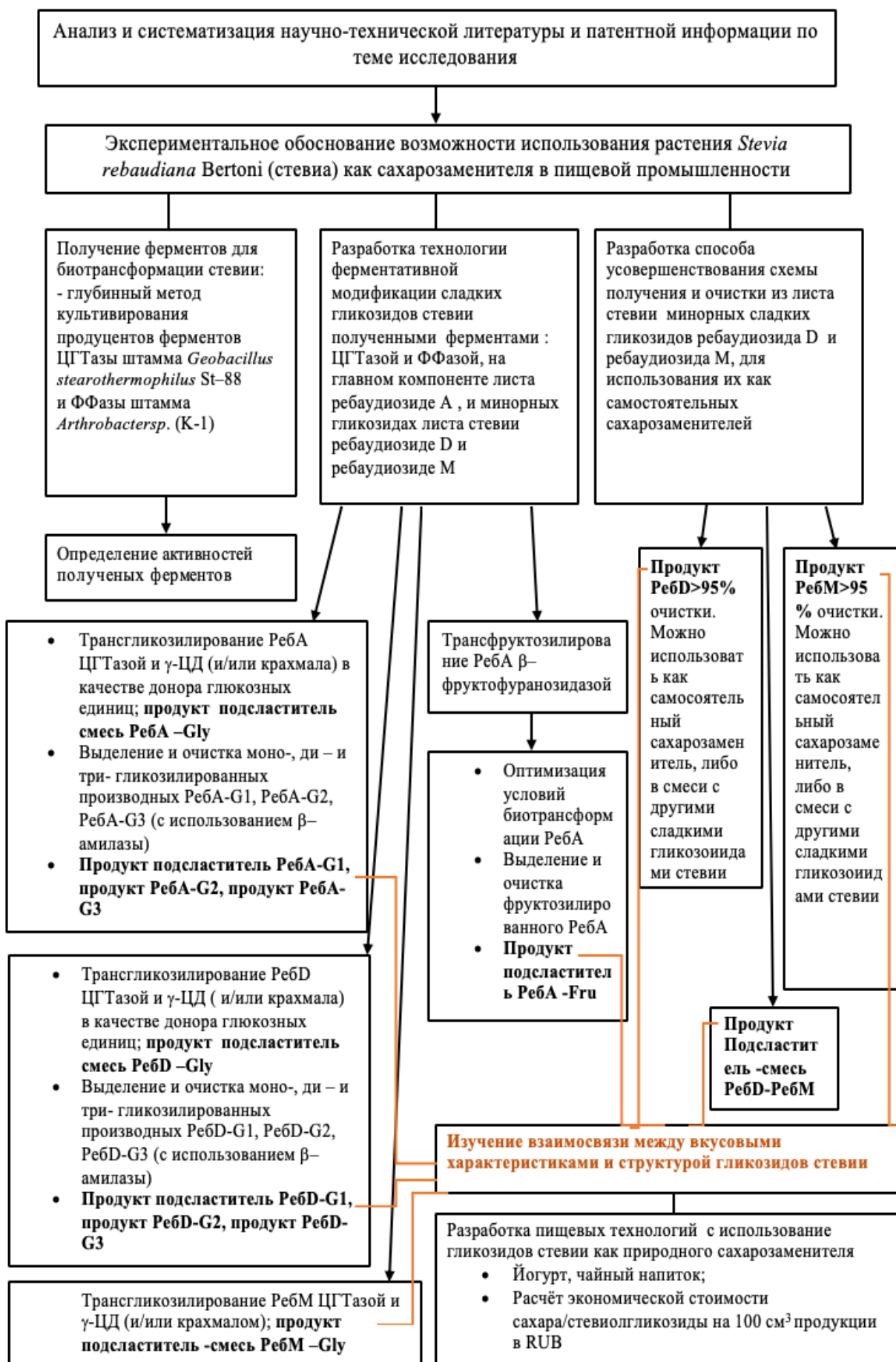


Рисунок 2-Структурная схема исследования

3. Ферментативная модификация гликозидов стевии

3.1 Трансгликозилирование РеБА ЦГТазой и γ -ЦДом или крахмалом в качестве донора глюкозных единиц. Для трансгликозилирования РеБА с помощью ЦГТазы, в качестве донора глюкозных единиц использовали крахмал или γ -циклодекстрин (γ -ЦД) и определяли оптимальную рН и температуру.

Для выявления оптимального значения рН процесса 10 г крахмала суспендировали в 30 см³ буферного раствора с соответствующим рН и разжижение осуществляли при 80-85°C в течение 20 мин после добавления 1 см³ концентрированного ультрафильтрата культуральной жидкости *Geobacillus stearothermophilus* (2,0 единицы на 1 г крахмала). В полученном растворе растворяли 10 г высокочистого РеБА, добавляли 7 см³ раствора фермента и инкубировали при 55°C в течение 12 ч. Эффективность процесса оценивалась по остаточному содержанию гликозидов. Для выявления оптимальных значений рН процесса с использованием ЦД, по 5,8 г γ -ЦД и высокочистого РеБА растворяли в 85 см³ буферного раствора с соответствующим рН, добавляли раствор фермента с активностью 8,5 ед/г РеБА и инкубировали при 55°C течение 12 ч рисунок 2.

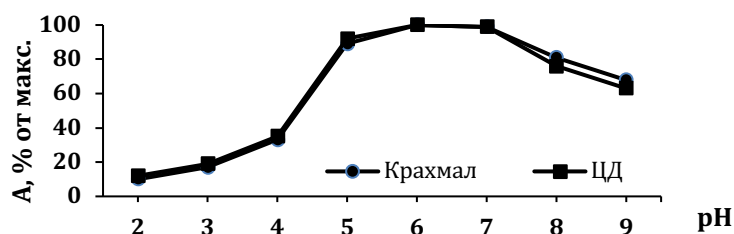


Рисунок 3- Влияние рН на трансферазную активность ЦГТазы

Geobacillus stearothermophilus (А, % от максимальной) при трансгликозилировании РеБА. рН 3,0-3,5 – ацетатный буфер; рН 4,0-6,5 – фосфатно-цитратный буфер; рН 7,0-9,0 – натрий-фосфатный буфер.

Для определения оптимальной температуры трансгликозилирование осуществляли аналогично описанному выше способу определения оптимального рН, при различных температурах. рН реакционной среды устанавливали 6,5. Установлено, что оптимальная температура процесса находилась в пределах 65-75°C (рисунок 3). Для обеспечения высокой стабильности ЦГТазы была выбрана температура, равная 65°C.

