

На правах рукописи

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ПИЩЕВЫХ
ПРОИЗВОДСТВ»

ЧХАН КРИСТИНА ВИКТОРОВНА

**УЛУЧШЕНИЕ ВКУСОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ
(*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI) МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ
БИОТРАНСФОРМАЦИИ**

05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
Кандидат технических наук, доцент
Мойсеяк Марина Борисовна

Москва 2019

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: Стевия и её гликозиды	10
1.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni (стевия)	10
1.2 Гликозиды стевии	11
1.2.1 Структура и свойства	11
1.2.2. Основные характеристики гликозидов стевии	15
1.2.3. Стабильность гликозидов стевии	17
1.2.4. Биологические свойства гликозидов стевии	19
1.2.5. Выделение и очистка гликозидов стевии	21
1.3. Ферментативная модификация гликозидов стевии	29
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Ферменты ЦГТаза и β -фруктофуранозидаза	34
2.2. Определение ферментативной активности	34
2.2.1. Определение ферментативной активности ЦГТаза	35
2.2.2. Определение ферментативной активности	37
β -фруктофуранозидазы	
2.2.3. Идентификация гликозидов методом	38
высокоэффективной жидкостной хромато-масс	
спектрометрии (ВЭЖХ/МС)	
ГЛАВА 3. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ	40
ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ	
3.1. Трансгликозилирование ЦГТазой	42
3.1.1. Трансгликозилирование РеБА ЦГТазой	44

3.1.2. Трансгликозилирование РебА ЦГТазой и γ -ЦД в качестве донора	46
3.1.3. Трансгликозилирование РебА ЦГТазой и крахмалом в качестве донора	53
3.2. Трансгликозилирование РебD и РебM ЦГТазой	59
3.2.1. Очистка РебD и РебM	59
3.2.2. Трансгликозилирование РебD с помощью ЦГТазы	64
3.2.3. Трансгликозилирование РебM с помощью ЦГТазы	69
ГЛАВА 4. ТРАНСФРУКТОЗИЛИРОВАНИЕ РебА β -ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗОЙ	70
4.1. Культивирование <i>Arthrobacter sp.</i> К-1	74
4.2. Влияние концентрации раствора и соотношение РебА и сахарозы на выход фруктозил-РебА (Fru-РебА)	74
4.3. Влияние рН, температуры и количества фермента	76
4.4. Выделение и очистка фруктозилированного РебА	78
ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ВКУСОВЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И СТРУКТУРОЙ ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ	81
5.1. Функция концентрация/отклик или максимальный отклик	90
5.2. Вкусовой профиль	93
5.3. Временной (темпоральный) профиль	97
5.4. Адаптационный профиль	100
5.5. Разработка пищевых технологий с использованием гликозидов стевии как природного сахарозаменителя	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	111
ВЫВОД	114

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	129
СПИСОК ПРИЛОЖЕНИЙ	130
ПРИЛОЖЕНИЯ	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. 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). В связи с этим поиск новых низкокалорийных и безопасных заменителей сахара является насущной актуальной задачей.

В настоящее время известно большое количество искусственных химических соединений, обладающих высокой степенью сладости, так называемые искусственные интенсивные подсластители: сахарин, цикламат, ацесульфам К, аспартам, и природные подсластители. Однако, они имеют вторичные эффекты, оказывают отрицательное влияние на здоровье людей. Так, подсластители на основе аспартама противопоказаны больным с гомозиготной фенилкетонурией. Аспартам повышает аппетит, способствует появлению мигрени, депрессий и психических расстройств, а также может инициировать злокачественную опухоль (Butchko et al., 2001; Hull, 2002). Сахарин не рекомендуется детям и беременным женщинам, а также при заболеваниях печени и почек; в некоторых странах его производство и продажа запрещены (Kuhn et al., 2004). Ацесульфам К имеет металлический привкус, цикламаты вызывают нежелательные изменения в организме при повышенных дозах. Миракулин, монелин, тауматин, осладин, филодульцин – сахарозаменители, широко используемые в некоторых странах - также обладают рядом отрицательных свойств (Родионова, 2000; Nabors, Gelardi, 1991; Lipinski, Hanger, 2001).

В этой связи поиск естественных и низкокалорийных подсластителей растительного происхождения, которые безвредны для человеческого организма и могут быть использованы в пищевой промышленности и медицине, является актуальной и острой необходимостью.

Среди природных высокоинтенсивных подсластителей, сладкие гликозиды *Stevia rebaudiana* Bertoni (стевия) занимают особое место. Они в среднем от 30 до 450 раз слаще, чем обычный сахар. Однако они обладают остаточными горечью и послевкусием, которые влияют на вкусовые качества конечных продуктов и делают несколько сложным их применение (Bakal, Nabors, 1986; Kinghorn, 2002). Эти недостатки можно снять модификацией исходных соединений с помощью реакции межмолекулярного трансгликозилирования под действием различных ферментов. При этом происходит присоединение других углеводов в положениях С-13 и С-19 (Зубцов и др., 2002; Geuns, 2003; Kaneda et al., 1977; Kasai et al., 1981; Kennelly, 2002a; Kinghorn, 2002; Kobayashi et al., 1977; Mosettig et al., 1963; Zhang et al., 1999). В этом отношении очень

важно выявить взаимосвязь между структурными особенностями и вкусовыми качествами этих веществ с целью создания целенаправленно модифицированных гликозидов с заранее прогнозируемыми сенсорными характеристиками.

Другое направление - выделение и изучение сладких гликозидов стевии, аккумулирующихся в следовых количествах, с целью создания оптимизированных смесей, обладающих улучшенными сенсорными свойствами и потенциально имеющих существенный коммерческий потенциал.

Изучению именно этих вопросов посвящена настоящая работа.

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 учёные 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 стевии, 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 осуществления указанной цели решали следующие задачи:

- идентифицировать минорные сладкие гликозиды стевии 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 немодифицированными 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 немодифицированных гликозидов стевии;
- 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 стевии РебА, РебD и РебМ с помощью ферментов цикломальтодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТаза) и β -фруктофуранозидазы (ФФазы). Выявлены наилучшие условия трансгликозилирования.

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

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

Установлена взаимосвязь между структурными особенностями и качеством вкуса.

Теоретическая и практическая значимость работы:

- Усовершенствована схема выделения и очистки сладких минорных гликозидов стевии 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 заменителей сахара.
- Разработаны рекомендации по получению оптимизированных смесей, содержащих наиболее перспективные гликозиды и их производные.

Методология и методы исследования.

Объектом исследований служила стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

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 листа стевии минорных гликозидов РебD и РебM, обладающие лучшими вкусовыми характеристиками, для использования их как самостоятельных сахарозаменителей так и в оптимизированных смесях.

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

Степень достоверности и апробация результатов. 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 (Москва), 2 печатные статьи в сборниках конференций с докладом (Москва); четыре опубликованных патента (США).

Место выполнения работы. Московский Государственный Университет Пищевых Производств и на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории PureCircle Ltd. (Малайзия). Вкусовые характеристики полученных подсластителей определялись дегустационной группой Центральной научно-исследовательской лаборатории PureCircle Ltd. (Малайзия).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части из 4 глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 178 ссылок, и 4 приложений. Общий объем диссертации 145 страниц, включая 19 таблиц и 60 рисунков. Список литературы содержит 178 источников, в том числе 160 зарубежных авторов.

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Стевия и ее гликозиды

В настоящее время известны множества растений с содержанием соединений по сладости, превосходящие сахар в сотни и тысячи раз. Это, например, диоскорефилум (*Dioscorephellum cumminsii*), липпия (*Lippia dulcis*), хемслея (*Hemsleya panicis-scandens*), синсепалу (*Syncepalum dulcificum*), момордика (*Thladiantha groswenorii*, *syn. Momordica groswenorii*). Однако, коммерческое использование их как сырья для производства сахарозаменителей ограничено либо трудностью сбора плодов и нетехнологичностью переработки, либо содержанием токсичных соединений. Так, липпия содержит помимо сладкого компонента гернандильцина, который в 1000 раз слаще сахара, токсичный монотерпен – камфору, а у хемслеи, наряду со сладким гликозидом кукурбитаном, имеется вредный для здоровья человека кукурбицин, обладающий свойствами цитотоксина.

В этой связи все большей популярностью пользуется *Stevia rebaudiana* (стевия), которая аккумулирует ряд сладких гликозидов, не обладающих побочными действиями.

1.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni (стевия)

Стевия - род многолетних растений семейства Астровые, или Сложноцветные, включающий в себя около 260 видов трав и кустарников, произрастающих в Южной и Центральной Америке. Но только *Stevia rebaudiana* имеет естественную сладость, благодаря накоплению сладких гликозидов (таблица 1) (Kingham, 2002).

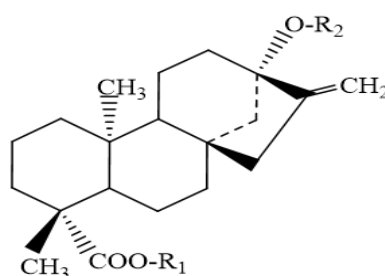
Таблица 1 - Классификация *Stevia rebaudiana* (Kingham, 2002)

Царство	<i>Plantae</i>
Подцарство	<i>Tracheobionta</i>
Надотдел	<i>Spermatophyta</i>
Отдел	<i>Magnoliophyta</i>
Класс	<i>Magnoliopsida</i>
Подкласс	<i>Asteridae</i>
Группа	<i>Monochlamydae</i>
Порядок	<i>Asterales</i>
Семейство	<i>Asteraceae (Compositae formerly)</i>
Подсемейство	<i>Asteroideae</i>
Триба	<i>Eupatorieae</i>
Род	<i>Stevia</i>
Вид	<i>rebaudiana</i>

1.2. Гликозиды стевии

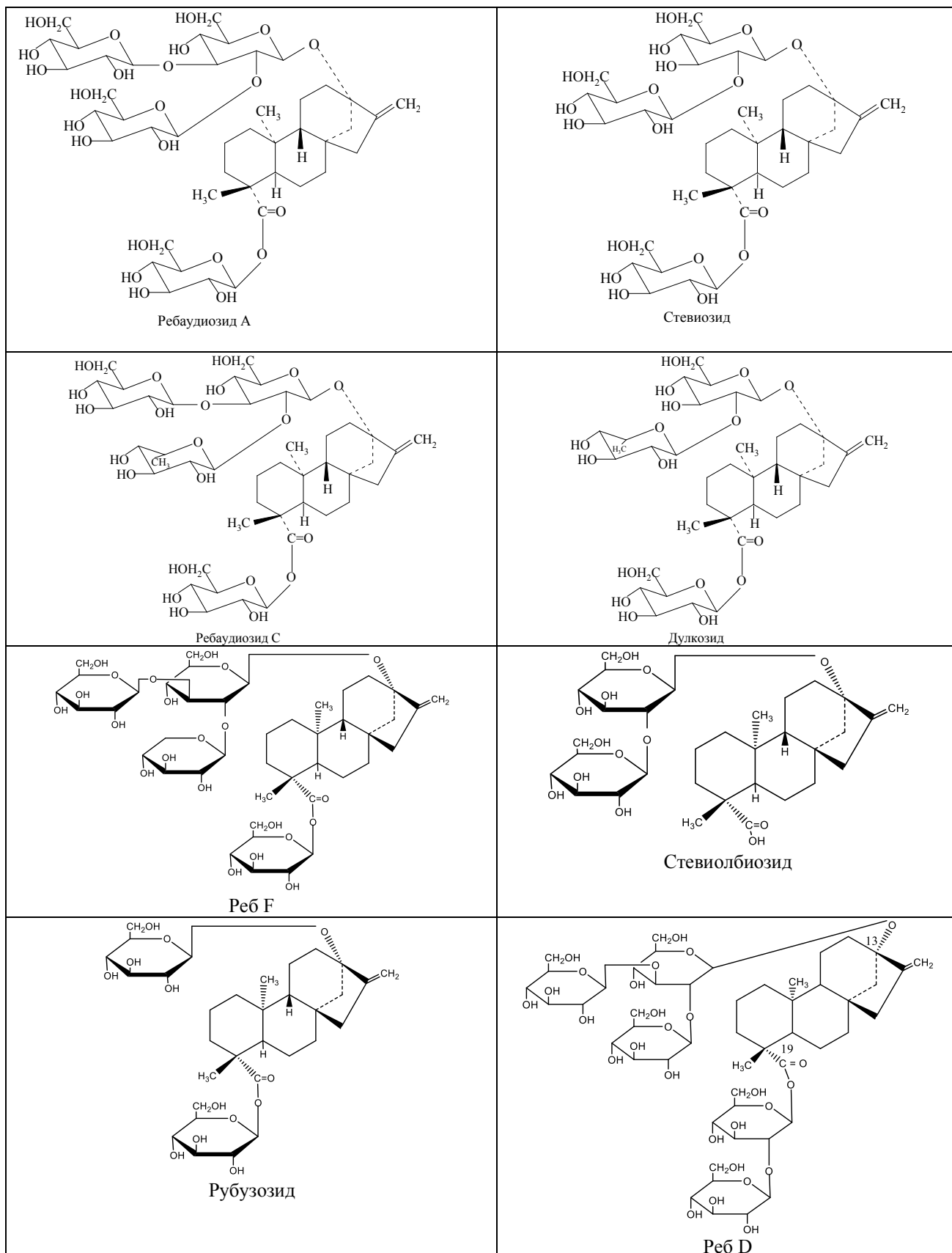
1.2.1. Структура и свойства

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 в листе является стевииозид (5-10% в/в), РебА (2-4% в/в), РебС (1-2% в/в) и дулкозид А (0,4-0,7% в/в) (рисунок 1 и 2) (Kinghorn, Soejarto, 1985). Все они обладают повышенной сладостью и в среднем 30-450 раза слаще чем сахар (Crammer, Ikan, 1987; Hafizuddin, 2003), но обладают остаточными горечью и послевкусием, которые лимитируют сферы их применения и делают затруднительным создание рецептур пищевых продуктов и напитков (Bakal, Nabors, 1986; Jaitak, 2010).



Название	R ₁ (C-19)	R ₂ (C-13)
1. Стевиол	H	H
2. Стевиолмонозид	H	β-Glc
3. Рубузозид	β-Glc	β-Glc
4. Стевиолбиозид	H	β-Glc-β-Glc(2→1)
5. Стевиозид	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2→1)
6. Ребаудиозид А	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
7. Ребаудиозид В	H	β-Glc-β-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
8. Ребаудиозид С	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2→1) β-Glc(3→1)
9. Ребаудиозид D	β-Glc-β-Glc(2→1)	β-Glc-β-Glc(2→1) β-Glc(3→1)
10. Ребаудиозид Е	β-Glc-β-Glc(2→1)	β-Glc-β-Glc(2→1)
11. Ребаудиозид F	β-Glc	β-Glc-β-Xyl(2→1) β-Glc(3→1)
12. Дулкозид А	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2→1)

Рисунок 1 - Основные гликозиды стевии (Kinghorn, Soejarto, 1985)



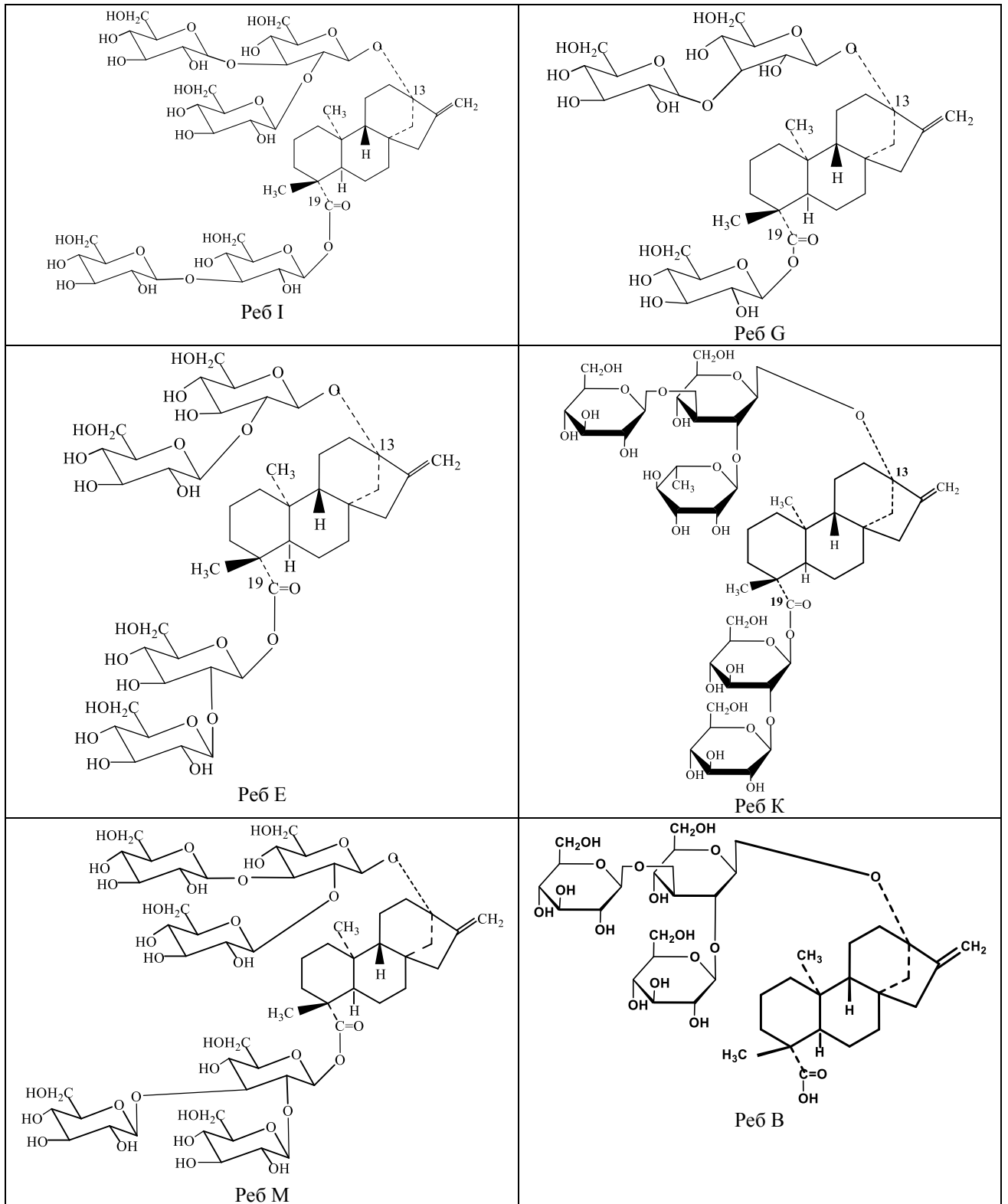
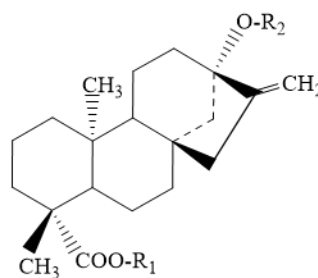


Рисунок 2 - Химическая структура гликозидов стевии (Kinghorn, Soejarto, 1985)

Некоторые гликозиды, присутствующие в следовых количествах, были выделены препаративным ВЭЖХ и идентифицированы как РебG, I, H, L, K, J, M, N и O (рисунок 2 и 3) (Patent WO2010/038911, 2010; Chaturvedula, Prakash, 2011a).



Название	R ₁ (C-19)	R ₂ (C-13)
1. Дулкозид В	H	β -Glc- α -Rha(2→1) β -Glc(3→1)
2. Ребаудиозид G	β -Glc	β -Glc- β -Glc(3→1)
3. Ребаудиозид I	β -Glc- β -Glc(3→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
4. Ребаудиозид H	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1)- β -Glc(3→1) β -Glc(3→1)
5. Ребаудиозид L	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1) } β -Glc(6→1)
6. Ребаудиозид K	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc- α -Rha(2→1) β -Glc(3→1)
7. Ребаудиозид J	β -Glc- α -Rha(2→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
8. Ребаудиозид M	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
9. Ребаудиозид N	β -Glc- α -Rha(2→1) β -Glc(3→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
10. Ребаудиозид O	β -Glc- α -Rha(2→1)- β -Glc(3→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)

Рисунок 3 - Минорные гликозиды стевии (Kinghorn, Soejarto, 1985)

Некоторые сравнительные характеристики гликозидов стевии суммированы в таблице 2.

Таблица 2 - Характеристика гликозидов стевии

Название	Формула	Т _{Плавл.} °С	Мол. вес	Оптическое вращение [α] _D ²⁵ (H ₂ O, 1%)	Растворимость в воде, %	Относительная сладость	Качество вкуса
Стевиол	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	212- 213	318,45	-	0,02	-	Горький
Стевиолмонозид	C ₂₆ H ₄₀ O ₈	-	480,58	-	-	-	Горький
Стевиозид	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	196- 198	804,88	-39,3	0,13	210	Горький
РебА	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	242- 244	967,01	-20,8	0,80	200	Менее горький
РебВ	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	193- 195	804,88	-45,4	0,03	150	Горький
РебС	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	215- 217	951,01	-29,9	0,21	30	Горький
РебD	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	248- 249	1129,15	-29,5 (EtOH)	0,03	220	По сладости максимально приближен к сладости глюкозы
РебЕ	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	205- 207	967,01	-34,2	1,70	170	Очень похож на сахар
РебF	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	-	936,99	-25,5 (MeOH)	-	200	Менее горький
РебМ	C ₅₆ H ₉₀ O ₃₃	-	1291,29	-	0,1	250	Очень похож на сахар
Дулкозид А	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	193- 195	788,87	-50,2	0,58	30	Горький
Стевиолбиозид	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	188- 192	642,73	-34,5	0,03	90	Горький, неприятный на вкус
Рубузозид	-	-	642,73	642,73	-	110	Горький

1.2.2. Основные характеристики гликозидов стевии

Стевиозид и Ребаудиозид А (РебА)

Среди отдельных стевиолгликозидов высокой очистки в настоящее время только стевиозид и РебА доступны в очень больших масштабах. Доступные объемы РебВ, РебС, РебD и РебМ остаются ограниченными, и в основном коммерциализированы в смеси с РебА или с другими гликозидами.

В чистой форме стевиозид (сложного β -D-глюкопиранозилового эфира 13-[2-O- β -D-глюкопиранозил- β -D-глюкопиранозил)окси] каур-16-en-18-овой кислоты) белое кристаллическое вещество с точкой плавления 198°C, оптическим вращением -39,3° в воде, элементным составом C₃₈H₆₀O₁₈, и молекулярным весом 804,88 (Kinghorn, 2002).

РебА (сложного β -D-глюкопиранозилового эфира 13-[(2-O- β -D-глюкопиранозил-3-O- β -D-глюкопиранозил- β -D-глюкопиранозил)окси] каур-16-en-18-овой кислоты) с точкой плавления 242-244°C; [α]_D²⁴ = -20,8° (с 0,84, MeOH); C₄₄H₇₀O₂₃; молекулярной массой 966, второй наиболее изобильный сладкий дитерпеновый гликозид, содержащийся в листьях стевии.

РебА и стевиозид встречаются по крайней мере в трех различных полиморфных формах: (а) гидрат; (б) безводный гидрат и (в) сольват. Тип полиморфной модификации зависит от таких факторов, как состав водно-органического раствора, температуры кристаллизации и температуры сушки (Patent US Appl. 0116821, 2007; Prakash et al., 2008).

Кроме того, РебА и стевиозид могут быть представлены и в аморфной форме. Это может быть получено во время первоначальной очистки гликозидов или от индивидуального полиморфа или их комбинации перемалыванием в мельнице шарового типа, осаждением, лиофилизацией, криогенной сушкой или распылительной сушкой.

Кристаллический РебА значительно более растворим в воде, чем стевиозид (Kohda et al., 1976a; Kinghorn, Soejarto, 1991). Чистые безводные, аморфные и сольватные формы РебА, полученные кристаллизацией из метанола или этанола, могут образовать пересыщенные растворы в воде (>20 г/100 г, при 20°C через 5 мин), но имеют низкую растворимость в этаноле.

Ребаудиозид D (РебD)

Высокоочищенный РебD представляет собой белый порошок с молекулярной массой 1129,15 и молекулярной формулой $C_{50}H_{80}O_{28}$, и в 180-200 раз слаще 10%-ного раствора сахара. РебD может быть представлен как в гидратной, так и безводной формах.

Стабильная растворимость в воде РебD около 450 мг в 1 дм³. С этой растворимостью можно получить напиток, содержащий всего 74 мг/дм³ (ppm) РебD. Для многих напитков данная концентрация не обеспечивает требуемого уровня сладости. Растворимость РебD в воде при 20°C составляет около 0,03%, которая постепенно увеличивается при 60-70°C. Однако, значительный скачок происходит около 80°C, при которой растворимость достигает 0,6%, т.е. примерно в 20 раз выше, чем при комнатной температуре. Однако, эти растворы являются не стабильным, и РебD снова кристаллизуется в течение часа (Patent US Appl. 2011/0104353, 2011).

Ребаудиозид M (РебM)

Высокоочищенный РебM представляет собой белый порошок без запаха, с молекулярной массой 1291,29 и молекулярной формулой $C_{56}H_{90}O_{33}$, и в 250 раз слаще 10%-ного раствора сахара.

Аналогично с РебА, РебС, РебD и РебЕ, различные полиморфные формы обнаружены также для РебM (Patent US Appl. 2014/0171519, 2014).

Кристаллический РебМ растворим в воде (0,1 г/100 см³ при 25°C в течение 5 мин) и в этаноле. 0,06% раствор в буферном растворе лимонной кислоты прозрачен и бесцветен и может быть приготовлен при 52°C в течении 15-20 мин. Аморфный РебМ имеет растворимость 1,1-1,3% в воде при 25°C, однако, быстро выпадает в осадок при хранении. Термодинамическое равновесие растворимости в воде 0,26% при 25°C.

Растворимость аморфной формы значительно выше кристаллической. Ее можно увеличить комплексообразованием с γ -циклодекстрином (γ -ЦД). РебМ (1,0-4,0 г) и γ -ЦД (4,0 г) суспензируют в воде (100 см³) и нагревают до 100-120°C до их растворения, раствор охлаждают до комнатной температуры и сушат. Растворимость комплекса около 250 мг/ см³.

Лиофилизированные смеси РебМ с мальтодекстрином и эритритолом (1:1, вес/вес) также показывают более высокую растворимость (более чем 100 мг/ см³) по сравнению с чистым РебМ (Patent US Appl. 2014/0171519, 2014).

Растворимость РебМ улучшается путем распылительной сушки. Этот метод особенно эффективен, если смесь, предназначенная для распылительной сушки, содержит комбинацию эмульгатора, поверхностно-активного вещества и полимерного компонента, как ксантановая камедь, каррагенан, циклодекстрин, мальтодекстрин, додецилсульфат натрия, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, полиэтиленгликоль, модифицированный крахмал и т.д. (Patent WO 2015/006764, 2015).

1.2.3. Стабильность гликозидов стевии

Стевиозид является очень стабильной молекулой при 100°C в растворах pH 3,0-9,0, однако при pH выше 10,0 происходит его быстрая деградация (Bakal, Nabors, 1986). РебА стабилен в напитках при 37°C и низких pH в течение трех месяцев (Chang, Cook, 1983). Порошкообразный стевиозид и РебА не подвергаются изменению при 120°C в течение 1 часа, однако начиная с 140°C начинает медленно деградировать и полностью разрушаются при 200°C (Kroyer, 1999).

Стевиозид и РебА при 30°C в течение 30 суток не претерпевают изменения в соусах и гидролизатах белков, однако, частично разлагаются в уксусе при 80°C (Shirakawa, Onishi, 1979). При комнатных температурах они достаточно стабильны в газированных напитках, подкисленных фосфорной или лимонной кислотами, а также в разбавленных растворах уксусной, лимонной, винной и фосфорной кислот, в кофейных и чайных напитках (Chang, Cook, 1983).

Кроме того, при температурах до 80°C в течение 4-х часов стевиозид и РебА не вступают в реакцию с другими подсластителями типа сахарин, цикламат, аспартам, ацесульфам К и неогеспирин дигидрохалкон, что важно при приготовлении синергических смесей.

Таким образом, стевиозид и РебА показывают хорошую стабильность в обычных условиях их применения. Однако, при высоких температурах и крайних значениях pH протекает их частичный химический гидролиз (Kroyer, 1999).

Гликозилированный стевиозид имеет достаточную стабильность при 50°C и pH 2,0-6,5 в течение 72 ч, однако, до 55% деградация наблюдалась при pH 3,0 и 80°C.

Анализ гидратной формы РебD был проведен при различных температурах от 40°C до 300°C при согревании 10°C/мин. Результаты показывают небольшое изменение тепловой энергии (эндотермический тепловой эффект) около 81-104°C и до достижения точки плавления выше примерно 260°C, т.е. происходит потеря воды (или гидратов) в этом диапазоне температур. Помимо этого, небольшого изменения энергии, РебD оставался стабильным до 260°C (Patent US Appl. 2011/0104353, 2011).

В виде сухого порошка, РебM стабилен в течение не менее одного года при температуре окружающей среды и в условиях контролируемой влажности. Поведение РебM очень похоже на РебА (Prakash et al., 2014c).

В растворе РебM наиболее стабилен при pH 4,0-8,0 и заметно менее стабилен при pH < 2,0. Аналогично РебА, стабильность РебM уменьшается с увеличением температуры.

В водных растворах (pH 2,0-8,0) основные пути обмена реакции, ведущие к потере РебM являются: (а) изомеризация С-16 олефина с образованием С-15 изомера, (б) гидратация С-16 олефина, (в) гидролиз глицидилового эфира в С-19, (г) изомеризация С-16 олефина с образованием С-15 изомера. Все эти соединения являются сладкими на вкус и имеют похожие с РебM вкусовые характеристики. В экспериментах *in vitro*, РебM и РебА превращаются в агликон стевиол и глюкуроновую кислоту стевиола, известную как стевиол глюкуронид (Prakash et al., 2014b, c).

Щелочной гидролиз РебM приводит к образованию РебВ. РебM показывает хорошую устойчивость к высокотемпературной обработке в течение короткого времени и при последующем хранении продуктов, таких как ароматизированный холодный чай, соки, напитки для спортсменов, ароматизированное молоко, питьевой йогурт и не подкисленные чаи (Prakash et al., 2014c).

Все гликозиды достаточно стабильны к микроорганизмам и фотостабильны.

Суммируя, можно заключить, что:

1. Стевиозид, РебА, РебD и РебM стабильны при хранении в полиэтиленовых мешках и стеклянных бутылках.
2. Гликозиды стевии устойчивы к термической обработке при широком диапазоне pH, однако стабильность в нейтральных растворах выше.
3. Стевиозид, РебА, РебD и РебM стабильны в растворах различных органических кислот.
4. Они стабильны в условиях газированных напитков типа кола, в сухих пищевых смесях и жевательных резинках, кисломолочных продуктах и других в течение длительного периода хранения и пастеризации. Стевиолгликозиды фотостабильны.

1.2.4. Биологические свойства гликозидов стевии

Стевиозид и другие гликозиды стевии кроме интенсивной сладости обладают также достаточно уникальными биологическими свойствами (Chan et al., 1998; 2000; Jeppesen et al., 2002; Takahashi et al., 2001; Yasukawa et al., 2002). При его регулярном употреблении снижается содержание радионуклидов и холестерина в организме, снижается содержание сахара в крови, улучшается регенерация клеток и коагуляция крови, тормозится рост новообразований, укрепляются кровеносные сосуды. Он проявляет также желчегонное, противовоспалительное и диуретическое свойства, препятствует образованию язв в желудочно-кишечном тракте (Зубцов и др., 2002).

Стевиозид может использоваться при лечении диабета, а также для восстановления нормальных функций поджелудочной железы (Soejarto et al., 1983). При этом, в экспериментах на мышах выявлено, что как стевиозид, так и стевиол в дозах от 1 нмоль/ дм³ до 1 ммоль/ дм³ в присутствии 16,7 ммоль/ дм³ глюкозы улучшают секрецию инсулина. Их инсулинотропное действие находится в строгой зависимости от концентрации глюкозы, так как стевиозид (1 ммоль/ дм³) и стевиол (1 мкмоль/ дм³) усиливают секрецию инсулина только при концентрации глюкозы выше 8,3 ммоль/ дм³, а также сохраняется при отсутствии внеклеточного Ca²⁺. Выявлено также, что стевиозид и стевиол усиливают секрецию инсулина из бета-клеток INS-1 линии. При этом они влияют на аденозин трифосфат-чувствительную K⁺-канальную активность, однако не имеют никакого действия на циклический аденозин монофосфат, т.е. стевиозид и стевиол усиливают секрецию инсулина через прямое действие на бета-клетки поджелудочной железы (Jeppesen et al., 2000b; Koyama et al., 2003).

В опытах на больных диабетом крысах типа Goto-kakizaki установлено, что внутривенно введенный стевиозид (0,2 г/кг) значительно угнетает отклик глюкозы и, наоборот, повышает таковой для инсулина. Одновременно угнетается также уровень глюкагона. В течение

эксперимента уровень инсулина поднялся до базовой единицы у нормальных крыс, т.е. стевиозид имеет не только антигипергликемическую активность, но также обладает инсулинотропным действием и глюкагон-снижающим эффектом (Jeppesen et al., 2000a).

Поэтому, стевиозид имеет все возможности стать новым антидиабетическим средством при лечении диабета второго типа.

Стевиозид не является субстратом для *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei*, ассоциирующие с зубным кариесом (Kinghorn, Soejarto, 1985).

Экстракт стевики снижает сердцебиение и артериальное среднее кровяное давление (Boeckh, Humboldt, 1981; Jeppesen et al., 2003; Melis, 1992a). В экспериментах на крысах установлено, что как верхнее, так и нижнее артериальное давление находятся в прямой зависимости от внутривенно введенной дозы стевиозида (50-200 мг/кг). Максимальное снижение для систолического и диастолического кровяного давления составляло $31,4 \pm 4,2\%$ и $40,8 \pm 5,6\%$, соответственно. При этом эффект сохраняется по крайней мере в течение одного часа при дозе стевиозида 200 мг/кг. Уровень сывороточного допамина, норадреналина и эпинефрина (адреналина) изменяется незначительно после 60 мин внутривенного введения 100 мг/кг стевиозида. Таким образом, стевиозид может быть эффективным средством для снижения артериального кровяного давления, без какого-либо влияния на сывороточные катехоламины (Melis, 1995; Chan et al., 1998).

Аналогичные результаты получены с людьми при оральном введении стевиозида. Исследования проводились на 106 пациентах, больных гипертонией возраста от 28 до 75 лет в течение 1 года с использованием одной капсулы стевиозида весом в 250 мг ежедневно. Через три месяца как систолическое, так и диастолическое артериальное давление существенно снизилось и сохранилось в течение года (верхнее снизилось от $166,0 \pm 9,4$ до $152,6 \pm 6,8$ ммHg, а нижнее – от $104,7 \pm 5,2$ до $90,3 \pm 3,6$ ммHg). При этом, биохимические параметры, включая липиды и глюкозу, изменились очень незначительно, т.е. стевиозид может быть альтернативным или дополнительным терапевтическим средством для гипертоников (Chan et al., 2000).

Стевиозид, РебА и РебС, а также дулкозид А обладают сильным ингибирующим эффектом против 12-О-тетра-деканолифорбол-13-ацетата (ТФА), вызывающий воспаление у мышей. Доза, оказывающая 50%-ное снижение ТФА, составляла $54,1-291,6$ мкг/кг. Кроме того, стевиозид и смесь РебА и РебС, а также дулкозид А в дозах 1,0 и 0,1 мг/см³, существенно ингибируют влияние ТФА при опухоли кожи, которая инициируется 7,12-диметилбензил [α] антраценом, т.е. обладают противораковым действием (Yasukawa et al., 2002). Это может стать важным фактором для предупреждения и выявления злокачественной опухоли.

Интересно отметить, что в водном экстракте *Stevia rebaudiana* присутствует гетерополисахарид анионного характера, который в *in vitro* экспериментах существенно ингибирует антиротавирусную активность четырех серотипов путем блокирования связывания вирусов. Полисахарид имеет молекулярную массу 9800, состоит из уроновой кислоты и содержит также серин и аланин (Takahashi et al., 2001).

Ни чистый стевиозид, ни экстракт *Stevia rebaudiana* не проявляют активности в опытах острой токсичности на крысах (Pezzuto et al., 1985; Pezzuto, 1986; Aze et al., 1991). Кроме того, они не обладали мутагенной активностью против различных штаммов *Salmonella typhimurium*, *E. coli* и *Bacillus subtilis* (Pezzuto et al., 1985). Никаких отклонений не выявлено после вскармливания хомяков стевиозидом в количестве 2,5 г/кг (Yodyingyuad, Bunyawong, 1991; Akashi, 1975; Akashi et al., 1975; Toskulkae et al., 1994).

Изучению токсичности стевиозида в короткий и длительный периоды воздействия на млекопитающих посвящено достаточно много работ (Matsui et al., 1996a, b; Mori et al., 1981; Toskulkae et al., 1997; Toyoda et al., 1995; Toyoda, 1997; Xili et al., 1992), которые подтверждают, что он не обладает вредным воздействием на половые функции, канцерогенностью и генотоксичностью. Фармакокинетические *in vivo* исследования стевиозида на крысах показали, что стевиозид сначала гидролизуеться до стевиола (агликон) и, затем абсорбируется в слепой кишке крыс (Nakayama et al., 1986; Cardoso et al., 1996; Suanarunsawat et al., 1997). Аналогично стевиозиду, РеБА в конечном счете деградируются до стевиола под действием кишечной микрофлоры крыс в анаэробных условиях (Wingard et al., 1980).

1.2.5. Выделение и очистка гликозидов стевии

Экстракция

Схема получения гликозидов стевии включает экстракцию растительной массы водой или водным раствором этанола или метанола, осаждение и отделение высокомолекулярных веществ, обессоливания и обесцвечивания, очистку на специфических крупнопористых носителях, концентрирование и сушку (рисунок 4).

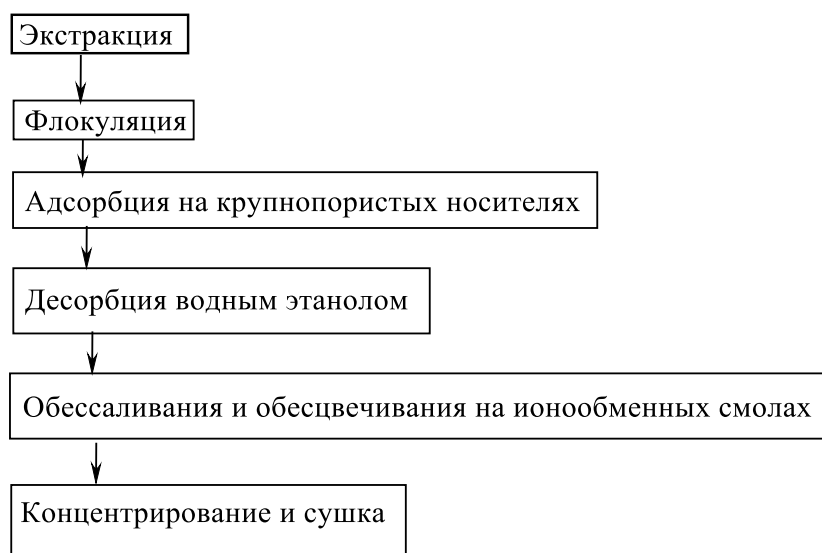


Рисунок 4 - Экстракция и очистка гликозидов стевии

Гликозиды экстрагируются из листьев водой или органическими растворителями. Также используется экстракция сверхкритическим давлением и перегонка водяным паром. Горячая вода оказалась наиболее предпочтительной средой для производственной экстракции. Однако, количество извлекаемых примесей ниже, если для экстракции использовать растворители (этанол, метанол/хлороформ или глицерин, сорбитол или пропиленгликоль).

В настоящее время, экстракция органическими растворителями используется только в лабораторных и пилотных условиях. Для этой цели чаще всего применяют водные растворы метанола и этанола (Patent US 4,361,697, 1982; Patent US 4,171,430, 1979; Patent Japan 77-105,260, 1977; Patent US 3,723,410, 1973; Патент РФ 2198548, 2003; Ситничук и др., 2002; Авт. свид. СССР 1794442, 1993).

Иногда перед экстракцией, листья предварительно обрабатывают хлороформом или диоксаном (Patent US 3,723,410, 1973; Patent US 4,361,697, 1982).

Метанол, этанол, пропиловый спирт, изопропиловый спирт и н-бутанол использованы для изоляции сладкого гликозида из водного экстракта. После удаления растворителя полученный сироп подвергают хроматографическому разделению на колонке с силикагелем с использованием смеси н-пропанола, воды и этилацетата в качестве подвижной фазы (Patent Japan 77-105,260, 1977; Patent US 4,171,430, 1979).

Однако, выход гликозидов, экстрагированных с помощью органических растворителей, как правило ниже, и процесс довольно сложен для применения его в промышленном масштабе. Поэтому, в настоящее время для промышленного получения гликозидов используется водная экстракция.

Водная экстракция является наиболее удобной, безопасной и экономичной для выделения и очистки гликозидов. Процесс может быть выполнен как в периодических, так и в непрерывных условиях.

Эффективность процесса экстракции в основном зависит от объема воды, температуры, pH, времени, а также от размера листа. При этом, оптимальный средний размер частиц листьев равен примерно 20-30 мм. При меньших размерах, скорость фильтрации существенно уменьшается из-за быстрого забивания фильтров частицами листа.

Кислое значение pH является более предпочтительным для приготовления экстракта с низким содержанием красящих веществ. Для подкисления воды используемой для экстракции, можно использовать любую минеральную или органическую кислоту, однако лимонная и фосфорная кислоты являются предпочтительными, так как в дальнейшем они могут быть удалены в виде осадка, полученного путем обработки оксидом кальция. Скорость экстракции отдельных гликозидов также различается при разных значениях pH и температуры. Однако, использование низких его значений (pH 2,0-3,0) позволяет получать менее окрашенные растворы.

В диапазоне значений pH 2,0-7,0, экстрагированное количество стевиозида остается практически таким же, в то время как в щелочной среде оно возрастает с повышением температуры. Интенсивность экстракции РебА, как правило, возрастает с увеличением температуры и практически не меняется при диапазоне pH 2,0-7,0, в то время как в щелочной среде снижается значительно. В условиях щелочной среды содержание минорных гликозидов, таких как РебВ, РебD, РебF, стевиолбиозид и дулкозид А, значительно выше. Конвертирование стевиозида в стевиолбиозид может произойти и в кислой среде. Интенсивность экстракции РебD, РебЕ и РебF увеличивается с повышением температуры.

Таким образом, применение кислых значений pH и умеренных температур является более предпочтительным в отношении содержания РебА и низких концентраций РебВ, РебD, РебF.

При больших объемах воды, количество экстрагированных негликозидных соединений выше, в то время как если взять очень низкие объемы воды, этого будет недостаточно для полного извлечения сладких гликозидов. В непрерывных условиях при 35-40°C, предпочтительным соотношением листа и воды является предел от 1:20-25, вес/объем (pH 4,5). Время экстракции составляет приблизительно 150-160 мин.

С практической точки зрения, в условиях производства применение большого количества воды сразу не желательно, потому что тогда размер экстракторов должны быть намного больше. Экстракцию предпочтительно проводить несколько раз с помощью 5,0-7,5 объемами воды для каждого шага. Продолжительность одной экстракции длится до 2 часов.

Эффективность экстракции при низких температурах может быть значительно улучшена с помощью сверхвысоких давлений. Процесс проводят в реакторе сверхвысокого давления с использованием от 10 до 20 объемов воды. После выдержки в течение 20 мин при комнатной температуре, процесс экстракции продолжают в течении 3-15 мин под давлением 150-600 МПа, повторяя два раза. Применение высокого давления позволило значительно уменьшить время экстракции и избежать деградации гликозидов (Patent Chinese Appl., 200910070870, 2010).

Метод экстракции с помощью суперкритического CO₂ является более быстрым и полным по сравнению с традиционными способами (Choi et al., 2002; Erkucuk et al., 2009; Pasquel et al., 2000; Pol et al., 2007; Yoda et al., 2003).

Двухступенчатый процесс производства экстракта стевии выполняется следующим образом: 1) предварительная обработка листьев стевии с помощью сверхкритической флюидной экстракции (SCFE) с CO₂ и 2) экстракция с помощью SCFE, с использованием смесей CO₂+вода, CO₂+этанол, и CO₂+вода+этанол. Условиями предварительной обработки было давление 200 бар и температура 30°C. Гликозиды были получены при давлении 120 и 200 бар и температурах 16, 30 и 45°C (Pasquel et al., 1999; 2000).