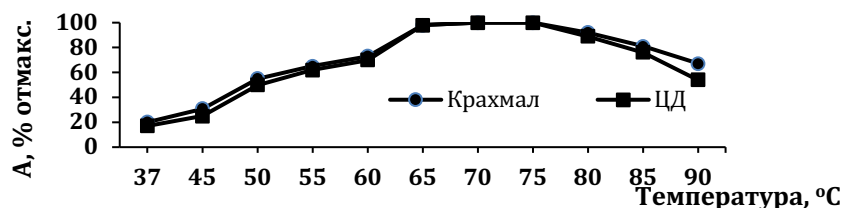


Рисунок 4- Влияние температуры на степень трансгликозилирования РеБА ЦГТазой

Соотношение и концентрация субстратов оказывало определенное влияние на биотрансформацию РеБА. Для выявления наилучшего варианта, реакции осуществляли в

течение 12ч при 65°C с 24% раствором РебА и γ -ЦД или крахмала в различных соотношениях, при рН 6,5 с использованием 9 ед/г РебА ЦГТаза. С увеличением количества γ -ЦД или крахмала существенно увеличивается степень трансформации, но при этом падает степень сладости получаемого продукта. С коммерческой точки зрения соотношение компонентов 1:1 (по массе), приводящее к сладости продукта в пределах 120-130 в составе напитков и 170-180 в кисломолочных и кондитерских продуктах, является наиболее приемлемой. Варьируя соотношение можно получить необходимый тип сладости. (рисунок 5).

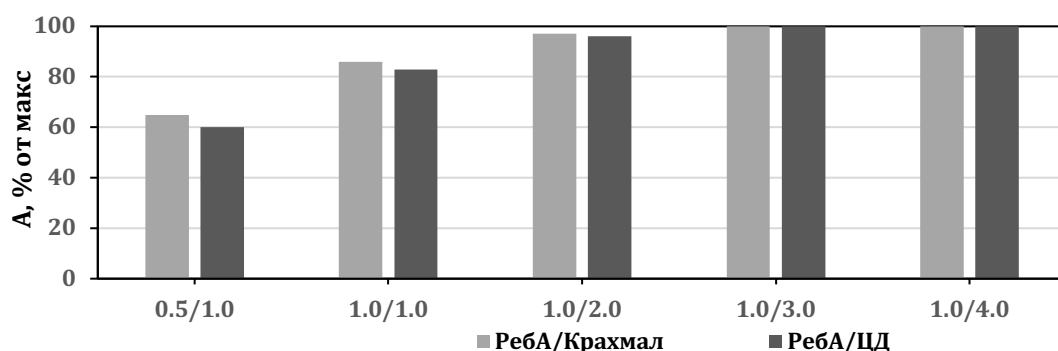


Рисунок 5 - Степень трансгликозилирования (А,%) в зависимости от соотношения РебА и доноров глюкозных единиц

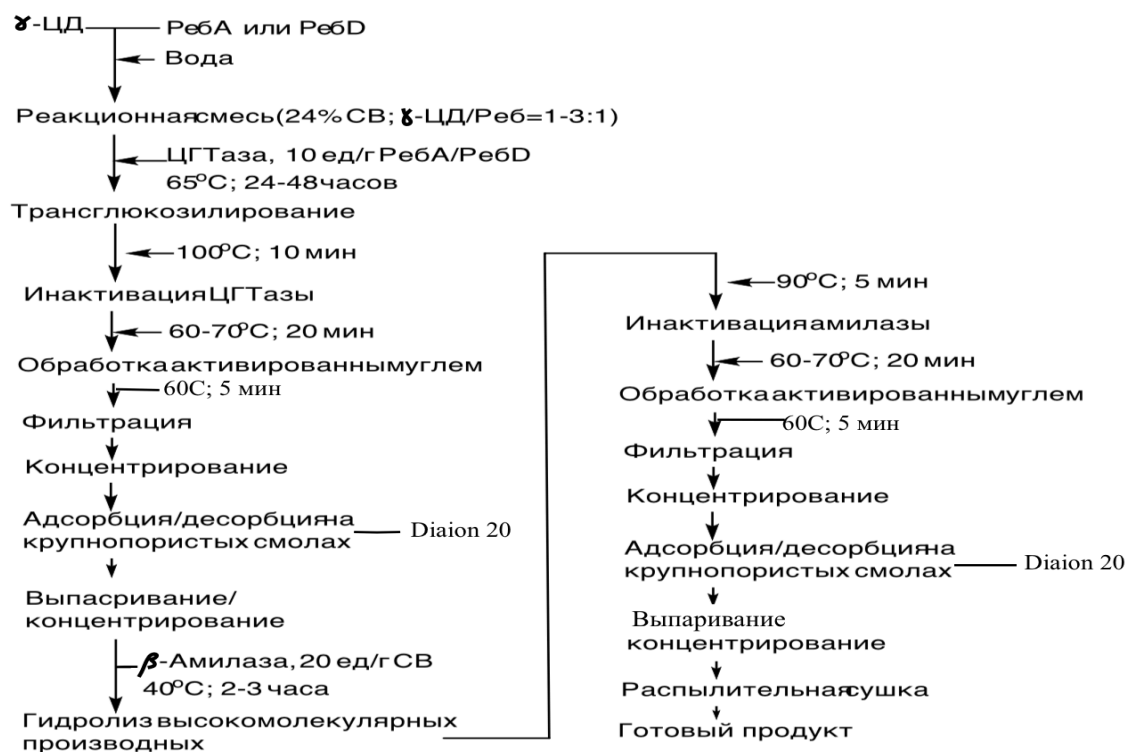


Рисунок 6- Общая схема трансгликозилирования гликозидов ферментом ЦГТазой с использованием ЦД в качестве донора

Реакцию трансгликозилирования в присутствии γ -ЦД в соотношении 1:1 осуществляли при 65°C в течении 24-48 ч. Для осуществления реакции при соотношении РебА: γ -ЦД=1:2 и 1:3, использовали 24% смесь 20 г γ -ЦД и 10 г РебА, и 30 г γ -ЦД и 10 г РебА, соответственно.

Продуктом реакции является смесь не модифицированного РебА и его моно- (РебА-

G1), ди- (РебА-G2), три- (РебА-G3) и более гликозилированных производных.

Выявлено, что при повышенных концентрациях циклодекстинов (ЦД) увеличивается степень трансгликозилирования и снижается количество не трансформированного РебА. При соотношении РебА: γ -ЦД =1:1 через 48 часов реакции количество остаточного РебА составляет 17,1%, а при 1:2 и 1:3 – 8,15% и 6,5%, соответственно. С увеличением продолжительности реакции, суммарное количество моно- и ди-гликозилированных производных падает с одновременным повышением производных с более длинными боковыми цепочками.

С целью повышения количества моно-, ди- и три-гликозилированных производных, что делает задачу выделения, очистки и получения их в гомогенном состоянии более лёгкой, полученный продукт обрабатывали β -амилазой. Также можно использовать и α -амилазу или глюкоамилазу. Такая обработка приводит к гидролизу длинных боковых цепочек производных до моно- и ди-гликозилированных компонентов (рисунок 7).

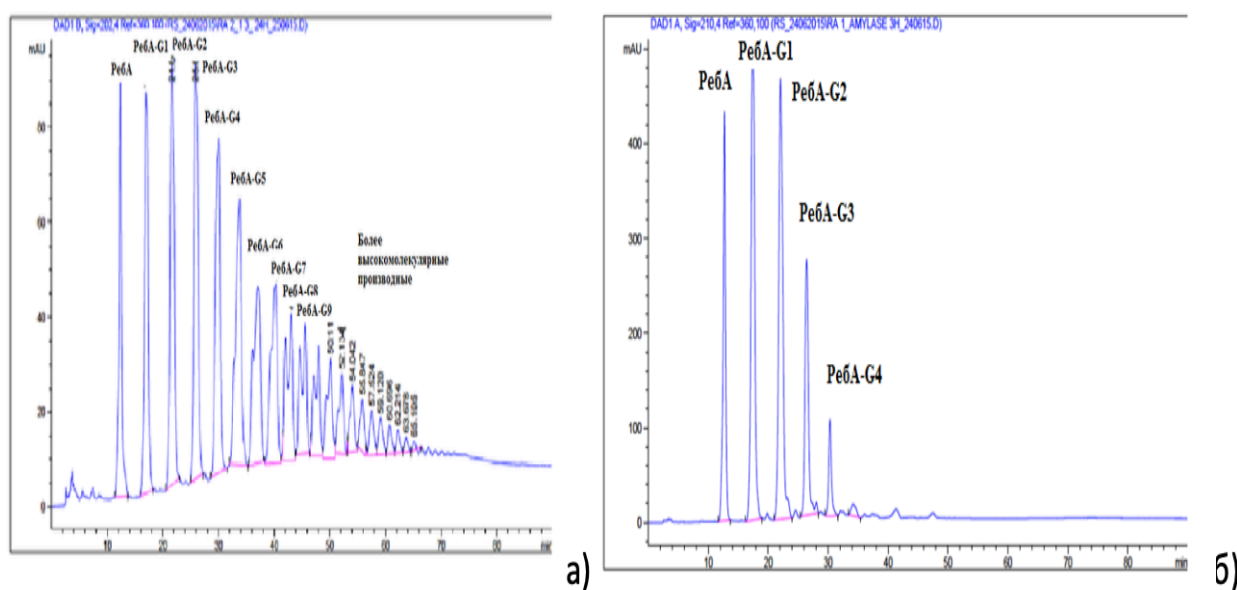


Рисунок 7 - ВЭЖХ-граммы трансгликозилированного РебА в присутствии ЦД до (а) и после обработки β -амилазой (б).

Продукт содержит не модифицированный РебА и от моно- до пента-гликозилированных производных в соотношении, приведенном в таблице 1.

Таблица 1- Соотношение гликозилированных производных РебА до и после обработки β -амилазой

Компоненты	Количество производных, %	
	РебА: γ -ЦД (1:3); 24 ч	РебА: γ -ЦД (1:3); 24 ч; после обработки β -амилазой
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	

Аналогичным способом проводили трансгликозилирование РебА ЦГТазой с крахмалом в качестве донора глюкозных единиц. Обработанный глюкоамилазой продукт содержит не модифицированный РебА и от моно- до тетра-гликозилированные производные.

Выделение и очистку индивидуальных производных осуществляли на 10-ти колонках смолой DiaionHP-20, соединенных между собой последовательно. Принцип разделения основан на разнице в сродстве к носителю различных производных. Через колонки пропускали 20%-ный раствор модифицированного РебА в 5% этиловом спирте после обработки глюкоамилазой и очистки на крупнопористой смоле. Количество вносимого гликозида составляло около 60-70% от общей адсорбционной емкости носителя.

Выявлено, что в первых колонках преобладающим является не прореагировавший РебА, количество которого постепенно снижается от колонки к колонке. В то же время, распределение производных имеет обратную зависимость. Сродство производных к носителю уменьшается с молекулярной массой таблица 2.

Таблица 2- Соотношение гликозидов в колонках

Гликозиды	Количество гликозидов в разных колонках, %							
	Исходный материал	#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

Из суммарного продукта, полученного из седьмой колонки, готовили 20% раствор и снова пропускали через систему из 10-ти колонок, процесс осуществляли аналогично выше описанному. Так удалось получить продукты с примерно 80%-ным содержанием моно- и дигликозидированных производных из четвертой и седьмой колонок, которые впоследствии были выделены и очищены.

3.2 Трансгликозидирование минорных компонентов РебD и РебM ЦГТазой. Была усовершенствована схема выделения и очистки РебD и РебM из коммерческого экстракта стевии и из концентрата гликозидов с сравнительно высоким содержанием РебD. Содержание РебD в экстракте может варьироваться в зависимости от сорта растения стевии или технологической схемы получения экстракта. Показана схема очистки экстракта с содержанием 52% РебА и 1,2% РебD, а также с экстрактом стевии, обогащенного РебD (20-28%) и РебM (10-13%).

В случае с обогащенным экстрактом, первичную обработку осуществляли 70-75%-ным раствором метанола в соотношении 1:7 (вес/объем) при 22°C в течение 48 ч. Осадок содержащий 60% РебD отделяли фильтрованием, и смешивали с 15-тью объемами деионизированной воды и выдерживали в течение 1 ч. при 65-68°C, затем кристаллы отделяли фильтрованием. Кристаллы представляют собой РебD с чистотой 80%, перекристаллизация которого из 50%-ного этанола (1:8-1:10, вес/объем) происходит быстро при охлаждении до 50°C и приводит к образованию РебD с чистотой около 90%. Повторной перекристаллизацией 50%-ным этанолом и промывкой можно достичь более чем 95% содержания РебD (рисунок 9). РебD и РебM можно использовать самостоятельно в качестве интенсивных подсластителей высокого качества.

Высокоочищенный РебD представляет собой белый порошок без запаха с молекулярной массой в 1129.15 а.е.м. и молекулярной формулой $C_{50}H_{80}O_{28}$ в 180-200 раз слаще сахара по сравнению с 10% раствором сахарозы. Точка плавления 248-249°C, растворимость в воде около 0,2%, которая увеличивается при нагревании. РебD стабилен при различных pH и нагревании (Abelyan et al, 2012). Он может служить в качестве натурального высокоинтенсивного подсластителя в продуктах питания, напитках, фармацевтических

композициях, косметике, жевательных резинках, зубных пастах и т.д.