Однако, этот процесс достаточно дорогой по сравнению с традиционным методом экстракции, что затрудняет его использование в коммерческих процессах.

Экстракцию можно ускорить также при помощи комбинации различных методов, таких как ультразвук и микроволн. Применение микроволн и ультразвука предотвращает деградацию гликозидов при высокотемпературной обработке во время экстракции классическим способом. Увеличивается эффективность экстракции при повышенной температуре. Однако, при увеличении мощности ультразвукового поля видимого эффекта не наблюдается (Alupului et al., 2009; Jaitak et al., 2009; Liu et al., 2010; Patent Chinese Appl. 200910117118, 2009).

Эффективность экстракции можно существенно увеличить с применением таких ферментов, как целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы, способные разрушить клеточную стенку растений, делая более быстрым высвобождение внутриклеточных веществ. Такой процесс делает возможным "зеленый" вариант экстракции гликозидов стевии. При этом, выход продуктов выше по сравнению с традиционными методами. Так, применение пектиназы сокращает время экстракции практически вдвое, значительно увеличивает скорость экстракции и фильтрации, а также выход экстрагируемых стевиигликозидов (Patent US 7,838,044, 2010). Гемицеллюлаза даёт наиболее высокий выход гликозидов по сравнению с целлюлазой и пектиназой (Puri et al., 2011a, b, c).

Однако, ферментативная экстракция стевиигликозидов ограничена из-за цены фермента и его производства, а также часто низкой эффективности коммерческих ферментов при

гидролизе клеточной стенки растений. Кроме того, при более длительном процессе экстракции, многие из ферментов способны гидролизовать сами гликозиды, особенно, если фермент загрязнен другими гидролитическими ферментами, какими часто являются промышленные товарные ферменты.

Очистка экстракта

Для очистки гликозидов стевии используют экстракцию различными растворителями, флокуляцию и осаждение, ионный обмен, адсорбцию на полимерных или неорганических адсорбентах, колоночную хроматографию, ультрафильтрацию и нанофильтрацию и некоторые другие методы. На практике, очистку гликозидов осуществляют с использованием комбинации различных методов.

Первый этап для очистки экстракта стевии является осаждение высокомолекулярных соединений, а также некоторых пигментов и других примесей. Наиболее часто в качестве осаждающего вещества используют гидроксид и ортофосфат кальция, гидроксид бария или ацетат бария, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ и FeCl_3 (Phillips, 1987). Алюминием хлорида наиболее эффективно удаляются пигменты, но приводит к наиболее высокой потере гликозидов. В промышленных использованиях сочетание $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и FeCl_3 является наиболее эффективным (Fuh, Chiang, 1990; Patent US Appl. 20100112175, 2010).

После фильтрации, экстракт пропускают через колонки с крупнопористым полимерным носителем, который адсорбирует гликозиды, а примеси вымываются промывкой водой. Десорбцию гликозидов осуществляют с помощью водного раствора этанола или метанола. После удаления растворителей и обесцвечивания, экстракт концентрируют и сушат на распылительной сушке.

Очистку исходного экстракта можно осуществить также комбинированным использованием микрофильтрации, ультрафильтрации и нанофильтрации (Patent US 5,972,120, 1999).

При этом экстракцию осуществляют непрерывно в проточных колонках. Оптимальный средний размер листьев составляет около 20 мм. При более мелких частицах, скорость фильтрации существенно уменьшается и колонка засоряется. Воду добавляют в количестве 0,05 частей от веса сухих листьев. Температуру колонки устанавливают в пределах 4°C и экстракцию осуществляют водой с pH в пределах 2-4 (фосфорной кислотой). При низких температурах и pH протекает более селективная экстракция с получением практически бесцветного раствора. Экстракт фильтруют через трубчатые керамические мембраны (0,35 μm) и далее через ультрафильтрационные мембраны (2,5 кДа фильтрующей способностью) с диафильтрацией.

Добавление в экстракт полиакриламида или CaO существенно облегчает процесс фильтрации на керамических фильтрах. Полученный фильтрат очищается от низкомолекулярных примесей с использованием наномембран при температурах до 80°C. Экстракт высушивают на распылительной сушке (Zhang et al., 2000).

Процесс очистки может быть осуществлен непрерывно с помощью хроматографии на псевдоподвижном слое (SMBC). Листья экстрагируются 25 объемами воды под ультразвуком (50-90 кГц) в течение приблизительно 1 часа, затем смесь отфильтровывают. Фильтрат обрабатывают $\text{Ca}(\text{SO}_4)_2$ (0,6-1,2% от общего раствора) и CaO (0,6-1,2% от общего раствора), pH доводят до 7,0 с помощью HCl и хранят при температуре 50-60°C в течении 0,5-3,0 часов, образовавшийся осадок отделяют фильтрованием. Фильтрат концентрируют до 8-30% содержания гликозидов, затем применяется система SMBC, макропористые смолы AB-8, ADS-8, D-06, ADS-7 или ADS-17. Для адсорбции скорость потока 5-12 BV/h, где BV – объем колонки заполняемый смолой, h - час; промывка выполняется с помощью деионизированной воды с расходом 8-30 BV/h. Регенерация осуществляется 2-4%-ным раствором гидроксида натрия при низкой скорости 4-108 BV/h. Десорбция осуществляется 50-70%-ным раствором этанола (1-4 объемами от количества смолы). Раствор, содержащий 60-90% общих стевииолгликозидов, выпаривают до 20-45% и сушат распылением (Patent Chinese Appl. CN101717418, 2010). При помощи соответствующей адсорбционной смолы процесс может быть более эффективным по сравнению с обычными периодическими системами, особенно, если процесс проводить в системах на основе воды.

Очистка индивидуальных гликозидов

Есть несколько подходов выделения и очистки отдельных стевииолгликозидов, такие как хроматографическое обогащение, кристаллизация из органических растворителей, гелефильтрация, жидкостная хроматография и непрерывное хроматографическое разделение на водной основе.

В настоящее время большинство промышленных технологий для производства гликозидов стевии высокой чистоты основываются на их избирательных способностях осаждения или кристаллизации при использовании различных растворителей, в особенности этанола и метанола или их комбинации.

Например, этанол является основным органическим растворителем, применяемым для производства высокочистого РеБА. В зависимости от качества исходного экстракта, а также содержания РеБА и минорных гликозидов, могут быть использованы различные схемы для промышленного производства. Однако, все они предполагают осаждение-обогащение РеБА на

первой стадии, с дальнейшей перекристаллизацией из водного этанола (Patent US Appl. 2007/0292582, 2007).

Очистку стевиозида осуществляют обработкой стевиозид-содержащего материала безводным метанолом или водным этанолом (Abelyan, Abelyan, 2012; Patent Japan 55-092400, 1980; Patent US 4,599,403, 1986; Patent US 4,171,430, 1979; Patent US 3,723,410, 1973; Patent US Appl. 2008/0292764, 2008; Patent Japan 55-162953, 1980; Патент РФ 2111969, 1998).

Для очистки РебС используют метанол, этанол и их смесь, а также изопропанол (Patent WO2011/037959, 2011) и ацетон (Patent WO2012/094752, 2012). Высокоочищенный РебС получен также перекристаллизацией из 50% метанола и 55-60% этилацетата (Patent Chinese Appl. CN103804440, 2014).

Рубузозид может быть использован в качестве подсластителя, а также усилителя сладости и вкуса. Высокоочищенный рубузозид получают либо из экстракта стевии или листьев *Rubus suavissimus* (китайская ежевика), или же ферментативным гидролизом стевиозида.

Для очистки рубузозида из листьев *Rubus suavissimus*, их высушивают, экстрагируют, обессоливают, частично очищают на макропористых хроматографических носителях и высушивают. Экстракт, содержащий 40-70% рубузозида растворяют в трех объемах 98% метанола, выдерживают при 60-65°C в течение 10-30 мин и медленно охлаждают до 10°C и кристаллизацию осуществляют в течение 24 часов. Кристаллы отделяют, перекристаллизуют из 4-х объемов 85% водного раствора метанола, промывают 92%-ным метанолом при 30°C, отделяют и сушат. Чистота рубузозида составляет более 98% (Darise et al., 1984; Patent US Appl. US2013/0040033, 2013; Patent US Appl. 2011/0160311, 2011).

Рубузозид получен также ферментативным гидролизом стевиозида. Стевиозид (чистотой около 98%) растворяли в 5-ти объемах воды при 80°C, охлаждали и обрабатывали гесперидиназой (*Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich) или пектиназой (Viscozyme L, Novozymes) при 50°C и 37°C, соответственно в течение 24 часов. Реакционную смесь обрабатывали активированным углем, фильтровали, концентрировали и сушили. Содержание рубузозида достигает до 60-78% в случае с гесперидиназой, при пектиназе степень трансформации стевиозида достигает до 99% (рисунок 5а). Дальнейшая очистка рубузозида осуществлена как в случае с экстрактом (рисунок 5б) (Patent US Appl. US2015/0118379, 2015).

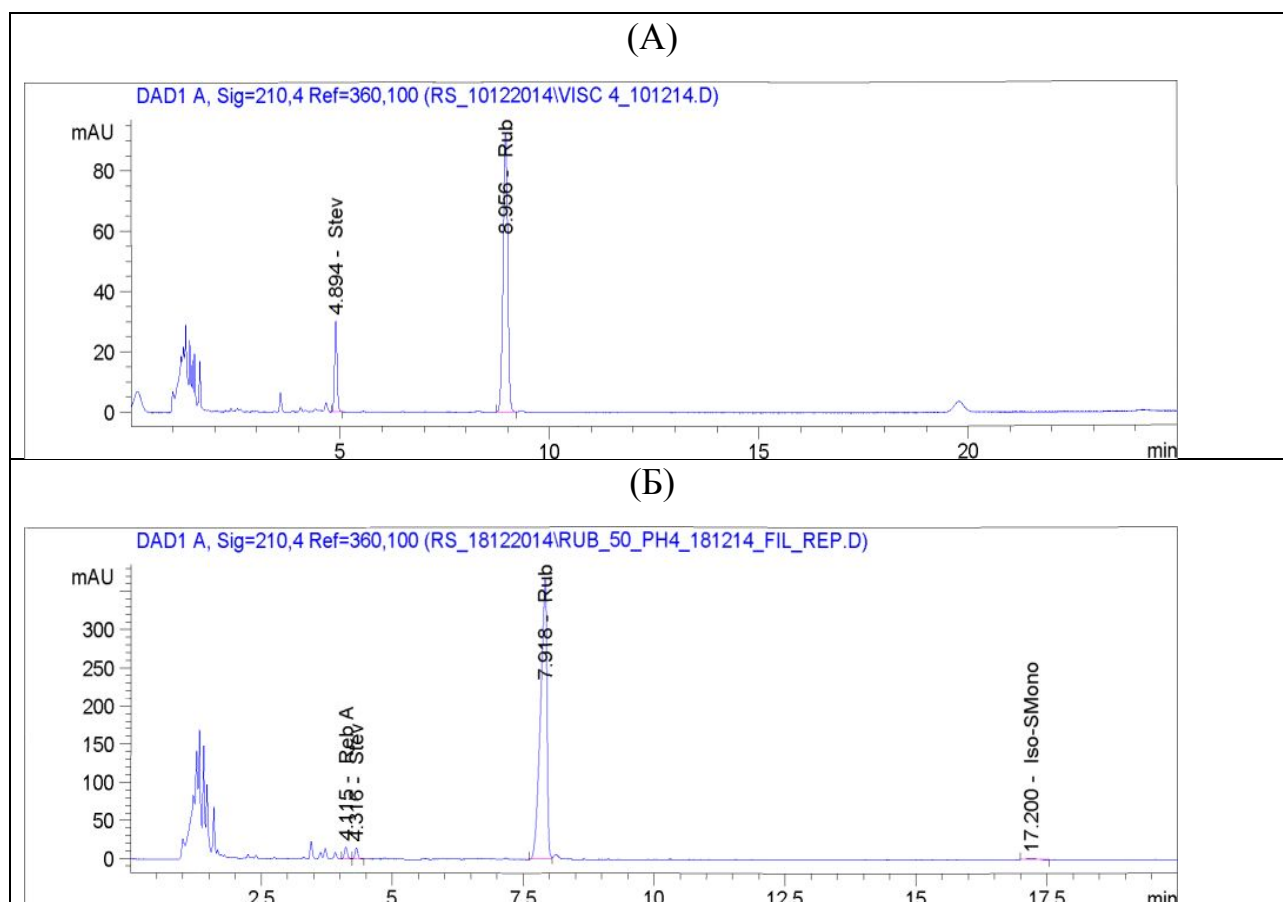


Рисунок 5 - ВЭЖХ-грамма рубузозида до и после очистки

В листьях стевии РебВ содержится в незначительных количествах (Kennelly, 2002b), поэтому его получают путем щелочной изомеризации РебА с помощью 1М раствора КОН (можно использовать также другие щелочи и их спиртовые растворы) при 80°C в течение 7-24 часов. Реакционную смесь нейтрализуют до pH 4,0-5,0, и выпавший осадок РебВ промывают водой. Чистота продукта более 99% (Kohda et al., 1976b; Chaturvedula, Prakash, 2011d; Abelyan, Abelyan, 2012).

Путем добавления РебВ или увеличения его концентрации в экстракте стевии или композициях, содержащих сладкие гликозиды, можно уменьшить неприятные вкусовые характеристики, такие как горечь, солодковое послевкусие, либо получить сладость наиболее схожую с природными калорийными подсластителями (Patent US Appl. US2012/0269954, 2012; Patent WO/2011/090709, 2011; Patent US Appl. 0116835, 2007).

Очистка минорных гликозидов РебD и РебM также была осуществлена в лаборатории методами обогащения экстракта во время его очистки на крупнопористых носителях и селективного осаждения/кристаллизации с помощью различных органических растворителей. Экстракт пропускали через серию колонок с носителем и, так как сродство РебD и РебM к носителю меньше, чем у стевозида и РебА, то они концентрируются в последних колонках. Их

отдельно элюировали водным раствором этанола, обессоливали, обесцвечивали и высушивали. Очистку индивидуальных гликозидов осуществляли этиловым и метиловым спиртами, а также водой. Детальная очистка РебD приведена в экспериментальной части диссертации.

Получение и очистка стевииолибиозида осуществлены аналогично процессу РебB, используя стевииозид в качестве исходного материала. Раствор стевииозида в 10% KOH (1:45 вес/объем) кипятили в течении 2-х часов, реакционную смесь подкисляли до pH 3,0 10%-ной H₂SO₄, фильтровали и охлаждали, чтобы осадить стевииолибиозид в виде кристаллов. Стевииолибиозид перекристаллизовали из метанола, промывали холодной водой и сушили (Chaturvedula, Prakash, 2011c; Patent US 4,381,402, 1983; Patent US 4,454,290, 1984; Wood et al., 1955).

1.3. Ферментативная модификация гликозидов стевии

Как уже было отмечено, гликозиды стевии обладают остаточной горечью и послевкусием, которые влияют на его качественные характеристики. Их можно снять реакцией межмолекулярного трансгликозилирования под действием различных ферментов, в течение которой происходит присоединение новых углеводов в положениях C-13 и C-19. Количество углеводных единиц в указанных позициях определяет качество и степень сладости компонента.

В качестве трансгликозилирующего фермента используют пуллулазу, изомальтазу (Lobov et al., 1991), β-галактозидазу (Kitahata et al., 1989a) и декстран сахаразу (Yamamoto et al., 1994), а в качестве доноров - пуллулан, мальтозу, лактозу и частично гидролизованный крахмал, соответственно.

Обработка пуллулазой приводит к получению 13-O-[β-мальтотриозил-(1,2)-β-D-глюкозил]-19-O-β-D-глюкозил-стевииола; 13-O-[β-мальтозил-(1,2)-β-D-глюкозил]-19-O-β-D-глюкозил-стевииола и 13-O-[β-сефорозил-19-O-β-мальтотриозил-стевииола. В случае с мальтазой также получены три трансгликозилированных продукта: 13-O-[β-сефорозил-19-O-β-изомальтозил-стевииол; 13-O-[β-изомальтозил-(1,2)-β-D-глюкозил]-19-O-β-D-глюкозил-стевииол и 13-O-[β-нигерозил-(1,2)-β-D-глюкозил]-19-O-β-D-глюкозил-стевииол. Некоторые из них обладают прекрасными вкусовыми качествами.

Три гликозилированные производные получены при обработке стевииозида β-амилазой в присутствии мальтозы в качестве донора, а именно: (а) β-O-α-гликозилированное производное при C-19; (б) β-O-α-гликозилированное производное при C-13 и (в) 3-O-α-гликозилированное производное при C-13. Сладость производных (а) и (б) ниже, чем у стевииозида, однако для производного (а) наблюдалось существенное улучшение вкусовых качеств. Это является первым примером улучшения вкуса добавлением глюкозы в позиции C-19-O-глюкозильного остатка. В

принципе, в пищевой промышленности вкусовые качества более важны, чем характер подсластителя и его количество. Компонент (в) обладает горьким привкусом, если даже дополнительно гликозилировать в позиции С-13 софорозильного остатка (Lobov et al., 1991; DuBois, 1985). Таким образом, тип боковых глюкозных единиц имеет существенное влияние на характер сладкого вкуса гликозидов.

Обработка декстран сахаразой *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894 смеси стевииозида и гидролизата крахмала изоамилазой приводит к образованию моно- и диглюкозил-производных стевииозида в качестве основных трансгликозилированных продуктов. Моногликозил-производные представляют собой 13-О-[(6- α -гликозил(2- β -гликозил)- β -гликозил]-19-О- β -гликозил-стевииол и 13-О-(6- α -гликозил-2- β -гликозил- β -гликозил-19-О- β -гликозил-стевииол (SG1 и SG2), а ди-производное - 13-О-(6- α -гликозил(6- α -гликозил-2- β -гликозил)-19-О- β -гликозил-стевииол (2m) (рисунок 6) (Yamamoto et al., 1994). Сравнительная сладость всех полученных соединений была существенно ниже таковой для исходного стевииозида.

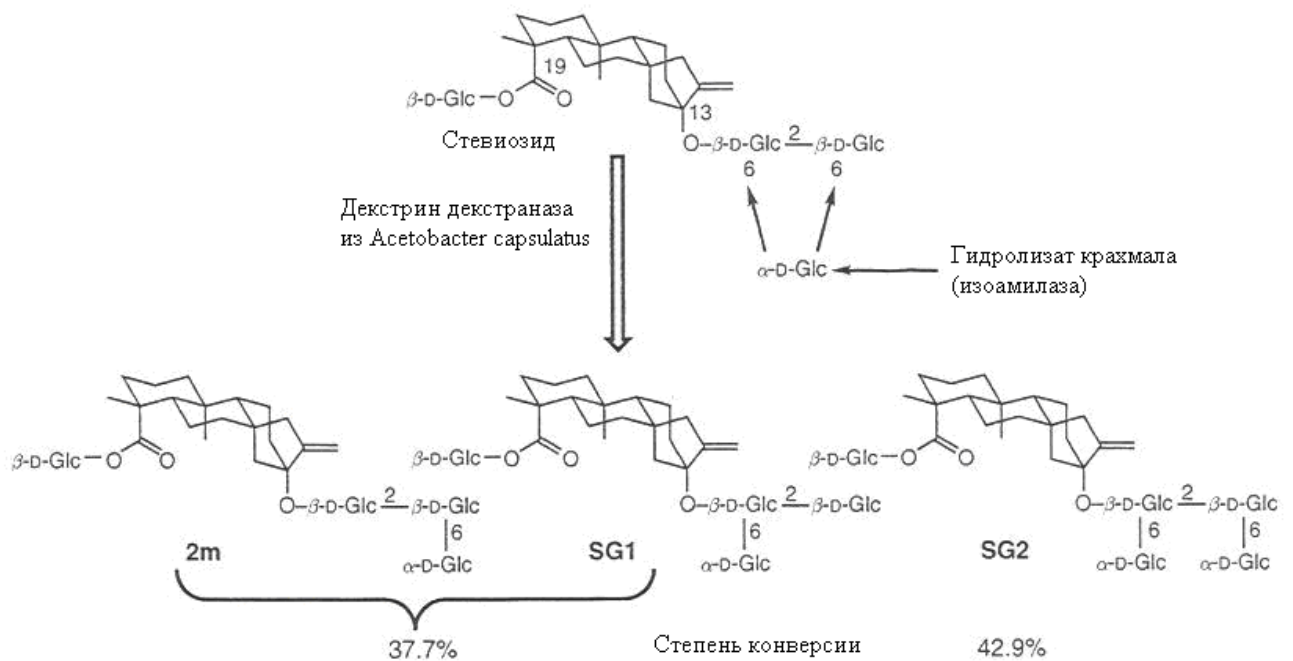


Рисунок 6 - Транс- α -гликозилирование стевииозида с помощью декстран сахаразы (Ohtani, Yamasaki, 2002)

Обработка стевииозида с помощью трансгликозилирующего фермента *Streptomyces sp.* W19-1 в присутствии курдлана (линейный β -1,3-глюкан) приводит к образованию трех транс β -1,3-гликозилированных продуктов: (а) S β G1a: 13-О- β -софорозил-19-О- β -ламинарибиозил-стевииол;

(б) SβG1b: β-O-[β-глюкозил-(1,3)- β-глюкозил-(1,2)- β-глюкозил]-19-O-β-глюкозил-стевиол и (в) SβG2: 13-O-β-софорозил-19-O-β-ламинаритриозил-стевиол. Улучшение вкусовых качеств отмечается для SβG1a и SβG2, а также смеси продуктов, хотя интенсивность их сладости была ниже, чем у стевиозида (рисунок 7).

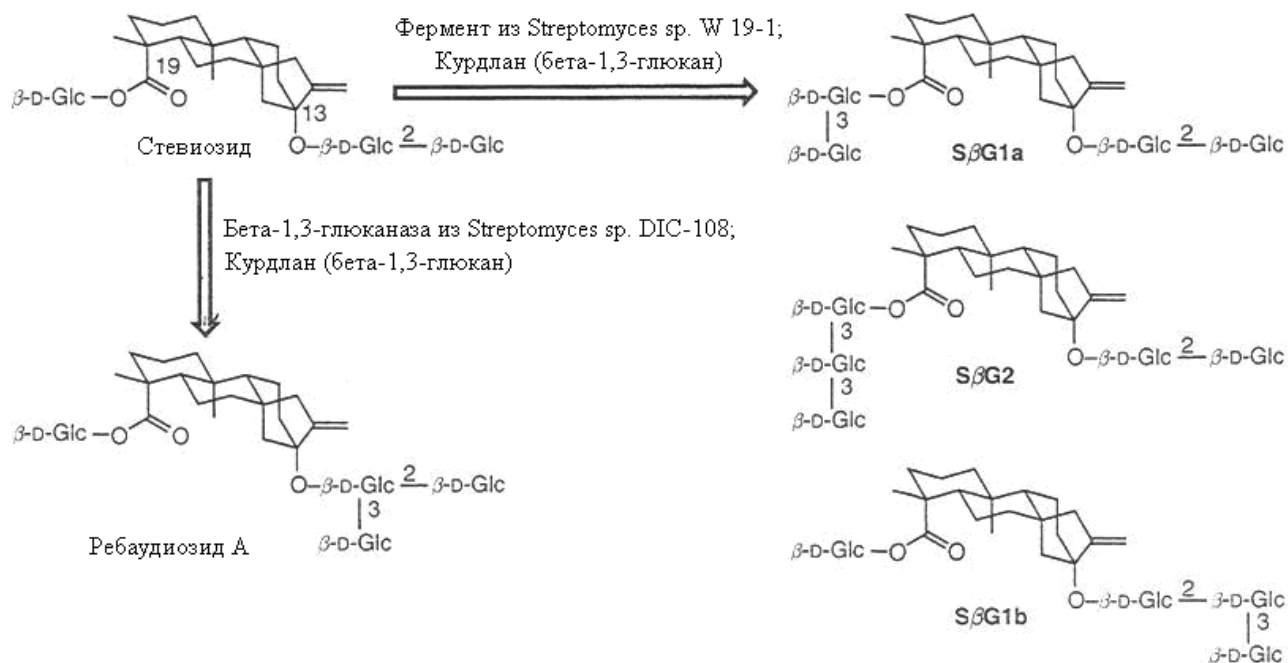


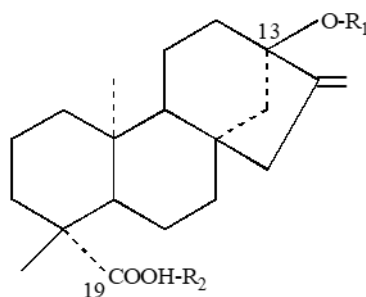
Рисунок 7 - Транс-α-глюкозилирование стевиозида β-1,3-глюканазой в присутствии курдлана (Ohtani, Yamasaki, 2002)

Обработка стевиозида ферментом *Streptomyces sp. DIC-108* в присутствии β-1,3-глюкана приводит к образованию РебА.

При применении β-фруктофуранозидазы из *Arthrobacter sp.* и сахарозы в качестве донора, происходит транс-β-2,6-фруктофуранозилирование 19-O-глюкозильного остатка. Образовавшиеся остатки обладали отличными вкусовыми качествами, однако отличались нестабильностью и легко подвергались гидролизу (Ishikawa et al., 1990).

Трансгликозилирование гликозидов стевии осуществлено также β-галактозидазой из различных источников, используя лактозу в качестве донора гликозильных единиц. Все ферменты образовывали четыре производные: 13-O-β-D-глюкозил-19-O-[β-D-галактозил-1,4-β-D-глюкозил]-стевиол (RGal-1); 13-O-β-D-галактозил-1,4-β-D-глюкозил-19-O-β-D-глюкозил-стевиол (RGal-2); 13-O-β-D-глюкозил-19-O-[β-D-галактозил-1,6-β-D-глюкозил]-стевиол (RGal-3) и 13-O-[β-D-галактозил-1,6-β-D-глюкозил]-19-O-β-D-глюкозил-стевиол (RGal-4). Однако, они

устраняют горечь рубузоида только частично из-за низкого выхода производных с требуемыми качественными характеристиками (рисунок 8) (Kitahata et al., 1989b).



Соединение	R ₁	R ₂
Рубузоид	β -Glc	β -Glc
RGal-1	β -Glc	β -Glc ⁴ - ¹ β -Gal
RGal-2	β -Glc ⁴ - ¹ β -Gal	β -Glc
RGal-3	β -Glc	β -Glc ⁶ - ¹ β -Gal
RGal-4	β -Glc ⁶ - ¹ β -Gal	β -Glc

Рисунок 8 - Продукты трансгликозилирования рубузоида с помощью β -галактозидазы (Kitahata et al., 1989a).

Наилучшие результаты получены при трансгликозилировании с помощью ЦГТаз микробного происхождения, таких как *Bacillus macerans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus megaterium* и других с использованием крахмала (донор) (Fukunaga et al., 1989; Patent US 4,219,571, 1980). В результате образуются α -1,4-глюкозил-производные, причем трансглюкозилируются как 13-О-, так и 19-О-глюкозильные остатки в молекулах стевииозида и рубузоида. Практически все полученные производные обладают улучшенными вкусовыми качествами (Abelyan, 2005; Kasai et al., 1981; Ohtani et al., 1991).

Наилучшие результаты получаются при удлинении глюкозидной цепи в позиции С-13 до 4 единиц, с неизменностью позиции С-19. Любое присоединение глюкозила к положению С-19 приводит к ухудшению вкусовых качеств производных. Наилучшими вкусовыми качествами как среди компонентов экстракта, так и его производных обладают моно- и ди-глюкозилированные производные, которые могут быть получены селективно и использованы в качестве превосходных заменителей сахара.

Для улучшения вкусовых характеристик, продукт обрабатывают β -амилазой с целью гидролиза высокомолекулярных производных стевииозида и очищают хроматографическим путем. Основными компонентами полученной смеси являются моно- и диглюкозилированные варианты стевииозида (Kasai et al., 1981; Kitahata, 2001; Patent Japan 03-83558, 1991; Patent Japan 03-262458, 1991; Patent US Appl. 201110023192, 2011; GRAS assessment, 2011).

Обобщая далеко не исчерпывающий обзор литературы по сладким гликозидам *Stevia rebaudiana* Bertoni, можно сделать следующее заключение:

- Гликозиды *Stevia rebaudiana* Bertoni имеют не только интенсивный сладкий вкус, но и оказывают определенное оздоровительное влияние на организм.

- Разработано множество методов их выделения из листьев, однако существуют определенные трудности при их полной экстракции и тонкой очистке.

- Нет систематических и сравнительных исследований по модификации гликозидов различными ферментами и изучение взаимосвязи между структурными особенностями модифицированных производных и вкусовыми качествами.

- Разработка эффективных методов выделения и очистки некоторых минорных гликозидов, обладающих отменными вкусовыми характеристиками, становится насущной необходимостью.

- Разработка эффективных методов трансгликозилирования и получение производных с наилучшими вкусовыми характеристиками поможет создавать оптимизированные смеси, соответствующие требованиям пищевой промышленности для отдельных видов продуктов, и сладость которых наиболее близка к сахару.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования служила стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

2.1. Ферменты ЦГТаза и β -фруктофуранозидаза

В качестве продуцента цикломальтодекстрин глюканотрансферазы (ЦГТаза) был использован *Geobacillus stearothermophilus* St-88 из коллекции культур микроорганизмов компании PureCircle Ltd. (Малайзия).

В качестве продуцента β -фруктофуранозидазы использовали штамм *Arthrobacter sp.* (К-1) FERM BP-3192 из коллекции культур NBRC (IPOD), Япония.

Выращивание штаммов в глубинных условиях осуществляли на качалках типа Certomate IS (В. Braun Biotech. Int., Германия) и в ферментере Biostat В (В. Braun Biotech. Int., Германия) на следующих питательных средах:

Культура-продуцент ЦГТаз

Geobacillus stearothermophilus (г/ дм³): Крахмал – 7,0; кукурузный экстракт – 5,0; NH₄Cl – 5,3; CaCO₃ – 2,5 (рН 6,5; 56°C) (Абелян и др., 2002).

Культура-продуцент β -фруктофуранозидазы

Arthrobacter sp. К-1 (г/ дм³): Кукурузный экстракт – 5,0; сахароза – 3,0; (NH₄)₂HPO₄ – 0,4; MgSO₄·7H₂O – 0,1 (рН 7,0; 37°C) (Fujita et al., 1990).

β - амилаза

Использовали ферментный препарат β – амилаза #1500S (Nagase, Япония), активность 1500 ед/г.

Глюкоамилаза

Использовали ферментный препарат глюкоамилазы Glucoamylase AMG 300L, активность 300 ед / см³, Novozyme, Дания.

2.2. Определение ферментативной активности

2.2.1. Определение ферментативной активности ЦГТаз

Циклизирующая активность ЦГТаз

Метод основан на специфическом определении α -ЦД. К 1 мл 3%-ного раствора крахмала (оптимальный pH) добавляли 0,5 см³ фермента и смесь инкубировали при оптимальной температуре. Через определенные интервалы времени 3 капли реакционной смеси смешивали с 1 каплей раствора 0,1N I₂ в 0,1M KI и после фиксации на предметном стекле микроскопированием определяли наличие α -ЦД. С появлением гексагональных кристаллов реакцию считали законченной. За единицу активности принимали количество фермента, которое трансформирует 1 см³ 3%-ного раствора крахмала за 30 мин (Tilden, Hudson, 1942).

Декстринизирующая активность ЦГТаз

К 10 см³ 2%-ного раствора крахмала с оптимальным значением pH добавляли 4 мл раствора фермента и инкубировали при оптимальной температуре. Через определенные интервалы времени отбирали 0,5 см³ пробы и приливали раствор 0,0035M I₂ в 0,26M KI в количестве 5 см³. Объем раствора доводили до 10 см³ дистиллированной водой и через 3 мин определяли оптическую плотность при 660 нм. За единицу активности принимали количество фермента, которое за 10 мин в условиях эксперимента конвертирует 50% крахмала. Эта единица примерно в 25 раза больше соответствующей единицы Тильдена-Хадсона (Hale, Rawlins, 1951).

Диспропорционирующая активность ЦГТаз

Реакционная смесь, содержащая испытуемый препарат фермента, 10 мг растворимого крахмала, 50мМ сахарозы и 10мМ CaCl₂ в 1 см³ 0,1M буфера, инкубировали при 40°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали кипячением и после центрифугирования определяли количество мальтозилфруктозы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Zorbax-NH₂ («Agilent 1100 Series», США) с использованием подвижной фазы ацетонитрил-вода (70:30) и дифференциального рефрактометра в качестве детектора. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 μ моль мальтозилфруктозы за 1 мин (Akimaru et al., 1991).

Дециклизирующая активность ЦГТаз

1,0 см³ реакционной смеси, содержащей фермент, 5мМ β-ЦД, 10мМ CaCl₂ в 0,1М буфере (соответствующий рН) и 150 мкг глюкоамилазы, инкубировали при 40°C в течение 10 мин. Затем определяли количество редуцирующих сахаров. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующее 1 μмоль β-ЦД в минуту (Akimaru et al., 1991).

Трансгликозилирующая активность ЦГТаз

Реакционную смесь, содержащую препарат ЦГТазы (4,0 ед.), 10 мг растворимого крахмала, 50 ммоль сахарозы и 10 ммоль CaCl₂ в 1 см³ 0,1М буфера (рН 6,5) инкубировали при 50°C в течение 15 мин. Реакцию останавливали кипячением (10 мин) и после центрифугирования (10000 g, 10-15 мин) определяли количество 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. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль мальтозилфруктозы за 1 мин (Akimaru et al., 1991).

Для определения влияния различных ионов металлов на активность ЦГТазы фермент диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч, преинкубировали в водном растворе ионов в течение 30 мин при 50°C и оптимальном рН и определяли остаточную циклизирующую активность.

Влияние температуры на активность ЦГТазы определяли в реакционной смеси следующего состава: 1 см³ 2 %-ного раствора растворимого крахмала, 0,5 см³ 1/15М фосфатного буфера, рН 7,0 и 1 см³ фермента. Смесь инкубировали при разных температурах в течение 15 мин и определяли остаточную декстринизирующую активность.

Термостабильность ЦГТазы определяли при инкубации 1 см³ раствора фермента в 1 см³ 1/15М растворе фосфатного буфера, рН 7,0 в течение двух часов. Затем определяли активность при оптимальной температуре.

Влияние рН на активность ЦГТазы изучали в реакционной смеси следующего состава: 1 см³ 2%-ного раствора растворимого крахмала, 0,5 см³ раствора буфера и 1 см³ фермента. Инкубировали при 50°C в течение 5 мин.

Использовали следующие буферные растворы: рН 4,0-6,0 - 0,1Н ацетатный буфер; рН 6,0-8,0 - 1/15М фосфатный буфер; рН 8,0-10,0 - 0,2М NaOH-глициновый буфер. Стабильность ЦГТ-

азы к различным рН определяли при выдержке 1 см³ фермента в 1 см³ растворах разных буферов при рН 4,0-10,0 и температуре 50°С в течение двух часов. Затем определяли активность при оптимальных условиях.

2.2.2. Определение трансгликозилирующей активности β-фруктофуранозидазы

Трансгликозилирующая активность β-фруктофуранозидазы определяли следующим образом, за единицу активности принимали количество фермента, необходимое для переноса 1 мкМ фруктозы за 1 мин в условиях эксперимента (Зинченко и др., 1994).

Степень трансгликозилирования (А) определяли по формуле:

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

где количество присоединённой фруктозы вычисляли по разнице между содержанием глюкозы и свободной фруктозы.

Для определения **β-фруктофуранозидазной активности**, раствор неочищенного фермента (0,5 см³) и 0,5 см³ 40% (вес/об) сахарозы в 50мМ фосфатного буфера (рН 6,5), инкубировали при 30°С при постоянном перемешивании в течение 10 мин. Реакцию останавливали кипячением в течение 5 мин, центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли количество редуцирующих сахаров. Количество восстанавливающих сахаров определяли методом реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой (DNS). За единицу β-фруктофуранозидазной активности принимали количество фермента, которое высвобождало 1 мкмоль глюкозы за 1 мин в условиях эксперимента.

Количество редуцирующих сахаров определяли методом Сомоджи-Нельсона (Somogyi, 1952).

Фруктозу и глюкозу идентифицировали спектрофотометрически (Bergmeyer et al., 1974).

Количество общих сахаров определяли методом фенол-серной кислоты (Dubois et al., 1959).

Количественное определение фруктоолигосахаридов осуществляли методом ВЭЖХ на приборе «Agilent 1100 series» (США) в следующих условиях: колонка – Zorbax-NH₂ (5 мкм, 4,6x250 мм); подвижная фаза – ацетонитрил-вода (70:30, объем/объем); скорость потока 2 см³/мин; детектор - дифференциальный рефрактометр.

Определение гликозидов стевии и их производных проводилось методом ВЭЖХ на приборе «Agilent 1100 series» (США) в следующих условиях: колонка – Zorbax-NH₂ (5 мкм, 4,6x250 мм); подвижная фаза – ацетонитрил-вода (70:30, объем/объем); скорость потока 1 см³/мин; детектор – УФ-детектор при 210 нм.

Для анализа **трансгликозилированных производных гликозидов стевии ЦГТазой** использовали колонку Zorbax-NH₂ (5 мкм, 4,6x250 мм) с подвижной фазой ацетонитрил-вода, метод градиента от 80:20 объем/объем (2 мин) до 50:50 объем/объем в течение 90 мин с использованием УФ-детектора при 210 нм. Скорость потока 1 см³/мин, температура колонки 20°C.

Определение фруктозилированного РебА (РебА-Fru) проводили 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=68:22 (объем/объем) в течение 20 мин. Скорость потока 1,8 см³/мин, температура колонки 40°C с использованием УФ-детектора при 210 нм.

Для приготовления фосфатного буфера использовали 0,01М раствор NaH₂PO₄·H₂O и pH довели до 2,6 фосфорной кислотой.

2.2.3. Идентификация гликозидов методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс спектрометрии (ВЭЖХ/МС)

Масс-спектрометрия (МС) основана на анализе ионов, движущихся в вакууме. В результате масс-спектры обеспечивают ценную информацию о молекулярной массе, количестве, идентичности и чистоте образца. МС добавляет специфичность качественного и количественного анализа.

Для осуществления ВЭЖХ-МС использовали нижеследующие условия:

Настройки аппарата

Колонка: Agilent Poroshell 120 SB-C18 (2,7 мкм; 4,6ммx150мм)

Температура колонки: 40°C

Мобильная фаза: Растворы заранее отфильтровывали и смешивали непосредственно перед анализом:

Раствор А: 25% ацетонитрил и 75% раствор муравьиной кислоты (0,1%)

Раствор Б: 32% ацетонитрил и 68% раствор муравьиной кислоты (0,1%)

Таблица 3. Параметры градиента мобильной фазы в колонке

Время (мин)	Мобильная фаза Раствор А	Мобильная фаза Раствор Б
0	100	0
13	100	0
13,5	50	50
14	0	100
60	0	100

Скорость потока: 0,5 см³/мин

Инъекция: 2 мкл

Обнаружение: MSD в режиме сканирования

MSD Настройки

Режим: ES-API, Отрицательная полярность

Сушка газа (поток): 13,0 дм³/мин

Давление распылителя: 30 psig (фунтов на кв. дюйм)

Сушка газа (температура): 270°C

SIM Параметры:

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.

ГЛАВА 3. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ

Вкусовые характеристики и некоторые физико-химические свойства гликозидов могут быть существенно улучшены добавлением одного или более углеводных единиц к молекуле. Существуют два основных метода такой модификации: трансгликозилирование и конденсация (обратная реакция гидролиза) (рисунок 9) (Fujimoto et al., 1996; Nakano, Kitahata, 2005; Patent US Appl. 2010/0278993, 2010; Prakash et al., 2014a). Их называют также кинетической и равновесно-контролируемой реакциями, соответственно.

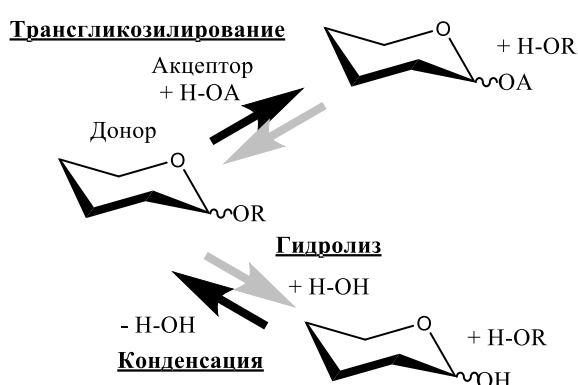
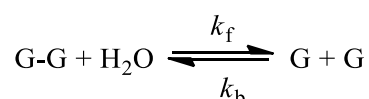


Рисунок 9 - Синтетические реакции получения гликозидов
(Nakano, Kiso, 2009)

Несмотря на то, что конденсация и трансгликозилирование протекают по разным механизмам, в обоих случаях степень полимеризации продуктов выше, чем субстратов.

Поскольку ферменты являются катализаторами, то они в одинаковой степени должны ускорить как прямую, так и обратную реакцию. Поэтому, любая гидролаза, катализирующая гидролиз гликозидных связей, должна также катализировать образование этих же связей (конденсация) согласно следующему уравнению:



где G является глюкозным остатком или молекулой глюкозы, G-G - мальтоза, и k_f и k_b являются константами скорости прямой и обратной реакции.

Кроме того, равновесные константы гидролитической реакции, K_h , и конденсации, K_c , имеют следующую зависимость:

$$K_c = 1/K_h = [G-G][H_2O]/[G]^2, = k_b/k_f,$$

и следовательно

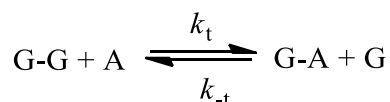
$$[G-G] = K_c [G]^2 / [H_2O] = [G]^2 / (K_h - [H_2O]),$$

где $[G]$ и $[G-G]$ представляют собой концентрации глюкозы и мальтозы в равновесии.

Таким образом, для реакций конденсации предпочтительны высокие концентрации субстратов и низкое содержание воды. Константа равновесия гидролитической реакции K_h может быть выражена не принимая во внимание концентрация воды $[H_2O]$, так как $K_h' = K_h[H_2O]$, и аналогично, константа скорости $k_f' = k_f[H_2O]$.

Таким образом, с уменьшением количества воды и, следовательно, увеличением концентрации глюкозы в реакционной смеси, реакцию можно направить в сторону конденсации, т.е. реакция имеет четкую концентрационную зависимость (Yamamoto, 1988).

С другой стороны, трансферазную реакцию можно описать следующим уравнением:



где A – молекула акцептора.

Константа равновесия трансферазной реакции K_t может быть описана как

$$K_t = [G-A][G]/[G-G][A] = k_t/k_{-t}$$

и следовательно

$$[G-A] = K_t [G-G][A]/[G]$$

где k_t и k_{-t} являются константами скорости прямой и обратной реакции, соответственно.

Субстрат $G-G$ может выступать одновременно в качестве донора и акцептора, в этом случае, мальтотриоза, $G-G-G$, будет синтезироваться как продукт трансферазной реакции, $G-A$.

Тенденция возникновения реакции переноса или конденсации в катализируемых ферментами реакциях определяется константой равновесия (K_t or K_c) для данной реакции с одной стороны, и характеристикой фермента, с другой. Гидролиз является преобладающей реакцией при низких концентрациях субстрата (Yamamoto, 1988).

Реакция трансгликозилирования широко используется для получения различных гликозидов и олигосахаридов, во время которой гликозильная единица донора переносится к

соответствующему акцептору с образованием новых гликозидных связей. Большинство гликозилтрансфераз только в малой степени катализируют гидролиз, хотя некоторые из них, также классифицированные как трансферазы, обладают достаточно высокой гидролитической активностью. Данная гидролитическая реакция может быть рассмотрена как трансферазная реакция, где гликозильный остаток переносится к молекуле воды. В реакциях, катализируемых гидролазами, трансферные продукты также выступают как субстраты для гидролиза. Поэтому, каждый раз необходимо тщательно контролировать время инкубации и соотношение фермента к субстрату. С другой стороны, в катализируемых трансферазами реакциях не протекает существенный гидролиз продуктов реакции даже после длительной инкубации (Nakano, Kiso, 2009).

Когда равновесие гидролитических реакций смещается в сторону синтеза путем применения высоких концентраций субстратов и, следовательно, низких концентрации воды, или же удалением продуктов реакции из реакционной среды, протекает реакция конденсации (Fujimoto et al., 1996). Данная реакция имеет преимущества, когда соответствующие олигосахариды и гликозиды не доступны в качестве доноров для трансгликозилирования. Однако, выход продуктов трансгликозилирования существенно выше по сравнению с реакциями конденсации (Nakano, Kiso, 2009).