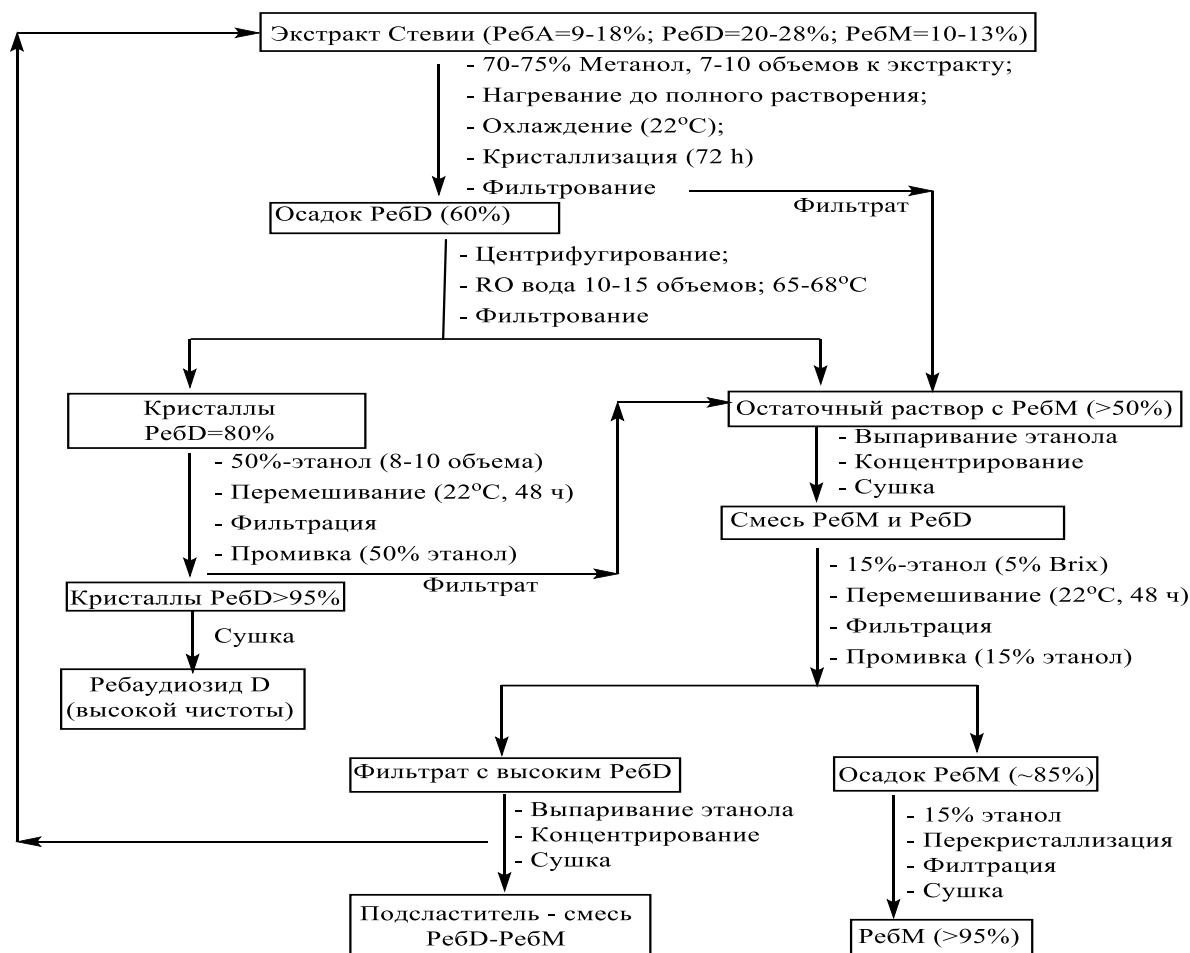


Рисунок 8- Очистка РебD и РебM из обогащенного экстракта

3.2.2 Трансгликозилирование РебD с помощью ЦГТаза *B. stearothermophilus*

проводили с использованием крахмала или γ -ЦД в качестве донора глюкозных единиц. Выделение и очистку индивидуальных производных осуществляли на 10-ти колонках с смолой DiaionHP-20 (100см³ смолы), соединенных между собой параллельно. Процесс осуществляли аналогично вышеописанному для РебА (рисунок 6).

Для обогащения его моно- и ди-гликозилированными производными, смесь обрабатывали глюкоамилазой, как в случае с РебА, и повторно очищали на десяти колонках с DiaionHP-20. Суммарные элюаты из колонок 1 и 2, и 4-5 после 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 (по массе).

Аналогичным с РебD способом, реализовывали трансгликозилирование РебM с помощью ЦГТаза *B.stearothermophilus* и с использованием γ -ЦД. Таким образом впервые были получены и очищены производные гликозида РебDi и РебM, которые могут быть использованы в качестве самостоятельных сахарозаменителей.

4. Трансфруктозилирование РеБА β -фруктофуранозидазой. С целью улучшения вкусовых характеристик, РеБА подвергали также β -2,6-трансгликозилированию с помощью β -фруктофуранозидазы из *Arthrobacter* sp. К-1 и сахарозы в качестве источника фруктозных единиц. С целью трансфруктозилирования РеБА, β -фруктофуранозидазу получали с помощью различных продуцентов: из *Arthrobactersp.* К-1 (FERM ВР-3192) (Япония), *Arthrobactersp.* 10137 (Коллекция Промышленных культур, Китай), *Microbacterium saccharophilum* NBRC 108778 (Япония), *Aspergillusniger* IMI303386, (Великобритания), *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 26077 (США) и *Aureobasidium pullulans* DSM 2404 (ФРГ). Наилучшие результаты по выходу фруктозилированного РеБА получены со штаммом *Arthrobacter* sp. К-1, фермент которого синтезировал моно- β -2,6-фруктозилированную в положении 19-*O*-глюкозильного остатка производную РеБА (РеБА-F) с достаточно высоким выходом, т.е. данная β -фруктофуранозидаза строго специфична к позиции С-19 рисунок 9.

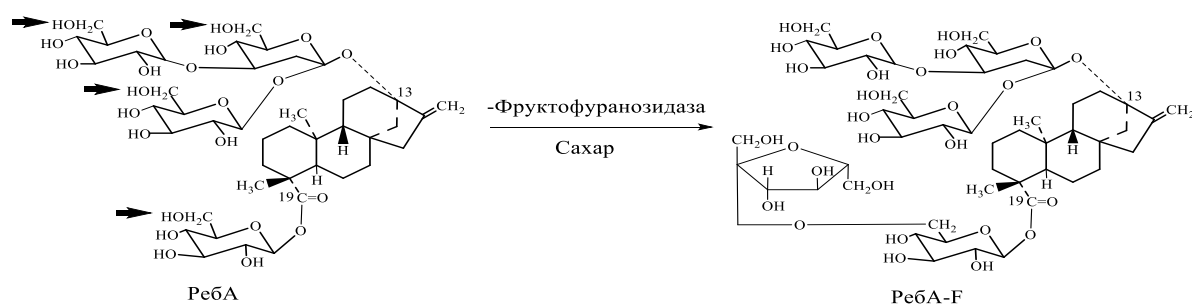


Рисунок 9 - Трансфруктозилирование РеБА

Изучено влияние концентрации раствора и соотношение РеБА и сахарозы на выход фруктозил-РеБА (Fru-РеБА), влияние pH, температуры и количества фермента. Выход моно-фруктозилированного производного составляет 70%, при условии количества компонентов реакции 0,5% РеБА, 5% сахарозы и времени протекания реакции 17 ч.

Дальнейшую очистку фруктозил-РеБА осуществляли кристаллизацией и перекристаллизацией. Немодифицированный РеБА остается в фильтрате, а чистота белых кристаллов фруктозил-РеБА достигает до 95% и более.

Для точной идентификации продуктов использовали масс-спектрометрический (МС) анализ в системе Agilent 6110 Series Quadrupole LC/MS.

Разработанная технология обеспечила улучшение качества вкусового профиля, послевкусия, горечи и восприятия вкуса для фруктозилированного РеБА. Полученные вкусовые характеристики сопоставимы с вкусовыми характеристиками аспартама и гораздо лучше, чем у РеБА. Наблюдалось некоторое уменьшение горечи и улучшение вкусового профиля относительно РеБА. Интересно, что вкусовые характеристики фруктозилированного ребаудиозида А сопоставимы с аспартамом и превосходят РеБА.

5. Взаимосвязь между вкусовыми характеристиками и структурой гликозидов стевии. Синтетические и натуральные некалорийные высокоинтенсивные подсластители,

проявляют сладкий вкус, который отличается от вкуса углеводных подсластителей по: Функции концентрация/отклик или Максимальный отклик; по Вкусовому профилю; Временному (темпоральному) профилю; по Адаптационному профилю.

5.1. Функция концентрация/отклик или Максимальный отклик

Интенсивность сладости высокоинтенсивных подсластителей не является постоянной величиной у всех синтетических и натуральных высокоинтенсивных подсластителей прямо зависит от заменяемой ими концентрации сахарозы, а также от системы и других ингредиентов, в продуктах в которых используются подсластители. Например, РебА в 400 раз слаще, чем 2.0% сахароза, но только в 230 раз по сравнению с 8% сахарозой. Взаимосвязь между вкусовыми характеристиками и структурой гликозидов стевии изучали для РебА, РебD, РебМ и их ферментативно-модифицированных производных (таблица 3, 4).

Таблица 3 - Интенсивность сладости различных подсластителей в зависимости от контрольной концентрации сахарозы в воде

Подсластитель	Концентрация сахарозы, %				
	2.0	3.0	5.0	8.0	10.0
Сахароза	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Фруктоза	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
Глюкоза	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Стевиозид	280	270	250	220	180
РебА	400	350	270	230	210
РебD	420	410	350	240	220
РебМ	521	-	380	295	237
РебА-G1	-	-	-	190	-
РебD-G1	-	-	-	200	-
РебМ-G1	-	-	-	230	-
РебА-F	-	-	-	280	-
Смесь РебА-Gly	-	-	-	150	-
Смесь РебD-Gly	-	-	-	150	-
Смесь РебМ-Gly	-	-	-	170	-

Принимая во внимание разный характер сладости сахарозы и высокоинтенсивных подсластителей, можно заменять сахарозу только до определенной степени без возникновения посторонних привкусов. Все полученные производные могут быть использованы в качестве единственного подсластителя в пищевых продуктах и напитках, в оригинале содержащих более 10% сахара. Тем более, перспективными могут быть оптимизированные смеси на их основе.

Таблица 4 - Максимальная сладость высокоинтенсивных подсластителей и различных гликозидов стевии и их производных в воде при комнатной температуре в эквивалентах сахара (%ЭС)

Подсластитель	%ЭС	Подсластитель	%ЭС
Аспартам	16,0	Стевиозид	9,1
Ацесульфам-К	11,6	РебА	8,5
Сукралоза	13,0	РебD	10,1
Неотам	15,1	РебМ	14,2
Цикламат-Na	15,2	РебА-G1	10,4
Сахарин-Na	10,1	РебD-G1	11,3
Тауматин	10,1	РебМ-G1	14,9
Неогесперидин дигидрохалкон	9,8	РебА-F	10,7
Глицирризинат моноаммония	7,3	Смесь РебА-Gly	10,8
		Смесь РебD-Gly	11,6
		Смесь РебМ-Gly	15,4

5.2. Вкусовой профиль полученных гликозидов. Углеводные подсластители проявляют чистый сладкий вкус, особенно сахара. Зачастую высокоэффективные подсластители имеют посторонние привкусы. Чистые высокоинтенсивные подсластители без сочетания с другими подслащивающими веществами обычно находятся в пределах 4-8% эквивалента сахарозы (ЭС). Следовательно, 6% ЭС представляет собой среднее значение, с которым можно сравнить сладость высокоинтенсивных подсластителей. При этой концентрации сладость РебА в 200 раз выше, чем у сахарозы. При низких значениях ЭС, РебА проявляет чистую сладость, в то время как при более высоких концентрациях ($ЭС \geq 6$), проявляются другие характеристики вкуса (например, горечь и неприятный лакричный привкус).

В отличие от других коммерческих гликозидов стевии, для РебМ не обнаружено значительных нежелательных привкусов в водных растворах при значении около 8% ЭС. Подслащивающий профиль РебМ очень похож на аспартам, но имеет более интенсивное сладкое послевкусие. Качество вкуса РебМ существенно лучше, чем РебА или РебD. РебМ не обладает терпким, вяжущим привкусом (рисунок 10).

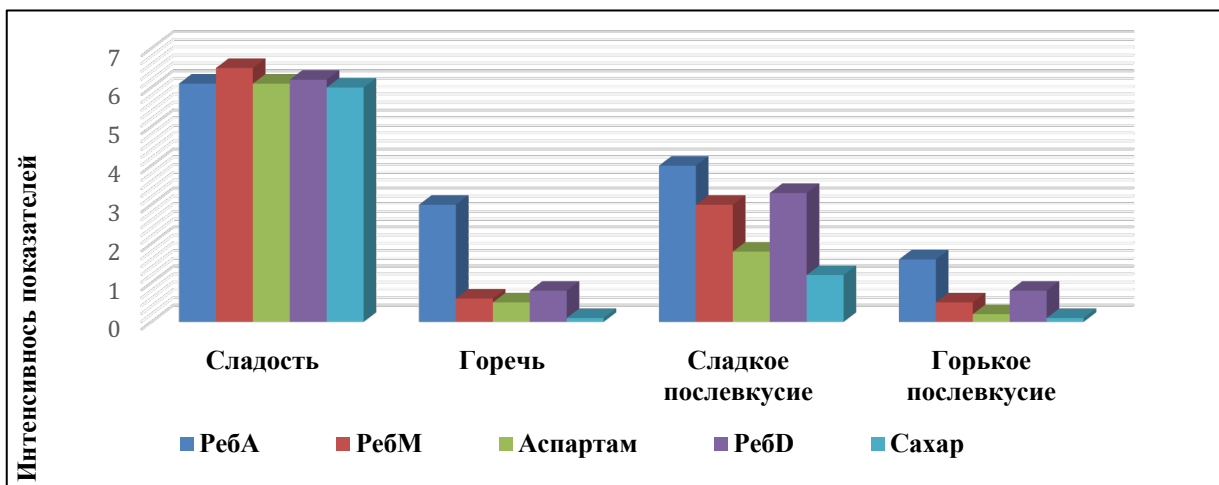


Рисунок 10 - Вкусовой профиль РебА, РебD, РебМ, аспартама и 8% раствора сахарозы в воде. Показано, что трансгликозилирование РебА, РебD и РебМ с помощью ЦГТаз приводит к существенному улучшению вкусовых качеств, в том числе снижается горечь и посторонние привкусы, а также горькое послевкусие (рисунок 11, 12). Вкусовые характеристики фруктозил – РебА (РебА-F) также превосходят таковые для РебА и сопоставимы с моно- и ди-гликозилированными производными, рисунок 11. Но данный продукт обладает пониженной стабильностью в кислых средах из-за лабильности связи между глюкозой и фруктозой.