В настоящее время трансгликозилирование широко используется также для улучшения вкусовых характеристик гликозидов стевии, а также для их взаимопревращения.

3.1. ТРАНСГЛЮКОЗИЛИРОВАНИЕ ЦГТазой

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 С-13 и С-19 гликозидов стевии (α -1,4-трансглюкозилирование).

Химическая схема ферментативной обработки на примере стевииозидов в присутствии ЦД представлена на рисунок 10.

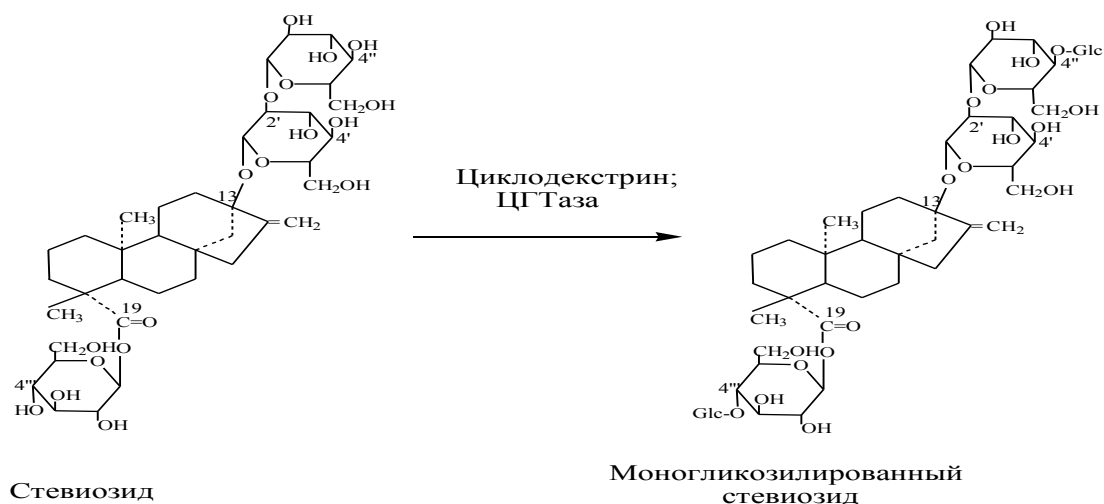


Рисунок 10 - Трансгликозилирование стевиозида с помощью ЦГТаз в присутствии ЦД

ЦГТазы, продуцируемые термофильными микроорганизмами, являются наиболее эффективными для трансгликозилирования гликозидов стевии. В данном исследовании мы использовали *Geobacillus stearothermophilus* в качестве продуцента (Chkhan, 2015)

Общая процессуальная схема трансгликозилирования смеси гликозидов стевии приведена на рисунке 11.

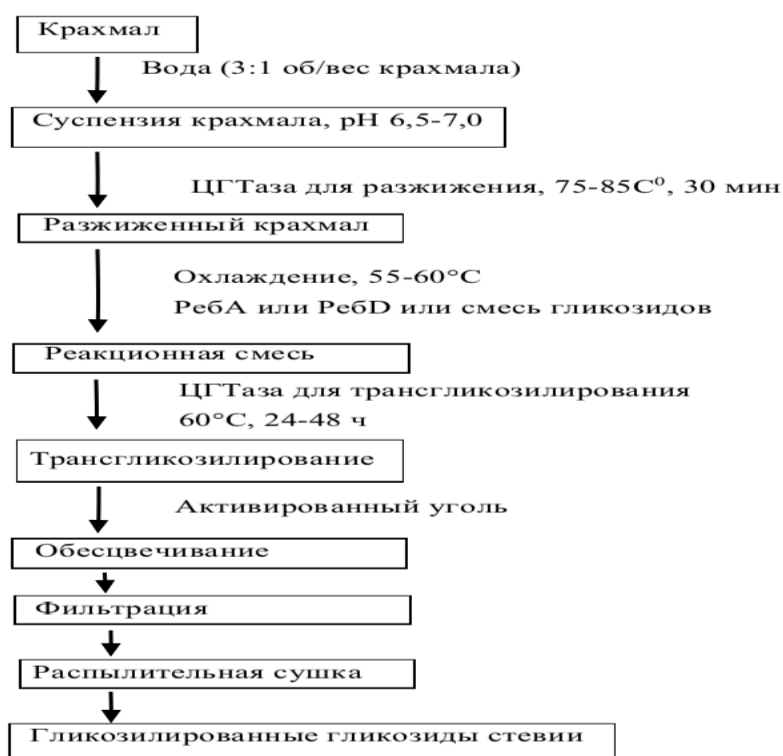


Рисунок 11 - Трансгликозилирование гликозидов стевии ЦГТазой и с крахмалом в качестве донора (Кочикян и др., 2006)

3.1.1. Трансгликозилирование РебА ЦГТазой

Для трансгликозилирования РебА с помощью ЦГТазы в качестве донора глюкозных единиц использовали крахмал или γ -циклодекстрин (γ -ЦД) (Абелян, 2001; Abelyan 2009)

Для выявления оптимального значения рН процесса с использованием крахмала, 10 г крахмала суспендировали в 30 см³ буферного раствора с соответствующим рН и разжижение осуществляли при 80-85°С в течение 20 мин после добавления 2 ед/г концентрированного ультрафильтрата культуральной жидкости *Geobacillus stearothermophilus* (2,0 единиц на 1 г крахмала). В полученном растворе растворяли 10 г высокочистого РебА, добавляли 20 ед/г фермента и инкубировали при 55°С в течение 12 ч. Эффективность процесса оценивали 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 фермент 8,5 ед/г РебА и инкубировали при 55°С течение 12 ч.

Выявлено, что оптимальный рН для обоих процессов находится в пределах 5,5-7,0 (рисунок 12).

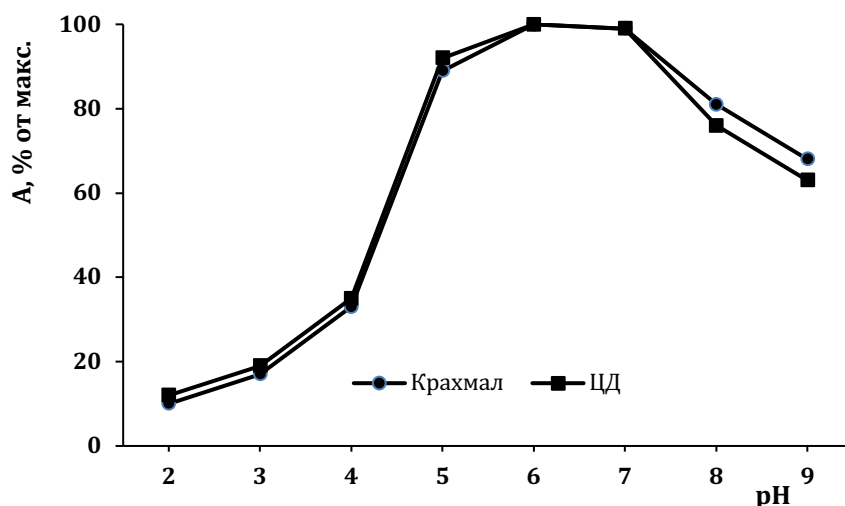


Рисунок 12 - Влияние рН на трансферазную активность ЦГТазы *Geobacillus stearothermophilus* (А, % от максимальной) при трансгликозилировании РебА. рН 3,0-3,5 – ацетатный буфер; рН 4,0-6,5 – фосфатно-цитратный буфер; рН 7,0-9,0 – натрий-фосфатный буфер.

Для определения оптимальной температуры трансгликозилирование осуществляли аналогично описанному методу для оптимального рН, при различных температурах. рН

реакционной среды устанавливали 6,5. Оптимальная температура процесса находилась в пределах 65-75°C, однако, чтобы обеспечить высокую стабильность ЦГТазы, 65°C была выбрана в качестве оптимальной (рисунок 13) (Чхан, Мойсеяк, 2019а).

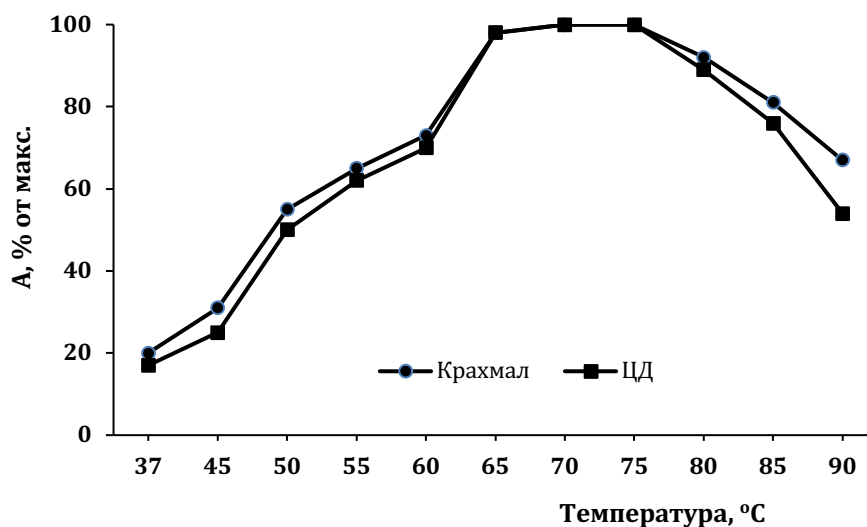


Рисунок 13 - Влияние температуры на степень трансгликозилирования РебА ЦГТазой *Geobacillus stearothermophilus* (А, % от максимальной)

С увеличением количества биокатализатора повышалась степень трансферазной реакции. Однако суммарный выход моно- и ди-глюкозилированных производных, обладающих наилучшими вкусовыми качествами, достигал своего максимума при использовании фермента в количестве 8-9 ед. ЦГТазы/г РебА (рисунок 14).

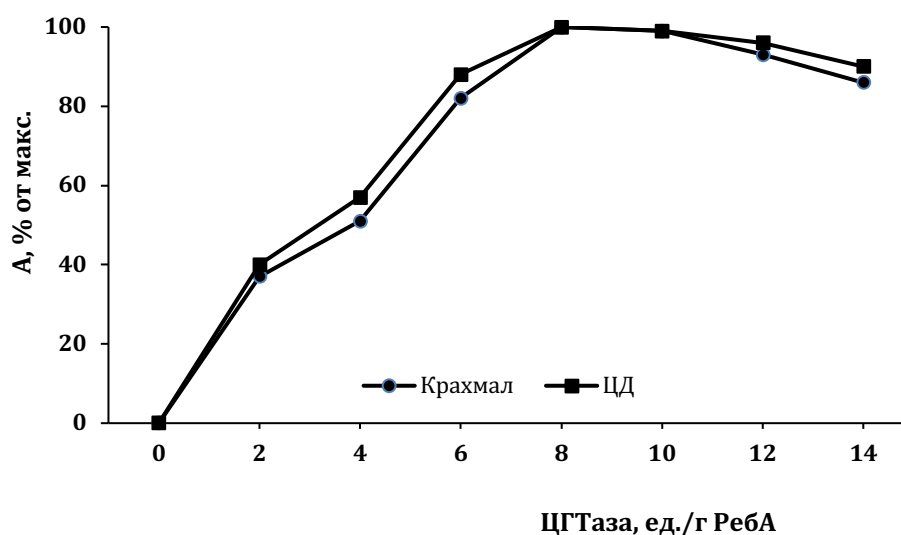


Рисунок 14 - Суммарный выход моно- и ди-гликозилированных производных РебА (А, %) в зависимости от количества добавляемой ЦГТазы

Соотношение и концентрация субстратов оказывали определенное влияние на трансгликозилирование РебА. Для выявления наилучшего варианта, реакции осуществляли в течение 12 ч при 65°C с 24% 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 крахмала 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 (в/в), приводящее к сладости продукта в пределах 120-130 в условиях газированных напитков и 170-180 в кисломолочных и кондитерских продуктах является наиболее приемлемым (Чхан, Мойсеяк, 2019а). Хотя, конечно, все зависит от модели бизнеса и требования рынка, так как варьируя соотношение можно получить необходимый тип сладости и в некоторых случаях решить проблему с наполнителями (рисунок 15).



Рисунок 15 - Степень трансгликозилирования (А, %) в зависимости от соотношения РебА и доноров глюкозных единиц

3.1.2. Трансгликозилирование РебА ЦГТазой и γ -ЦД в качестве донора

На следующем этапе исследований проводили реакцию трансгликозилирования в присутствии γ -ЦД в соотношении 1:1 (в/в) осуществляли следующим образом.

50 г γ -ЦД растворили в 300 см³ воды, затем добавили 50 г РебА ($\geq 97\%$) и нагрели для полного растворения. Охлаждали до 65°C и добавили 25 см³ концентрированного фильтрата культуральной жидкости с ЦГТазной активностью. Реакцию осуществляли при 65°C в течении 24-48 часов при постоянном перемешивании. Реакцию останавливали термообработкой при 100°C в течение 10 мин, обрабатывали активированным углем (1%) при 70°C в течение 20 мин, уголь отделяли фильтрованием.

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

Продуктом реакции является смесь немодифицированного РебА и его моно- (РебА-G1), ди- (РебА-G2), три- (РебА-G3) и более гликозилированных производных (смесь РебА- Gly) (рис. 16) (Чхан, Мойсеяк, 2019а).

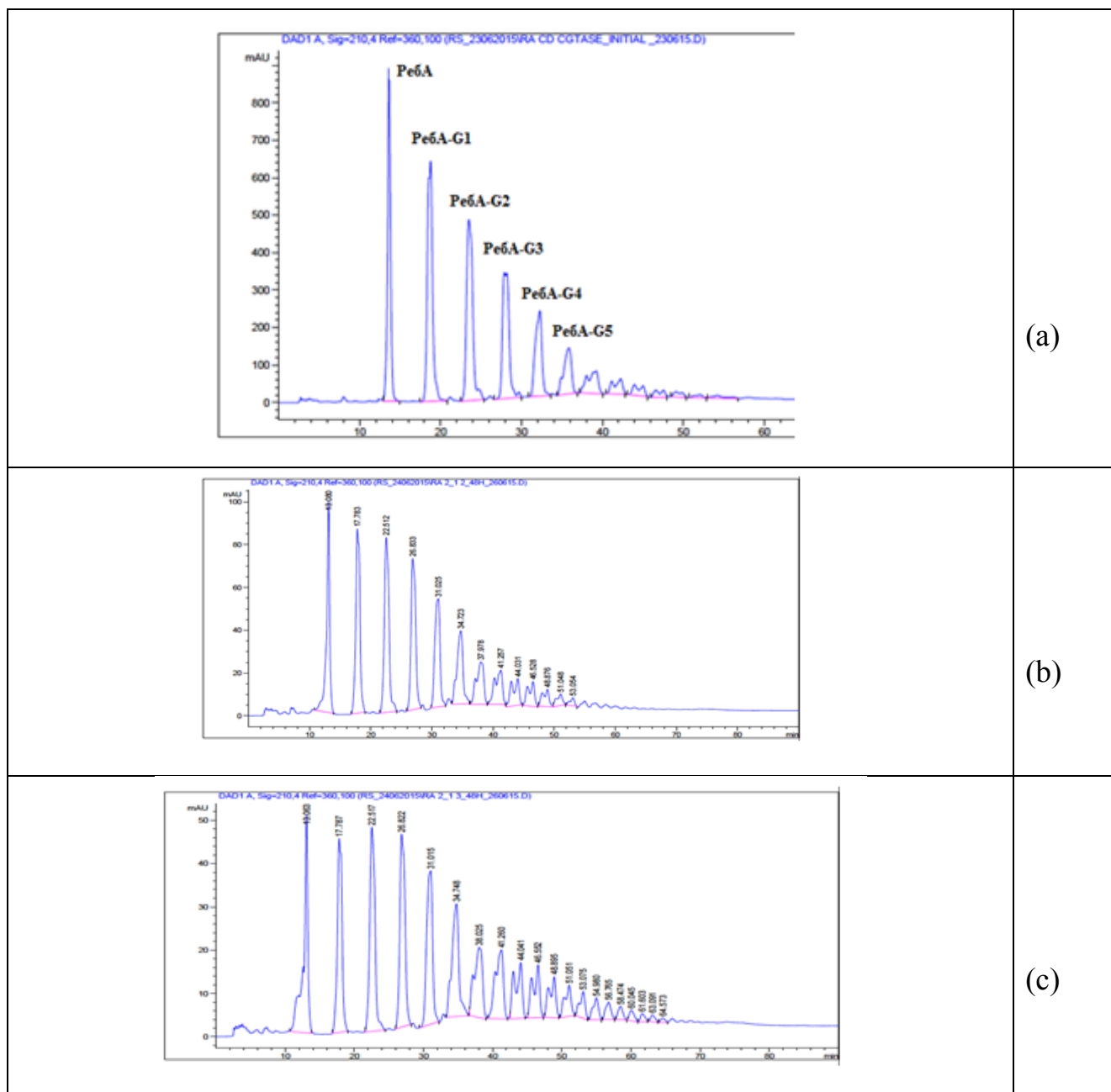


Рисунок 16 - ВЭЖХ-грамма исходной реакционной смеси при 1:1 (a); 1:2 (b) и 1:3 (c) массовом соотношении РебА и γ -ЦД через 48 ч реакции

Выявлено, что при повышенных концентрациях ЦД увеличивается степень трансгликозилирования и снижается количество нетрансформированного РебА. Так, если при соотношении РебА: γ -ЦД=1:1 (в/в), через 48 часов реакции количество остаточного РебА составляет 17,14%, то при 1:2 (в/в) и 1:3 (в/в) – 8,15% и 6,5%, соответственно. Однако, с увеличением продолжительности реакции, суммарное количество моно- и ди-

гликозилированных производных падает с одновременным повышением производных с более длинными боковыми цепочками. Так, если при соотношении РебА:γ-ЦД=1:2 (в/в), через 24 часов реакции их количество составляет 29,48%, а при 1:3 (в/в) – 34,25%, то через 48 часов реакции сумма составляет 27,92% и 26,6%, соответственно (таблица 4 и рисунок 17) (Abelyan, 2009; Чхан, Мойсеяк, 2019а).

Таблица 4 - Соотношение гликозилированных производных РебА с ЦГТазой с использованием γ-ЦД в качестве донора глюкозных единиц

Продукты	Количество производных, %				
	РебА:γ-ЦД (1:1, в/в)	РебА:γ-ЦД (1:2) (в/в)		РебА:γ-ЦД (1:3) (в/в)	
		48 ч	24 ч	48 ч	24 ч
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

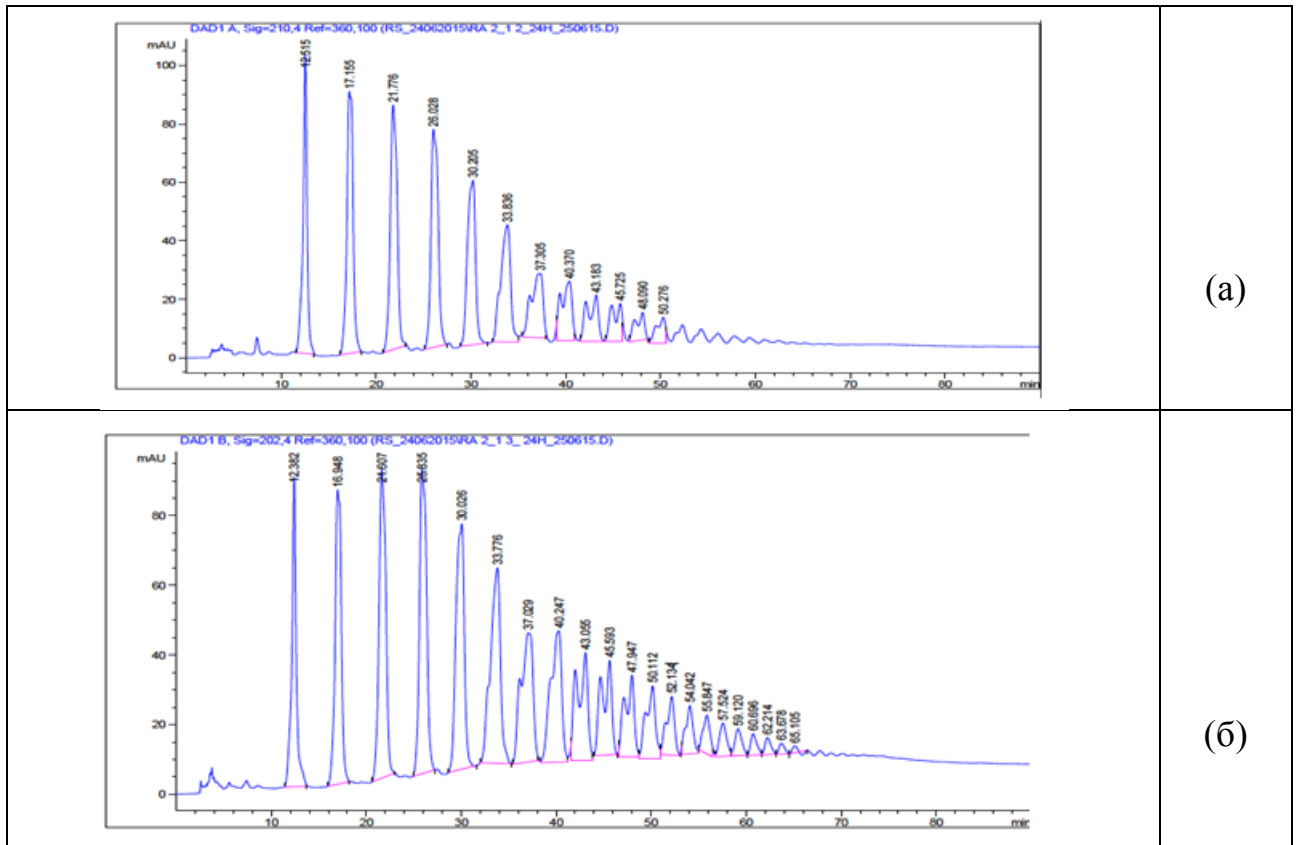


Рисунок 17 - ВЭЖХ-грамма исходной реакционной смеси при 1:2 (а) и 1:3 (б) массовом соотношении РеБА и γ -ЦД через 24 часов реакции

Как и следовало ожидать из теории, эффективность трансгликозилирования повышалась пропорционально увеличению общей концентрации субстратов, как это показано на рисунке 18.

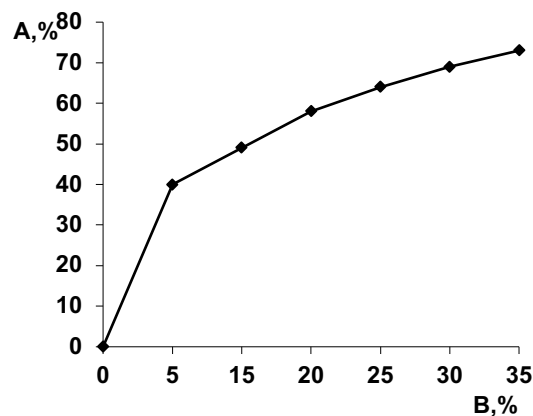


Рисунок 18 - Влияние общей концентрации субстратов (B, %) на степень трансгликозилирования (A, % от максимальной) при соотношении РеБА к γ -ЦД 1:1 (v/v), 65°C через 24 часов реакции

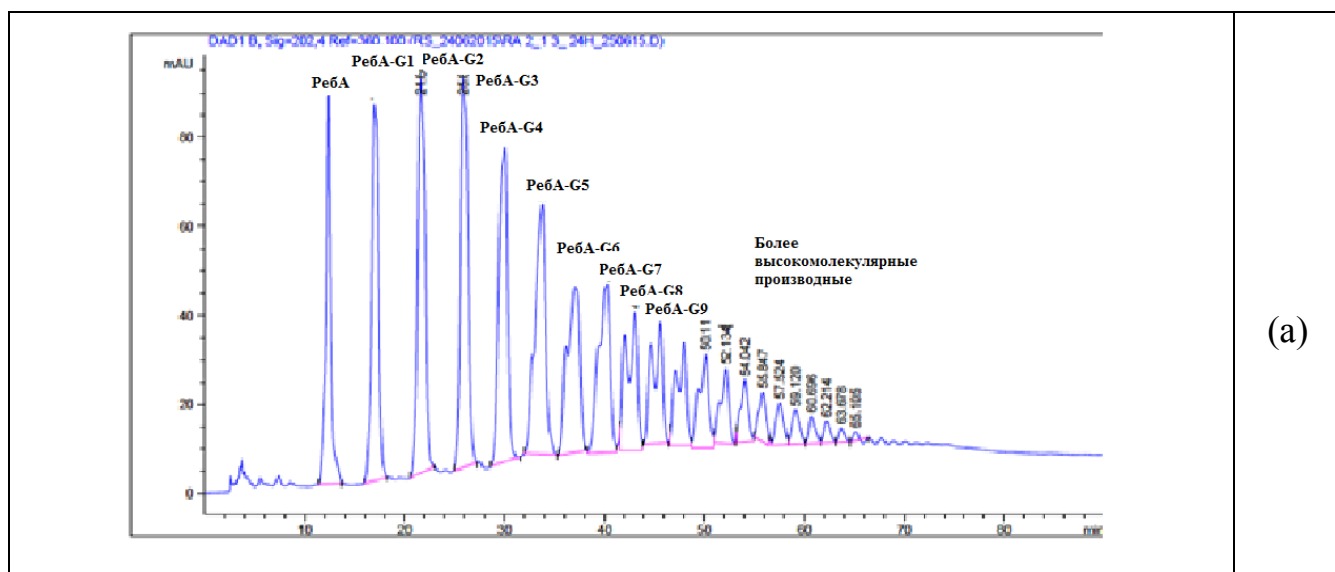
Обработанный активированным углем раствор реакционной смеси смешивали с этанолом до его 10%-ой концентрации и пропускали через колонку с Diaion HP-20 или Amberlite XAD-4,

соотношение гликозидов к гелю составляет 10% (вес/объем). Колонку последовательно промывали тремя объемами дистиллированной воды и 10%-ого этанола для удаления неадсорбированных веществ. Элюцию трансгликозилированных продуктов проводили пятью объемами 50%-ного этилового спирта, растворы выпаривали и остаток высушивали досуха при 45-50°C под вакуумом.

С целью повышения количества моно-, ди- и три-гликозилированных производных, что делает задачу их выделения, очистки и получения в гомогенном состоянии, полученный продукт обрабатывали β -амилазой или глюкоамилазой. Такая обработка приводит к гидролизу длинных боковых цепочек производных до моно- и ди-гликозилированных компонентов (рисунок 19).

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

К 50 г исходного продукта добавляли 10 ед/г β -амилазы (Nagase, Япония), разбавленную в 10 раз, и инкубировали при 40°C в течении 2-3-х часов. Количество фермента и время обработки можно менять в соответствии с преследуемой целью, что будет влиять на соотношение отдельных производных в конечной смеси. Продукт очищали на специфической крупнопористой хроматографической смоле Diaion HP-20, как это описано выше для исходной реакционной смеси (рисунок 19).



(a)

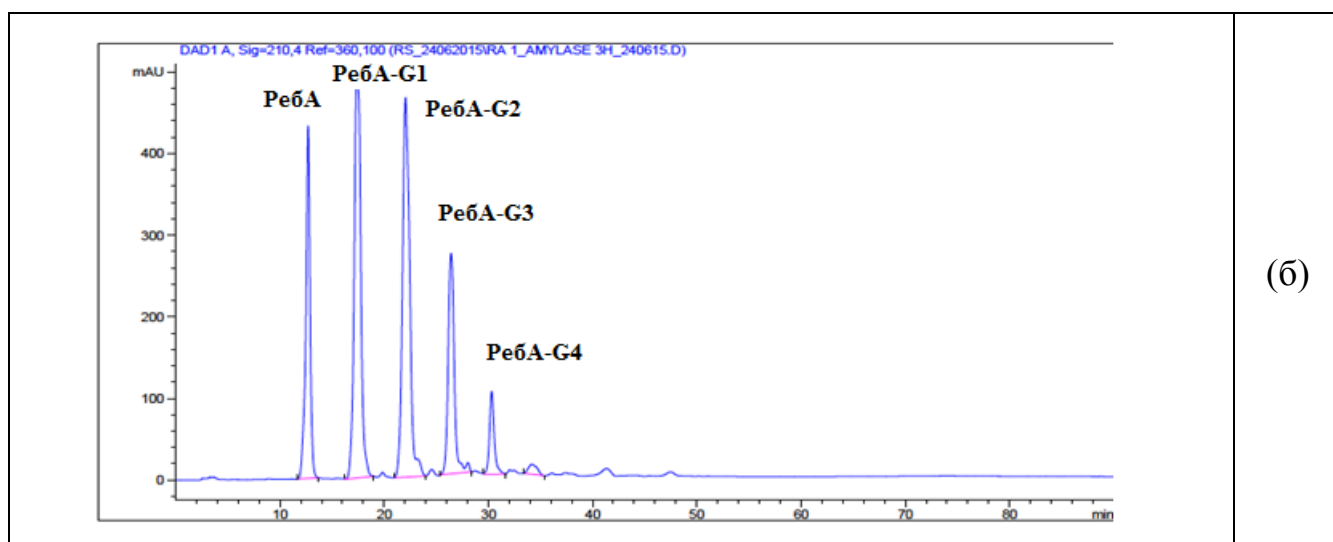


Рисунок 19 - ВЭЖХ-граммы трансгликозилированного РебА в присутствии ЦД до (а) и после обработки β -амилазой (б).

Продукт содержит немодифицированный РебА и от моно- до пента-гликозилированные производные в соотношении, приведенные в таблице 5.

Таблица 5 - Соотношение гликозилированных производных РебА до и после обработки β -амилазой

Продукты	Количество производных, %	
	РебА:γ-ЦД (1:3) (в/в); 24 ч	РебА:γ-ЦД (1:3) (в/в); 24 ч; 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	

Процессуальная схема трансгликозилирования с использованием γ -ЦД в качестве донора глюкозных единиц приведена на рисунок 20.

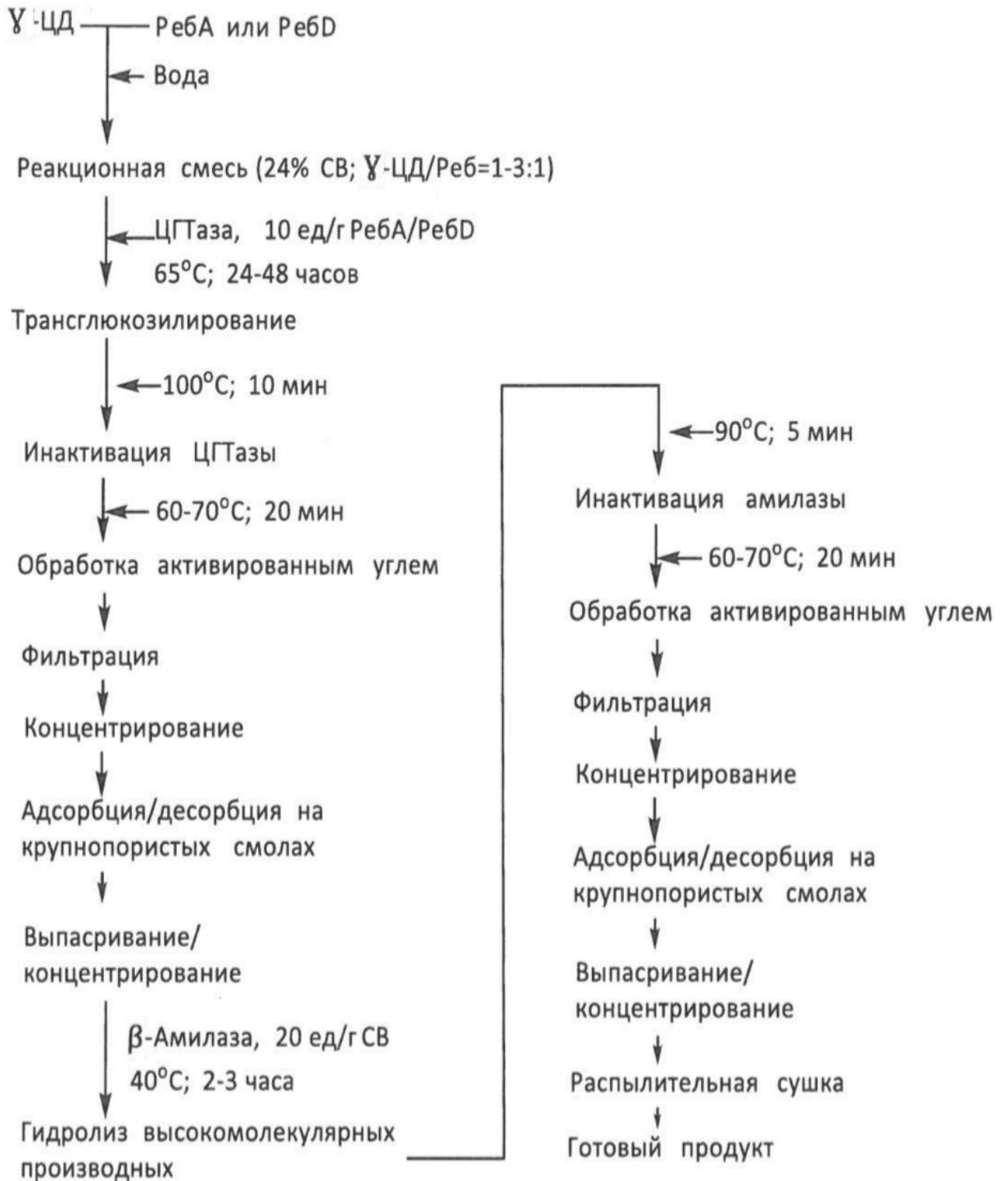


Рисунок 20 - Упрощенная схема трансглюкозилирования гликозидов ферментом ЦГТазой с использованием ЦД в качестве донора

3.1.3. Трансгликозилирование РебА ЦГТазой и крахмалом в качестве донора

Для осуществления трансгликозилирования РебА в присутствии крахмала, крахмал суспендировали в трех объемах (вес/объем) деионизированной воды с pH 6,0-6,5, добавляли ЦГТазу в количестве 2,0 ед/г крахмала и смесь постепенно нагревали при постоянном перемешивании до 75-80°C, до получения однородной разжиженной массы крахмала с декстрозным эквивалентом (ДЭ) в пределах 0,15-0,3. Раствор охлаждали до 60-65°C, добавляли РебА в количестве 1:1 (в/в) и перемешивали до полного растворения. Далее вносили вторую порцию ЦГТазы в количестве 8,0 ед/г крахмала и реакцию осуществляли при 65°C в течение 48 часов при постоянном перемешивании. По истечении этого времени реакционную смесь подвергали термообработке при 100°C в течение 10 мин для инактивации фермента, реакционную смесь обрабатывали активированным углем, фильтровали и фильтрат высушивали на распылительной сушке (рисунок 21 и 22).

Для гидролиза высокомолекулярных производных 30% раствор трансгликозилированного продукта обрабатывали 25 ед/г СВ глюкоамилазой (Novozymes, Дания) при 50°C в течение 2 часов. Реакционная смесь обесцвечивали активированным углем и очищали на крупнопористых смолах, как это описано в случае с циклодекстрином в качестве донора глюкозных остатков. После промывки колонки водой и 10%-ным этанолом, элюцию осуществляли 50%-ным этанолом (рисунок 21 и 22).

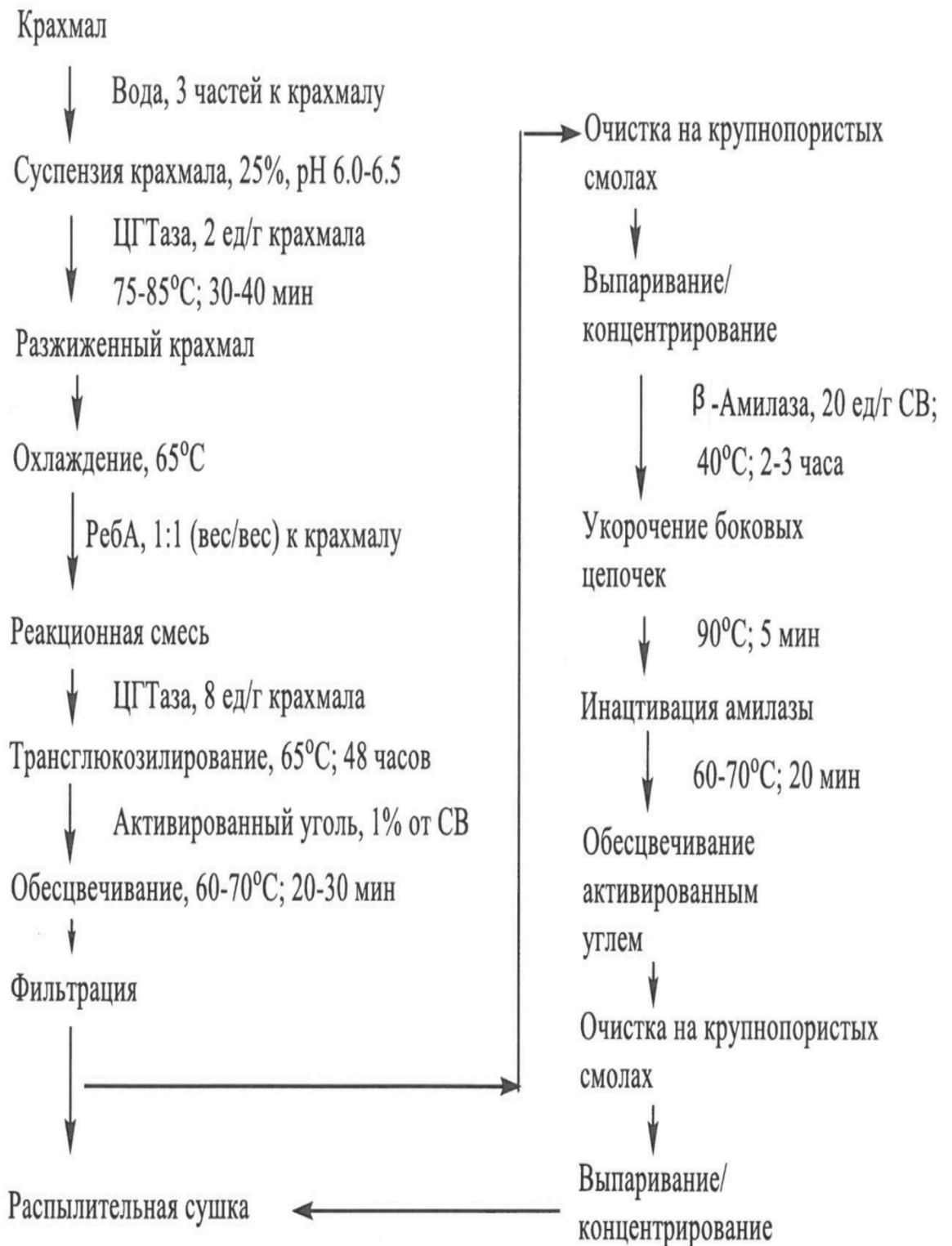


Рисунок 21 - Трансглюкозилирование РеБА ЦГТазой с использованием крахмала в качестве донора

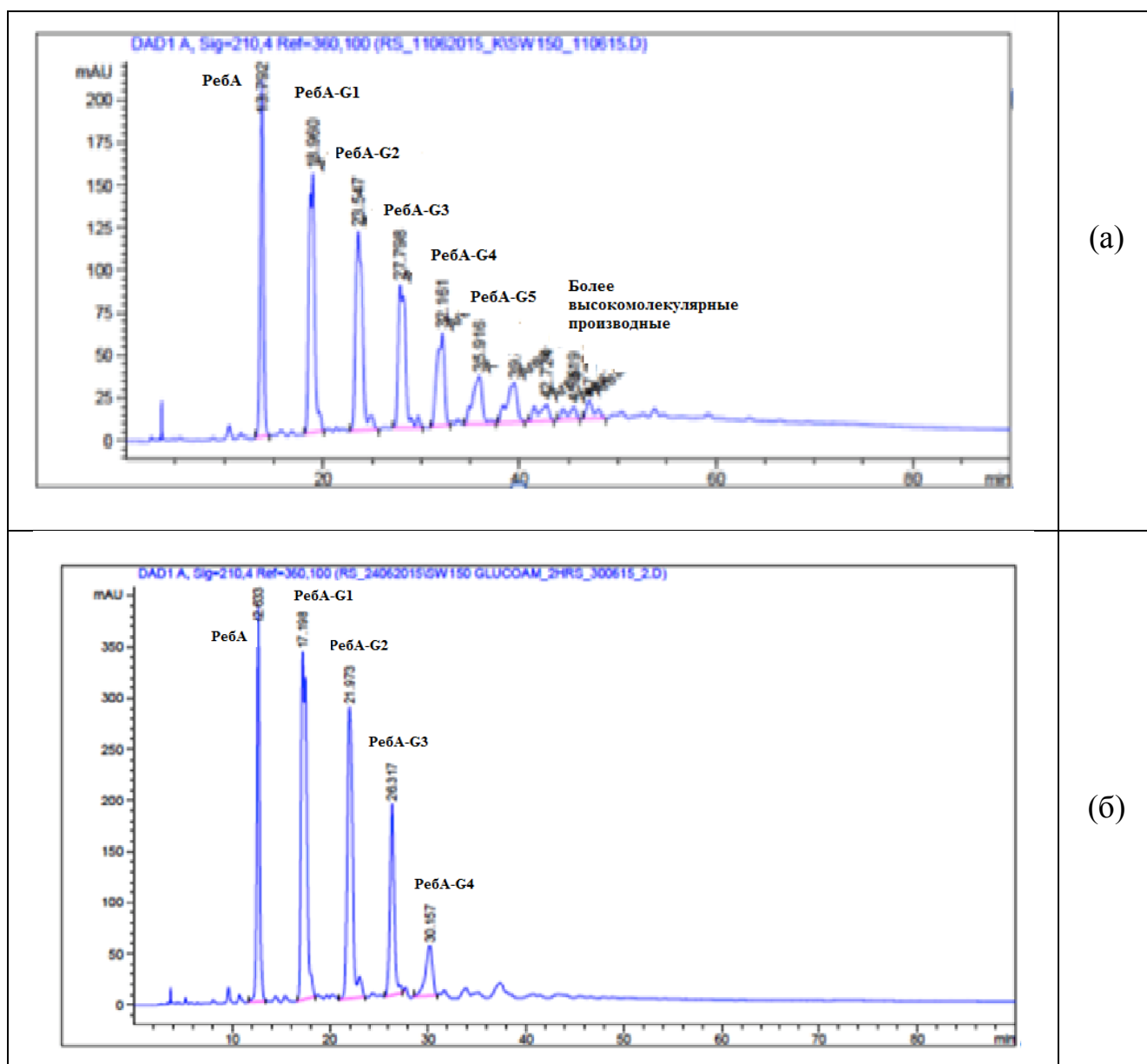


Рисунок 22 - ВЭЖХ-граммы трансглюкозилированного РебА в присутствии крахмала до (а) и после обработки глюкоамилазой (б).

Обработанный глюкоамилазой продукт содержит немодифицированный РебА и от моно- до тетра-глюкозилированные производные в соотношении, приведенные в таблице 6.

Таблица 6 - Соотношение гликозилированных производных РебА до и после обработки глюкоамилазой

Продукты	Количество производных, %	
	РебА:крахмал (1:1) (в/в); 48 ч	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	Малые количества	
РебА-G11		
РебА-G12		

Выделение и очистка гликозилированных производных РебА

Выделение и очистку индивидуальных производных осуществляли на 10-ти колонках с смолой Diaion HP-20, соединенных между собой параллельно. Принцип разделения основан на разнице в сродствах к носителю различных производных (Чхан, Мойсеяк, 2019в).

Через колонки пропускали 20%-ный раствор модифицированного РебА в 5% этиловом спирте после двухкратной обработки глюкоамилазой и очистки на крупнопористой смоле. Количество вносимых гликозидов составляло около 60-70% от общей адсорбционной емкости носителя. Колонки по отдельности последовательно промывали тремя объемами воды и 10%-ного этанола, и элюцию гликозидов осуществляли пятью объемами 50%-ного этанола.

Выявлено, что 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. В шестой колонке не обнаружился интактный РебА, а в седьмой идентифицированы только ди- и три-гликозилированные РебА (таблица 7, рисунок 23).