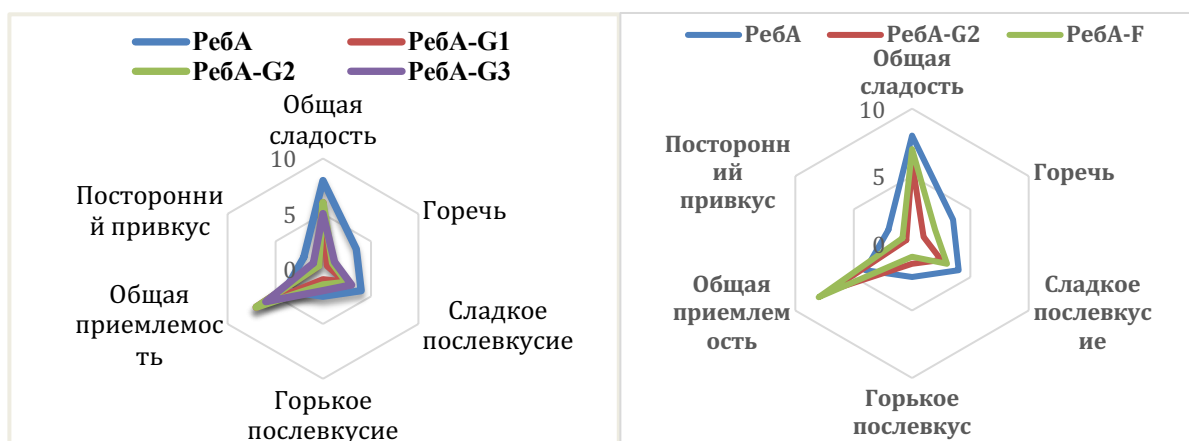


Рисунок 11 - Сравнительный вкусовой профиль РебА и его гликозилированных производных

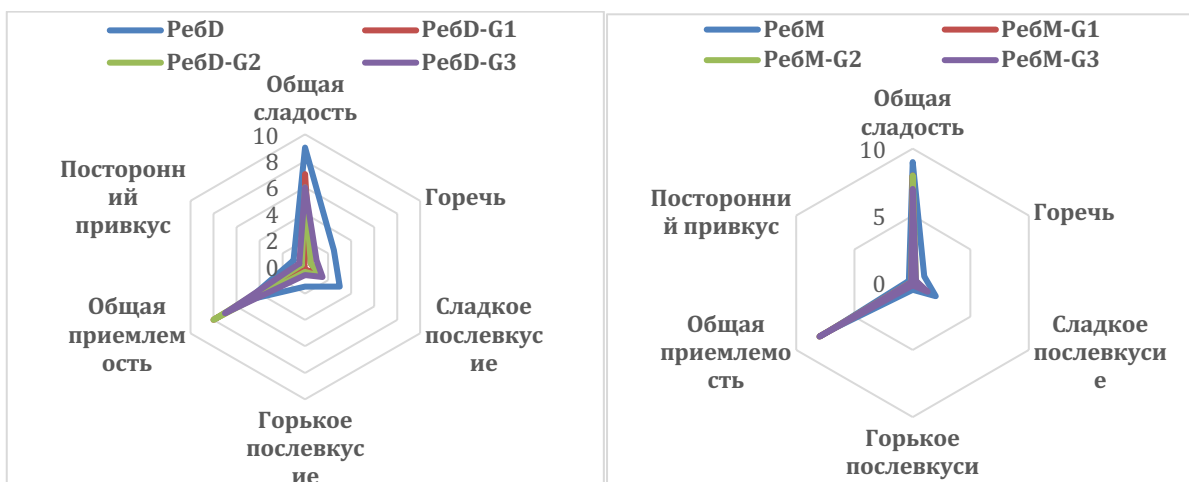


Рисунок 12 - Сравнительный вкусовой профиль РебD и РебМ и его гликозилированных производных

5.3. Временной (темпоральный) профиль, который описывает изменения в восприятии сладости с течением времени. Время появления (АТ) и время исчезновения (ЕТ) сладости. Значение АТ и ЕТ для РебА было больше, чем для аспартама и сахарозы в эквиваленте с 8%-ной сахарозы (Prakashetal., 2008), однако лучше, чем у сукралозы и неотама. В этом отношении, РебD и РебM являются более близкими к аспартаму, хотя оба в высокоочищенном виде все же обладают большими значениями АТ и ЕТ (Prakashetal., 2013b).

Показано, что гликозилирование гликозидов стевии в некоторых случаях может привести к существенному улучшению данного профиля. Так, сравнение РебА, РебD и РебM и их α -1,4-ди-гликозилированных производных с 8% раствором сахарозы выявило, что ферментативная модификация приводит к сокращению АТ и ЕТ, и они становятся ближе к сахару. У них максимальная сладость ощущается быстрее, чем у исходных гликозидов, которая постепенно исчезает, но также быстрее, чем это наблюдалось для исходных подсластителей.

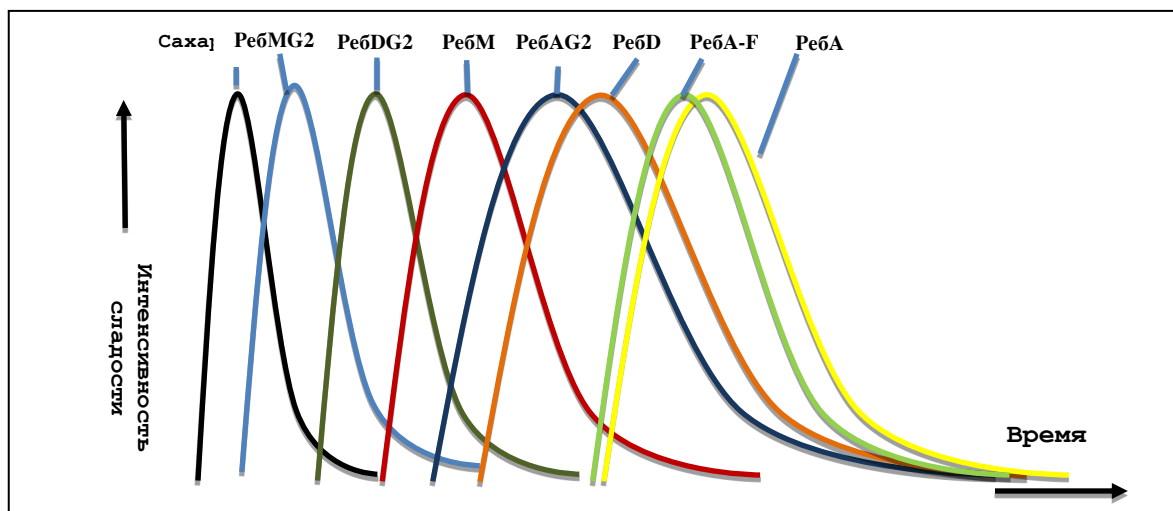


Рисунок 13 - Характер темпорального профиля ребаудиозидов и их производных, полученных в результате исследований

5.4. Адаптационный профиль. Если вкус раствора углеводного подсластителя тестировать многократно маленькими глотками в течение короткого периода времени, то отмечается лишь незначительное изменение интенсивности сладости. Однако, высокоинтенсивные подсластители демонстрируют значительное снижение воспринимаемой сладости (десенсibilизация). Степень десенсibilизации выше для смеси высокоочищенной смеси экстракта стевии (ЭС95). РебD и его смеси с РебА, показывают лучший профиль адаптации (рисунок14) (Abelyan,Abelyan, 2012).