Таблица 7 - 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

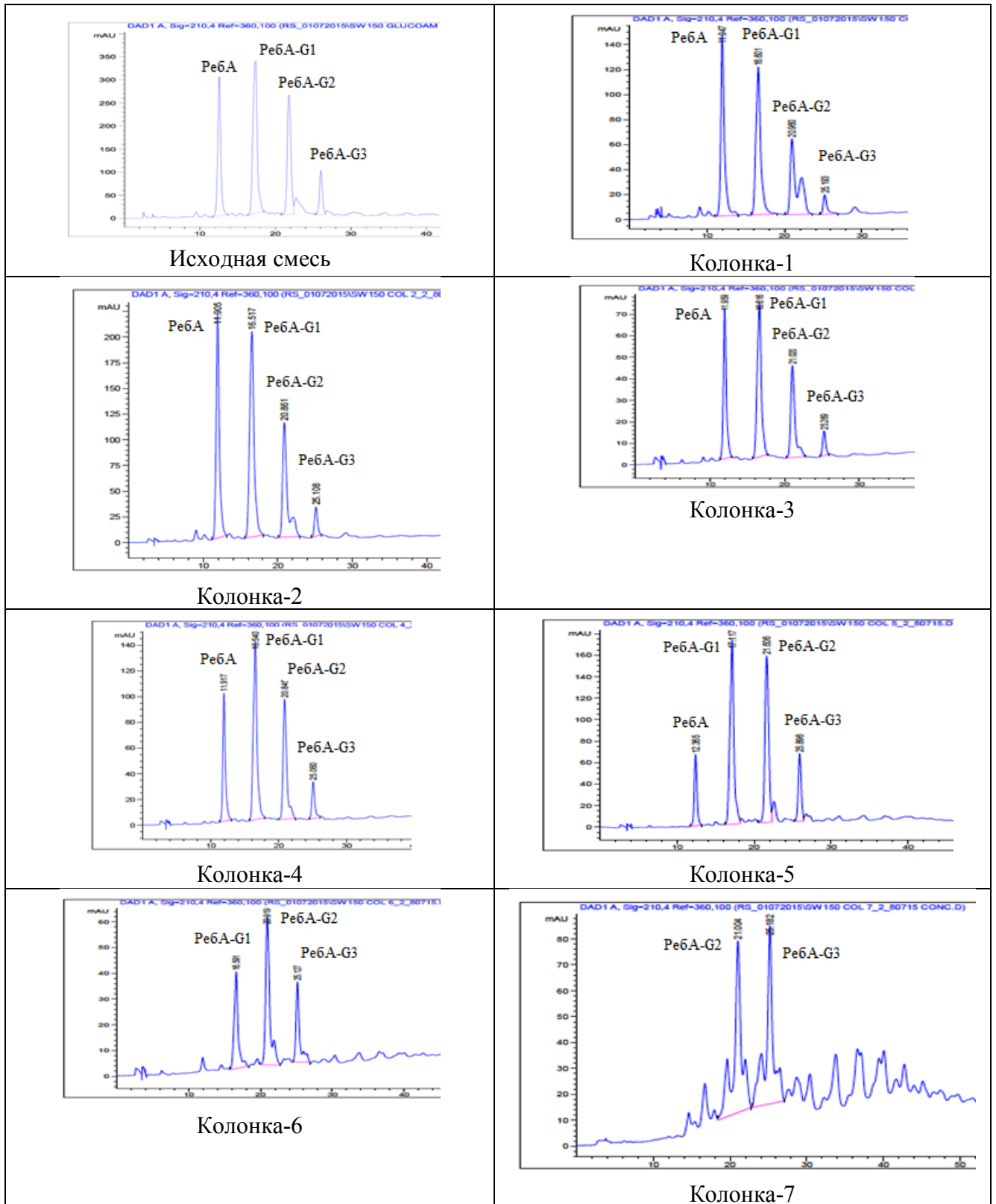


Рисунок 23 - ВЭЖХ-граммы накопления PeбA и его производных в различных колонках с Diaion HP-20

Все элюаты обработали активированным углем и высушивали под вакуумом.

Из суммарного продукта, полученного из седьмой колонки, приготавливали 20% раствор и снова пропускали через систему из 10-ти колонок и процесс осуществляли аналогично

вышеописанному. Таким путем удалось получить продукты с около 80%-ным содержанием моно- и ди-гликозилированных производных из четвертой и седьмой колонок (таблица 8).

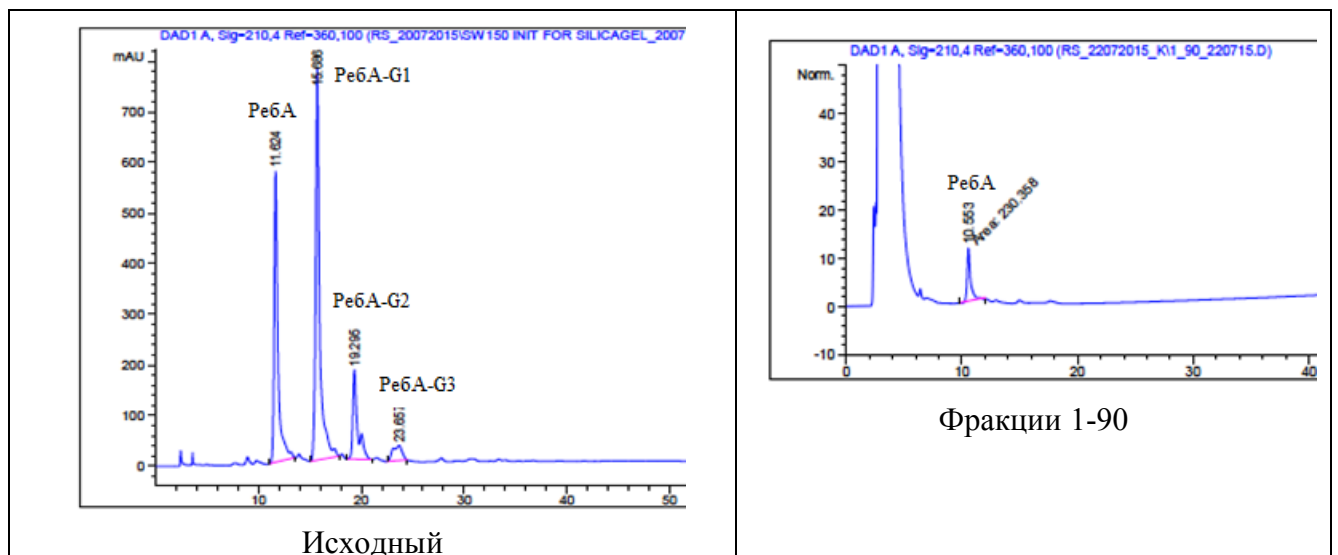
Таблица 8 - Разделение моно и ди-гликозилированных РебА на колонке с Diaion HP-20

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

Глюкозилированные производные РебА были очищены также на колонках с силикагелем. Продукт, предварительно обработанный β -амилазой, в виде 20% раствора (10 мл) пропустили через препаративную колонку с силикагелем объемом в 350 мл, используя смесь растворителей этилацетат-н-пропанол-вода в соотношении 7:2:1. Элюаты собирали фракциями по 10 мл через 3,5 объема. Начальные фракции элюата содержали немодифицированный РебА в качестве основного продукта, в то время как средние и последние - моно- и ди-гликозилированные производные, соответственно (таблица 9 и рисунок 23).

Таблица 9 - Распределение производных РебА на колонке с силикагелем

Гликозид	Количество гликозидов в разных колонках, %			
	Исходное	Фр-111-131	Фр-132-174	Фр-810-910
РебА	33,8	9,9	7,2	
РебА-G1	48,6	90,1	92,8	
РебА-G2	13,2			72,9
РебА-G3	4,4			27,1



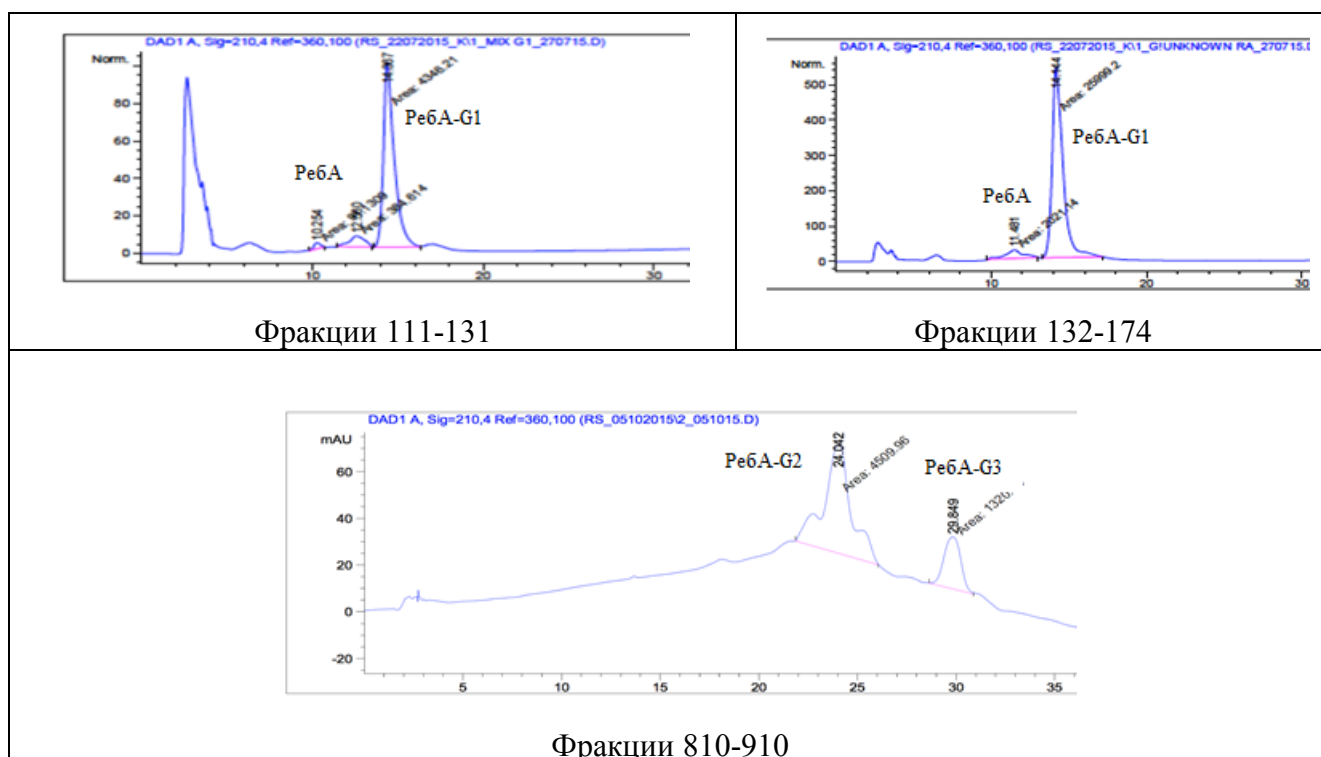


Рисунок 24 - ВЭЖХ-граммы накопления РебА и его производных в различных элюатах из колонок с силикагелем

3.2. Трансглюкозилирование РебD и РебM ЦГТазой

3.2.1. Очистка РебD и РебM

Очистка РебD была разработана непосредственно из коммерческого экстракта стевии, а также из концентрата гликозидов с сравнительно высоким содержанием РебD. Причем, содержание РебD в экстракте может варьироваться в зависимости от сорта растения стевии или технологической схемы получения экстракта.

В первом случае экстракт с содержанием 52% РебА и 1,2% РебD смешивали с тремя объемами 85-95% этанола в соотношении 1:3 и выдерживали при 55°C в течении 20-30 мин, затем охлаждали до комнатной температуры, добавляли затравку в виде 1% РебА и выдерживали в течении 12 часов, при постоянном перемешивании. Осадок отделяли фильтрованием и промывали абсолютным этанолом.

Выход кристаллов и степень чистоты РебА и РебD существенно зависит от их содержания в исходном экстракте, а также концентрации и количества этанола.

Осадок, представляющий собой смесь 95-96% РебА и 3,5-3,8% РебD, смешивали с тремя объемами абсолютного метанола и, после перемешивания при комнатной температуре в течение 1,5 часа, фильтровали, промывали безводным метанолом и высушивали под вакуумом при 70 °C.

Кристаллы содержали более чем 99% РебА.

Остаточный раствор выпаривали с целью удаления метанола и концентрировали до 33-34% содержания сухих веществ, из которого РебD кристаллизовали при 20-22°C в течение 24 часов. Осадок, содержащий около 80-85% РебD, отделяли фильтрованием.

Остаточный раствор также можно концентрировать до 60-65%-ного сиропа и оставлять в течение 2-3 суток, в течение которого происходит полное затвердевание массы. РебD (80-85% чистоты) можно экстрагировать 2-3 объемами безводного метанола.

Для дальнейшей очистки 80-85% РебD обрабатывали тремя объемами 60%-ного метанола при 50-55°C и, затем при комнатной температуре в течение 1,5-2,0 ч. После фильтрования и промывки с абсолютным метанолом, получили кристаллы РебD с чистотой в 98-99,2%.

Схема последовательности очистки приведена на рисунок 25.



Рисунок 25 - Получение РебD из коммерческого экстракта стевии

В случае с обогащенным с РебD (20-28%) и РебM (10-13%) экстрактом, первичную обработку осуществляли 70-75%-ным раствором метанола в соотношении 1:7-1:10 (вес/объем) при 22°C в течение 48-72 ч. Осадок 60%-ного РебD отделяли фильтрованием и промывали 15-тью объемами деионизированной воды при 65-68°C в течение 1 ч. 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 до более чем 95%-ного и более содержания РебD (рисунок 26). Очистку 80%-ной РебD можно осуществлять также промывкой горячей водой. Для этого, кристаллы суспендировали в восьми объемах воды, подогревали до кипячения и постепенно охлаждали до 70°C при постоянном перемешивании. Повторная обработка приводит к РебD с более 97% чистотой.

Сухой порошок обедненных фильтратов отличается высоким содержанием РебM ($\geq 50\%$) наряду с 38-39% РебD. С целью выделения и очистки РебM, продукт растворяли при нагревании в 15%-ном этаноле и перекристаллизовывали при комнатных температурах в течение 12 часов. Перекристаллизация кристаллов с содержанием 80% РебM из воды или 15%-ного этанола образует РебM с не менее чем 95% чистоты. Для этого, 80%-ный РебM суспендировали в восьми объемах воды, подогревали до кипячения и постепенно охлаждали до 70°C при постоянном перемешивании. Повторная обработка приводит к РебM с более 95% чистотой. Во втором случае, 80%-ный РебM растворяли в 15%-ном этаноле при нагревании, охлаждали до 22°C и перемешивали в течение 12 ч. РебM с более чем 95%-ной чистотой получали после фильтрования и сушки под вакуумом (рисунок 26).

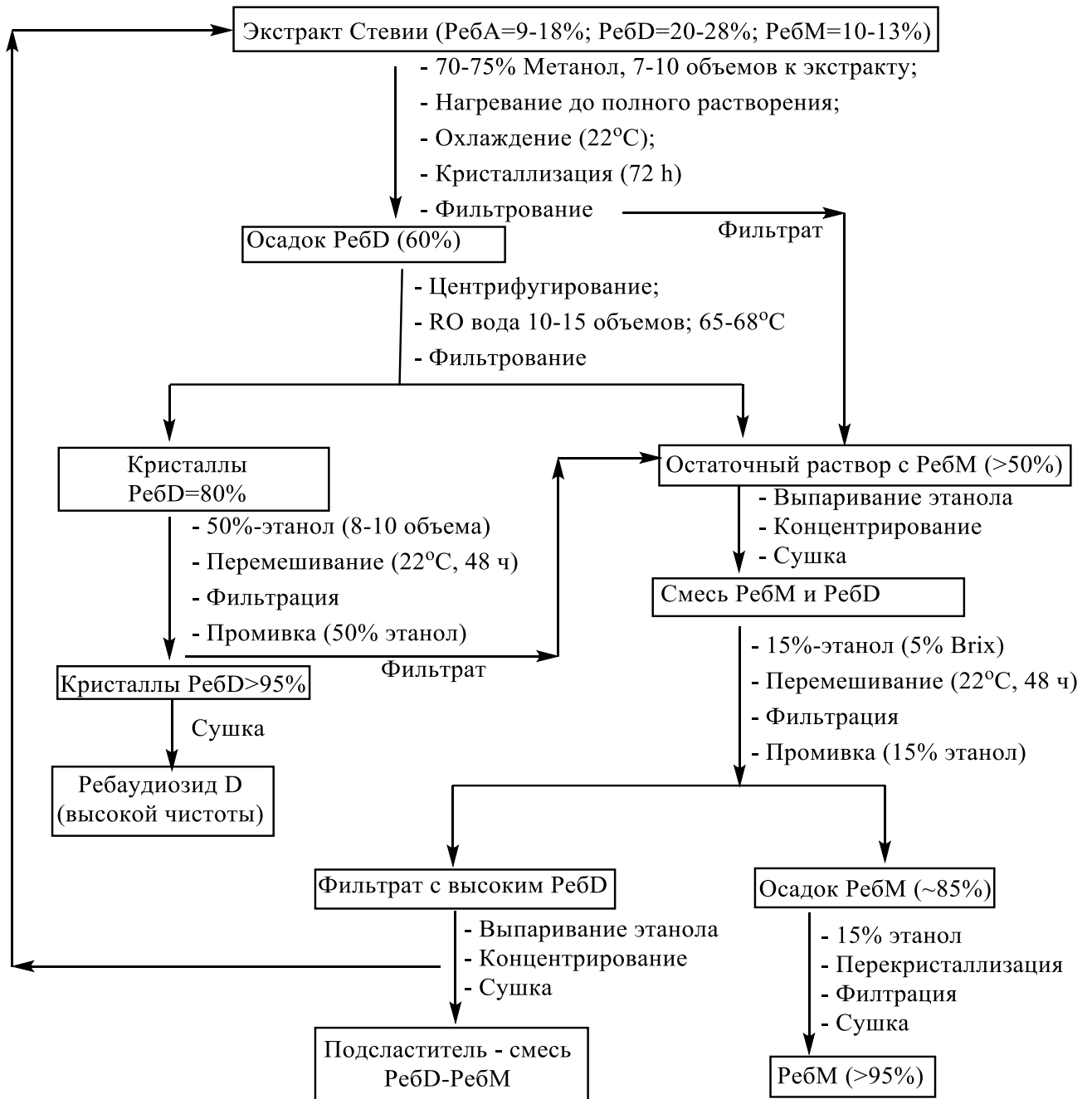


Рисунок 26 - Очистка РебD и РебМ из обогащенного экстракта

Высокоочищенный РебD представляет собой белый порошок без запаха с молекулярной массой 1129,15 и молекулярной формулой $C_{50}H_{80}O_{28}$. В 180-200 раз слаще сахара по сравнению с 10% раствором сахарозы. РебD проявляет максимальное собственное поглощение при 1730 см^{-1} . Точка плавления - $248-249^\circ\text{C}$, растворимость в воде около 0,2%, которая увеличивается при нагревании. Растворим в разбавленных растворах метанола, этанола, н-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, жевательных резинках, зубных пастах и т.д.

3.2.2. Трансгликозилирование РебD с помощью ЦГТазы

Трансгликозилирование РебD с помощью ЦГТазы проводили с использованием крахмала, γ -ЦД или их смеси в качестве донора глюкозных единиц (Abelyan, 2009; Abelyan, Abelyan, 2012; Чхан, Мойсеяк, 2019а).

10 г 96%-ной чистоты РебD и 12 г γ -ЦД (мол/мол к РебD) нагрели в 100 мл воды (рН 6,5-7,0) до полного растворения. Раствор охлаждали, суспендировали крахмал в соотношении 1:1 (в/в) к γ -ЦД и добавляли 2 ед/г ЦГТазу *Geobacillus stearothermophilus* и разжижение осуществляли при постепенном увеличении температуры до 80-85°C и выдерживали 20 мин при постоянном интенсивном перемешивании. Смесь охлаждали до 65°C и добавляли вторую порцию ЦГТазы в количестве 10 ед/г крахмала и реакцию трансгликозилирования осуществляли при 65°C в течение 48ч при постоянном перемешивании. По истечении этого времени реакционную смесь подвергали термообработке при 100°C в течение 10 мин для инактивации фермента, реакционную смесь обрабатывали активированным углем, фильтровали, очищали на крупнопористой адсорбционной смоле Diaion HP-20, концентрировали и высушивали (рисунок 27).

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

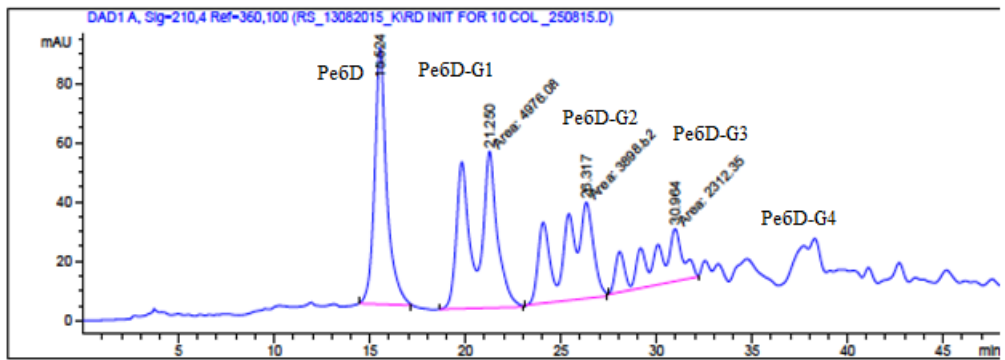
Через колонки пропускали 20%-ный раствор гликозилированного РебD в количестве 60-70% от общей адсорбционной емкости носителя.

Колонки по отдельности последовательно промывали тремя объемами воды и 10%-ного этанола с целью удаления сопутствующих веществ, и элюцию гликозидов осуществляли пятью объемами 50%-ного этанола.

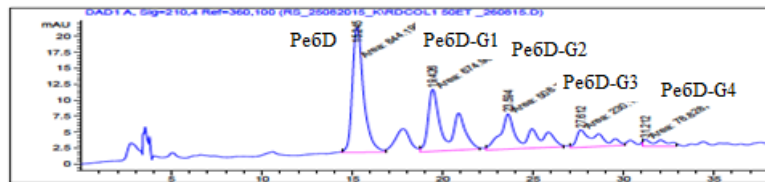
Аналогично РебА, в первых колонках преобладающим является непрореагировавший РебD, количество которого постепенно снижается от колонки к колонке. В то же время, распределение производных имеет обратную зависимость. Причем, сродство производных к носителю уменьшается с молекулярной массой. В колонках 6-10 гликозидов не обнаружили (таблица 10 и рисунок 27).

Таблица 10 - Соотношение РебD и производных в различных колонках

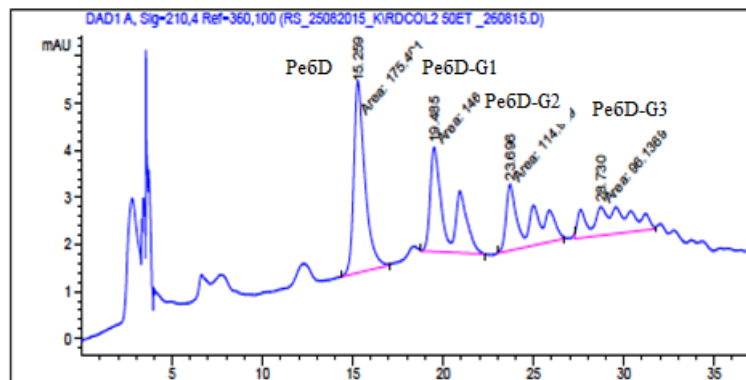
Гликозид	Количество гликозидов в разных колонках, %					
	Исходный	#-1	#-2	#-3	#-4	#-5
РебD	22,6	36,1	31,2	10,2	1,5	1,0
РебD-G1	32,1	28,9	26,5	25,3	10,2	8,1
РебD-G2	24,9	21,8	21,6	29,3	20,0	17,8
РебD-G3	12,4	9,8	17,0	22,4	29,6	14,1
РебD-G4	4,2	3,4	3,7	4,1	15,4	14,7
РебD-G5	2,1			8,7	11,7	25,1
РебD-G6	1,3				7,0	11,9
РебD-G7	1,1				4,6	7,3



Исходная реакционная смесь



Колонка-1



Колонка -2

Рисунок 27 - Продолжение

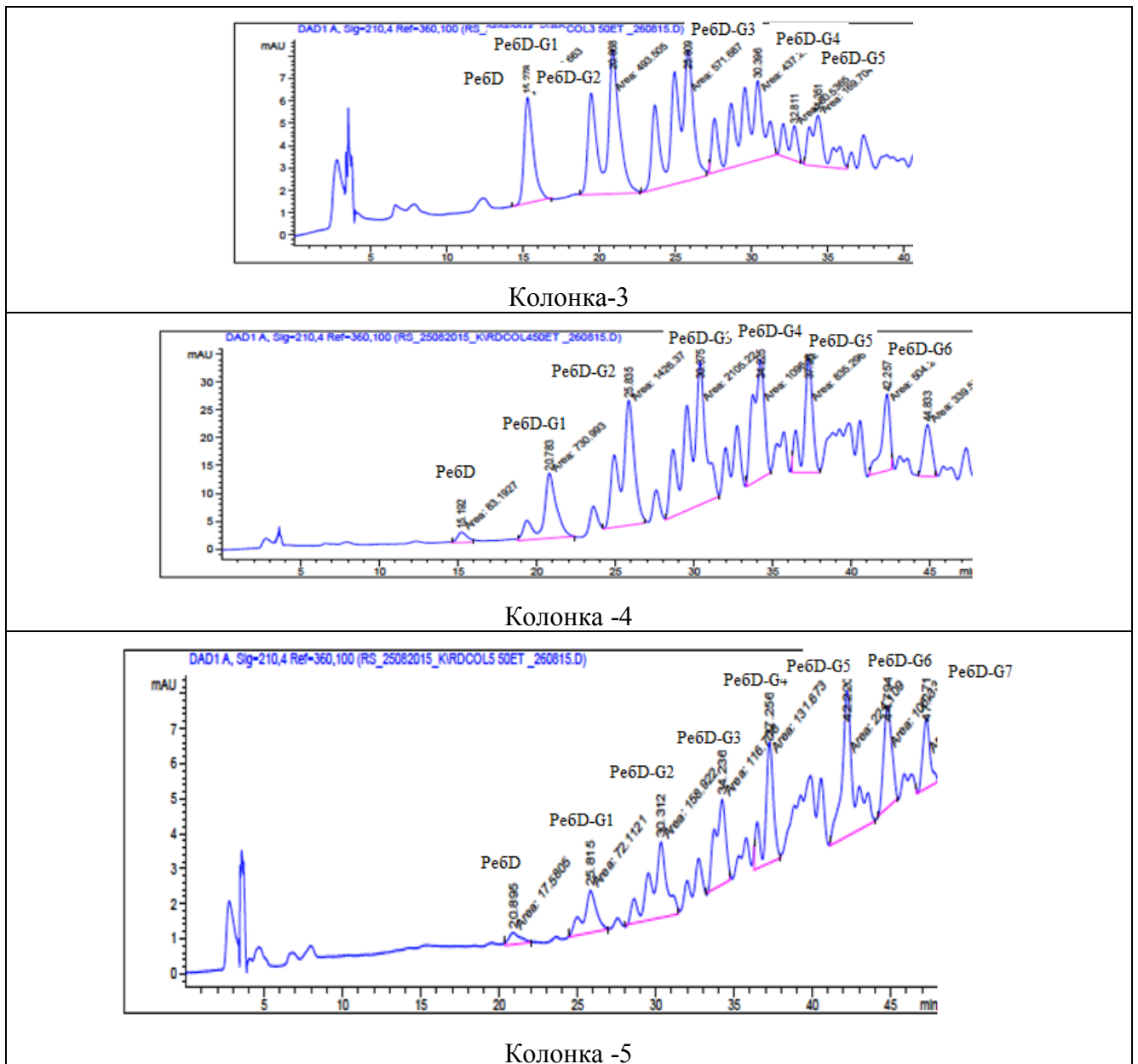


Рисунок 27 - ВЭЖХ-граммы накопления РебД и его производных в различных колонках с Diaion HP-20

Фракции из колонок 4 и 5 с низким содержанием непрореагировавшего РебД соединяли, высушивали досуха и обрабатывали β -амилазой аналогично вышеописанному в случае с РебА. Получали продукт с содержанием 2,3% непрореагировавшего РебД, 18,6% РебД-G1, 35,9% РебД-G2, 31,0% РебД-G3 и 12,2% РебД-G4. Через 7 часов гидролиза продукт содержал 20,0% непрореагировавшего РебД, 35,2% РебД-G1, 32,2% РебД-G2, и 12,6% РебД-G3 (рисунок 28).

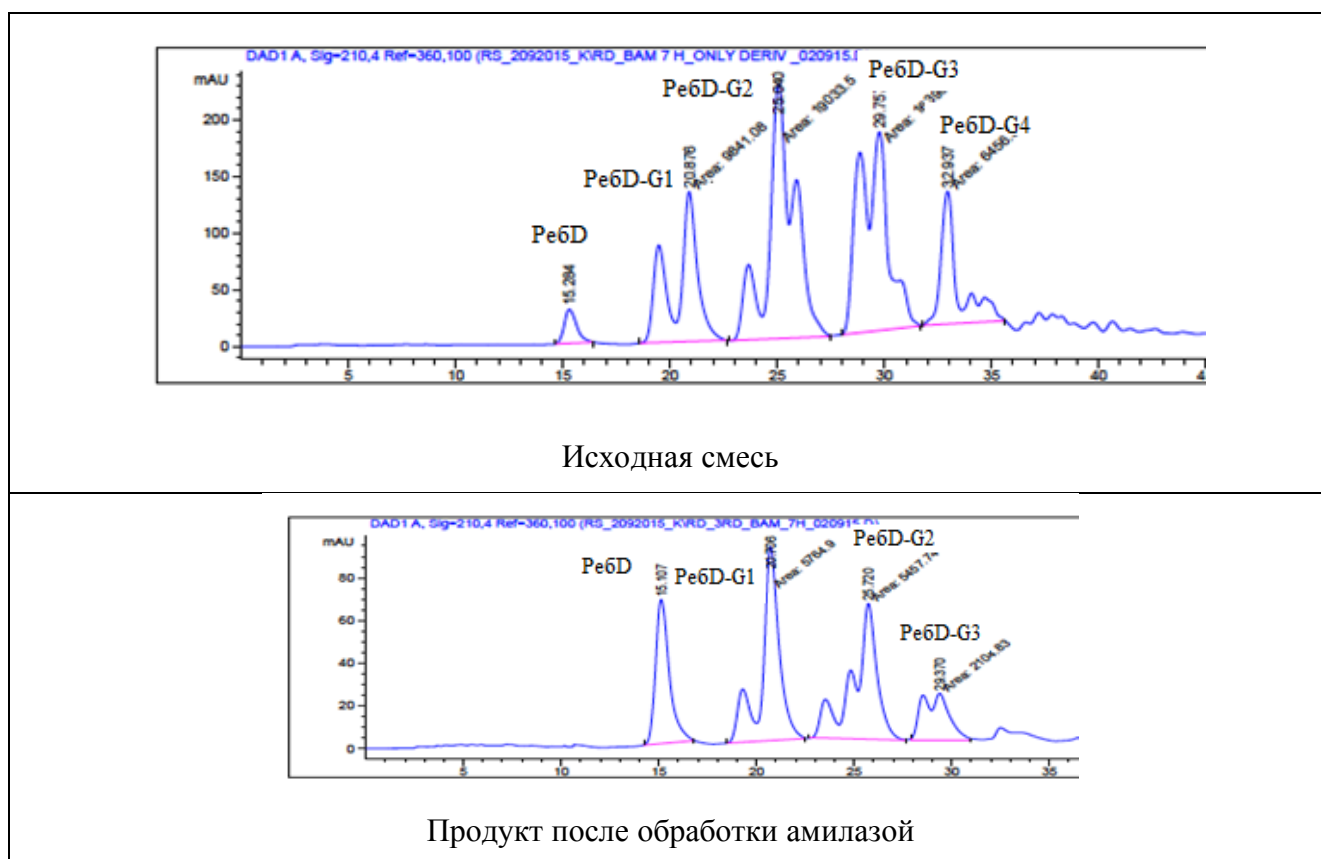


Рисунок 28 - ВЭЖХ-грамма объединенных фракций с низким содержанием интактного РебD после обработки β -амилазой

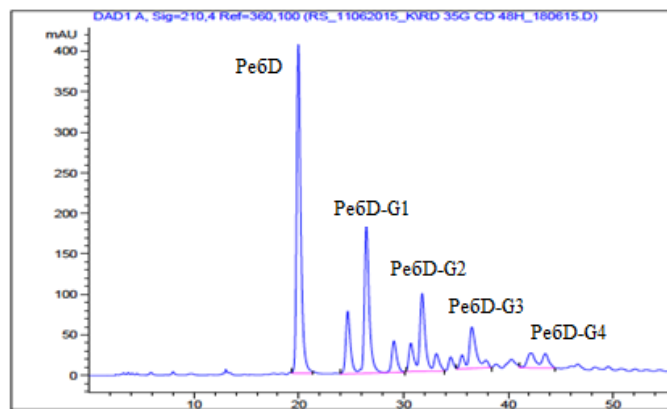
Для обогащения его моно- и ди-гликозилированными производными, смесь обрабатывали глюкоамилазой, как в случае с РебА и повторно очищали на десяти колонках с Diaion HP-20. Суммарные элюаты из колонок 1 и 2, и 4-5 после дополнительного гидролиза глюкоамилазой и очистки на крупнопористом адсорбенте содержали 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 (в/в). Например, 35 г γ -ЦД растворяли в 300 мл воды и добавляли 35 г 96%-ого РебD. Смесь нагревали до полного растворения, охлаждали до комнатной температуры и добавляли 10 ед/г γ -ЦД ЦГТазы *Geobacillus stearothermophilus*. Реакцию трансгликозилирования осуществляли при 65°C в течении 48 ч при постоянном перемешивании. Реакцию останавливали кипячением и обработкой активированным углём. Результаты анализов суммированы в таблице 11 и рисунке 29. Показано, что с повышением концентрации γ -ЦД количества высокомолекулярных производных увеличивается, т.е. происходит более быстрое и глубокое трансгликозилирование. Реакционные

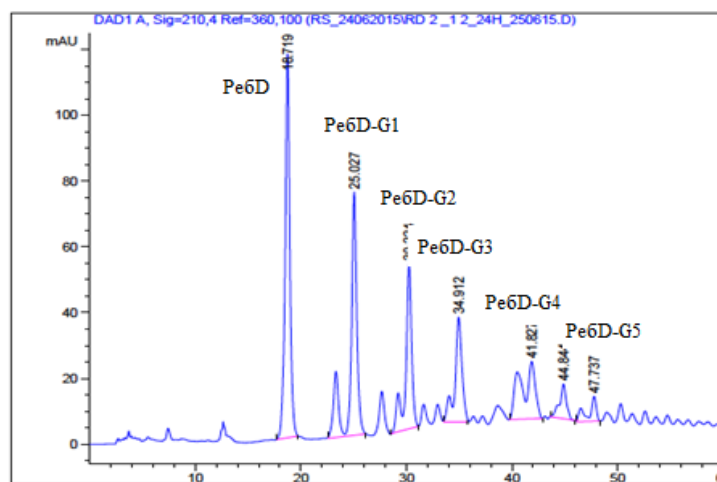
смеси обрабатывали аналогично как в случае с использованием крахмала или смеси крахмала с γ -ЦД.

Таблица 11 - Соотношение гликозидов после трансгликозилирования РебD в присутствии различных количеств γ -ЦД

Гликозиды	Количество гликозидов, %		
	РебD/ γ -ЦД=1:1 (в/в)	РебD/ γ -ЦД=1:2 (в/в)	РебD/ γ -ЦД=1:3 (в/в)
РебD	36,8	28,4	23,8
РебD-G1	31,2	27,6	24,1
РебD-G2	16,7	15,8	16,4
РебD-G3	9,5	11,8	12,7
РебD-G4	5,8	12,7	17,2
РебD-G5		3,7	5,8



РебD/ γ -ЦД=1:1 (в/в)



РебD/ γ -ЦД=1:2 (в/в)

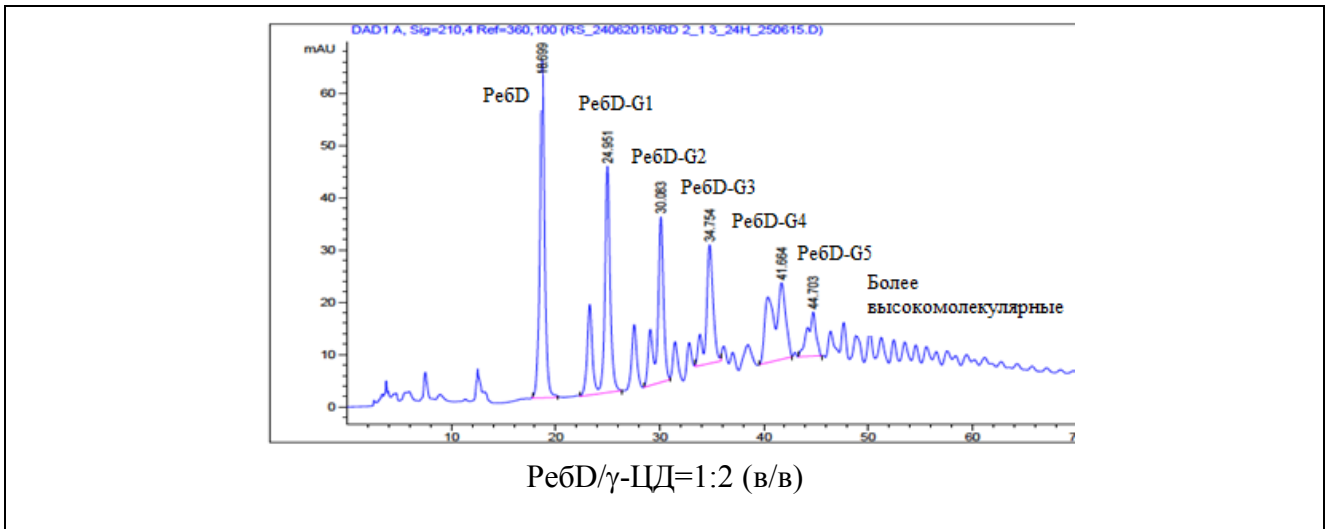


Рисунок 29 - ВЭЖХ-грамма трансгликозилированного РебД ЦГТазой в присутствии γ -ЦД

3.2.3. Трансгликозилирование РебМ с помощью ЦГТазы

Аналогичным с РебД способом реализовывали трансгликозилирование РебМ с помощью ЦГТазы *Geobacillus stearothermophilus* и с использованием γ -ЦД. Через 48 ч реакции реакционная смесь содержала РебМ, РебМ-G1, РебМ-G2 и РебМ-G3 в соотношении 3,8/2,9/1,6/1,0 (рисунок 30) (Абелян, 2009; Абелян, 2001; Чхан, Мойсяк, 2019)

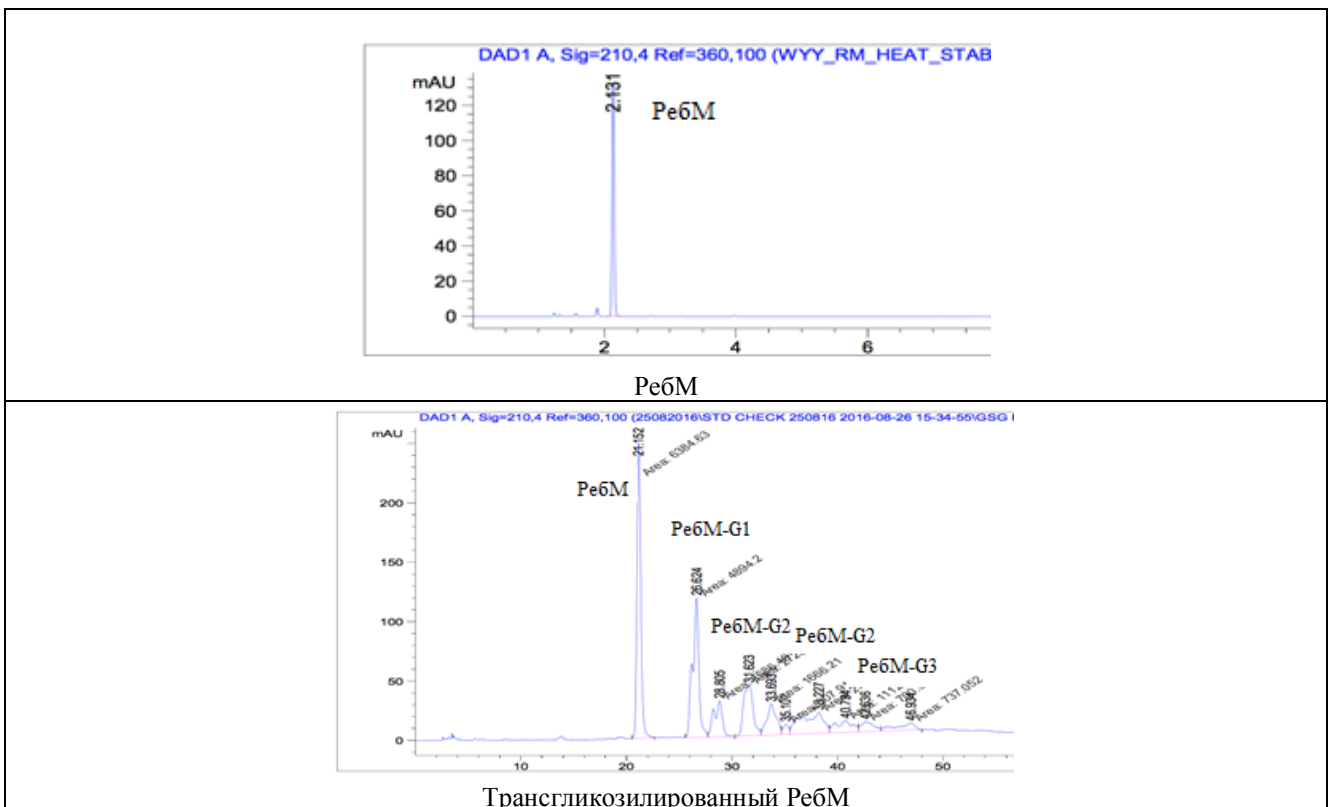


Рисунок 30 - ВЭЖХ-грамма интактного и трансгликозилированного РебМ ЦГТазой в присутствии γ -ЦД

ГЛАВА 4

ТРАНСФРУКТОЗИЛИРОВАНИЕ РЕБА

β-ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗОЙ

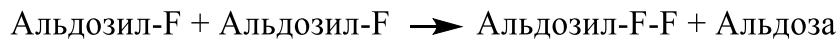
С целью улучшения вкусовых характеристик, РеБА подвергали также β-2,6-трансгликозилированию с помощью β-фруктофуранозидазы из *Arthrobacter sp.* К-1 и сахарозы в качестве источника фруктозных единиц (Chkhan, 2019)

Для β-фруктофуранозидазы реакция гликозилирования схематично можно представить следующим образом:

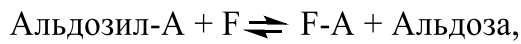
1. Гидролиз



2. Самоферментативная реакция

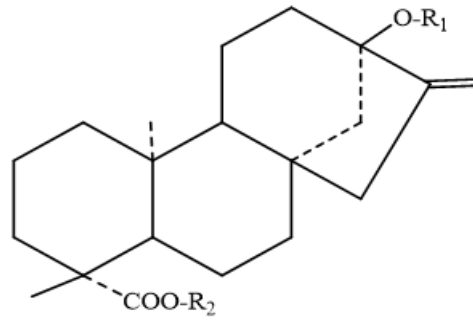


3. Трансферная реакция к акцептору



где F является остатком фруктозы, а A - акцептором.

β-2,6-Трансфруктозилирование приводило к существенному улучшению вкусовых качеств стевииозида и рубузозида. β-2,6-трансфруктозилирование протекало в положении 19-О-глюкозной единицы. Для этого фермент (50 единиц) инкубировали с сахарозой (2,0М) в присутствии стевииозида или рубузозида (0,05М) в 50мМ фосфатного буфера (рН 6,5; 31 мл) при 40°C в течение 16 ч. Реакцию останавливали нагреванием при 100°C 10 мин, центрифугировали и реакционную смесь очищали на Diaion HP-20 и силикагеле. Полученные производные были идентифицированы как β-D-фруктофуранозил-2,6-β-D-глюкопиранозил эстер стевииолбиозида и β-D-фруктофуранозил-2,6-β-D-глюкопиранозил эстер стевииолмонозида для стевииозида и рубузозида, соответственно (рисунок 31). При этом, сладость компонентов не увеличилась, однако вкусовые характеристики обоих производных существенно превосходили таковые исходных гликозидов. Особенно это было ярко выражено для фруктозилированного стевииозида, качество вкуса, горечь и послевкусие которого были сопоставимы с аспартамом (таблица 12) (Ishikawa et al., 1991).