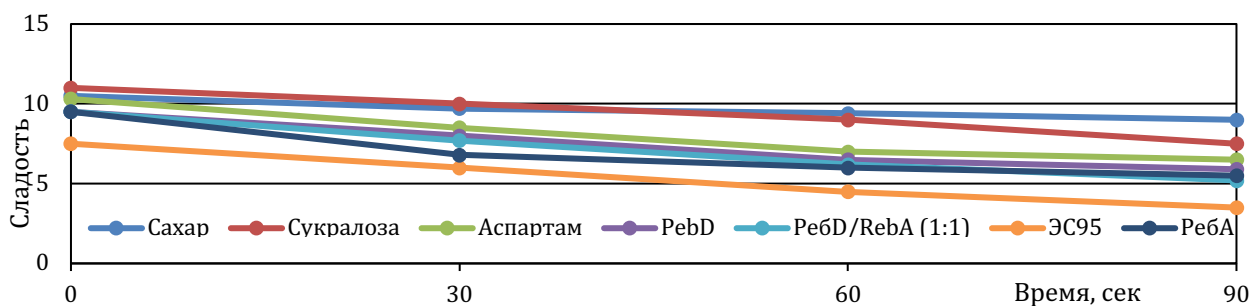


Рисунок 14 - Адаптационный профиль различных подсластителей в воде

Установлено, что ферментативное трансгликозилирование приводит к улучшению эффекта десенсибилизации. Поэтому, гликозилирование может быть эффективным инструментом для модулирования вкусовых характеристик и, таким образом, общего вкусового профиля гликозидов стевии, рисунок 15.

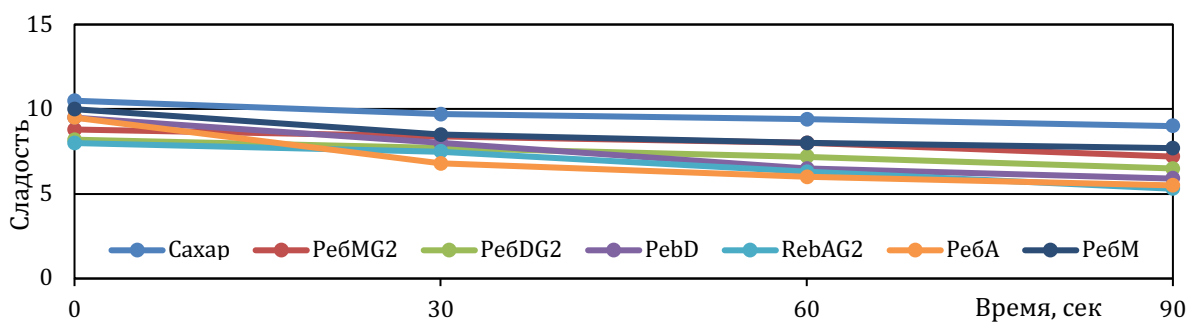


Рисунок 15 - Характер адаптационного профиля гликозидов стевии и их производных в воде

Стевиол-гликозиды могут быть модифицированы различными трансгликозидазами, что в целом приводит к улучшению их растворимости и вкусового профиля, в частности уменьшается горькое послевкусие. Процесс трансгликозилирования также может служить инструментом для модификации и улучшения оставшихся после выделения РеbА и стевиозида растворов с высоким содержанием РеbС.

Ферментативное трансгликозилирование эффективно для структурной модификации биологически активных соединений, включая высокоинтенсивные подсластители. Посредством модификации соединений можно изменять структуру и характеристики подсластителей, и открыть новые области и возможности их применения.

5.5. Изучение влияния гликозидов стевии как сахарозаменителя на вкусовые характеристики йогурта. Для изучения возможности использования полученных стевиолгликозидов в рецептуре пищевых продуктов в качестве примера был выбран классический рецепт йогурта, с дальнейшей возможностью расширения продуктовой линейки йогуртов.

Для решения поставленной задачи готовили 6 образцов йогурта по классической технологии с добавлением стевии до и после инкубации йогурта и с добавлением сахара до и после инкубации, один образец с добавлением РеbА до инкубации, второй образец с добавлением РеbА (Purkayashita, S., et al., US Patent Appl. 14/494,322 – 2015.) после инкубации,

третий образец с добавлением смеси РебА-Gly до инкубации, четвертый образец с добавлением РебА после инкубации, пятый образец с добавлением сахара до инкубации, шестой образец с добавлением сахара после инкубации. При проведении органолептической оценки большинство экспертов предпочли йогурт, который был подслащен РебА-Gly, кроме образца, подслащенного сахаром (контроль). На второе место дегустаторы поставили образец йогурта, подслащенный гликозидом стевии РебА.

Таким образом, органолептический анализ исследуемых образцов показал, что есть перспективы использования стевии в йогурте вместо сахара, это приемлемо для потребителей, особенно если учитывать что стевия не калорийна, что для многих потребителей имеет большое значение.

Органолептическая оценка стевии как настольного подсластителя чая или кофе в сравнении с сахаром белым. Потребительский подсластитель стевия может быть представлен как таблетки, саше, пакетики или рассыпной. Он сейчас широко используется в большинстве напитков, включая газированные, негазированные, нектары, соки, чай, холодный чай и кофе.

Для проведения органолептической оценки использовался сенсорный тест-Треугольный тест. Для потребительской оценки настольного подсластителя брали РебА и РебD и оценивали чайный напиток с ними.

По результатам органолептической оценки самую высокую оценку сладости показали образцы чая, подслащенные сахаром и РебD. Чай, подслащенный РебD, оценивался как наиболее приближенный к сладости сахара. Чайный напиток, подслащенный РебА, имел небольшую горечь и ощущалось слегка горькое послевкусие. В потребительский подсластитель может добавляться наполнитель лактоза, эритрит, инулин или мальтодекстрин для уменьшения интенсивности сладости и улучшения вкусовых качеств. Полученные в результате настольные подсластители могут быть сопоставимы с сахаром по сладости или до десяти раз слаще сахара. Их можно использовать как сахар, чтобы добавить естественную сладость горячим или холодным напиткам, или посыпать фрукты, а также для использования во многих кулинарных рецептах, что является нулевой натуральной альтернативой калорийности сахара.