	R_1	R_2
Стевиозиде	$-\beta\text{-D-Glc}^2 - \beta\text{-D-Glc}$	$-\beta\text{-D-Glc}$
Ребаудиозид А	$-\beta\text{-D-Glc} \begin{matrix} 2 \\ \beta\text{-D-Glc} \\ 3 \\ \beta\text{-D-Glc} \end{matrix}$	$-\beta\text{-D-Glc}$
Рубузозид	$-\beta\text{-D-Glc}$	$-\beta\text{-D-Glc}$
Фруктозил-Реба	$-\beta\text{-D-Glc} \begin{matrix} 2 \\ \beta\text{-D-Glc} \\ 3 \\ \beta\text{-D-Glc} \end{matrix}$	$-\beta\text{-D-Glc}^6 - {}^2\beta\text{-D-Fru}$
Фруктозил-Стевиозид	$-\beta\text{-D-Glc}^2 - \beta\text{-D-Glc}$	$-\beta\text{-D-Glc}^6 - {}^2\beta\text{-D-Fru}$
Фруктозил-Рубузозид	$-\beta\text{-D-Glc}$	$-\beta\text{-D-Glc}^6 - {}^2\beta\text{-D-Fru}$

Рисунок 31- Фруктозилированные гликозиды стевии (Ishikawa et al., 1990)

Таблица 12 - Органолептическая оценка фруктозилированных производных (Ishikawa et al., 1990)

Компонент	Горечь	Послевкусие	Общее качество вкуса
Фруктозил-стевиозид	4,6	4,2	2,9
Фруктозил-рубузозид	2,6	2,7	1,5
Стевиозид	3,3	3,5	1,5
Реба	3,7	3,5	1,9
Аспартам	4,7	4,3	3,0
Оценка была проведена в образцах растворов с концентрациями, соответствующими по сладости 5% раствору сахарозы. 5, наиболее лучший; 4, значительно лучше; 3, лучше; 2, немного лучше; 1, хуже.			

Реакция трансфруктозилирования стевиозида с помощью β -фруктофуранозидазы из *Arthrobacter sp.* К-1 (200-400 единиц) в присутствии сахарозы в молярном соотношении 0,5-1,0 - 20-40 при 40°C в течение 24 ч следовала механизму Пинг-Понг (Ping-Pong) Bi-Bi (рисунок 32) (Suzuki et al., 2002).

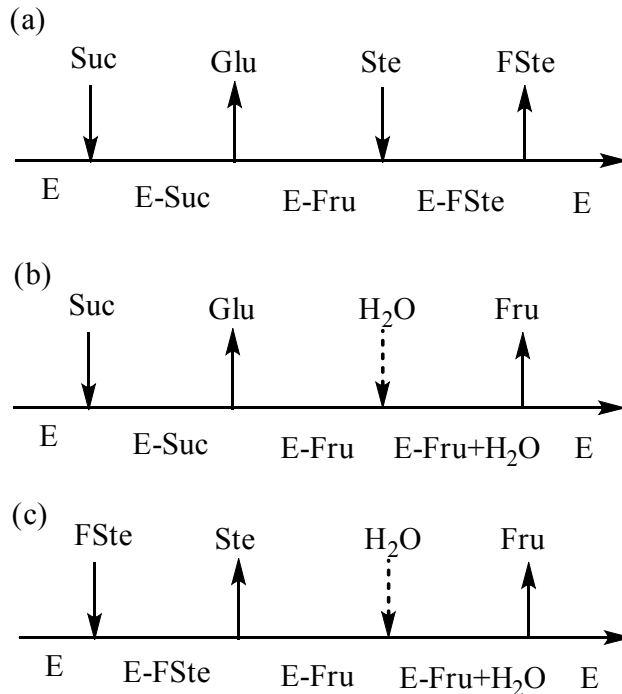


Рисунок 32 - Схематическая диаграмма механизма Пинг-Понг Bi-Bi для каждой реакции. (а) Синтез фруктозил-стевиозида; (б) Гидролиз сахарозы; (с) Гидролиз фруктозил-стевиозида (Suzuki et al., 2002)

Свободный фермент (E) вступает в реакцию с сахарозой (Suc) с образованием первого комплекса (E-Suc). Затем из комплекса E-Suc высвобождается глюкоза (Glu), с образованием второго комплекса E-Fru. Этот комплекс взаимодействует со стевиозидом, что приводит к образованию третьего комплекса E-FSte и затем высвобождения FSte. В этой системе наряду с реакцией трансфруктозилирования, протекает гидролиз сахарозы и фруктозил-стевиозида. Синтез фруктозил-стевиозида подавляется глюкозой и фруктозой. Концептуальная схема общего механизма реакции показана на рисунок 33.

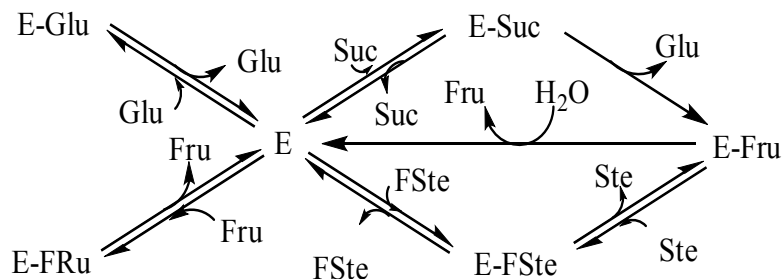


Рисунок 33 - Концептуальная схема общего механизма реакции синтеза фруктозил-стевиозида (Suzuki et al., 2002)

В наших экспериментах с целью трансфруктозилирования РебА, β -фруктофуранозидазу получали из *Arthrobacter sp.* К-1 (FERM BP-3192) (Япония), *Arthrobacter sp.* CICC 10137 (Коллекция промышленных культур, Китай), *Microbacterium saccharophilum* NBRC 108778 (Япония), *Aspergillus niger* IMI 303386 (Великобритания), *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 26077 (США), *Aureobasidium pullulans* DSM 2404 (ФРГ).

Для этого раствор РебА (0,05 М; 0,48 г), сахарозы (2,0 М; 6,85 г) и β -фруктофуранозидазы (50 единиц на 1 г сахарозы) в 20 мл воды (рН 6,5-7,0) инкубировали при 40°C в течение 20 ч при постоянном перемешивании. Фермент инактивировали при 100°C в течении 10 мин, и реакцию смесь очищали на адсорбционной смоле Diaion HP-20, используя воду для промывки и этанол для элюирования, аналогично вышеописанному в случае с глюкозилированными производными.

Наилучшие результаты по выходу фруктозилированного РебА получены со штаммом *Arthrobacter sp.* К-1, фермент которого гидролизовал моно- β -2,6-фуранозилированный в положении 19-О-глюкозильного остатка производную РебА (RebA-F) с достаточно высоким выходом, т.е. данная β -фруктофуранозидаза строго специфична к позиции С-19 (рисунок 34). Поэтому, все дальнейшие эксперименты проводили с применением данного фермента.

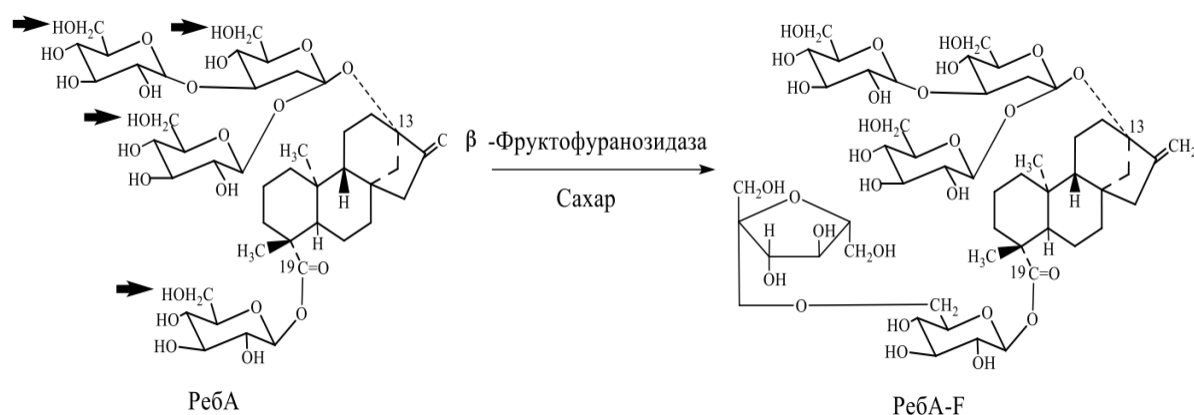


Рисунок 34 - Трансфруктозилирование РебА

Выход продукта реакции трансфруктозилирования зависит в значительной степени от концентрации и соотношения акцептора, донора и фермента, а также от времени. Трансфруктозилирование проходит более эффективно при избытке сахарозы. Выход моно-фруктозилированного производного составляет 70%, при условии количества компонентов реакции 0,5% РебА, 5% сахарозы и времени протекания реакции 17 часов.

Дальнейшая очистка полученного компонента осуществляется методом перекристаллизации из метанола.

4.1. Культивирование *Arthrobacter sp.* К-1

Для получения β -фруктофуранозидазы использовали культуру *Arthrobacter sp.* К-1.

Культуру *Arthrobacter sp.* К-1 поддерживали на питательном агаре "Nissui", содержащий 0,5% дрожжевого экстракта, 1,0 % полипептона и 0,5% NaCl (pH 7,0).

Культивирование в глубинных условиях в колбах для получения инокулянта реализовали при 30°C в течении 48 ч на жидкой питательной среде, содержащей 1,2% дрожжевого экстракта, 0,8% полипептона, 4,0% лактозы, 0,4% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 7,0).

Культуральная жидкость в количестве 420 см³ переносили в 10 дм³ ферментёр с питательной средой.

- 5,0% кукурузный экстракт,
- 3,0% сахараза,
- 0,4% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,
- 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 7,0)

Культивирование осуществляли при 37°C в течении 24 ч, в условиях постоянной аэрации и контроля pH в пределах 6,8-7,2 с помощью 2Н NaOH.

Культуральную жидкость центрифугировали при 12,000 оборотах (20 мин, 4°C), отфильтровывали через целлюлозно-ацетатный фильтр 0,45мм и сконцентрировали на ультрафильтрах. Концентрат внеклеточного фермента хранили при 4°C.

β -Фруктофуранозидазную (ФФаза) активность определяли в КЖ и УФ по количеству восстанавливающих сахаров, освободившихся в результате гидролиза сахаразы.

4.2. Влияние концентрации раствора и соотношение РеБА и сахаразы на выход фруктозил-РеБА (Fru-РеБА)

Раствор сахаразы в воде и фермент ФФаза инкубировали в присутствии различных концентраций РеБА при 40°C. Количество фруктозил-РеБА в реакционной смеси определялось с помощью ВЭЖХ. Результаты объединены в таблице 13.

Таблица 13 - Влияние концентрации акцептора и времени реакции на формирование Fru-РеБА (общая концентрация сухих веществ - 35%; 40°C; pH 6,5)

Соотношение (вес/вес)		Время реакции, час	Трансфруктозилирование, % фруктозил-РеБА
РеБА	Сахараза		
1	2	24	5,4
		48	20,1
		72	32,0
1	3	24	6,9
		48	24,6
		72	36,5

Таблица 13 - продолжение

1	4	24	9,3
		48	29,2
		72	38,5
1	5	24	23,3
		48	32,7
		72	41,2
1	6	24	24,7
		48	35,4
		72	44,3
1	7	24	33,6
		48	38,7
		72	48,8

Выход трансфруктозилирования существенно зависит от концентрации акцептора, донора и фермента, а также от времени реакции. Получение фруктозил-РеБА более эффективно при избыточных количествах сахарозы. Так, если при массовом соотношении РеБА к сахарозе 1:1 степень трансфруктозилирования за 24 ч была всего 5,4%, то при соотношении 1:5, достигает до больше, чем 23%. Степень трансфруктозилирования существенно увеличивается с продолжительностью реакции, как это показано для 24 ч, 48 ч и 72 ч (таблица 13 и рисунок 35).

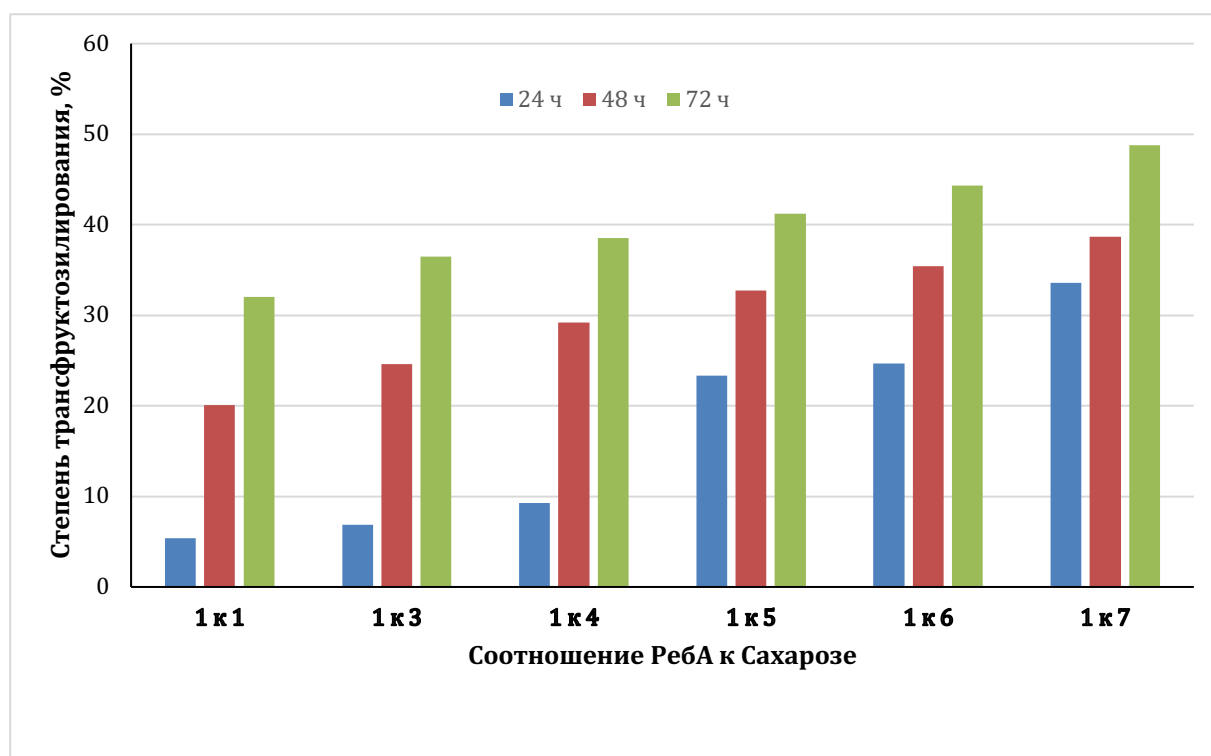


Рисунок 35 - Влияние соотношения сахарозы и РеБА, а также времени на степень трансфруктозилирования

Выявлено, что трансфруктозилирование протекает более эффективно в концентрированных растворах. Чем выше общая концентрация сахарозы и РеБА, тем больше выход фруктозилированного РеБА (рисунок 36).

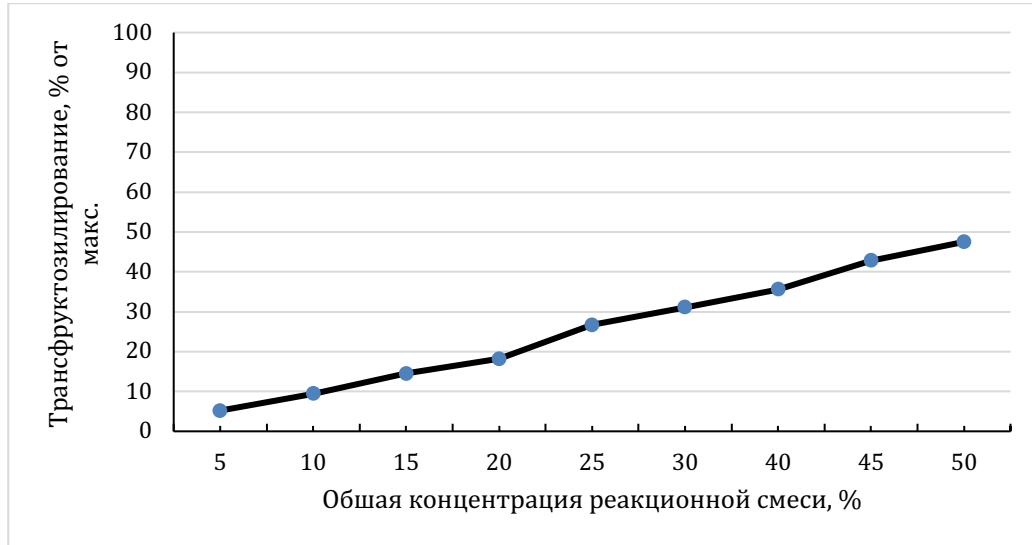


Рисунок 36 – Влияние концентрации реакционной смеси на степень трансфруктозилирования (соотношение сахарозы к РеБА = 10 : 1 в/в, 48 ч; 40С⁰)

4.3. Влияние рН, температуры и количества фермента

С целью определения влияния рН на трансфруктозилирование, β -фруктофуранозидазу инкубировали с раствором 1%-ного РеБА и 10%-ной сахарозы при 40С в течении 15 ч при различных рН. Выявлено, что реакция трансфруктозилирования наиболее эффективно протекает в интервале рН 6,5-8,0 (рисунок 37).

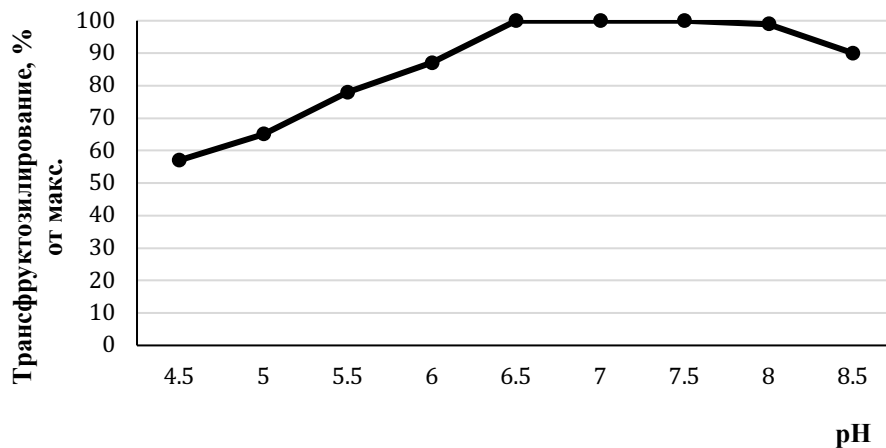


Рисунок 37 - Влияние рН на трансфруктозилирование РеБА с помощью β -фруктофуранозидазы из *Arthrobacter sp.* К-1

Для выявления наилучшей температуры, фермент инкубировали при различных температурах с раствором 1%-ного РебА и 10%-ной сахарозы при рН 6,7 в течение 15 часов при постоянном перемешивании. Реакция имеет четко выраженный температурный оптимум при 40°C. Отклонение от этого приводит к резкому падению эффективности реакции (рисунок 38).

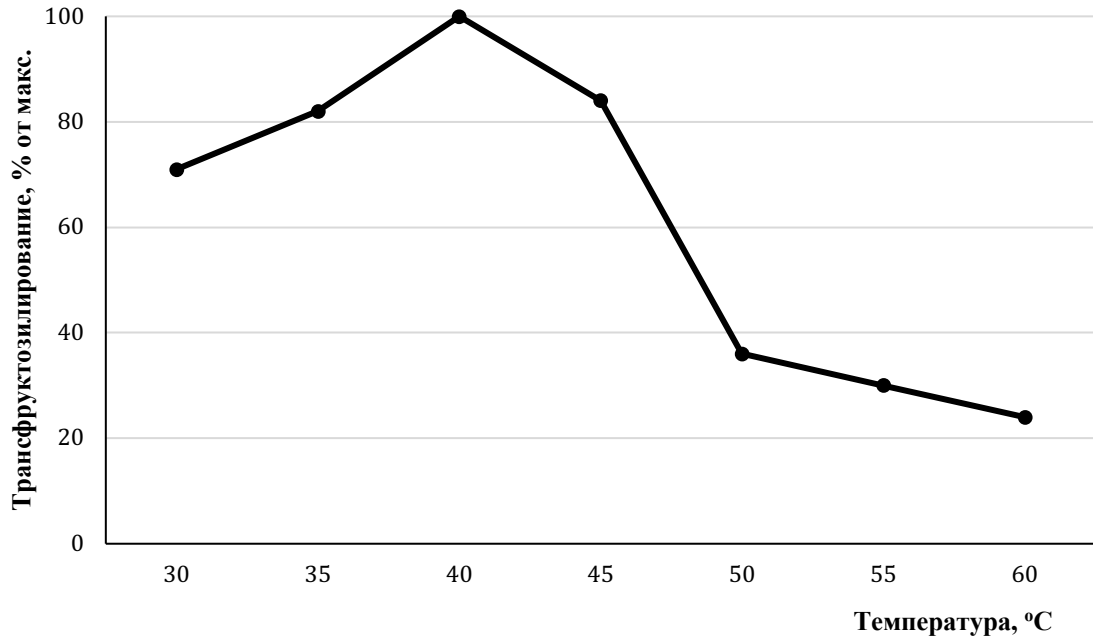


Рисунок 38 - Влияние температуры на трансфруктозилирование РебА с помощью β -фруктофуранозидазы из *Arthrobacter sp.* К-1

Выявлено также, что с увеличением количества фермента происходит ускорение реакции. Наиболее оптимальным оказались количества 50-100 единиц на 1 г сахарозы (рисунок 39).

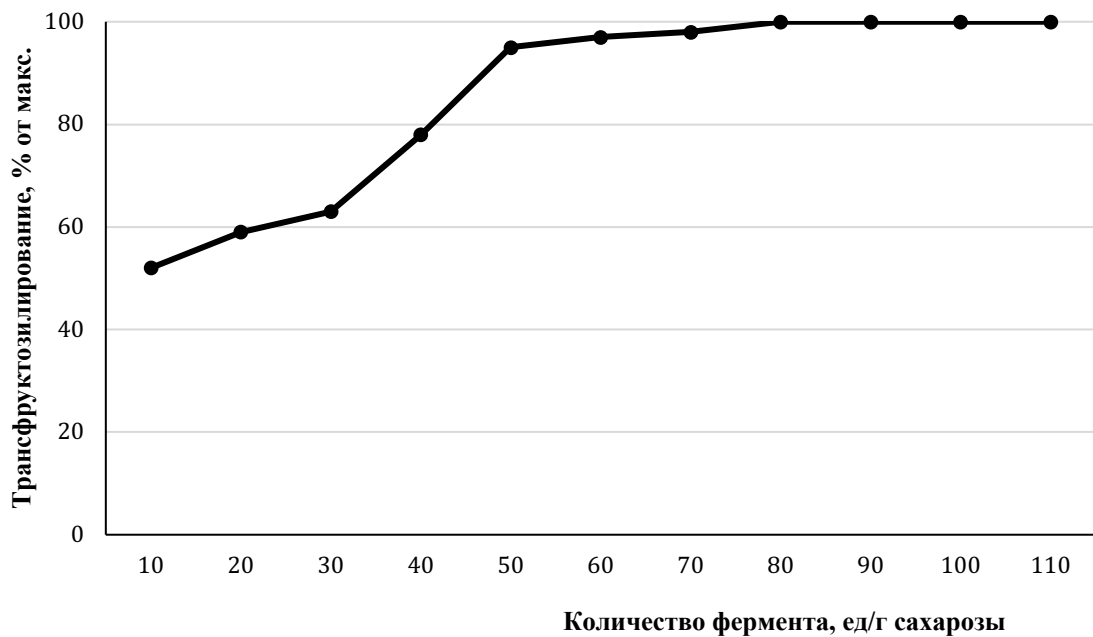


Рисунок 39 - Влияние количества β -фруктофуранозидазы на трансфруктозилирование РебА

4.4. Выделение и очистка фруктозилированного РебА

Раствор 49 г РебА и 340 г сахарозы растворяли в 1 дм³ деионизированной воды, добавляли 80 ед/г сахарозы β -фруктофуранозидазы и реакцию осуществляли при 40°C в течение 48 ч при постоянном перемешивании.

Реакцию останавливали кипячением, охлаждали, добавляли равный объем абсолютного этанола и осадок отделяли фильтрованием. Фильтрат обрабатывали активированным углем (1%) при 50-60°C в течение 20 мин для обесцвечивания. Этанол выпаривали и остаток очищали на двух колонках с макропористой смолой Diaion HP-20. Колонки последовательно промывали 10-ю объемами воды и 10%-ным этанолом, и адсорбированные гликозиды элюировали 5-ю объемами 70%-ного метанола. Метанол удаляли вакуум-выпариванием и содержание гликозидов проверяли методом ВЭЖХ на колонке Zorbax-NH₂ (4мм x 250 мм) при температуре колонки 40°C с использованием смеси ацетонитрил-вода в соотношении 80:20 (объем/объем) в качестве подвижной фазы, скорости потока 1 мл/мин и DAD детектора, УФ (210 нм). Элюат из первой колонки представляет собой смесь основного количества не модифицированного РебА, в то время как второй содержит более чем 80% фруктозил-РебА (рисунок 40).

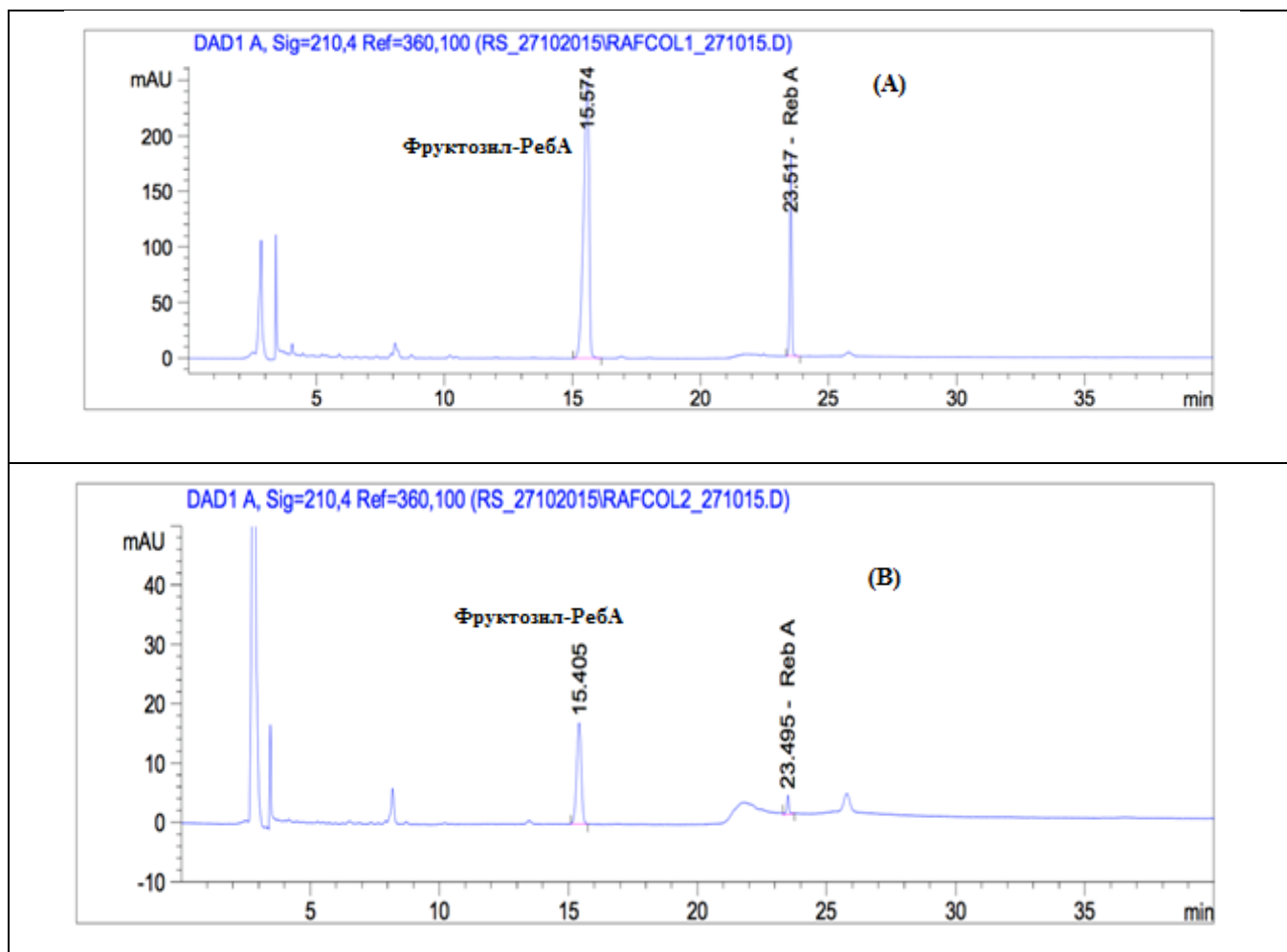


Рисунок 40 - ВЭЖХ-граммы элюатов из первой (А) и второй колонок (В)

Дальнейшую очистку фруктозил-РебА осуществляли кристаллизацией и перекристаллизацией из минимального количества абсолютного метанола, в котором он практически нерастворим. Немодифицированный РебА остается в фильтрате, а чистота белых кристаллов фруктозил-РебА достигает до 95% и более (рисунок 41).

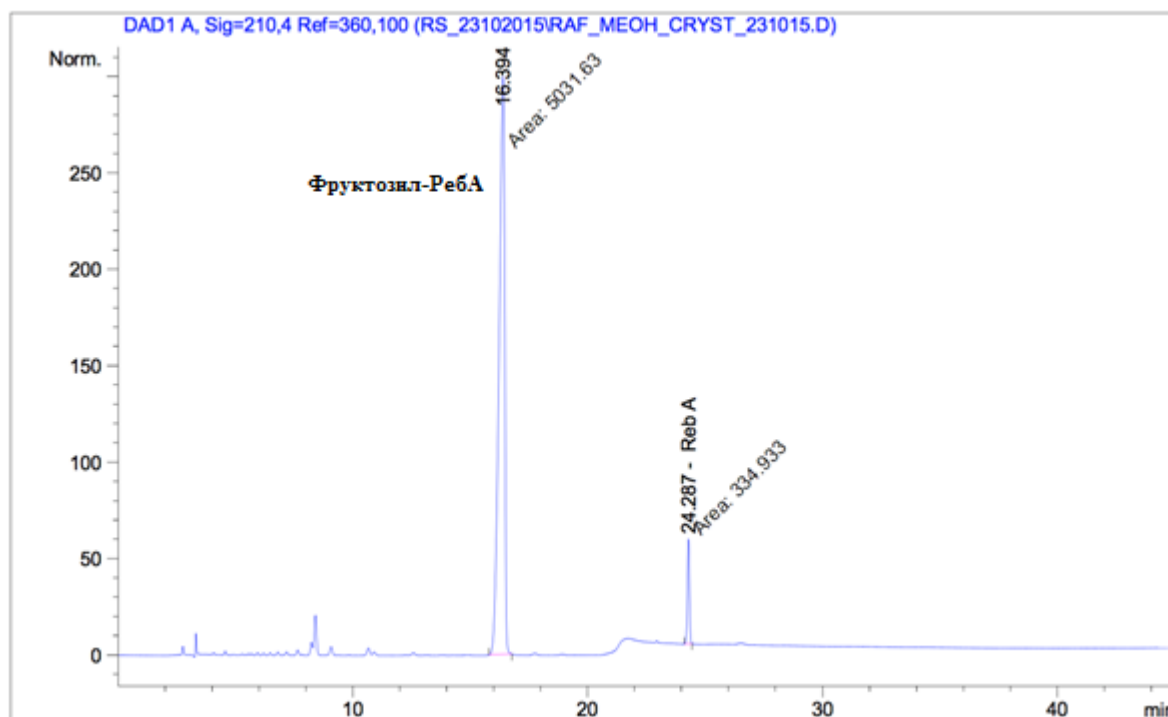


Рисунок 41 - ВЭЖХ-грамма фруктозил-РебА после перекристаллизации из абсолютного метанола

Для точной идентификации продуктов использовали масс-спектрометрический (МС) анализ в системе Agilent 6110 Series Quadrupole LC/MS с колонкой силикагель C18.

Фруктозил-РебА, $C_{44}H_{70}O_{23}$, β -2,6-фруктозилированный у 19-О-глюкозильной группы, и идентифицирован как β -D-фруктофуранозил-2,6- β -D-глюкопиранозильный эфир стевииол-13-О- β -D-глюкопиранозил-1,2- β -D-глюкопиранозил-1,3- β -D-глюкопиранозид с молекулярной массой 1128 (рисунок 42).

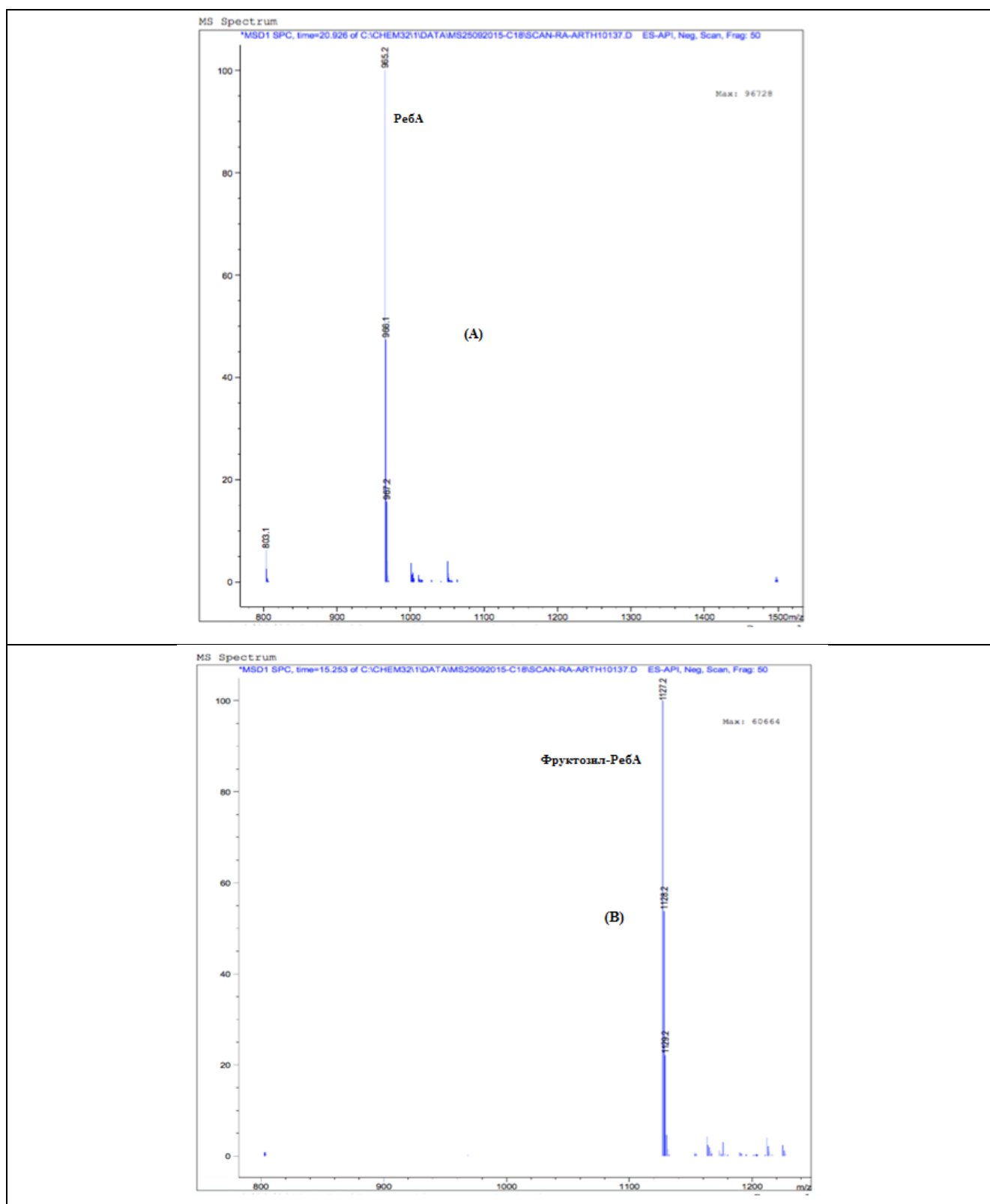


Рисунок 42 - MSD анализ РебА (А) и фруктозил-РебА (В)

Улучшено качество вкусового профиля, послевкусия, горечи и приятности вкуса для фруктозилированного РеБА (Чхан, Мойсеяк, 2019б). Полученные вкусовые характеристики сопоставимы с вкусовыми характеристиками аспартама и гораздо лучше, чем у РеБА. Наблюдалось некоторое уменьшение горечи и улучшение вкусового профиля относительно РеБА, однако послевкусие производного было несколько сильнее, чем у РеБА. Интересно, что вкусовые характеристики фруктозилированного стевииозиды сопоставимы с таковыми аспартама и превосходят РеБА. Однако, фруктофуранозная связь не стабильна и может гидролизироваться в условиях приготовления пищи.

ГЛАВА 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ВКУСОВЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И СТРУКТУРОЙ ГЛИКОЗИДОВ СТЕВИИ

Качество и интенсивность сладости гликозидов стевии зависит от их строения и, в особенности, типа и количества углеводных единиц в их структуре, а также характера и конфигурации связей (Patent US WO 2017/106577, 2017). Известные в настоящее время гликозиды приведены в таблице 14.

Таблица 14 - Строение и некоторые характеристики природных гликозидов стевии

Соединение	19-О-гликозил (R ₂)	13-О-гликозил (R ₁)	Растворимость в воде %	Сладость к сахару	Качество вкуса
<u>Глюкозные остатки отсутствуют на С-19</u>					
Стевиол	H	H	0,02	НО	Горький
Стевиолмонозид	H	β-Glu	НО	НО	Горький
Стевиолбиозид	H	β-Glu (2,1)- β-Glu	0,03	90	Горький
РебВ	H	β-Glu (2,1)- β-Glu β-Glu (3,1)	0,03	150	Горький
Дулкозид В	H	β-Glu (2,1)- α-Rha β-Glu (3,1)	0,58	30	Горький
<u>Один глюкозный остаток на С-19</u>					
Стевиол-19-О-гликозид	β-Glu	H	НИ	НИ	НИ
Рубузозид	β-Glu	β-Glu		110	Горький
Стевиозид	β-Glu	β-Glu (2,1)- β-Glu	0,13	210	Менее горький

РебА	β -Glu	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	0,80	210	Лучше стевиозида
РебА2	β -Glu	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (6,1)			
РебС	β -Glu	β -Glu (2,1)- α -Rha β -Glu (3,1)	0,21	30	Горький
РебF (Ксилозил)	β -Glu	β -Glu (2,1)- β -Xyl β -Glu (3,1)		200	Менее горький (более балансируе нный)
РебF2 (Ксилозил)	β -Glu	β -Glu(1,2)-[β -Xyl(1,3)]Glu(β -	НИ	НИ	Похож на РебF
РебR	β -Glu	β -Xyl (3,1)- β -Glu β -Glu (2,1)	НИ	НИ	Похож на РебF
Дулкозид А	β -Glu	β -Glu (2,1)- α -Rha	0,5	30	Горький
РебG	β -Glu	β -Glu(3,1)- β -Glu	НИ	НИ	Сладкий
РебH	β -Glu	β -Glu (2,1)- α -Rha(3,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	НИ	НИ	Сладкий
РебQ	β -Glu	α -Glu(1,4)- β -Glu(1,2)[Glc(β -1,3)]Glc(β -1-	НИ	300- 350	Сладкий
РебQ3	β -Glu	α -Glu(1,4)- β -Glu(1,3)[Glc(β -1,2)]Glc(β -1-	НИ	НИ	Сладкий
РебI2	β -Glu	α -Glu(1,3)- β -Glu(1,2)[Glc(β -1,3)]Glc(β -1-	НИ	НИ	Сладкий
РебL	β -Glu	β -Glu(1,6)- β -Glu(1,2)[Glc(β -1,3)]Glc(β -1-	НИ	НИ	Сладкий
РебА3	β -Glu	β -Glu(1,2)-[β -Fru(2,3)]Glc(β -1-	НИ	НИ	Сладкий
Стевиозид D (Куиновозидил)	β -Glu	β -Qui(1,2)- β -Glu	НИ	НИ	Горький
Стевиозид E (Куиновозидил)	β -Glu	β -Qui(1,2)-[β -Glu(1,3)]Glu(β -	НИ	НИ	Горький
Стевиозид E2 (Куиновозидил)	β -Qui	β -Glu(1,2)-[β -Glu(1,3)]Glu(β -	НИ	НИ	Горький
Стевиозид F (Ксилозил)	β -Glu	β -Xyl(1,2)- β -Glu	НИ	НИ	Похож на стевиозид

Два β -1,2-глюкозных остатка на C-19

РебКА (Стевиозид-А)	β -Glu (2,1)- β -Glu	β -Glu	НО	НО	НО
РебЕ	β -Glu (2,1)- β -Glu	β -Glu (2,1)- β -Glu	1,70	170	Слегка горький; лучше РебА
РебV	β -Glu (2,1)- β -Glu	β -Glu(3,1)- β -Glu			

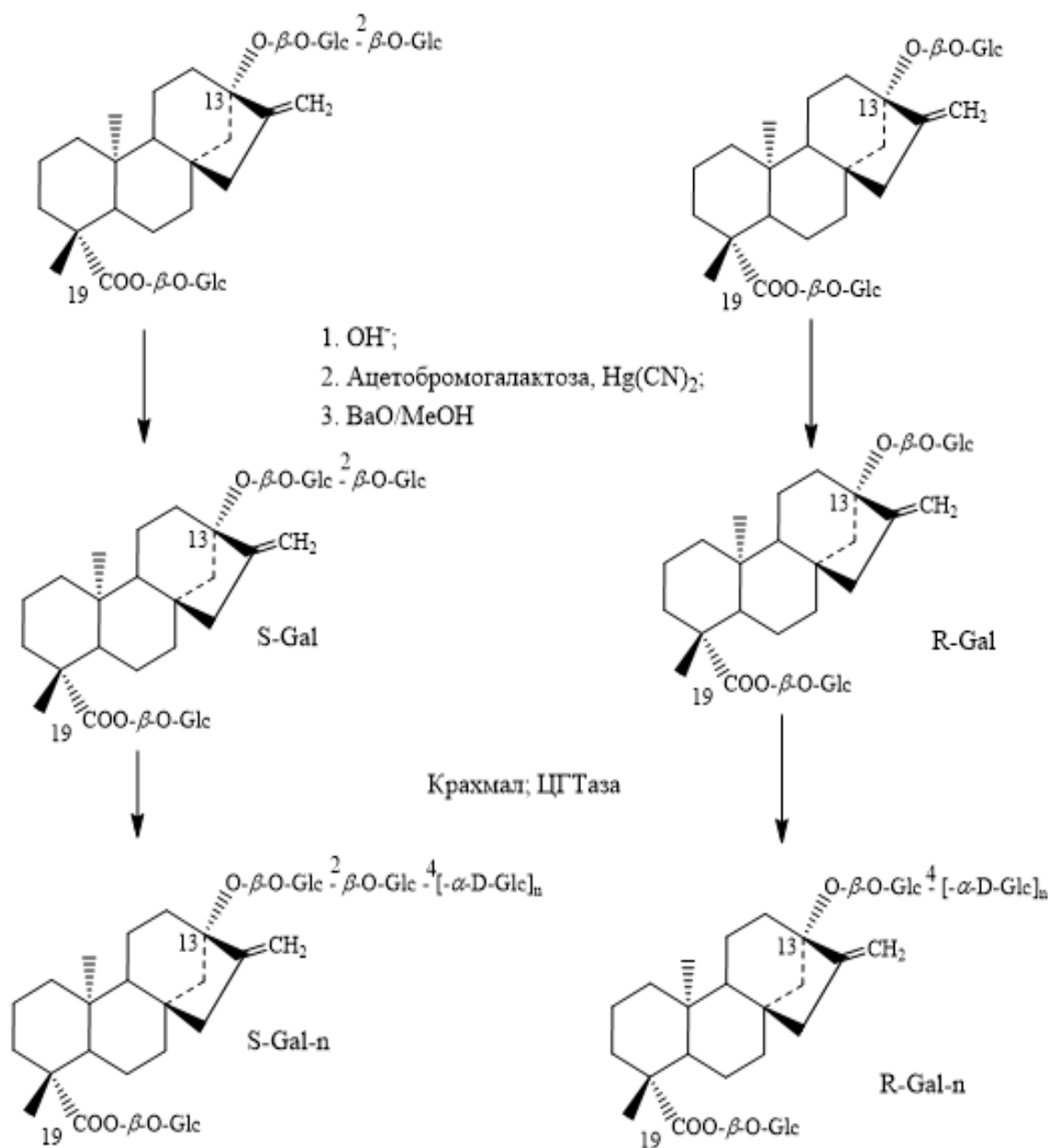
Продолжение таблица 14

РебD	β -Glu (2,1)- β -Glu	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	0,03	220	Слегка горький; лучше РебА
РебК	β -Glu (2,1)- β -Glu	β -Glu (2,1)- α -Rha β -Glu (3,1)	НО	НО	НО
РебС (изомер)	β -Glu (2,1)- α -Rha	β -Glu(3,1)- β -Glu	НО	НО	НО
РебS	β -Glu (2,1)- α -Rha	β -Glu(2,1)- β -Glu	НО	НО	НО
РебJ (Рамнозил)	β -Glu (2,1)- α -Rha	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	НО	НО	НО
РебF3 (Ксилозил)	β -Xyl(1,6)- β -Glu	β -Glu(1,2)- β -Glu	НО	НО	НО
Нет тривиального названия (Куиновозил)	β -Qui(1,2)- β -Glu	β -Glu(1,2)-[β -Glu(1,3)]Glu(β -	НО	НО	НО
<u>Два β-1,3-глюкозных остатка на C-19</u>					
Стевиозид В	β -Glu (3,1)- β -Glu	Glu	НО	НО	НО
РебI	β -Glu (3,1)- β -Glu	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	НО	НО	Горечь очень маленькая
РебU	β -Glu(1,6)- α -Ara	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	НО	НО	НО
<u>Три глюкозных остатка на C-19</u>					
РебW	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	β -Glu(3,1)- β -Glu	НО	НО	НО
РебM	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	0,1	250	Близко к сахару. Очень низкая горечь
РебQ2	α -Glu(1,2)-[α -Glu(1,4)]Glc(β 1-	β -Glu(2,1)- β -Glu	НО	НО	НО
РебI3	β -Glu(1,2)-[β -Glu(1,6)]Glc(β 1-	β -Glu(2,1)- β -Glu	НО	НО	НО
РебT	β -Glu(1,2)-[β -Glu(1,3)]Glu(β -	β -Glu (3,1)- β -Glu β -Xyl(1,2)	НО	НО	НО
РебN	β -Glu (2,1)- α -Rha β -Glu (3,1)	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)		300 - 350	Похож на РебD

Продолжение таблица 14

РебО	β -Glu (3,1)- β -Glu(2,1) α -Rha (3,1)- β -Glu	β -Glu (2,1)- β -Glu β -Glu (3,1)	НО	НО	Похож на РебN
Нет тривиального названия (Куиновозил)	β -Glu(1,2)-[β -Glu(1,3)]Glu(β -	β -Qui(1,2)-[β -Glu(1,3)]Glu(β -	НО	НО	НО
Нет тривиального названия (Ксилезил)	β -Xyl(1,2)-[β -Glu(1,3)]Glu(β -	β -Glu(1,2)-[β -Glu(1,3)]Glu(β -	НО	НО	НО

Взаимосвязь между структурой и качеством сладости была изучена для некоторых производных гликозидов стевии (Esaki et al., 1984; Kamiya et al., 1979). Было выявлено, что замена 19-О-гликозильной группы стевиозида и рубузозида β -галактозильным остатком (галактозил-стевиозид; SGal, галактозил-рубузозид; RGal) приводит к существенному ухудшению вкусовых качеств. Удлинение цепочки на позиции 13-О-гликозильных единиц в SGal и RGal до четырех остатков существенно улучшило качество сладости (SGal-1 и -2; RGal-1, -2 и -3), в то время как более трансгликозилирование привело к ухудшению вкусовых характеристик (рисунок 43). Обработкой с помощью β -амилазы были получены продукты с высоким содержанием SGal-1 и -2, а также RGal-1 и -2, обладающих более тонким вкусом сладости.



	n	N	RS	QT
1	0	2	143	0
SGal	0	2	129	-2
SGal-1	1	3	236	+4
SGal-2	2	4	289	+3
SGal-3	3	5	143	-1
SGal-4	4	6	152	-3

	n	N	RS	QT
1	0	1	114	-2
RGal	0	1	104	-4
RGal-1	1	2	167	-1
RGal-2	2	3	312	+3
RGal-3	3	4	203	+1
RGal-4	4	5	111	-3

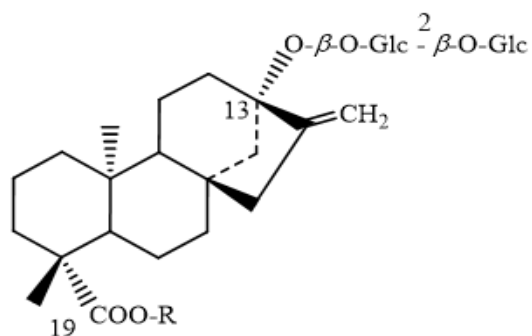
N - количество глюкозных единиц на 13-O.

RS - сладость по отношению к сахарозе

QT - качество сладости. (+) - лучше; (-), - хуже

Рисунок 43 - Продукты трансгликозилирования стевииозида и рубузозида (Ohtani, Yamazaki, 2002)

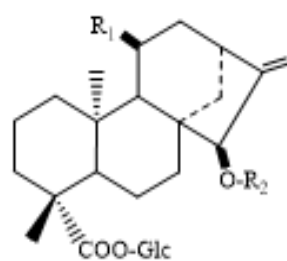
Замена глюкозы на другие сахара также приводит к изменению как силы сладости, так и вкусового профиля (рисунок 44) (Esaki et al., 1984; Kamiya et al., 1979; Ohtani, Yamazaki, 2002).



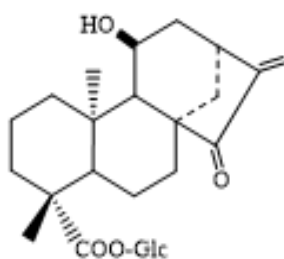
	RS	Вкус
β -D-Glc	255	Сладкий
β -D-Xyl	160	Сладкий
α -L-Ara	285	Сладкий
α -L-Man	285	Сладкий
β -L-Glc	210	Сладкий
α -L-Rha	200	Горько-сладкий
β -L-Qui	110	Горько-сладкий

Рисунок 44 - Сладость модифицированных гликозидов стевии (Ohtani, Yamazaki, 2002)

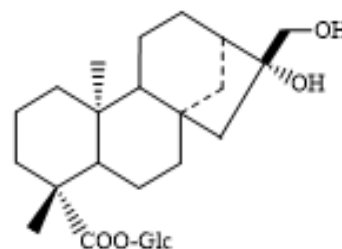
Таким образом, количество и тип сахаров на позициях С-13 и С-19 является определяющим для сладости и ее качества, так как все монодесмозиды, паникулозиды и суавиозиды являются безвкусными и не обладают сладкими характеристиками (рисунок 45).



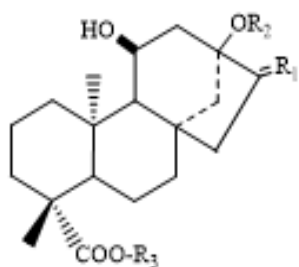
QT	R ₁	R ₂
1. -	H	H
2. -	OH	H
3. -	H	β -D-Glc



4. (QT: (-))



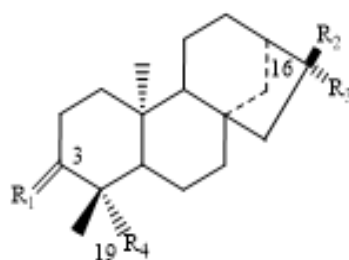
5. (QT: (-))

Паникулозиды I-V из *Sterea paniculata* и *S. orata*

QT	R ₁	R ₂	R ₃
6. +	CH ₃ , H	β -D-Glc	β -D-Glc
7. +	CH ₃ , H	β -D-Glc(2,1)- β -D-Glc	β -D-Glc
8. +	CH ₂	H	β -D-Glc
9. -	CH ₂	β -D-Glc	H
10. -	CH ₂	β -D-Glc(2,1)- β -D-Glc	H

6. Дигидрорубузозид; 7. Дигидростевниозид; 8. Стевниозид 19- β -D-O-глюкозид

Искусственные производные гликозидов стевниола



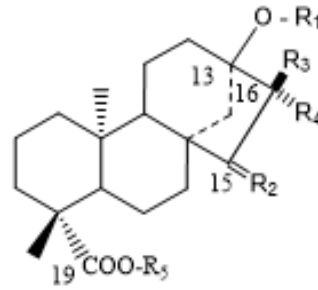
	QT	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Паникулозид IV	-	H ₂	OH	CH ₂ OH	COO- β -D-Glc
Суавнозид А	+	α -OH	OH	CH ₂ O- β -D-Glc	CH ₃
Суавнозид Е	-	H ₂	CH ₂ OH	OH	COO- β -D-Glc
Суавнозид К	B	H ₂	CH ₂ O- β -D-Glc	OH	COO- β -D-Glc
Сугерозид	-	O	OH	CH ₂ O- β -D-Glc	CH ₃

Рисунок 45 - Структуры различных гликозидов (QT - качество вкуса) (Ohtani, Yamazaki, 2002)

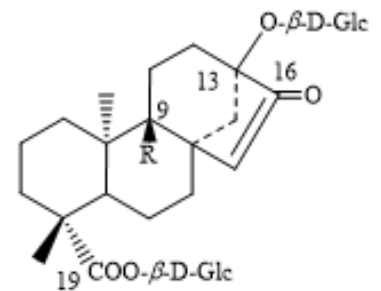
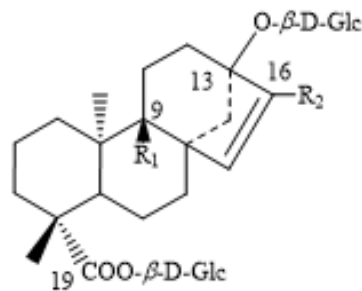
Установлены лишь пару исключений для суавиозидов А и I, которые обладают слегка сладким вкусом, несмотря на отсутствие сахаров в позициях С-19 и С-13, соответственно. Химическое производное стевииола, стевииозид 19-β-D-О-глюкозид также обладает сладким вкусом и примерно 50 раз более сладкий, чем сахароза, но сопровождается горечью. Гидрирование двойной связи (С-15) вызывает значительное снижение сладости и горечи полученной смеси 16-α- и β-метил производных и дигидро-рубозозида. Та же тенденция наблюдалась в случае с дигидро-стевииозидом, сладость которого существенно ниже исходного гликозида (Kasai et al., 1981).

В случае с суавиозидом В и рубозозида, гидроксирование двойной связи при С-9 и С-16 соответственно привело к уменьшению сладости. Все моно- и ди-гидроксированные производные по С-16 и/или С-17 позиции рубозозида (суавиозиды G, I, L, 16-β-гидрокси-суавиозид L, и 16-α-гидрокси-суавиозид L), обладали лишь небольшой сладостью или горечью. Суавиозид F (19-деглюко-16-ОН производное) горький без сладости. Введение кетогруппы при С-15 (15-оксо-суавиозид L и 15-оксо-16-эпи-суавиозид L) приводит к переходу сладкого вкуса в горький, в то время как введение эндоциклической двойной связи при С-15 (суавиозид J, 9-гидрокси-суавиозид J, суавиозид H и суавиозид 9-гидрокси-суавиозид H) приводит к уменьшению сладости. 9,17-Дигидроксированное соединение (9-гидрокси-суавиозид J) является безвкусным. Суавиозиды P и M с модифицированным скелетом стевииола обладают горьким вкусом (рисунок 46) (Ohtani, Yamazaki, 2002; Chaturvedula, Prakash, 2011b).

Таким образом, по всей вероятности, каждая часть молекулы стевииола является необходимой для обладания сладким вкусом.

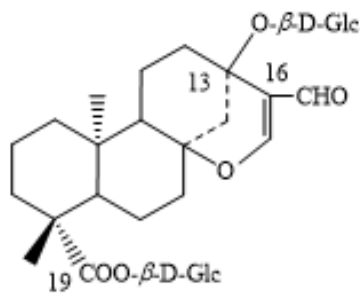


	QT	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Суавиозид F	B	β -D-Glc	H ₂	OH	CH ₃	H
Суавиозид G	+	β -D-Glc	H ₂	OH	CH ₃	β -D-Glc
Суавиозид I	+	H	H ₂	OH	CH ₂ OH	β -D-Glc
Суавиозид L	+	β -D-Glc	H ₂	H	CH ₂ OH	β -D-Glc
15-окси-суавиозид L	B	β -D-Glc	O	H	CH ₂ OH	β -D-Glc
15-окси-16-ери-суавиозид L	B	β -D-Glc	O	CH ₂ OH	H	β -D-Glc
16 β -гидрокси-суавиозид L	+	β -D-Glc	H ₂	OH	CH ₂ OH	β -D-Glc
16 α -гидрокси-суавиозид L	+	β -D-Glc	H ₂	CH ₂ OH	OH	β -D-Glc

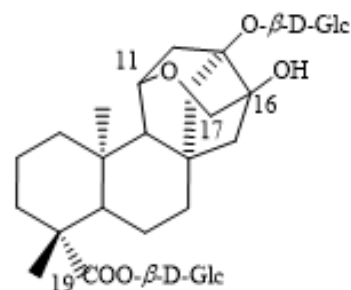


	QT	R ₁	R ₂
Суавиозид J	+	H	CH ₂ OH
9-гидрокси-суавиозид J	-	OH	CH ₂ OH
Суавиозид H	+	H	CHO
9-гидрокси-суавиозид H	-	OH	CHO

	QT	R
Суавиозид O	+	H
9-гидрокси-суавиозид O	-	OH



Суавиозид P
(QT: (B))



Суавиозид M
(QT: (B))

Рисунок 46 - Суавиозиды и их производные из *Rubus suavissimus*
(Ohtani, Yamazaki, 2002)

В данной работе взаимосвязь между строением и вкусовыми характеристиками изучали для РебА, РебD, РебМ и их ферментативно модифицированных производных.

У человека выявлены пять вкусовых особенностей: сладкий, кислый, горький, соленый и умами. В ходе эволюции человека два из этих типов оказались наиболее важными для выживания вида: сладость испытанное средство поиска источника энергии в виде углеводов, а горечь показывала на присутствие потенциально смертельных токсинов или алкалоидов (Meyers, Brewer, 2008). Многие соединения проявляют сладкий вкус, однако углеводные подсластители, встречающиеся обычно во фруктах и овощах и, в частности, сахароза, являются стандартами сладкого вкуса. Синтетические и натуральные некалорийные (высокоинтенсивные) подсластители, включая гликозиды стевии, проявляют сладкий вкус, который отличается от вкусов углеводных подсластителей, а именно:

- Функция концентрация/отклик или максимальный отклик;
- Вкусовой профиль;
- Временной (темпоральный) профиль;
- Адаптационный профиль.

Для использования в пищевых продуктах или напитках, подсластитель должен быть безопасным, достаточно стабильным, достаточно растворимым, экономичным и патентоспособным. Тем не менее, «Качество вкуса» является абсолютно критичным для подсластителей. Без этого критерия не имеет значения, является ли подсластитель безопасным, стабильным, растворимым, экономически эффективным и защищенным патентом. Он не будет успешным на рынке (DuBois, 2008).

5.1. Функция концентрация/отклик или Максимальный отклик

Интенсивность сладости углеводных подсластителей не зависит от концентрации сахарозы, используемой в качестве сравнения. С другой стороны, интенсивность сладости практически всех синтетических и натуральных высокоинтенсивных подсластителей прямо зависит от контрольной концентрации сахарозы. Функция концентрация/отклик (C/R) (R является величиной в процентных единицах от эквивалента сахарозы) для всех синтетических и натуральных высокоинтенсивных подсластителей хорошо моделируется законом действия низких масс $R=R_m C/(k_d+C)$, где R_m - максимальный отклик (ответ), k_d - константа диссоциации подсластитель-рецептор комплекса (DuBois et al., 1991). Все углеводные подсластители имеют одинаковый R_m , тогда как все синтетические и натуральные высокоинтенсивные подсластители имеют более низкий R_m . Интенсивность сладости высокоинтенсивных подсластителей не

является постоянной величиной и изменяется в зависимости от контрольной концентрации сахарозы, в отличие от углеводов и полиолов, которые имеют одинаковые максимальные отклики независимо от концентрации эталонного раствора сахарозы. Например, РебА в 385 раз слаще, чем 2,5%-ная сахароза, но только в 250 раз по сравнению с 7,5% раствором сахарозы. Аналогичная картина наблюдается для других гликозидов стевии и высокоинтенсивных подсластителей (таблица 15).

Таблица 15 - 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	-

В дополнение, интенсивность сладости высокоинтенсивных подсластителей зависит от системы и ингредиентов, где используются подсластители. Например, их сладость выше в солевых растворах. Это очень важно, поскольку обычные сладкие продукты и напитки как правило содержат 10-15% сахарозы. Поэтому альтернативные системы подсластителей должны обеспечить такую же сладость. Однако высокоэффективные подсластители проявляют более низкий и изменчивый максимальный отклик. Это возможно из-за того, что углеводные подсластители взаимодействуют с более чем одним вкусовым рецептором, в то время как высокоэффективные подсластители – только с одним.

Искусственные высокоактивные подсластители имеют высокие значения максимального отклика и могут обеспечить сладость 10-15% сахара, в то время как стевиозид и РебА могут заменить всего 9,1% и 8,5-8,7% сладости сахара, соответственно. В этом отношении, РебD и РебМ являются более эффективными, для которых функция C/R равняется 10,1 и 14,2, соответственно (таблица 16).

Таблица 16 - Максимальная сладость высокоинтенсивных подсластителей в воде при комнатной температуре в эквивалентах сахара (% ЭС)

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

Другими словами, если, например, из аспартама, сукралозы и неотама можно приготовить раствор со сладостью 16%, 13% и 15,1%, соответственно, то из коммерчески доступных гликозидов стевии только РебD и РебМ способны обеспечить сладость больше 10% сахара. Следовательно, РебА и стевиозид не могут быть использованы в качестве единственного подсластителя для замены сахара в напитках, где используется более 10% сахара.

Но интересно, что при низких температурах гликозиды стевии проявляют более высокую сладость (таблица 17).

Таблица 17 - Максимальный отклик гликозидов стевии в воде при разных температурах

Подсластитель	Функция C/R	
	22°C	5°C
Стевиозид	9,1	15,2
РебА	8,5	16,3
РебD	10,1	17,8
РебМ	14,2	14,2 (4°C)
Смесь гликозидов (95%)	8,1	14,2

Таким образом, очень важно создавать смеси или производные гликозидов стевии, обладающие не только низкой горечью, но и способностью обеспечить более высокую сладость. В этом отношении, было обнаружено, что гликозилированные производные РебА, РебD и РебМ обладают более высоким значением максимального отклика, вероятно, благодаря большим размерам молекул, высокой растворимости и низкой горечи. В принципе, все производные, полученные нами, могут быть использованы в качестве единственного подсластителя в пищевых

продуктах и напитках, в оригинале содержащих более 10% сахара (таблица 18). Тем более, интересными могут быть оптимизированные смеси на их основе.

Таблица 18 - Максимальная сладость различных гликозидов стевии и их производных в воде при комнатной температуре в эквивалентах сахара (% ЭС)

Подсластитель	% ЭС
Стевиозид	9,1
РебА	8,5
РебD	10,1
РебМ	14,2
РебА-G1	10,4
РебD-G1	11,3
РебМ-G1	14,9
РебА-F	10,7
Смесь РебА-Gly	10,8
Смесь РебD-Gly	11,6
Смесь РебМ-Gly	15,4

5.2. Вкусовой Профиль

Вкусовой профиль подсластителя представляет собой совокупность количественных характеристик интенсивности всех атрибутов вкуса. Углеводные подсластители проявляют чистый сладкий вкус без признаков горького, кислого, соленого, пикантного или умами привкусов и обычно используются в качестве стандарта для чистого сладкого вкуса. Однако, высокоэффективные подсластители проявляют другие качества вкуса в дополнение к сладости. Фактически, чистый сладкий вкус является исключением, а не правилом для них, в то время как горький привкус – обычное явление. Например, сахарин проявляет как горький, так и металлический послевкусия, цикламат натрия проявляет горький и соленый привкусы, эрнандульцин имеет горький привкус. Другие вкусовые признаки, обычно наблюдаемые для высокоэффективных подсластителей, включают мятный (охлаждающий), лакричный и вяжущий привкусы.

Кроме сладости, сахароза обладает также другими характеристиками вкуса, не описываемыми горьким, кислым, соленым и умами признаками. Тем не менее, его вкус легко отличить от вкуса высокоинтенсивных подсластителей, проявляющих только сладость в течение первых нескольких секунд дегустации. Вкус сахарозы является уникальным среди подслащивающих веществ, даже среди тех, которые не проявляют ни одного из «посторонних» привкусов, отмеченных выше.

Посторонние привкусы являются главными недостатками некалорийных подсластителей. Реалистично чистые высокоинтенсивные подсластители без сочетания с другими подслащивающими веществами обычно находятся в пределах 4-8% эквивалента сахарозы (ЭС). Следовательно, 6% ЭС представляет собой разумное 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 ($ЭС \leq 6$), проявляются другие атрибуты вкуса (например, горечь и неприятный лакричный привкус), а иногда и преобладают. Однако кислые, соленые, умами («приятный вкус»), металлические или другие атрибуты вкуса не обнаружены.

Вкусовые характеристики РебМ являются более приемлемыми (Patent US WO 2017/075034). В отличие от других коммерческих гликозидов стевии, для РебМ не обнаружено значительных нежелательных привкусов в водных растворах при значении около 8% ЭС. У РебМ немного более интенсивное сладкое послевкусие, чем у аспартама. Подслащивающий профиль РебМ очень похож на аспартам, но имеет более интенсивное сладкое послевкусие. Качество вкуса РебМ существенно лучше, чем РебА или РебD. РебМ не проявляет чистого сахароподобного вкусового профиля, и скорее сладость более жироподобный с более широким темпоральным профилем сладости. Подобно РебD, РебМ не обладает терпким, вяжущим привкусом (рисунок 47) (Чхан и др., 2019а).

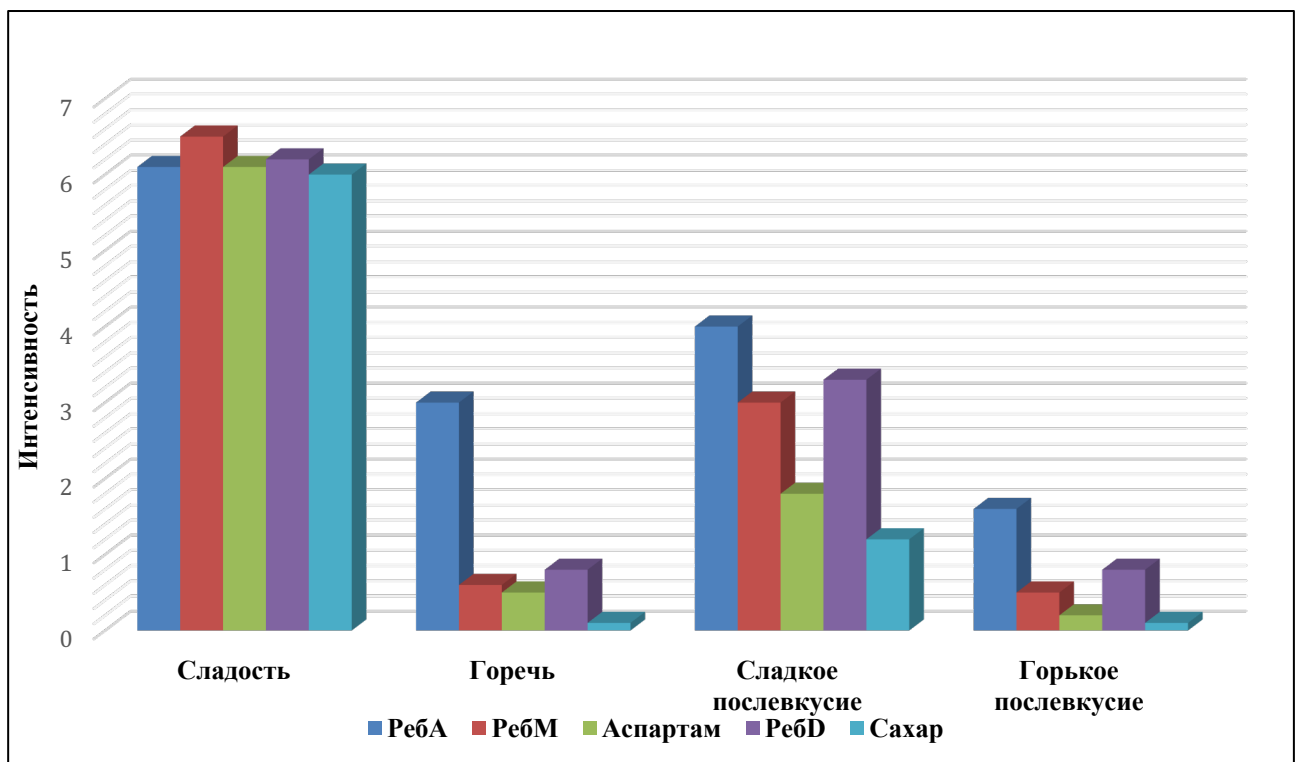


Рисунок 47 - Вкусовой профиль РебА, РебD, РебМ, аспартама и сахарозы (8%) в воде

Выявлено, что трансгликозилирование РебА, РебD и РебМ с помощью ЦГТаз приводит к существенному улучшению вкусовых качеств, в том числе снижается горечь и посторонний привкус, а также горькое послевкусие (рисунок 48-50) (Чхан и др., 2019б). С другой стороны, снижается интенсивность подслащивания, однако для всякого подсластителя главным является качество вкуса, без которого не имеет значения на сколько раз они слаще сахара, безопасны, растворимы, стабильны, дешевы или защищены патентом. Качество вкуса является абсолютно критическим.

Вкусовые характеристики фруктозилированного РебА (РебА-F) также превосходят таковые для РебА и сопоставимы с моно- и ди-глюкозилированными производными (рисунок 51). Однако, следует отметить, что данный продукт обладает пониженной стабильностью в кислых средах из-за лабильности связи между глюкозой и фруктозой. Вероятно, это производное не может быть использовано в напитках типа колы и фруктовых соках. Однако, обладая отменными характеристиками сладости вполне пригоден для использования в качестве настольного подсластителя, а также в хлебопекарных продуктах и кондитерских изделиях (Мойсеяк и др., 2019; Чхан, Мойсеяк, 2019б).

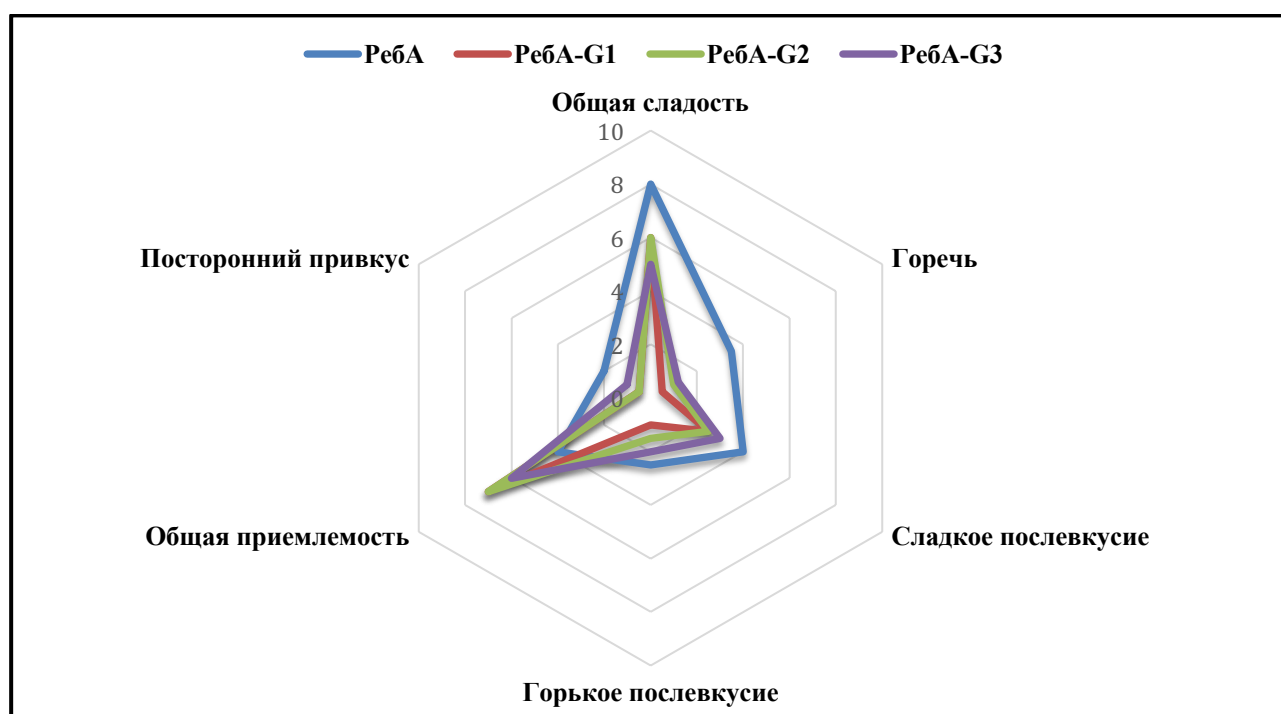


Рисунок 48 - Сравнительный вкусовой профиль РебА и его глюкозилированных производных

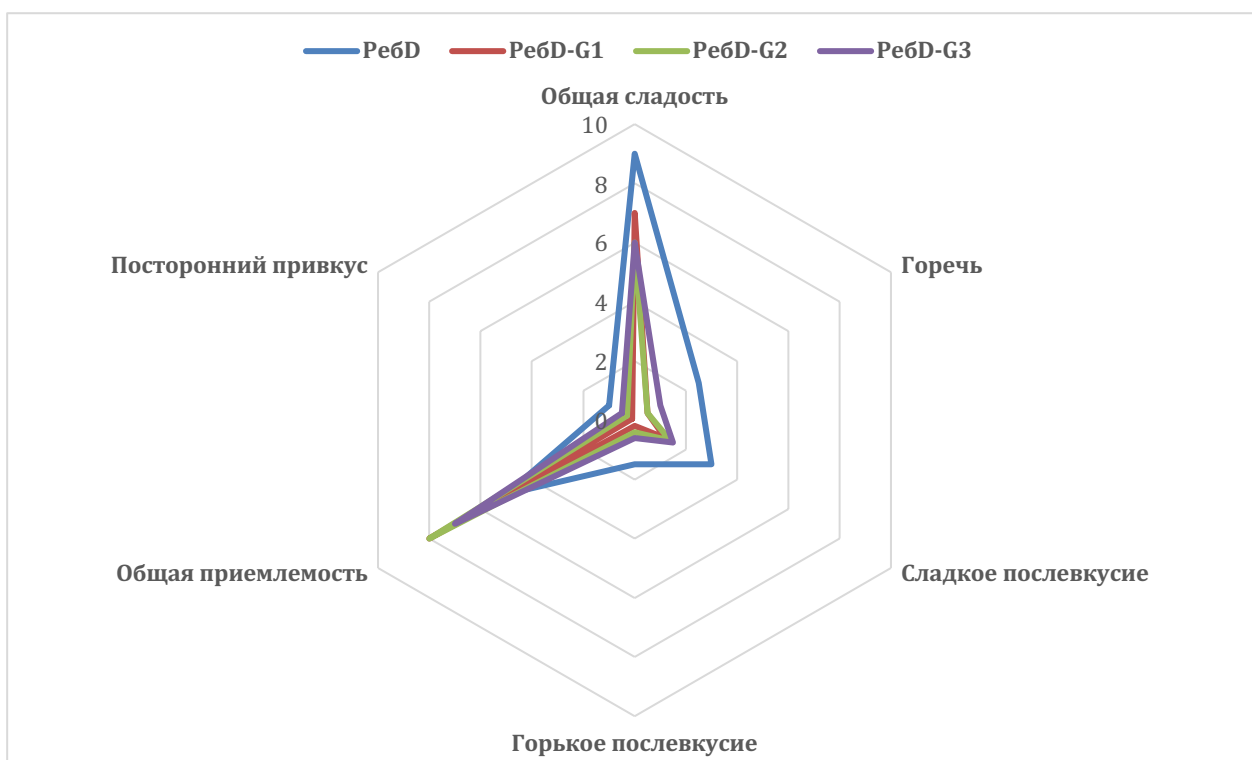


Рисунок 49 - Сравнительный вкусовой профиль РебD и его гликозилированных производных

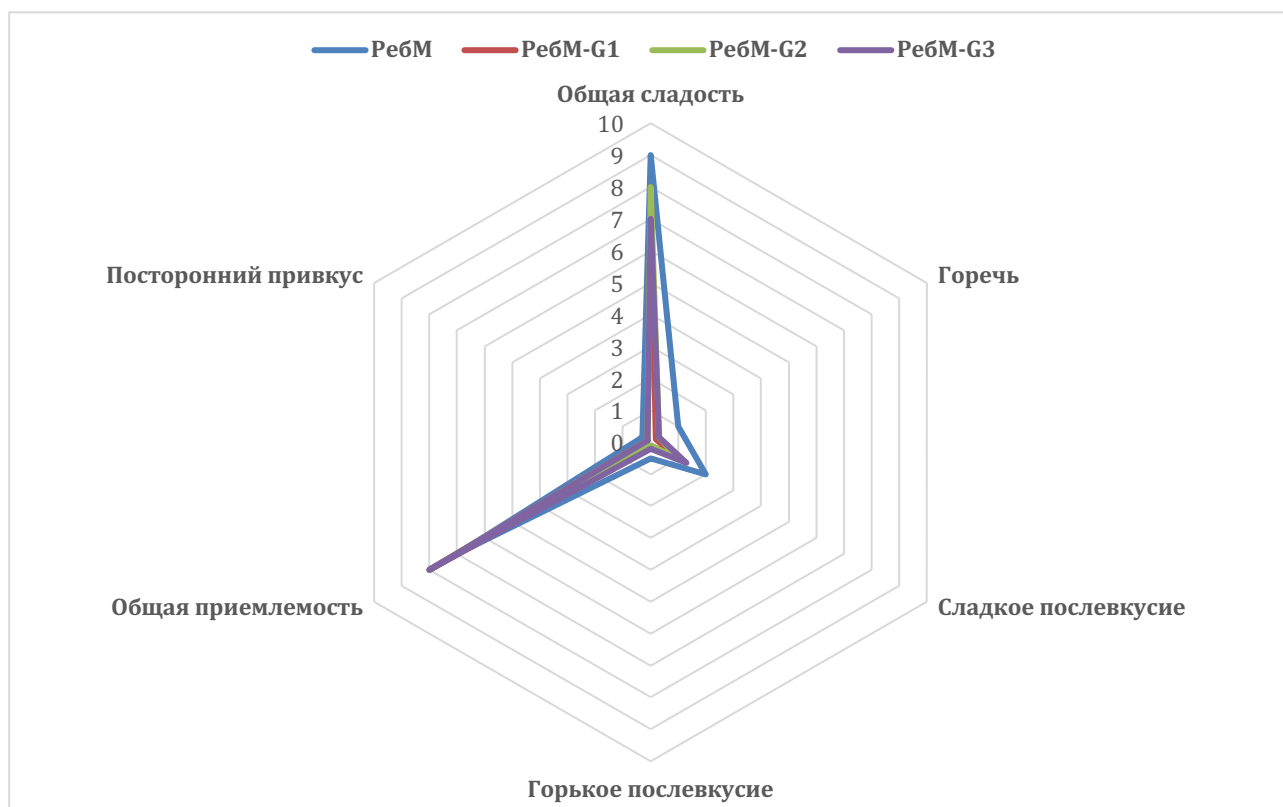


Рисунок 50 - Сравнительный вкусовой профиль РебM и его гликозилированных производных

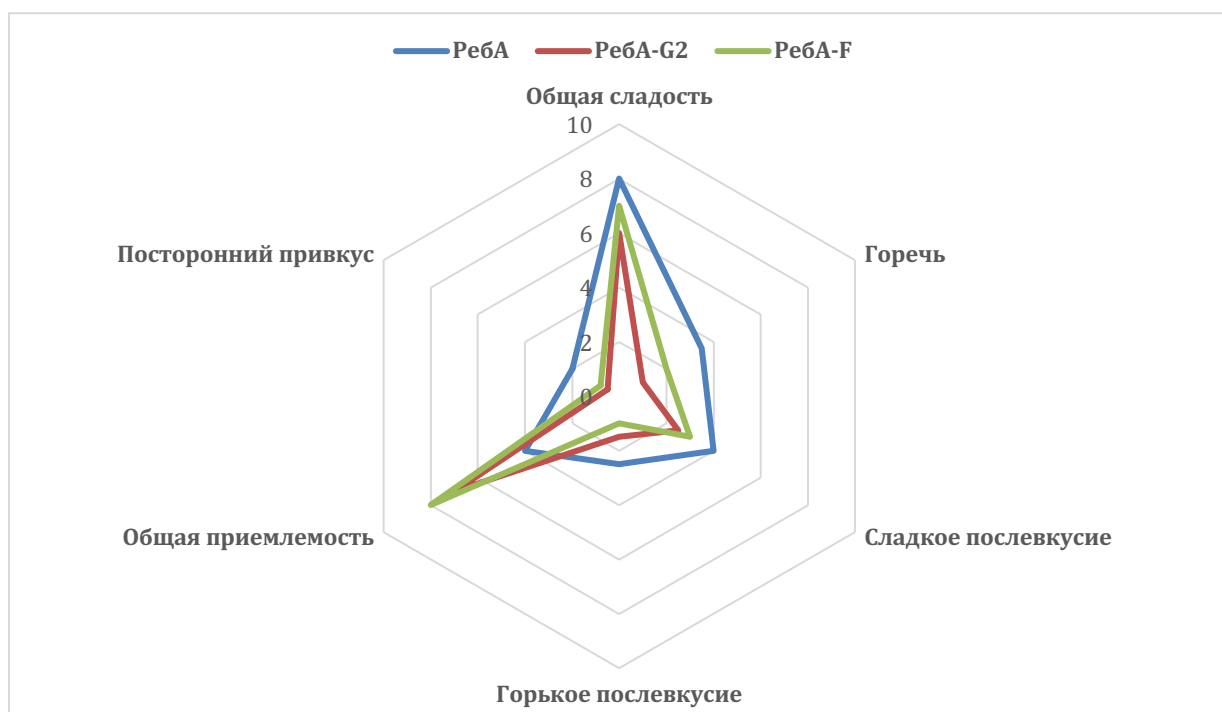


Рисунок 51 - Сравнительный вкусовой профиль РебА, его ди-глюкозилированного (РебА-G2) и β -2,6-фруктозилированного (РебА-F) производных

5.3. Временной (темпоральный) профиль

Темпоральный профиль сладости описывает изменения в восприятии сладости с течением времени. Каждый подсластитель имеет характерное время появления (АТ) и время исчезновения (ЕТ) сладости. Время, необходимое для того, чтобы подсластитель проявлял максимальную интенсивность сладости, определяется как АТ, и время, когда воспринимаемая сладость снижается до сладости, эквивалентной сладости, равной 2% сахарозы, определяется как ЕТ. Это свойство является одним из ключевых при использовании подсластителя в пищевых продуктах и напитках.

Сахароза обладает сладким вкусом, в котором максимальная сладость чувствуется быстро, а затем сладость исчезает относительно быстро при глотании продуктов или напитков. Напротив, сладкий вкус практически всех высокоэффективных подсластителей достигает своего максимума медленнее, а интенсивность восприятия уменьшается более медленно, чем это у сахарозы, т.е. большинство высокоэффективных подсластителей демонстрируют продолжительное ЕТ в отличие от углеводных подсластителей. Это может быть полезно в некоторых продуктах, например, жевательная резинка, где желательна продолжительная сладость, но не для обычных напитков и пищевых продуктов.

Таким образом, длинная продолжительность сладости является существенной проблемой использования высокоинтенсивных подсластителей, включая гликозиды стевии. Вероятно, это можно преодолеть приготовлением оптимизированных смесей и/или модификацией молекулы гликозидов.

Значение АТ и ЕТ для РебА было длиннее, чем для аспартама и сахарозы в эквиваленте с 8%-ным раствором сахарозы (Prakash et al., 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 (рисунок 52) (Patent PCT Application WO 2013/096420, 2013).

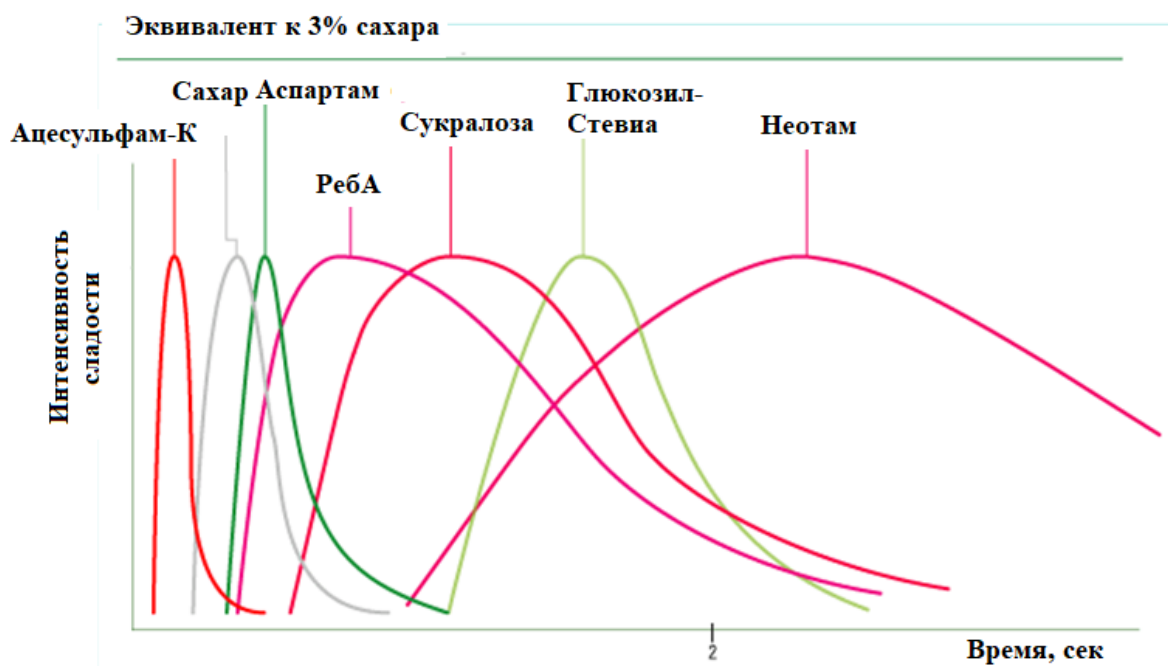


Рисунок 52 - Темпоральный профиль различных подсластителей (Morita)

Наиболее вероятное обоснование продолжительной сладости, объясняющее также медленное начало проявления сладости, вероятно заключается в том, что высокоэффективные подсластители, особенно крупные подобные сапонину молекулы, такие как РебА, РебD и РебM, неспецифически связываются с участками клеточной мембраны полости рта. Если это так, то можно ожидать, что концентрация подсластителей достигает максимума на рецепторе после некоторой задержки. В то же время, когда высокоэффективный подсластитель диссоциирует от рецептора, он, вероятно, связывается неспецифически с близлежащими нерепторными участками и, следовательно, доступен для повторного связывания с рецептором снова и снова, что приводит к восприятию затяжной сладости (DuBois, 2011).

С коммерческой точки зрения подсластитель или подслащивающая система должны быть способны обеспечить чистую сладость с интенсивностью, по меньшей мере эквивалентной 10%-ной сахарозе, и без заметной задержки ощущения максимальной сладости или длительного сладкого послевкуся.

В настоящее время существуют два подхода для модуляции нетипичных временных профилей высокоинтенсивных подсластителей, а именно, (а) ингибирование неспецифического связывания высокоинтенсивного подсластителя со вкусовыми рецепторами языка и эпителиальными клетками и (б) ингибирование скорости выхода высокоинтенсивного подсластителя из вкусовых рецепторов и эпителиальных клеток и их мембран (Patent US Appl. 0116828, 2007).