ВЫВОДЫ

1. Улучшены вкусовые характеристики гликозидов стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) методом ферментативной биотрансформации;
2. Идентифицированы минорные сладкие гликозиды стевии ребаудиозида D и ребаудиозида M и разработан эффективный метод получения высокочистых РебD и РебM, и изучены их сенсорные характеристики;
3. Модифицированы в присутствии циклодекстринов и крахмала в качестве доноров и исследованы особенности трансгликозилирования ребаудиозида A, ребаудиозида D и ребаудиозида M с помощью ЦГТаза термофильного штамма *Geobacillus stearothermophilus* St-88 и β -фруктофуранозидазы и установлено, что степень и эффективность трансгликозилирования находятся в строгой зависимости от концентрации субстрата и фермента, а также pH, температуры и длительности реакции; показана возможность получения гликозилированных гликозидов стевии с различной длиной боковых цепочек.
4. Разработаны методы очистки моно-, ди- и три-гликозилированных производных ребаудиозида A, ребаудиозида D и ребаудиозида M на основе их сродства к макропористому носителю, и сравнительно охарактеризованы их вкусовые качества;
5. Разработаны эффективные хроматографические и физические методы для получения очищенных препаратов гликозидов и лабораторных и пилотных условиях;
6. Изучены структуры гликозидов различными физико-химическими и ферментативными методами;
7. Выявлена связь между строением гликозидов и вкусовыми характеристиками модифицированных и не модифицированных гликозидов стевии, что может служить основой для создания новых оптимизированных смесей гликозидов стевии с улучшенным вкусовым, адаптационным и температурным профилями;
8. Разработаны рекомендации по применению полученных гликозидов в качестве заменителей сахара в пищевых продуктах (на примере йогурта и чая).

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Чхан, К.В. Влияние ферментативного трансгликозилирования гликозидов стевии на их вкусовые характеристики / К.В. Чхан, М.Б. Мойсеяк //Хранение и переработка сельхозсырья. - 2019. – №.1- С.86 - 93
2. Чхан, К.В. Взаимосвязь между вкусовыми характеристиками и структурой гликозидов стевии /К.В.Чхан, В.А. Абелян, М.Б. Мойсеяк// Пищевая Промышленность. - 2019. – №.6.-С. 74-78
3. Чхан, К.В. Вкусовой профиль сладких минорных гликозидов стевии ребаудиана и их

модифицированных производных/ К.В. Чхан, В.А. Абелян, М.Б. Мойсеяк // Пищевая Промышленность. - 2019. – №.7.-С. 68-72

Опубликованные патенты:

1. Purkayashtha, S., Markosyan, A., Petit, M., Chkhan, K., Adamyan, M. Fermented dairy products containing sweetener and flavor modifier derived from Stevia and methods of producing same // US Patent Appl. 14/494,322 – 2015.
2. Purkayashtha, S., Martin, J., Petit, M., Markosyan, A., Chkhan, K., Adamyan, M. Steviol glycoside compositions // US Patent WO 2017/106577. - 2017.
3. Purkayashtha, S., Martin, J., Petit, M., Chkhan, K. Steviol glycoside compositions // US Patent WO 2017/075034. – 2017.
4. Purkayashtha, S., Martin, J., Petit, M., Chkhan, K. Steviol glycoside compositions // US Patent US 2018/0317534 A1. – 2018.

Другие издания:

1. Чхан, К.В., Мойсеяк, М.Б., Использование ферментных препаратов при получении сахарозаменителей из стевии / К.В. Чхан, М.Б. Мойсеяк // Кондитерское и хлебопекарное производство. –Москва, 2019 г. -С.34 - 35
2. Chkhan, K.V., Transglycosylation of Rebaudioside A by β -fructofuranosylase//Health, Food and Biotechnology.- 2019.

Публикации в сборниках научных трудов и материалах конференций:

- 1 Chkhan, K.V., Microbial synthesis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* // Материалы Международной конференции по микробиологии «Culture Collections The Challenge and the Future», Institute of Bioscience, University Putra Malaysia, June 2015;
- 2 Мойсеяк М.Б. Может ли быть лакомство функциональным продуктом / Чхан, К.В., Мойсеяк М.Б. // Материалы XII Международной конференции «Кондитерские изделия XXI века» /Международная промышленная академия 25-27 февраля 2019г. – М.:2019.-С.127 - 132;
- 3 Чхан, К.В., Природные некалорийные сахарозаменители полученные биотрансформацией сладких гликозидов стевии / К.В.Чхан, М.Б. Мойсеяк// Материалы XIII Международного биотехнологического Форума-Выставка «РосБиоТех-2019» / МГУПП 24-26 Апреля, Москва, С.200 – 209.

SUMMARY

Sugar alternatives are receiving increasing attention due to awareness of many diseases related to consumption of high-sugar containing foods and beverages. Non-caloric sweeteners of natural origin are becoming increasingly popular. The sweet herb *Stevia rebaudiana* produces a number of diterpene glycosides which feature high intensity sweetness and sensory properties superior to those of many other high potency sweeteners.

Stevia rebaudiana is a plant species belonging to the *Astraceae* family, and is native to South America and cultivated now in many parts of the world. The leaves of stevia plant contain different sweet tasting components, called steviol glycosides. Each of these steviol glycosides has its own unique taste profile and sweetness intensity, which can be up to 400 times sweeter than sugar. The quality and strength of the sweetness of steviol glycosides depends on their structure and, in particular, the type and amount of carbohydrate units in their structure, as well as the nature and configuration of the bonds. Steviol glycosides are characterized structurally by having one base, aglycone steviol, and by the presence of carbohydrate residues at the positions C13 and C19 (an ent-kaurene-type diterpene).

It was discovered that in addition to their favorable impact on the flavor and sweetness profiles in steviol glycoside compositions, the impact of minor glycosides can be improved when they are glycosylated. Glycosylated steviol glycosides have one or more glycoside moieties attached to the steviol glycoside backbone and can improve the flavor and sweetness profiles of steviol glycoside compositions to be similar to or even surpass the flavor and sweetness profiles of highly purified steviol glycosides, thereby providing an efficient and effective alternative to highly purified steviol glycosides.

The method used for the synthesis of glycosylated products is transglycosylation. Intermolecular transglycosylation with various enzymes results in various degrees of enhancement of steviol glycosides taste profile. The best results were obtained using CGTases produced by thermophilic strain *Geobacillus stearothermophilus* St-88 and starch or γ -cyclodextrin (γ -CD) were used as a donor of glucose units and the optimum pH and temperature were determined.

It is shown that effective transglycosylation of RebA, RebD and RebM results in significant improvement of their taste attributes, e.g. removes bitter aftertaste, increases maximal response, adjusts onset and increases solubility.

Автор выражает особую благодарность за научные консультации доктору биологических наук, профессору Абеяну Варужану Амаяковичу.