Например, темпоральный профиль может быть улучшен с помощью состава с использованием добавок для уменьшения или устранения связывания с нерцепторными участками, что было показано на примере гипертонических добавок, таких как хлорид натрия, хлорид калия, эритритол или глицирризиновая кислота (Crammer, Ikan, 1987; DuBois, 2011). В присутствии этих осмолитов, темпоральный профиль РебА вполне сравнима с сахарозой (Patent US Appl. 0128311, 2007).

Нами показано, что гликозилирование гликозидов стевии в некоторых случаях может привести к существенному улучшению данного профиля. Так, сравнение РебА, РебD и РебМ и их α -1,4-ди-гликозилированных производных с 8% раствором сахарозы выявило, что ферментативная модификация приводит к сокращению АТ и ЕТ, и они более ближе становятся к сахару. У них максимальная сладость ощущается быстрее, чем у интактных гликозидов, которая постепенно исчезает, но опять быстрее, чем это наблюдалось для исходных подсластителей (рисунок 53) (Чхан и др., 2019б). Вероятно, это связано с высокой растворимостью полученных веществ и одновременно с их большими размерами.

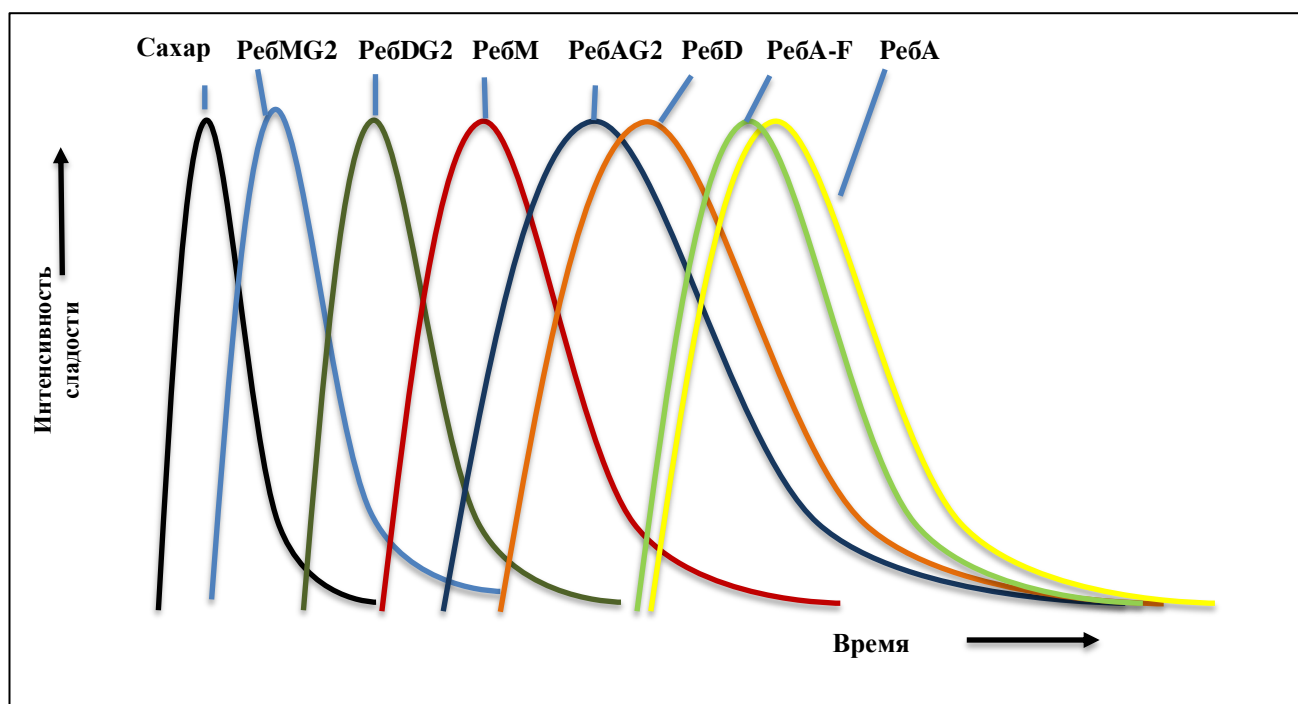


Рисунок 53 - Характер темпорального профиля ребаудиозидов и их производных

5.4. Адаптационный профиль

Если вкус 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). Сенсорная система, по-видимому, менее чувствительна к некалорийным подсластителям, чем в случае углеводных подсластителей (DuBois, 2008). Десенсibilизация (или профиль адаптации) варьируется от подсластителя до подсластителя. Так, например, наблюдается лишь незначительная десенсibilизация с использованием сахарозы и глюкозно-фруктозного сиропа (ГФС), а с аспартамом наблюдается умеренная десенсibilизация. Десенсibilизация представляет собой проблему также для гликозидов стевии, которая может быть преодолена с помощью конструирования состава гликозидсодержащей смеси. Ясно, что высокоэффективные подсластители должны иметь константы скорости высвобождения из рецептора, которые ниже, чем у слабо действующих углеводных подсластителей, и поэтому представляется разумным, что десенсibilизация рецептора подсластителя может коррелировать со сладостью (DuBois, 2008).

Степень десенсibilизации выше для смеси высокоочищенной смеси экстракта стевии (ЭС95). РебD и его смеси с РебA показывают лучший профиль адаптации. Очень низкая десенсibilизация в случае сукралозы может быть связана с длительным затяжным послевкусием этого подсластителя (рисунок 54) (Abelyan, Abelyan, 2012; Чхан и др., 2019a).

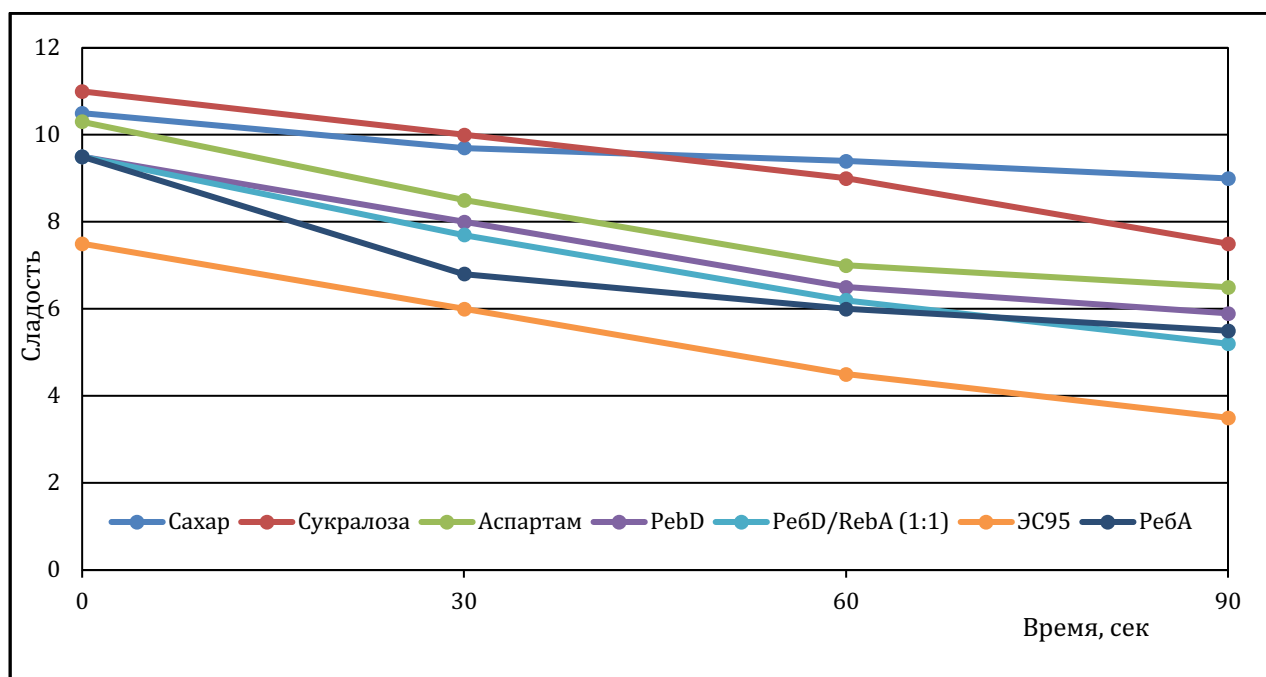


Рисунок 54 - Адаптационный профиль различных подсластителей в воде

В результате наших исследований было выявлено, что ферментативное трансгликозилирование приводит к некоторому улучшению эффекта десенсibilизации. Адаптационный профиль РеbМ превосходит таковой для РеbD, однако, гликозилированные формы являются ближе к сахару и аспартаму (рисунок 55). Поэтому, гликозилирование может быть эффективным инструментом для модулирования вкусовых характеристик и, таким образом, общего вкусового профиля гликозидов стевии.

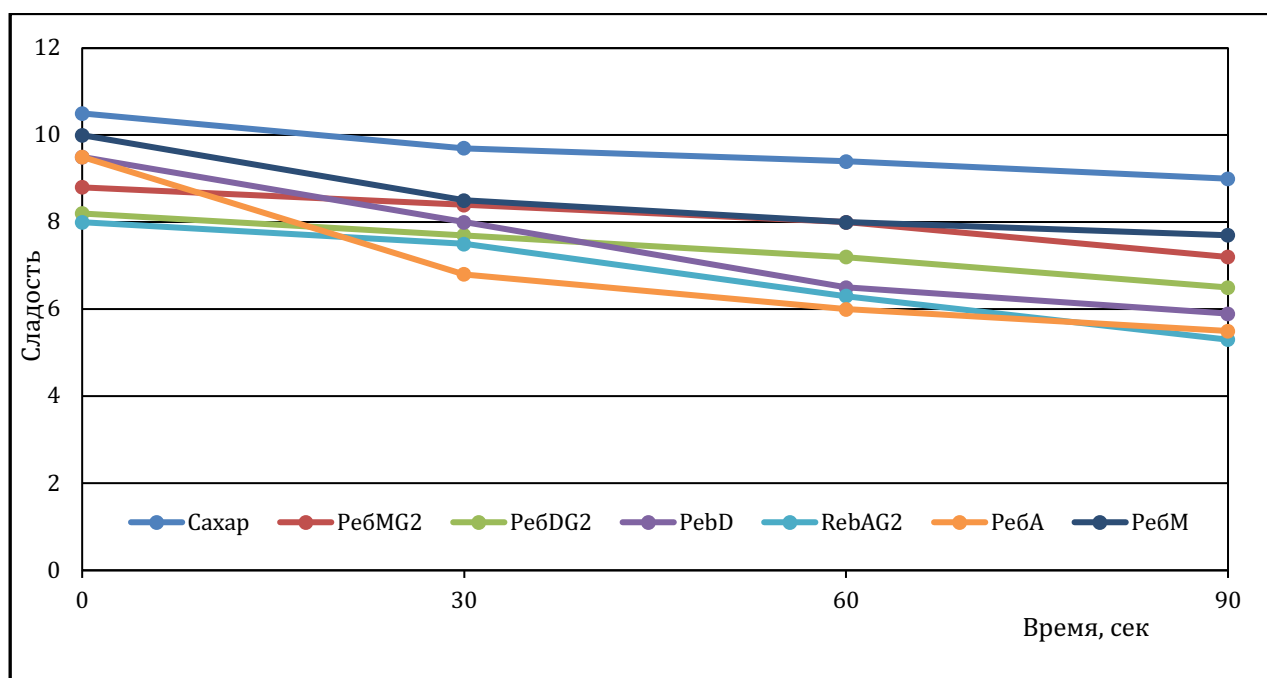


Рисунок 55 - Характер адаптационного профиля гликозидов стевии и их производных в воде

Таким образом, подобно другим высокоинтенсивным подсластителям, гликозиды стевии имеют некоторые проблемы со вкусообразующими атрибутами, которые необходимо преодолеть. Наиболее распространенными проблемами подсластителей являются задержка максимального восприятия сладости, затяжная сладость, горькое послевкусие, нелинейная концентрация подсластителя к коэффициенту эквивалентности сладости, адаптация или десенсибилизация, а также отсутствие полноты ощущения. Кроме того, подобно многим высокоинтенсивным подсластителям, экстрагированным из растений, экстракт стевии низкого сорта имеет аромат травяного или лакричного типа.

5.5. Разработка пищевых технологий с использованием гликозидов стевии ребаудиана как природного сахарозаменителя

Сила сладости практически всех синтетических и натуральных высокоинтенсивных подсластителей обычно сравнивается с контрольной концентрацией сахарозы.

Например, 2% раствор РеБА в 400 раз слаще, чем 2% раствор сахарозы, однако 8% раствор РеБА только в 250 раз слаще по сравнению с 8% раствором сахарозы. Зависимость интенсивности сладости концентрации сахарозаменителей не является линейной и имеет тенденцию к снижению. Интенсивность сладости меняется в зависимости от соответствующего контрольного значения концентрации сахарозы. 8% и 10% сахарозе соответствует более низкое значение интенсивности сладости подсластителя.

Для дальнейших исследований выбрано значение концентрации 8% как наиболее часто используемое в пищевых продуктах (греческий классический йогурт, печенье и др.). В безалкогольных напитках в рецептуре используют как правило 10% сахара (Cola, Redbull, Fanta и др.)

Установлено, что стевиозид и РеБА могут заменить всего 9 и 8,5-8,7% сладости сахара, соответственно. В этом отношении, РеБD и РеБM являются более эффективными, для которых это значение равняется 10% и 14% соответственно.

Из коммерчески доступных гликозидов стевии только РеБD и РеБM способны обеспечить сладость больше 10% сахара. Следовательно, РеБА и стевиозид не могут быть использованы в качестве единственного подсластителя для замены сахара в напитках, где используется более 10% сахара. Необходимо учитывать, что при низких температурах гликозиды стевии проявляют более высокую сладость.

Таким образом очень важно создавать смеси или производные гликозидов Стевии, обладающие не только низкой горечью, но и способностью обеспечить более высокую сладость. В результате исследования было обнаружено, что гликозилированные производные РеБА, РеБD

и РебМ обладают более ярко выраженной сладостью, вероятно, благодаря большим размерам молекул, высокой растворимости и низкой горечи (Patent US2018/0317534 A1, 2018) В принципе, все производные, полученные в результате исследований, могут быть использованы в качестве единственного подсластителя в пищевых продуктах и напитках, в оригинале содержащих более 10% сахара.

Вкусовые характеристики РебМ являются наиболее приемлемыми. В отличие от других коммерческих гликозидов стевии, в РебМ не обнаружено значительных нежелательных привкусов в 8% ЭС водных растворах. Подслащивающий профиль РебМ по своим характеристикам 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. Вкусовой профиль минорных гликозидов стевии РебD, РебМ наиболее приближен к вкусовому профилю сахара. РебD и РебМ не обладают выраженной горечью и горьким послевкусием. И наиболее приемлемы по своим вкусовым характеристикам к применению в качестве самостоятельного природного сахарозаменителя.

Вкусовой профиль производных РебА-G1 и РебА-G2, гораздо лучше чем чистого гликозида Ребаудиозида А полученного экстракцией из листа стевии. Производные РебА-G1 и РебА-G2 не имеют остаточной горечи, постороннего привкуса в отличии от РебА, а также общая приемлемость их вкуса лучше в сравнении с чистым гликозидом РебА. Научно-исследовательская лаборатория PureCircle Sdn.Bhd. провела оценку вкуса высокоинтенсивных подсластителей стевии, полученных в данной работе: смесь РебА-Gly, Ребаудиозид А, РебD, РебМ, РебА-G1 и РебА-G2.

Расчёт экономической эффективности сладких стевииолгликозидов стевии как сахарозаменителей

Сахар

Средняя урожайность сахарного тростника с гектара в год составляет около 100 млн. Тонн.
Средняя урожайность сахара с гектара в год составляет около 100 млн. тонн (урожай 10%).

Стевия

Средняя урожайность стевии на гектар в год составляет около 2 млн. тонн сухих продуктов (в расчете на 1 урожай в год в Китае, в странах, где стевия может расти круглый год и производить несколько урожаев, урожайность выше)

Средний урожай стевииол-гликозидов на гектар в год составляет около 230 кг (при среднем содержании СГ 13% и 90% при экстракции)

При средней сладости 250 по сравнению с сахарозой 1 г стевии способна заменить 57 тонн сахара. Это означает, что на гектар в год производится почти в 6 раз больше сладости по

сравнению с сахарным тростником, при этом значительно снижается потребление воды, труда и земли.

Цена стевииолгликозидов \$70/кг, если трансглюкозилировать то стоимость снизится за счёт разбавления крахмалом.

Таблица 19 – Расчёт экономической эффективности стевии в продукции

Подсластитель	Средняя цена, RUB /кг	Степень сладости	Концентрация в 100мл конечной продукции, %	Себестоимость подсластитель в 100мл продукции, RUB
Сахар	RUB 45.00	1	8%	RUB 0.36
Стевиолгликозиды	RUB 4500.00	400	0.02%	RUB 0.09

Изучение влияния гликозидов стевии как сахарозаменителя на вкусовые характеристики йогурта

Для изучения возможности использования полученных стевииолгликозидов в рецептуре пищевых продуктов в качестве примера был выбран классический рецепт йогурта, с дальнейшей возможностью расширения продуктовой линейки йогуртов (Patent US Appl. 14/494,322, 2015).

Органолептическая оценка вкуса проводилась дегустационной группой из 9 человек, которые оценивали образцы на предмет следующих дескрипторов вкуса: сладости, горечи, горького послевкусия, сладкого послевкусия и общей приемлемости, постороннего привкуса, а также цвета, степени неровности поверхности, неоднородности при перемешивании, густоты во рту, кислинки.

Разработка рецептуры классического йогурта с добавлением стевии

С этой целью 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 РебА до инкубации (шифр образца 1-019), второй образец с добавлением РебА после инкубации (шифр образца 2-019), третий образец с добавлением смеси РебА-Gly до инкубации (шифр образца 3-019), четвертый образец с добавлением смеси РебА-Gly после инкубации (шифр образца 4-019), пятый образец с добавлением сахара до инкубации (шифр образца 5-019-0), шестой образец с добавлением сахара после инкубации (шифр образца 6-019-0) (Patent US Appl. 14/494,322, 2015).

После того как были продегустированы 6 образцов и отобраны 3 образца с более высокой органолептической оценкой, данные 3 образца были сравнены между собой органолептически, из них, образец с сахаром брался за контрольный образец, как чистый сладкий вкус (рисунок 56, 57).

Для проведения исследований по классической технологии молоко доводят до кипения, растворяют в отмеренном количестве молока один из ингредиентов стевии (РебА / смесь РебА-Gly) или сахар белый. Затем молоко охлаждают до 37 °С и добавляют моносодиумфосфата (46 мг на 100 см³ молока) и вносят при умеренном перемешивании в количестве (5-10 г / 100 см³) закваску (культура йогурта- коммерческая закваска фирмы Danone и Stonyfield Farm), а затем выдерживают в инкубаторе при 37 °С в течение 16 часов. “Белую массу” (обезличенный классический йогурт) выдерживают при температуре 4 °С в холодильнике в течение 24 часов и подают холодной на дегустацию «фокус» группе отобранные экземпляры. (Patent US Appl. 14/494,322, 2015)

Органолептическая оценка полученных 6 образцов йогурта

Дегустационная группа из 8 членов продегустировала следующие образцы: йогурт с добавлением РебА до и после инкубации (1-019, 2-019), йогурт с добавлением смеси РебА-Gly до и после инкубации (3-019, 4-019), йогурт с добавлением сахара до и после инкубации (5-019-0, 6-019-0). В качестве дескрипторов вкуса были выбраны следующие показатели: сладость, горечь, горькое послевкусие, сладкое послевкусие, общая приемлемость, посторонний привкус. Диапазон значений, интенсивности дескрипторов принят от 0 до 10. Фокус группа выявила, что профиль сладости образцов йогурта подслащенных до инкубации, имеет более приятный сладкий сливочный вкус. Полученные результаты исследований представлены на рисунке 56 и 57.

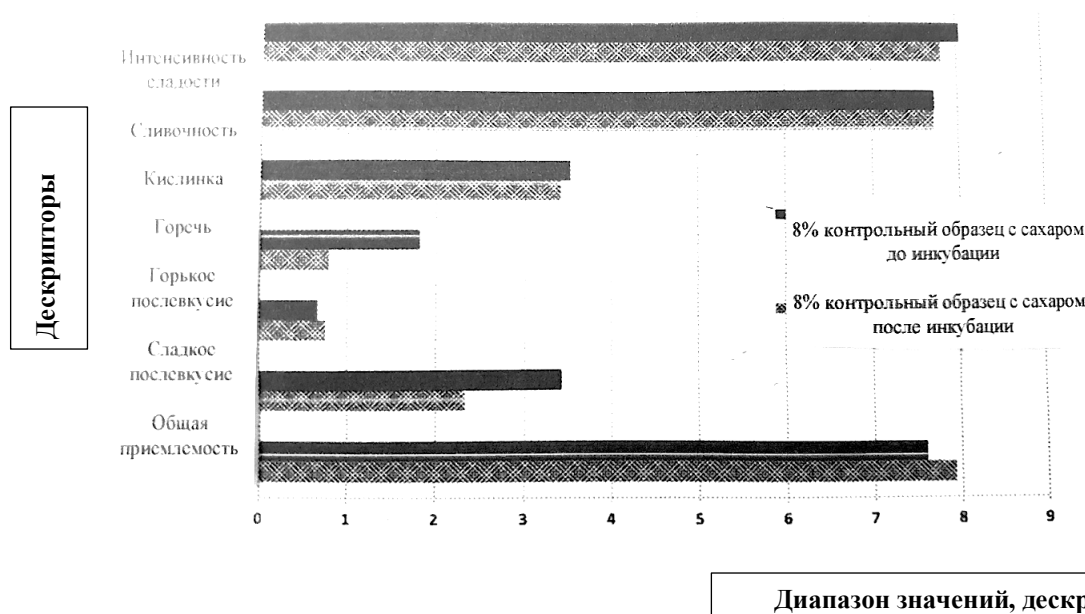


Рисунок 56 - Вкусовая оценка контрольного образца обезличенного классического йогурта, с добавлением 8% сахара до и после инкубации

Из рисунка 56 видно, что исследуемый образец йогурта с добавлением сахара, добавленный до и после инкубации (5-019-0, 6-019-0), не показал какой-либо существенной разницы во вкусе. Для дальнейшей сравнительной оценки с образцами йогурта с добавлением стевии, был отобран образец 5-019-0 (йогурт с добавлением 8% сахара до инкубации).

Следующим был исследован образец обезличенного классического йогурта с гликозидами стевии. Результаты оценки фокус группы представлены на рисунке 57.

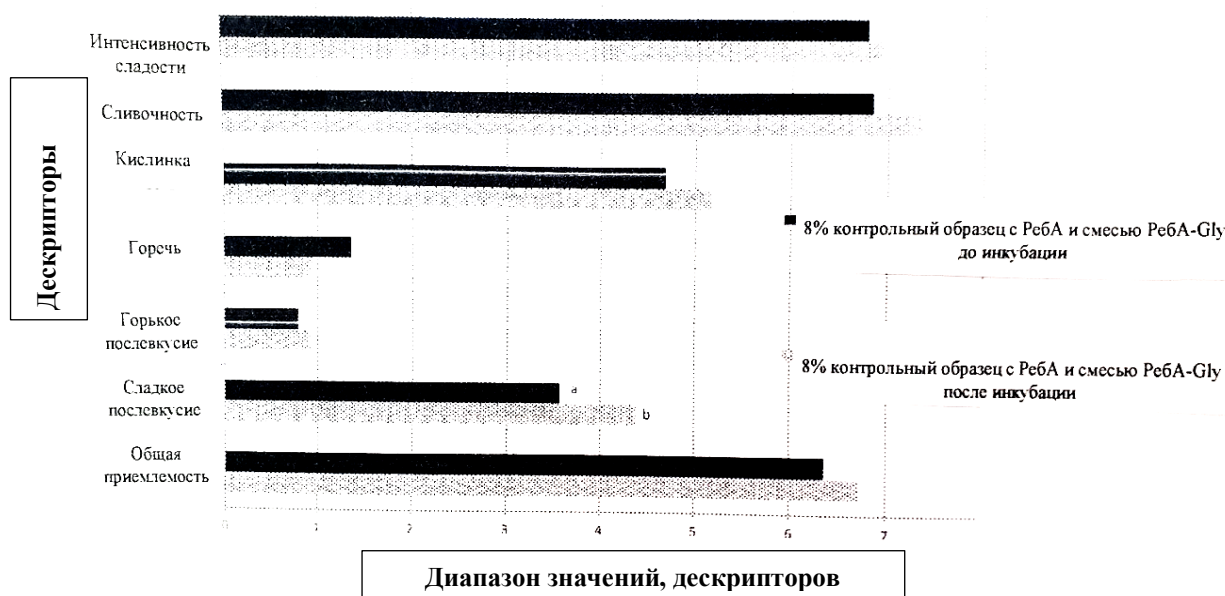


Рисунок 57 - Средняя вкусовая оценка тестируемого образца йогурта, тестируемый образец, с добавлением гликозидов стевии (модифицированных и немодифицированных) до и после инкубации.

Из рисунка 57 видно, что исследуемый образец йогурта с добавлением гликозидов стевии до инкубации (1-019, 3-019) имеют более приятный вкус, менее кислый, более короткое сладкое послевкусие, по интенсивности сладости различия практически нет при добавлении стевии до или после инкубации (2-019, 4-019).

Органолептическая оценка выбранных 3 образцов йогурта

Дегустационная группа из 8 членов продегустировала следующие отобранные образцы йогуртов: йогурт с добавлением РеБА после инкубации (2-019), йогурт с добавлением смеси РеБА-Gly после инкубации (4-019), йогурт с добавлением сахара после инкубации (6-019-0). В качестве дескрипторов вкуса были выбраны следующие показатели: сладость, горечь, горькое послевкусие, сладкое послевкусие, общая приемлемость, посторонний привкус, а также цвета, степени неровности поверхности, неоднородности при перемешивании, густоты во рту, кислинки. Диапазон значений, интенсивности дескрипторов принят от 0 до 10.

По результатам органолептической оценки выбранных 3 образцов йогурта с добавлением РебА, смеси РебА-Gly, сахара, была построена профилограмма бруса, на которой видно, что происходит улучшение общего вкуса и сладкого послевкусия в образцах йогурта подслащенных трансгликозилированным РебА-Gly в сравнении с образцом йогурта подслащенного сахаром (рисунок 58, 59).

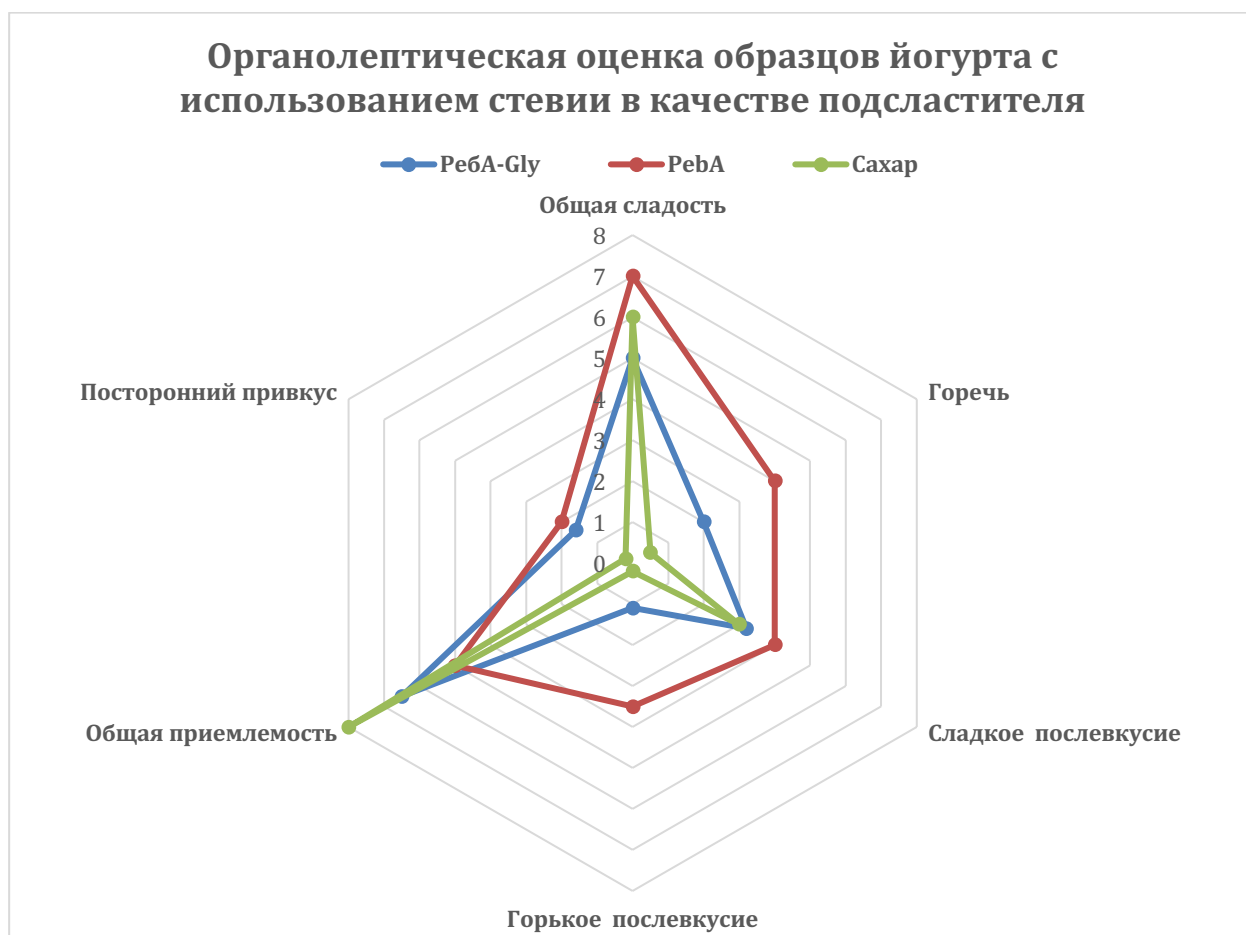


Рисунок 58 - Органолептическая оценка образцов йогурта с использованием стевии.

В результате исследования, определено, что большинство экспертов предпочли йогурт, который был подслащен РебА-Gly, кроме образца, подслащенного сахаром, который являлся контрольным образцом «вкуса». На второе место дегустаторы поставили образец (1-019) йогурта подслащенный основным гликозидом стевии Ребаудиозидом А.



Рисунок 59 - Органолептическая оценка образцов йогурта с использованием стевии.

В результате исследования, определено, что большинство экспертов определили, что образцы подслащенные стевией не отличались от контрольного образца йогурта с сахаром по дескрипторам: цвета, степени неровности поверхности, неоднородности при перемешивании, густоты во рту, кислинки.

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 некалорийна, 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. Подсластитель стевия сейчас широко используется в большинстве напитков включая газированные, негазированные, нектары, соки, чай, холодный чай и кофе.

Для исследования использован сенсорный тест-Треугольный тест.

Образцы готовили следующим образом: чайный раствор готовили с использованием 0.5 г порошка стевии (РебD)/ дм³ (10% раствор, по сладости относительно сахарозы) (шифр образца 9-019); чайный раствор с использованием 0.5 г порошка стевии (РебА)/ литр (10% раствор, по сладости относительно сахарозы) (шифр образца 10-019)

200 мл чая подслащивали тремя/четырьмя чайными ложками сахара (шифр образца 11-019) (10%-й раствор сахарозы) или подсластителями (1саше= 2 ч.л сахара, 1 ч.л =4/5 г сахара). Образцы были опробованы дегустационной панелью из 8 человек по разработанной в данной работе системе органолептической оценки по 54-ти бальной оценке, при этом каждый показатель оценивался 9 баллами.

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 (рисунок 60).

По категории общей приемлемости чай, подслащенный сахаром, а также гликозидами РебD и РебА был оценен высокими баллами и практически совпадал. Хотя никаких существенных различий между тремя подсластителями обнаружено не было. Горечь и горькое послевкусие не присутствовала у РебD и сахара, однако присутствовала у образца подслащенного гликозидом стевии - РебА .

На рисунке 6 показана дегустационная оценка чайного напитка с добавлением гликозидов стевии РебаудидаD, Ребаудиозид А и 10%-ого раствора сахара как контроль.



Рисунок 60 - Чайный напиток с добавлением гликозидов стевии РебаудизидаD, Ребаудиозида А и 10% раствора сахара как контроль.

Из рисунка 60 видно, что образец чайного напитка с добавлением гликозида стевии РебD в качестве сахарозаменителя вкуса наиболее приближенный ко вкусу сахара. Немного значительным остается сладкое послевкусие для обоих гликозидов стевии РебА и РебD. Органолептический анализ всех образцов показал, что большинство потребителей из образцов подслащенных стевией предпочли чайный напиток подслащенный Ребаудиозидом D (рисунок 60).

В коммерческий настольных подсластитель добавляют наполнитель для уменьшения интенсивности сладости и улучшения вкусовых качеств. Наполнители состоят из несладких пищевых добавок, которые обладают ограниченной пищевой ценностью, таких как лактоза, эритрит, инулин или мальтодекстрин. 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. Это отличная на вкус натуральная альтернатива нулевой калорийности сахара.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено, что стевииолгликозиды могут быть модифицированы различными трансгликозидазами, что в целом приводит к улучшению их вкусового профиля и растворимости. В некоторых случаях возможно преодоление проблем, связанных с долго сохраняющимся горьким послевкусием. Процесс также может служить инструментом для модификации и улучшения оставшихся после выделения РебА и стевииозида растворов с высоким содержанием РебС. Ферментативная модификация присутствующих в незначительных количествах гликозидов (например, РебD) также полезна для создания новых подсластителей с уникальными характеристиками. Это может являться подходящим способом для синтеза уже коммерциализированных гликозидов (например, РебА, РебD и т.д.), их ферментативного взаимопревращения с существенно более низкой стоимостью. Трансгликозилирование может повысить растворимость гликозидов, а также улучшить стабильность растворов с высокой концентрацией гликозидов.

Трансгликозилированные продукты являются превосходными подсластителями, а также применимы как синергетические вещества или наполнители для чистых гликозидов или других высокоинтенсивных подсластителей или их смесей. Они очень полезны в сочетании с различными углеводными подсластителями, волокнами и другими функциональными ингредиентами. Этот тип продукции, как правило, обладает значительно лучшим вкусом и лучшими технологическими характеристиками. Ферментативно гликозилированные продукты также могут быть использованы для создания подсластителей, специально предназначенных для конкретной отрасли пищевой промышленности с конкретным использованием. Кроме того, высокая чистота отдельных гликозилированных производных благодаря их вкусовому профилю может увеличить спрос и открыть новые области применения для подсластителей из стевии.

Ферментативное трансгликозилирование эффективно для структурной модификации биологически активных соединений, включая высокоинтенсивные подсластители. В качестве модификации соединений можно изменять структуру, характеристики и биологическую доступность, можно создавать новые функции, и открыть новые области и возможности их применения. Трансгликозилирование натуральных подсластителей приводит к значительному улучшению вкусовых признаков, например, удаление горького привкуса, регулирование начального ощущения сладости, высокая растворимость и т.д. В некоторых случаях, такие модификации могут быть использованы для создания уникальных и эффективных физиологически функциональных пищевых продуктов.

В этом отношении, очень важно выявить взаимосвязь между структурными особенностями и вкусовыми качествами этих веществ с целью создания целенаправленно модифицированных гликозидов с заранее прогнозируемыми сенсорными характеристиками.

Именно изучению влияния ферментативного трансгликозилирования гликозидов стевии на их вкусовые характеристики посвящена настоящая работа. Для этого были проделаны исследования по идентификации, очистки и характеристике новых гликозидов стевии, присутствующих в следовых количествах, но обладающих более приемлемыми вкусовыми качествами.

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 С-13 и С-19 гликозидов стевии (α -1,4-трансгликозилирование). Именно количество углеводных единиц в указанных позициях определяет качество и степень сладости соединения.

ЦГТаза, продуцируемые термофильными микроорганизмами, являются наиболее эффективными для трансгликозилирования гликозидов стевии. Выбранная нами ЦГТаза из *Geobacillus stearothermophilus* St-88 является очень эффективной не только для трансгликозилирования стевיוзида, но также РебА, РебD и РебМ, которые обычно очень трудно поддаются модифицированию. Нами проведены целенаправленные и сравнительные исследования по трансгликозилированию РебА, РебD и РебМ с помощью ЦГТаза и выявлены оптимальные условия реакции. При этом, трансгликозилирование с успехом осуществлено как в присутствии крахмала, так и различных циклодекстринов. В первом случае, 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. Кроме того, остаточный циклодекстрин дополнительно может замаскировать горечь и сделать сладость более мягкой и нежной.

Легкий и доступный способ получения и разделения гликозилированных производных с различной длиной боковых цепочек позволяет организовать их производство с очень высокой эффективностью и воспроизводимостью, что является очень важным признаком для промышленности.

Фруктозилированный РебА может быть превосходным модулятором вкуса в составе специализированных смесей гликозидов стевии, особенно для снижения горького послевкуся.

Разработанный метод трансглюкозилирования благодаря своей эффективности может стать основой для промышленного применения с целью модификации минорных гликозидов, получения и очистки отдельных глюкозилированных производных.

Мы полагаем, что выявленные закономерности трансглюкозилирования различных гликозидов с помощью ЦГТаз и β -фруктофуранозидаз могут быть полезными и применимы для присоединения других типов углеводных остатков под действием таких ферментов, как например β - и α -галактозидаз, α -глюкозидаза и др., и надеемся, что полученный нами задел исследований в некоторой степени может служить в качестве основы для практических работ по трансглюкозилированию различных соединений методом биокатализа.

Так как РебД и РебМ присутствуют лишь в очень маленьких количествах, то если процесс их очистки не привязывать к общей технологической схеме, то их себестоимость может быть очень высокой, препятствующей их использованию в различных пищевых продуктах и напитках широкого потребления.

Мы полагаем, что разработанную нами схему можно легко включить в общий технологический процесс и, таким образом, сделать их получение более целесообразным с коммерческой точки зрения.

Мы думаем, что выявленная нами взаимосвязь между структурными особенностями и качеством вкуса в дальнейшем позволит разработать оптимизированные смеси гликозидов стевии и их производных, имеющие возможно лучшие вкусовые характеристики и позволяющие заменить максимальное количество сахара в пищевых продуктах без горечи и нежелательных послевкусыя.

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 РеbD и РеbM, 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 ЦГТазы 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 немодифицированных 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелян, В.А. Циклодекстрины: получение и применение / В.А. Абелян. - Ереван: Ван Арьян, 2001. - 519 с.
2. Абелян, В.А. Особенности получения циклодекстринов с помощью циклодекстрин глюкозилтрансфераз различных групп микроорганизмов / В.А. Абелян, А.М. Балаян, Л.С. Манукян, К.Б. Афян, В.С. Меликсетян, Н.А. Андреасян, А.А. Маркосян // Прикл. биохим. и микробиол. - 2002. - Т. 38. - №6. - С. 616-624.
3. Авт. свид. СССР 1794442. Способ получения подсластителя из листьев растения *Stevia rebaudiana* Bertoni / Н.В. Пискунов, В.А. Поляков, А.В. Орещенко, Н.Ф. Берестень, В.Ф. Зубенко, И.И. Ильенко, Б.Д. Чудновский, Т.К. Яворская. - 1993.
4. Зинченко, О.Н. Трансгликозилазная активность 3-фруктофуранозидазы *Penicillium cyaneum* / О.Н. Зинченко, О.В. Кривошеева, А.Г. Лобанок // Прикл. биохим. и микробиол. - 1994. - Т. 30. - №4-5. - С. 550-555.
5. Зубцов, В.А. Стевия – лекарственное и пищевое растение / В.А. Зубцов, Л.Л. Осипова, Т.И. Лебедева, Н.В. Антипова // Мат. I Межд. научно-практ. конф. “Растительные ресурсы для здоровья человека”, М., Сергиев-Пасад: Арес. - 23-27 сентября, 2002. - С. 356-358.
6. Кочикян, В.Т. Совместная ферментативная модификация стевиозида и ребаудиозида А / В.Т. Кочикян, А.А. Маркосян, Л.А. Абелян, А.М. Балаян, В.А. Абелян // Прикл. биохим. и микробиол. - 2006. - Т. 42. - №1 - С. 31-37.
7. Ляховкин, А.Г. Стевия - медовая трава / А.Г. Ляховкин, А.П., Николаева, В.Б. Учитель. - СПб.: Весь, 1999. – 96 с.
8. Патент РФ 2111969. Способ получения стевиозида / В.А. Зубцов, Е.И. Милородова, Е.Ю. Юрова, С.С. Рясенский, Л.Л. Осипова. - 1998.
9. Патент РФ 2198548. Способ получения подсластителя из листьев растения *Stevia rebaudiana* Bertoni / В.Н. Лисицин, Х. Хакимов. - 2003.
10. Родионова, Н.С. Стевия в технологии функциональных молочных продуктов / Н.С. Родионова // Известия ВУЗов. Пищевая технология. - 2000. – №4. – С. 38-40.
11. Семенова, Н. Стевия - растение XXI века / Н. Семенова. - Москва-Санкт-Петербург: Диля, 2004. – 160 с.
12. Ситничук, И.Ю. Разработка эффективного способа выделения суммы дитерпеновых гликозидов из *Stevia rebaudiana* Bertoni / И.Ю. Ситничук, Е.Н. Стрижева, А.А. Ефремов, Г.Г. Первышина // Химия растительного сырья. - 2002. - №3. - С. 73–75

13. Чхан, К.В. Взаимосвязь между вкусовыми характеристиками и структурой гликозидов стевии / К.В. Чхан, В.А. Абелян, М.Б. Мойсеяк // Пищевая промышленность. – 2019а. – №6. – С. .
14. 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. – 2019б. – №7. – С. .
15. Чхан, К.В. Влияние ферментативного трансгликозилирования гликозидов стевии на их вкусовые характеристики / К.В. Чхан, М.Б. Мойсеяк // ХиПС. – 2019а. – № . – С. .
16. Чхан, К.В. Использование ферментных препаратов при получении сахарозаменителей из стевии / К.В. Чхан, М.Б. Мойсеяк // Кондитерское и хлебопекарное производство. – 2019б. – №1-2. – С.34-35.
17. Чхан, К.В. Природные некалорийные сахарозаменители полученные биотрансформацией сладких гликозидов стевии / К.В. Чхан, М.Б. Мойсеяк // Материалы XIII международного биотехнологического форума, выставки “РосБиоТех-2019”. – М.: Московский Государственный университет пищевых производств, 2019в.
18. Чхан, К.В. Может ли быть лакомство функциональным продуктом / М.Б. Мойсеяк, О.В. Воронина, Д.Д. Кириллов, К.В. Чхан // Материалы XII международной конференции “Кондитерские изделия XXI века”. – М.: Международная промышленная академия, 2019. – С. 127-132.
19. Abelyan, V.H. Biocatalytic synthesis: preparation of high value products / V.H. Abelyan – Kuala Lumpur, 2005. - 721 p.
20. Abelyan, V.H. Cyclodextrins : Production and Uses / V.H. Abelyan – Kuala Lumpur, 2009. - 538 p.
21. Abelyan, V.H. The art of stevia / V.H. Abelyan, L.A. Abelyan. – Kuala Lumpur, 2012. - 838 p.
22. Akashi, H. Dried-leaves extracts of stevia. Toxicology tests / H. Akashi, Y. Yokoyama // Shokuhin Kogyo (Food Industry). - 1975. - V. 18. - P. 34-43.
23. Akashi, H. Safety of dried-leaves extracts of stevia. Report of toxicological test / H. Akashi // Shokuhin Kogyo (Food Industry). - 1975. - V. 18. - P. 1-4.
24. Akimaru, K. Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclomalto-dextrin glucanotransferase / K. Akimaru, T. Yagi, S. Yamamoto // J. Ferment. Bioeng. – 1991. – V. 71. – P. 322–328.
25. Alternative sweeteners / L.O. Nabors, R.C. Gelardi (eds.). – N.Y.: Marcel Dekker, 1991. - P. 1-10.
26. Alupului, A. Ultrasonic vs microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants / A. Alupului, I. Calinescu, V. Lavric // AIDIC Conference Series, DOI. - 10.3303/ACOS0909001. - 2009.

27. Aze, Y. Subchronic oral toxicity study of stevioside in F344 rats / Y. Aze, K. Toyoda, K. Imaida, S. Hayashi, T. Imazawa, Y. Hayashi, M. Takahashi // Bull. Nat. Inst. Hyg. Sci. - Tokyo, Japan, 1991. – P. 48–54.
28. Bakal, A. Stevioside / A. Bakal, L. O'Brien Nabors // In: Alternative sweeteners - L. O'Brien Nabors, L., R.C. Gelardi (Eds). – N.Y.: Marcel Dekker, 1986. - P. 295-307.
29. Bergmeyer, H.U. Methods of enzymatic analysis / H.U. Bergmeyer, E. Berut, F. Schmidt, H. Stork. – N.Y.: Acad. Press, 1974. - V.3. - P. 1196-1201.
30. Boeckh, E.M.A. Cardio-circulatory effects of total water extract in normal persons and of stevioside in rats / E.M.A. Boeckh, G. Humboldt // Ciencia e Culture. - San Paulo. – 1981. - V. 32. – P. 208-210.
31. Butchko, H.H. Aspartame / H.H. Butchko, W.W. Stargel, C.P. Comer, D.A. Mayhew, S.E. Andress // In: Alternative sweeteners – L. O'Brien Nabors (Ed.), 3rd ed., revised and expanded. - N.Y.: Marcel Dekker, 2001. – P. 41-66.
32. Cardoso, V.N. Pharmacokinetic studies of ¹³¹I-stevioside and its metabolites / V.N. Cardoso, M.F. Barbosa, E. Muramoto, C.H. Mesquita, M.A. Almeida // Nucl. Med. Biol. - 1996. – V. 23. – P. 97–100.
33. Chan, P. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats / P. Chan, D.Y. Xu, J.C. Liu, Y.J. Chen, B. Tomlinson, W.P. Huang, J.T. Cheng // Life Sci. – 1998. – V. 63. – №19. – P. 1679-1684.
34. Chan, P. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension / P. Chan, B. Tomlinson, Yi-J. Chen, Ju-C. Liu, Hsieh Ming-Hsiung, Cheng Juei-Tang // Bras. J. Clin. Pharmacol. – 2000. – V. 50. - P. 215-220.
35. Chang, S.S. Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages / S.S. Chang, J.M. Cook // J. Agric. Food Chem. – 1983. – V. 31. – P. 409-412.
36. Chaturvedula, V.S.P. Diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* / V.S.P. Chaturvedula, I. Prakash // Journal of Medicinal Plants Research. – 2011a. – V. 5. - №19. – P. 4838-4842.
37. Chaturvedula, V.S.P. A new diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana* / V.S.P. Chaturvedula, I. Prakash // Molecules. – 2011b. – V. 16. – P. 2937-2943.
38. Chaturvedula, V.S.P. Acid and alkaline hydrolysis studies of stevioside and rebaudioside A / V.S.P. Chaturvedula, I. Prakash // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2011c. – V. 1. - №8. – P. 104-108.
39. Chaturvedula, V.S.P. Structures of the novel diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* / V.S.P. Chaturvedula, I. Prakash // Carbohydrate Research. – 2011d. - V. 346. – P. 1057-1060.

40. Chaturvedula, V.S.P. Spectral analysis and chemical studies of the sweet constituent, rebaudioside A / V.S.P. Chaturvedula, I. Prakash // *European Journal of Medicinal Plants*. – 2012. – V. 2. - №1. – P. 57-65.
41. Chkhan, K.V. Microbial synthesis of sweet diterpene glycosides from *S. tevia rebaudiana* / K.V. Chkhan // *Proceedings of International conference on microbiology “Culture Collections – The Challenge and the Future”*. – Malaysia: Institute of Bioscience, UPM, 2015. – P. 82.
42. Chkhan K.V. Transglycosylation of rebaudioside A by β -fructofuranosidase / K.V. Chkhan // *Health, Food and Biotechnology*. - 2019.
43. Choi, Y.H. Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana* leaves / Y.H. Choi, I. Kim, K. Yoon, S.J. Lee, C.Y. Kim, K.P. Yoo // *Chromatographia*. – 2002. – V. 55. - №9-10. – P. 617-620.
44. Crammer, B. Progress in the chemistry and properties of the rebaudiosides / B. Crammer, R. Ikan // *In: Developments in sweeteners-3*. - Grenby, T.H. (ed.). - London: Elsevier, Applied Science, 1987. – P. 45-64.
45. Darise, M. Enzymic transglucosylation of rubusoside and the structure-sweetness relationship of steviol-bisglycosides / M. Darise, K. Mizutani, R. Kasai, O. Tanaka, S. Kitahata, S. Okada, S. Ogawa, F. Murakami, F.H. Fhen // *Agricult. Biol. Chem.* - 1984. – V. 48. – P. 2483-2488.
46. DuBois, G.E. Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogues with improved organoleptic properties / G.E. DuBois, R.A. Sepsenson // *J. Med. Chem.* – 1985. – V. 28. – P. 93-98.
47. DuBois, G.E. Concentration-response relationships of sweeteners: a systematic approach / G.E. DuBois, D.E. Walters, S.S. Schiffman, Z.S. Warwick, B.J. Booth, S.D. Pecore, K. Gibes, B.T. Carr, L. Brands // *In: Sweeteners: discovery, molecular design and chemoreception*. – D.E. Walters, F.T. Orthofer, G.E. DuBois (Eds.). - ACS Symposium Series 450, Washington, DC. – 1991. - P. 261-276.
48. DuBois, G.E. Sweeteners and sweetness modulators: requirements for commercial viability / G.E. DuBois // *In: Sweetness and sweeteners: biology, chemistry and psychophysics*. - D.K. Weerasinghe, G.E. DuBois (Eds.). - American Chemical Society. – 2008. – P. 444-462.
49. DuBois, G.E. Validity of early indirect models of taste active sites and advances in new taste technologies enabled by improved models / G.E. DuBois // *Flavour and Fragrance Journal*. - 2011. - V. 26. - №4. – P. 239-253.
50. Dubois, M. / M. Dubois, R. Gills, J.K. Hamilton // *Anal. Chem.* - 1959. - V. 29. - №2. - P. 350-354.

51. Erkucuk, A. Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: identification and optimization / A. Erkucuk, I.H. Akgun, O. Yesil-Celiktas // J. Supercritical Fluids. – 2009. – V. 51. - №1. – P. 29 -35.
52. Esaki, S. Synthesis and taste of certain steviol glycosides / S. Esaki, R. Tanaka, S. Kamiya // Agric. Biol. Chem. – 1984. – V. 48. - №7. – P. 1831- 1834.
53. Fuh, W. Purification of steviosides by membranes and ion exchange processes / W. Fuh, B. Chiang // Journal of Food Science. – 1990. – V. 55. - №5. – P. 1454-1457.
54. Fujimoto, H. Synthesis of oligosaccharide components of glycoconjugates using glycosidases / H. Fujimoto, M. Isomura, K. Ajisaka // J. Appl. Glycosci. – 1996. – V. 43. – P. 265-272.
55. Fujita, K. Transfructosylation catalyzed by β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter sp.* K-1 / K. Fujita, H. Hara, H. Hashimoto, S. Kitahata // Agric. Biol. Chem. – 1990. – V. 54. - №10 – P. 2655-2661.
56. Fukunaga, Y. Enzymic transglucosylation products of stevioside: separation and sweetness evaluation / Y. Fukunaga, T. Miyata, N. Nakayasu, K. Mizutani, O.R. Tanaka // Agricult. Biolog. Chem. - 1989. - V. 53. – P. 1603-1607.
57. Geuns, J.M.C. Molecules of interest – stevioside / J.M.C. Geuns // Phytochemistry. - 2003. - V. 64. – P. 913-921.
58. GRAS Assessment of α -glucosylated steviol glycosides. - Toyo Sugar Refining Co., Ltd., Nippon Paper Chemicals Co., Ltd., 2011.
59. Hafizuddin, W.M. A quantitative analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana* using anthrone reaction / W.M. Hafizuddin, W. Yussof, M. Roji Sarmidi // Proceedings of International Conference on advancement in science and technology. - 2003. - Kuala Lumpur, Malaysia: IIUM. – P. 94-98.
60. Hale, W.S. Amylase of *Bacillus macerans* / W.S. Hale, L.C. Rawlins // Cereal Chem. – 1951. – V. 28. – P. 49-58.
61. Handbook of amylases and related enzymes / Yamamoto, T. (ed.). - Tokyo: Pergamon Press, 1988.
62. Hull, J.S. Aspartame side effects / Hull, J.S. – 2002. Internet: <http://www.sweetpoison.com/aspartame-side-effects.html>
63. Ishikawa, H. Production of stevioside and rubusoside derivatives by transfructosylation of β -fructofuranosidase / H. Ishikawa, S. Kitahata, K. Ohtani, C. Ikuhara, O. Tanaka // Agric. Biol. Chem. - 1990. – V. 54. - P. 3137-3143.
64. Ishikawa, H. Transfructosylation of rebaudioside A (a sweet glycoside of stevia leaves) with *Microbacterium* β -fructofuranosidase / H. Ishikawa, S. Kitahata, K. Ohtani, O. Tanaka // Chemical

- and Pharmaceutical Bulletin. – 1991. – V. 39. – P. 2043-2045.
65. Jaitak, V. Simple and efficient enzymatic transglycosylation of stevioside by β -cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* / V. Jaitak, K.V. Kumar, N.B. Kumar, B. Singh, L.S. Savergave, V.V. Jogdand, S. Nene // Biotechnol. Letters. – 2009. – V. 31. - №9. – P. 1415-1420.
 66. Jaitak, V. Chemical investigation of medicinal and aromatic plants and synthetic modifications of organic molecules by chemical and enzymatic processes: PhD Thesis Institute of Himalayan Bioresource Technology / V. Jaitak. – India, 2010. - 269 p.
 67. Jeppesen, P. Effects of long-term treatment with stevioside on the type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats: potential as a new antidiabetic drug / P. Jeppesen, S. Gregersen, K. Hermansen // Diabetes Research and Clinical Practice. – 2000a. – V. 50. – P. 393-394.
 68. Jeppesen, P. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K^+ -channel activity / P. Jeppesen, S. Gregersen, C. Poulsen, K. Hermansen // Metabolism Clinical and Experimental. – 2000b. – V. 49. - №2. – P. 208-214.
 69. Jeppesen, P. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats / P. Jeppesen, S. Gregersen, K. Alstrup, K. Hermansen // Phytomedicine (Jena). – 2002. – V. 9. - №1. – P. 9-14.
 70. Jeppesen, P.B. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat / P.B. Jeppesen, S. Gregersen, S.E.D. Rolfsen, M. Jepsen, M. Colombo, A. Agger, J. Xiao, M. Kruhøffer, T. Orntoft, K. Hermans // Metabolism. – 2003. – V. 52. - №3. – P. 372-378.
 71. Kamiya, S. Synthesis and taste of some analogues of stevioside / S. Kamiya, F. Konishi, S. Esaki // Agric. Biol. Chem. – 1979. – V. 43. – P. 1863-1867.
 72. Kaneda, N. Chemical studies on sweet diterpene-glycosides of *Stevia rebaudiana*: conversion of stevioside into rebaudioside A / N. Kaneda, R. Kasai, K. Yamazaki, O. Tanaka // Chem. and Pharm. Bull. – 1977. – V. 25. – P. 2466-2472.
 73. Kasai, R. Sweet diterpene-glycosides of leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Synthesis and structure–sweetness relationship of rebaudiosides A, D, E and their related glycosides / R. Kasai, N. Kaneda, O. Tanaka, K. Yamasaki, I. Sakamoto, K. Morimoto, S. Okada, S. Kitahata, H. Furukawa // Nippon Kagaku kaishi. – 1981. – V. 5. – P. 726-735.
 74. Kennelly, E.J. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. / E.J. Kennelly // In: Stevia: the genus stevia. - A.D. Kinghorn (ed.). – London: Taylor and Francis. – 2002a. – P. 68-85.
 75. Kennelly, E.J. Constituents of *Stevia rebaudiana* / E.J. Kennelly // In: Stevia: the genus stevia. - Kinghorn, A.D. (ed.). – London: Taylor and Francis. – 2002b. – P. 71.

76. Kinghorn, A.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use / A.D. Kinghorn, D.D. Soejarto // In: Economic and medicinal plant research. – H. Wagner, H. Hikino, N.R. Farnsworth (eds). - London: Academic Press, 1985. - V. 1. - P. 1-52.
77. Kinghorn, A.D. Stevioside / A.D. Kinghorn, D.D. Soejarto // In: Alternative sweeteners. – L. O'Brien Nabors, R.C. Gelardi (eds.). – N.Y.: Marcel Dekker, 1991. - P. 157-171.
78. Kinghorn, A.D. Overview / A.D. Kinghorn // In: Stevia: the genus stevia. – A.D. Kinghorn (ed.). – London: Taylor and Francis. – 2002. – P. 1-17.
79. Kitahata, S. Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various β -galactosidases / S. Kitahata, H. Ishikawa, T. Miyata, O. Tanaka // Agric. Biol. Chem. – 1989a. – V. 53. - №11. – P. 2923-2928.
80. Kitahata, S. Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various α -galactosidases / S. Kitahata, H. Ishikawa, T. Miyata, O. Tanaka // Agric. Biol. Chem. – 1989b. – V. 53. - №11. – P. 2929-2934.
81. Kitahata, S. Current industrial production and application of saccharides in Japan / S. Kitahata // Kasai Research Institute. – 2001. - 202 p.
82. Kobayashi, M. Dulcoside A and dulcoside B new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* / M. Kobayashi, S. Horikawa, Ih. Degrandi, J. Ueno, H. Mitsuhashi // Phytochemistry. – 1977. – V. 16. – P. 1405-1411.
83. Kohda, H. Diterpene glycosides of stevia - structures of aglycones / H. Kohda, O. Tanaka, K. Nishi // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1976a. – V. 24. – P. 1040-1044.
84. Kohda, H. New sweet diterpene glucoside from *Stevia rebaudiana* / H. Kohda, R. Kasai, K. Yamasaki, K. Murakami, O. Tanaka // Phytochemistry. – 1976b. – V. 15. – P. 981-983.
85. Koyama, E. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora / E. Koyama, K. Kitazawa, Y. Ohori, O. Izawa, K. Kakegawa, A. Fujino, M. Ui // Food Chem. Toxicology. - 2003. – V. 41. – P. 359–374.
86. Kroyer, G.T. The low-calorie sweetener stevioside: stability and interaction with food ingredients / Kroyer, G.T. // Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. - 1999. – V. 32. – P. 509-512.
87. Kuhn, C. Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame-K / C. Kuhn, B. Bufe, H. Winnig, M. Witting, T. Hofman, O. Frank, T. Lawtschenko, J. Slack, C. Ward, W. Meyerhof, W. // J. Neurosci. – 2004. – V. 24. – P. 10260-10265.
88. Lipinski, G.W.R. Acesulfame K / G.W.R. Lipinski, L.Y. Hanger // In: Alternative sweeteners. – L. O'Brien Nabors (ed.). – N.Y.: Marcel Dekker, 2001. – P. 13-31.

89. Liu, J. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts / J. Liu, J-W. Li, J. Tang // Food and Bioproducts Processing. – 2010. – V. 88. – P. 215-221.
90. Lobov, S.V. Enzymic production of sweet stevioside derivatives: transglucosylation by glucosidases / S.V. Lobov, R. Kasai, K. Ohtani, O. Tanaka, K. Yamasaki // Agric. Biol. Chem. 1991. - V. 55. - №12. - P. 2959-2965.
91. Matsui, M. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays / M. Matsui, K. Matsui, Y. Kawasaki, Y. Oda, T. Noguchi, Y. Kitagawa, M. Sawada, M. Hayashi, T. Nohmi, K. Yoshihira, M. Ishidate, T. Sofuni // Mutagenesis. – 1996a. – V. 11. - №6. – P. 573-579.
92. Matsui, M. Regionally targeted mutagenesis by metabolically activated steviol: DNA sequence analysis of steviol-induced mutants of guanine phosphoribosyltransferase (gpt) gene of *Salmonella typhimurium* TM677 / M. Matsui, T. Sofuni, T. Nohmi // Mutagenesis. – 1996b. – V. 11. – №6. - P. 565-572.
93. Melis, M.S. Influence of calcium on the blood pressure and renal effects of stevioside / M.S. Melis // Bras. J. Med. Biol. Res. – 1992a. – V. 25. – P. 943-949.
94. Melis, M.S. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats / M.S. Melis // J. Ethnopharmacology. – 1995. – V. 47. – P. 129-134.
95. Meyers, B. Sweet taste in man: a review / B. Meyers, M. Brewer // J. of Food Science. – 2008. – V. 73. - № 6. – P. R81-R90.
96. Mori, N. Effect of stevioside on fertility in rats / N. Mori, M. Sakanoue, M. Takeuchi, K. Shimpo, T. Tanabe // Journal of Food Hygienic Society of Japan. - 1981. – V. 22. – P. 409-414.
97. Mosettig, E. The absolute configuration of steviol and isosteviol / E. Mosettig, U. Beglinger, F. Dolder, H. Lichiti, P. Quitt, J.A. Waters // J. Am. Chem. Soc. – 1963. - V. 85 – P. 2303-1305.
98. Nakano, H. Application of cyclodextrin glucanotransferases to the synthesis of oligosaccharides and glycosides / H. Nakano, S. Kitahata // In: Handbook of industrial biocatalysis. – C.T. Hou (ed.). - Boca Raton, FL: Taylor and Francis/CRC Press. – 2005. - P. 22-1 - 22-15.
99. Nakano, H. Synthesis of useful glycosides by cyclodextrin glucanotransferases / H. Nakano, T. Kiso // In: Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – C.T. Hou, J.-F. Shaw (eds.). - Boca Raton, FL: Taylor and Francis/CRC Press. – 2009. – P. 339-353.
100. Nakayama, K. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of stevioside in rats / K. Nakayama, D. Kasahara, F. Yamamoto // Journal of Food Hygiene Society of Japan. – 1986. – V. 27. – P. 1-8.
101. Ohtani, K. Solubilization of steviolbioside and steviolmonoside with γ -cyclodextrin and its

- application to selective syntheses of better glycosides from stevioside and rubusoside / K. Ohtani, Y. Aikawa, Y. Fujisawa, R. Kasai, O. Tanaka, K. Yamasaki // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1991. – V. 39. – №12. – P. 3172-3174.
102. Ohtani, K. Methods to improve the taste of the sweet principles of *Stevia rebaudiana* / K. Ohtani, K. Yamasaki // In: *Stevia: the genus stevia*. - Kinghorn, A.D. (ed.). - London: Taylor and Francis, 2002. – P. 138-159.
 103. Pasquel, A. *Stevia (Stevia rebaudiana Bertonii)* leaves pretreatment with pressurized CO₂: an evaluation of the extract composition / A. Pasquel, M. Meireles, M. Marques // *Proceedings of the 6th meeting on supercritical fluids: chemistry and materials*. – Nottingham, Inglaterra: ISASF, 1999. – V.1. – P. 501.
 104. Pasquel, A. Extraction of stevia glycosides with CO₂+water, CO₂+ethanol, and CO₂+water+ethanol / A. Pasquel, M. Meireles, M.O.M. Marques, A.J. Petenate // *Brazilian J. Chemical Engineering*. – 2000. – V. 17. - №3. – P. 271-282.
 105. Patent Chinese Appl. 200910117118. Method for extracting rebaudioside A / X. Shao, W. He, X. Li, H. Niu, 2009.
 106. Patent Chinese Appl. 200910070870. New method for extracting main glycosides of *Stevia rebaudiana* under ultrahigh pressure / S. Jia, B. Li, C. Qiao, Y. Dai, Z. Tan, X. Shi, 2010.
 107. Patent Chinese Appl. CN101717418 / L. Cao, X. Feng, H. Li, X. Wang, G. Zhang, L. Zhang, 2010.
 108. Patent Chinese Appl. CN103804440. Technology for purifying rebaudioside C / J. Zhao, W. Yang, Y. Song, Y. Li, Y. Li, 2014.
 109. Patent Japan 77-105,260. Stevioside sweetener composition / T. Morita, M. Fujita, E. Morita, 1977.
 110. Patent Japan 55-092400. Purification of stevioside / I. Kageyama, 1980.
 111. Patent Japan 55-162953. Preparation of stevioside / S. Sekiya, 1980.
 112. Patent Japan 03-262458. Highly sweet trnglycosylated *Stevia* sweetener and the method of production of this product / T. Miyata, Y. Sawaguchi, M. Aikawa, 1991.
 113. Patent Japan 03-83558. Highly sweet *Stevia* sweetener and its production / T. Miyata, Y. Sawaguchi, M. Aikawa, 1991.
 114. Patent PCT Application WO 2013/096420. Methods for purifying steviol glycosides and uses of the same / I. Prakash, A. Markosyan, V.S.P. Chaturvedula, M. Campbell, R. San Miguel, S. Purkayastha, M. Johnson, 2013.
 115. Patent US 2018/0317534 A1. Steviol glycoside compositions / S. Purkayastha, J. Martin, M. Petit, K. Chkhan, 2018.

116. Patent US 3,723,410. Method of producing stevioside / G.J. Persinos, 1973.
117. Patent US 4,171,430. Separation of sweet component from natural extracts / S. Matsushita, T. Ikushigo, 1979.
118. Patent US 4,219,571. Process for producing sweetener / T. Miyake, 1980.
119. Patent US 4,361,697. Extraction, separation and recovery of diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* plants / R.H. Dobberstein, M.S. Ahmed, 1982.
120. Patent US 4,381,402. Steviol compounds / G.E. DuBois, 1983.
121. Patent US 4,454,290. Stevioside analogues / G.E. DuBois, 1984.
122. Patent US 4,599,403. Method for recovery of stevioside / S. Kumar, H. Levy, H.W. Sorkin, E.Y., Rogers, C.F. Bruno, 1986.
123. Patent US 5,972,120. Extraction of sweet compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni / O. Kutowy, S.Q. Zhang, A. Kumar, 1999.
124. Patent US 7,838,044. Extraction, separation and modification of sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant / V.H. Abelyan, V.T. Ghochikyan, A.A. Markosyan, M.O. Adamyan, L.A. Abelyan, 2010.
125. Patent US Appl. 0116821. Cereal compositions comprising high-potency sweeteners / I. Prakash, G.E. DuBois, 2007.
126. Patent US Appl. 0116828. Natural high-potency tabletop sweetener compositions with improved temporal profile and/or flavor profile, methods for their formulation, and uses / I. Prakash, G.E. DuBois, G.A. King, 2007.
127. Patent US Appl. 0116835. High-potency sweetener composition with vitamin and composition sweetened therewith / I. Prakash, G.E. DuBois, 2007.
128. Patent US Appl. 0128311. Natural high-potency sweetener compositions with improved temporal profile and/or flavor profile, methods for their formulation, and uses / I. Prakash, G.E. DuBois, P. Jella, G.A. King, R.I. San Miguel, K.H. Sepcic, D.K. Weerasinghe, N.R. White, 2007.
129. Patent US Appl. 14/494,322. Fermented dairy products containing sweetener and flavor modifier derived from stevia and methods of producing same / S. Purkayashta, A. Markosyan, M. Petit, K. Chkhan, M. Adamyan, 2015.
130. Patent US Appl. 2007/0292582. Rebaudioside A composition and method for purifying rebaudioside A / I. Prakash, G.E. DuBois, G.A. King, M. Upreti, 2007.
131. Patent US Appl. 2008/0292764. Stevioside polymorphic and amorphous forms, methods for their formulation, and uses / I. Prakash, M. Upreti, 2008.
132. Patent US Appl. 2010/0278993. Rebaudioside A derivative products and methods for making / I. Prakash, G.E. DuBois, R.I.S. Miguel, J. Clos, 2010.

133. Patent US Appl. 20100112175. Process for manufacturing a sweetener and use thereof / V.H. Abelyan, A.A. Markosyan, L.A. Abelyan, L.A, 2010.
134. Patent US Appl. 2011/0104353. Method to improve water solubility of rebaudioside D / T. Lee, 2011.
135. Patent US Appl. 2011/0160311. Sweetness enhancers, compositions thereof, and methods for use / I. Prakash, G.E. DuBois, J. Klucik, R.I.S. Miguel, R.J. Fritsch, V.S.P. Chaturvedula, 2011.
136. Patent US Appl. 201110023192. Novel stevia variety and method of producing sweetener / T. Morita, K. Morita, S. Kanzaki, 2011.
137. Patent US Appl. 2014/0171519. Compositions and methods for improving rebaudioside X solubility / I. Prakash, A. Markosyan, V.S.P. Chaturvedula, G. Ma, 2014.
138. Patent US Appl. US2012/0269954. Stevia blends containing rebaudioside B / J.R. Bridges, A. Carlson, P.A. Patton, 2012.
139. Patent US Appl. US2013/0040033. High-purity rubusoside and process for purification of the same / A. Markosyan, 2013.
140. Patent US Appl. US2015/0118379. High-purity rubusoside and process for purification of the same / A. Markosyan, 2015.
141. Patent US WO 2017/075034. Steviol glycoside compositions / S. Purkayashta, J. Martin, M. Petit, K. Chkhan, 2017.
142. Patent US WO 2017/106577. Steviol glycoside compositions / S. Purkayashta, J. Martin, M. Petit, A. Markosyan, K. Chkhan, M. Adamyan, 2017.
143. Patent WO 2015/006764. Compositions and methods for improving rebaudioside M solubility / I. Prakash, Y. Chen, A. Markosyan, 2015.
144. Patent WO/2011/090709. Sweetness enhancers, compositions thereof, and methods for use / I. Prakash, G.E. DuBois, J. Klucik, J., R.I. San Miguel, R. Fritsch, V.S.P. Chaturvedula, 2011.
145. Patent WO2010/038911. New steviol glycoside / T. Morita, I. Fujita, F. Matsuura, M. Ota, 2010.
146. Patent WO2011/037959. Novel polymorphs of rebaudioside C and methods for making and using the same / F.R. Salemme, R.A. Daines, 2011.
147. Patent WO2012/094752. Processes of purifying steviol glycoside rebaudioside C / Y.L. Zhang, C.K. Li, 2012.
148. Pezzuto, J.M. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic / J.M. Pezzuto, C.M. Compadre, S.M. Swanson, N.P.D. Nanayakkara, A.D. Kinghorn // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1985. – V. 82. - №8. – P. 2478-2482.
149. Pezzuto, J.M. Chemistry, metabolism and biological activity of steviol (ent-13-hydroxykaur-13-en-19-oic acid) / J.M. Pezzuto // In: New trends in natural products chemistry. Studies in organic

- chemistry. - Atta-ur-Rahman, P.W. Le Quesne (eds.). – Amsterdam: Elsevier Science Publishers. – 1986. – V. 26. - P. 371-386.
150. Phillips, K.G. Stevia: steps in developing a new sweetener / K.G. Phillips // In: Developments in sweeteners-3. – T.H. Grenby (ed.). – London: Elsevier Applied Science. - 1987. - P. 1-43.
 151. Pol, J. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water / J. Pol, E.V. Ostra, P. Karasek, M. Roth, K. Benešová, P. Kotlaříková, J. Čáslavský // Anal. Bioanal. Chem. - 2007. – V. 388. - №8. – P. 1847-1857.
 152. Prakash, I. Bioconversion of rebaudioside I from rebaudioside A / I. Prakash, C. Bunders, K.P. Devkota, R.D. Charan, C. Ramirez, T.M. Snyder, C. Priedemann, A. Markosyan, C. Jarrin, R. Ter Halle // Molecules. – 2014a. – V. 19. – P. 17345-17355.
 153. Prakash, I. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener / I. Prakash, G.E. DuBois, J.F. Clos, K.L. Wilkens, L.E. Fosdick // Food and Chemical Toxicology. - 2008. – V. 46. – P. 75–82.
 154. Prakash, I. Structural characterization of the degradation products of a minor natural sweet diterpene glycoside rebaudioside M under acidic conditions / I. Prakash, V.S.P. Chaturvedula, A. Markosyan // Int. J. Mol. Sci. – 2014b. – V. 15. – P. 1014-1025.
 155. Prakash, I. Development of next generation stevia sweetener: rebaudioside M / I. Prakash, A. Markosyan, C. Bunders // Foods. – 2014c. – V. 3. – P. 162-175.
 156. Puri, M. Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by *Staphylococcus xylosus* MAK2 in a stirred tank reactor / M. Puri, A. Kaur, C.J. Barrow, R.S. Singh // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011a. – V. 89. – P. 715-722.
 157. Puri, M. Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from kinnow peel waste / M. Puri, A. Kaur, W.H. Schwarz, S. Singh, J.F. Kennedy // Int. J. Biol. Macromol. – 2011b. – V. 48. – P. 58-62.
 158. Puri, M. Downstream processing of stevioside and its potential applications / M. Puri, D. Sharma, A.K. Tiwari // Biotechnology Advances. – 2011c. – V. 29. - №6. – P. 781-791.
 159. Shirakawa, T. Quantitative analysis of stevioside in soy sauce and hydrolyzate of vegetable protein / T. Shirakawa, T. Onishi // Kagawaken Hakko Shokuhin Shikenjo Hokoku. – 1979. – V. 71. – P. 35–39.
 160. Soejarto, D.D. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting stevia species / D.D. Soejarto, C.M. Compadre, P.J. Medon, S.K. Kamath, A.D. Kinghorn // Economic Botany. – 1983. – V. 37. – P. 71-79.

161. Somogyi, M.J. Notes on sugar determination / M.J. Somogyi // J. Biol. Chem. - 1952. – V. 195. - №11. – P. 19-22.
162. Suanarunsawat, T. The effect of stevioside on glucose metabolism in rat / T. Suanarunsawat, N. Chaiyabutr // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1997. – V. 75. – P. 976–982.
163. Suzuki, H. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* / H. Suzuki, L. Achnine, R. Xu, S.P. Matsuda, R.A. Dixon // Plant J. – 2002. – V. 32. – P. 1033-1048.
164. Takahashi, K. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana* / K. Takahashi, M. Matsuda, K. Ohashi, K. Taniguchi, O. Nakagomi, Y. Abe, S. Mori, N. Sato, K. Okutani, S. Shigeta // Antiviral Research. – 2001. – V. 49. – P. 15-24.
165. Tilden, E.B. Preparation and properties of the amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa* / E.B. Tilden, C.S. Hudson // J. Bacteriol. – 1942. – V. 43. - №4. – P. 527-544.
166. Toskulkao, C. Effects of stevioside, a natural sweetener, of intestinal glucose absorption in hamsters / C. Toskulkao, M. Sutheerawattananon // Nutrition Research. – 1994. – V. 14. – P. 1711-1720.
167. Toskulkao, C. Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species / C. Toskulkao, L. Chaturat, P. Temcharoen, T. Glinsukon, T. // Drug and Chemical Toxicology. – 1997. – V. 20. – P. 31-44.
168. Toyoda, K. Reevaluation of the safety of a food additive (reported in fiscal 1994). A chronic toxicity/carcinogenicity study of stevioside (a substance extracted from stevia) / K. Toyoda, H. Matsui, T. Shoda, C. Uneyama, K. Takada, M. Takahashi // Final report. Unpublished report from Division of Pathology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Japan. - Submitted to WHO by Ministry of Health and Welfare, Food Chemistry Division, Japan. – 1995.
169. Toyoda, K. Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats // Food and Chemical Toxicology. – 1997. - V. 35. - №6. – P. 597-603.
170. Wingard Jr., R.E. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A / R.E. Wingard Jr., J.P. Brown, F.E. Enderlin, J.A. Dale, C.T. Seitz // Experientia. – 1980. - V. 36. – P. 519-520.
171. Wood, H.B. Stevioside. I. The structure of glucose moieties / H.B. Wood, R. Allerton, H.W. Diehl, H.G. Fletcher // J. Org. Chem. – 1955. - V. 20. – P. 875-883.
172. Xili, L. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats / L. Xili, B. Chengjiany, X. Eryi, A. Reiming, W. Yuengming, S. Haodong, H. Zhiyian // Food and Chemical Toxicology. – 1992. – V. 30. - №11. – P. 957-965.

173. Yamamoto, K. Effective production of glycosyl-steviosides by α -1,6-transglucosylation of dextrin dextranase / K. Yamamoto, K. Yoshikawa, S. Okada // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 1994. – V. 58. - №9. – P. 1657-1661.
174. Yasukawa, K. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin / K. Yasukawa, S. Kitanaka, S. Seo // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2002. – V. 25. - №11. – P. 1488-1490.
175. Yoda, S.K. Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂+water: extraction kinetics and identification of extracted components / S.K. Yoda, M.O.M. Marques, A.J. Petenate, M.A.A. Meireles // Journal of Food Engineering. – 2003. – V. 57. – P. 125-134.
176. Yodyingyuad, V. Effect of stevioside on growth and reproduction / V. Yodyingyuad, S. Bunyawong // Human Reproduction. - 1991. – V. 6. – P. 158-165.
177. Zhang, S.Q. *Stevia rebaudiana* leaves – a low calorie source of sweeteners / S.Q. Zhang, O. Kutowy, A. Kumar // Canadian Chemical News. – 1999. - V. 51. - №5. – P. 22-24.
178. Zhang, S.Q. Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves / S.Q. Zhang, A. Kumar, O. Kutowy // Food Research International. – 2000. – V. 33. - №7. – P. 617-620.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЦГТаза	Циклодекстрин глюканотрансфераза
ФФаза	Фруктофуранозидаза
РебА	Ребаудиозид А
РебD	Ребаудиозид D
РебM	Ребаудиозид M
РебА-Gly	Ребаудиозид А гликозилированный
Фруктозил-РебА РебА - F	Ребаудиозид А фруктозилированный
РебА-G1	моно-гликозилированная производная ребаудиозида А
РебА-G2	ди-гликозилированная производная ребаудиозида А
РебА-G3	три-гликозилированная производная ребаудиозида А
РебD-G1	моно-гликозилированная производная ребаудиозида D
γ-ЦД	Гамма-циклодекстрины
ЭС	Эквивалент Сахара
C/R	Функция концентрация/отклик
АТ	время появления сладости
ЕТ	время исчезновения сладости
СГ	стевиол гликозиды
ЭС95	высокоочищенная смесь экстракта стевии
УФ	ультрафильтрация
КЖ	культуральная жидкость
Diaion HP-20	адсорбционная смола
ВЭЖХ/МС	высокоэффективная жидкостная хромато-масс спектрометрия
MSD	Масс детектор для ВЭЖХ
BV/h	Объем колонки заполненный смолой/час
QT	Качество вкуса
R ₁ ; R ₂	Радикал
Gal	Галактоза
Glu	Глюкоза

СПИСОК ПРИЛОЖЕНИЙ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1	Форма дегустационного листа Дегустационный лист №1 Дегустационный лист №2 Дегустационный лист №3
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	АКТ проведения производственных пилотных испытаний получения, биотрансформации и очистки производных сладких гликозидов растения <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni с целью получения продуктов для использования их в качестве сахарозаменителей в напитках и пищевых продуктах.
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	Патенты
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	Диплом

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

(справочное)

Форма дегустационного листа

Дегустационный лист №1

Краткое описание образцов:

- обезличенный классический йогурт с добавлением *Стевии* до и после инкубации (1 саше = 2 ч.л. сахара, на 100см³)

- обезличенный классический йогурт с добавлением 8% сахара (контроль)

Попробуйте каждый из них и ранжируйте от меньшего к большему по дескрипторам.

Сладость, Горечь, Сладкое послевкусие, Горькое послевкусие, Общая приемлемость, Посторонний привкус

Шифр образца	Сладость	Горечь	Сладкое послевкусие	Горькое послевкусие	Общая приемлемость	Посторонний привкус	Шкала оценки
	Определите интенсивность сладкого вкуса	Определите интенсивность горечи во вкусе	Определите как долго остается ощущение сладости во рту	Определите как долго остается ощущение горечи во рту	Оцените общую приемлемость вкуса предоставленного образца йогурта Нравится / Не нравится	Определите присутствует ли какой-либо посторонний привкус в целом. Привкус отличный от горечи / сладости.	Ранжируйте от меньшего к большему по дескрипторам
1-019	1- не сладкий 5- умеренно сладкий 9- ярко выраженная сладость/ очень сладкий	1- не горький 5- умеренно горький 9- ярко выраженная горечь/ очень горький	1- без послевкусия 5-недолгое сладкое послевкусие 9- ярко выраженное сладкое послевкусие	1- без послевкусия 5- недолгое горькое послевкусие 9- ярко выраженное горькое послевкусие	1- не нравится 5-нравится	1- нет, постороннего привкуса нет 5-легких посторонний привкус 9- ярко выраженный посторонний привкус	От 1 до 9 баллов

2-019							
3-019							
4-019							
5-019-0							
6-019-0							
Шифр образца	Сладость	горечь	Сладкое послевкусие	Горькое послевкусие	Общая приемлемость	Посторонний привкус	Общий балл
1-019							
3-019							
5-019							

Дата _____
Подпись _____

Ф.И.О. тестера _____

Форма дегустационного листа

Дегустационный лист №2

Краткое описание образцов:

- обезличенный классический йогурт с добавлением *Стевии* до и после инкубации

(1 саше = 2 ч.л. сахара, на 100 см³)

- обезличенный классический йогурт с добавлением 8% сахара (контроль)

Попробуйте каждый из них и ранжируйте от меньшего к большему по дескрипторам.

Внешний вид; Консистенция во время перемешивания; Консистенция во рту; Вкус.

Дескриптор	Определение дескриптора	Протокол определения	Шкала оценки
1.Цвет	Интенсивность цвета йогурта	Определяется в сравнении с листом белой бумаги	1 – очень белый 4 – желтоватый 8 – интенсивный желтый или другой оттенок
2.Степень неровности поверхности	Степень деформации поверхности, включения	Чем больше неровностей на поверхности продукта, тем выше балл.	1 – однородная поверхность 8 – сильно неоднородная
3.Неоднородность при перемешивании	Способность продукта становится однородным во время перемешивания	Перемешивайте продукт 6 раз, наблюдая его консистенцию.	1- однородная 4- неоднородность исчезла при перемешивании 8- неоднородность сохранилась после перемешивания
4.Густота во рту	Густота	Оцените густоту/плотность продукта	1-жидкий 8 - густой
5.Кислый	Ощущение кислого вкуса в первую очередь на боковых поверхностях языка	Распределите продукт по всей полости рта, определите интенсивность кислого вкуса	1 – отсутствует 8 – очень сильная кислинка
6. Сладкий	Ощущение сладкого вкуса в первую очередь на кончике языка	Определите интенсивность сладкого вкуса	1- не сладкий 3- умеренно сладкий без послевкуся 6- умеренно сладкий с долгим сладким послевкусием 9- ярко выраженная сладость/очень сладкий

Дата _____

Ф.И.О. тестера _____

Подпись _____

Форма дегустационного листа

Дегустационный лист №3

Краткое описание образцов: моносортовое чайное сырье (чёрный чай слабый раствор) с добавлением Стевии (1 саше = 2 ч.л. сахара) (1 ч.л сахара= 4 г сахара)

Краткое описание образцов:

- обезличенный классический йогурт с добавлением Стевии до и после инкубации (1 саше = 2 ч.л. сахара, на 100 см³)

- обезличенный классический йогурт с добавлением 8% сахара (контроль)

Шифр образца	Сладость	Горечь	Сладкое послевкусие	Горькое послевкусие	Общая приемлемость	Посторонний привкус	Общий балл
	Определите интенсивность сладкого вкуса	Определите интенсивность горечи во вкусе	Определите как долго остается ощущение сладости во рту	Определите как долго остается ощущение горечи во рту	Оцените общую приемлемость вкуса предоставленного образца йогурта Нравится / Не нравится	Определите присутствует ли какой-либо посторонний привкус в целом. Привкус отличный от горечи / сладости	Ранжируйте от меньшего к большому по дескрипторам
9-019	1- не сладкий 5- умеренно сладкий 9- ярко выраженная сладость /очень сладкий	1- не горький 5- умеренно горький 9- ярко выраженная горечь /очень горький	1- без послевкусия 5- недолгое сладкое послевкусие 9- ярко выраженное слакое послевкусие	1- без послевкусия 5- недолгое горькое послевкусие 9- ярко выраженное горькое послевкусие	1- не нравится 5- нравится	1- нет, постороннего привкуса нет 5-легких посторонний привкус 9- ярко выраженный посторонний привкус	От 1 до 9 баллов
10-019							
11-019							-

Дата _____
Подпись _____

Ф.И.О. титестера _____


ПРИЛОЖЕНИЕ 2

КОПИЯ



ALAGESWARANATHAN V
SENIOR MANAGER HUMAN RESOURCES
PureCircle Sdn Bhd (578803-K)

«APPROVED»
General Manager
«PureCircle Sdn. Bhd»
Ekazhev Zaurbek



«30» 03/2018

REPORT

On conducted production pilot trials for obtaining, biotransformation and purification of derivatives of sweet glycosides of the plant *Stevia rebaudiana* Bertoni with intention to obtain products for use as sugar substitutes in beverages and food products

This report was prepared by the committee consisting of the plant General Manager Ekazhev Zaurbek, head of the Human Resource department of the plant Alagesvaranatan Vatmanatan and the Research and Development scientist Chkhan Kristina., from the period of March 5 to March 30, 2018 in the pilot plant of PureCircle Sdn Bhd Malaysia, production trials of the developed technology for the production and biotransformation of minor stevia glycosides, as well as purification of their derivatives, were carried out.

An extract of the *Stevia rebaudiana* Bertoni plant was used as the starting material. From the extract, glycosides - RebM, RebD, RebA - were isolated and transglycosylated using cyclomalto-dextrin glucanotransferase (CGTase). *Geobacillus stearothermophilus* St-88 from the PureCircle Ltd (Malaysia) microorganism culture collection was used as a producer.

Biotransformation products were purified on Diaion HP-20 or Amberlite XAD-4 adsorption resin, the ratio of glycosides to gel used was 10%. The mono-, di- and tri-glycosylated derivatives obtained as a result of the biotransformation of steviol glycosides were isolated and purified.

The isolation and purification of the individual derivatives was carried out on the interconnected columns filled with Diaion HP-20 resin.

A 20% solution of the modified glycoside in 5% ethanol was passed through the columns after treatment with glucoamylase or α -amylase and purification on a macroporous resin.

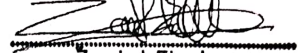
An organoleptic evaluation of the taste of enzymatically modified sweet glycosides of stevia - RebD, RebM, RebA, their mono-, di- and tri-glycosylated derivatives, as well as unmodified forms contained in stevia leaves was carried out. The descriptors were: sweetness, bitterness, sweet aftertaste, bitter aftertaste, extraneous tastes, general acceptability.

The obtained results demonstrate the successful implementation of the transglycosylation technology of minor sweet stevia glycosides and their purification into the scaled production, with the possibility of using the obtained products as both independent sugar substitutes and taste modifiers in food products and beverages.

General Manager
PureCircle Sdn. Bhd

Ekazhev Zaurbek

PureCircle Sdn Bhd 578803-K



Zaurbek Ekazhev
General Manager

HR Senior Manager

Mr. Alageswaranathan A/L Vatmanathan



ALAGESWARANATHAN V
SENIOR MANAGER HUMAN RESOURCES
PureCircle Sdn Bhd (578803-K)

R&D Scientist

Chkhan Kristina

/Перевод с английского языка на русский язык/

<Подпись>

[Штамп: Алагесваранатан В.
Начальник отдела кадров
ОАО «Pure Circle Sdn. Bhd» (578803-K)]

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
производству
ОАО «PureCircle Sdn. Bhd»
Экажев Заурбек
<Подпись>
30.03.2018

АКТ

**проведения производственных пилотных испытаний получения,
биотрансформации и очистки производных сладких гликозидов растения *Stevia
rebaudiana* Bertoni с целью получения продуктов для использования их в качестве
сахарозаменителей в напитках и пищевых продуктах**

Настоящий акт составлен комиссией в составе генерального директора по производству Экажева З.Д., начальника отдела кадров завода Алагесваранатана Ватманатана и сотрудницы научно-исследовательской лаборатории Чхан К.В., о том, что в период с 5 по 30 марта 2018 г в пилотном цехе ОАО «PureCircle Sdn. Bhd» Малайзия, были проведены производственные испытания разработанной технологии получения и биотрансформации минорных гликозидов стевии, а также очистке их производных.

В качестве исходного материала был взят экстракт растения *Стевия ребаудiana* Бертони. Из экстракта были выделены гликозиды РебМ, РебD, РебА. Трансгликозилированны с помощью цикломальто декстрин глюканотрансферазы (ЦГТазы), в качестве продуцента был использован *Geobacillus stearothermophilus* St-88 из коллекции культур микроорганизмов компании PureCircle (Малайзия).

Продукты биотрансформации были очищены с помощью адсорбционной смолы Diaion HP-20 Amberlite XAD-4 , соотношение гликозидов к гелю 10%. Полученные производные в результате биотрансформации стевииогликозидов стевии были выделены и очищены до три-гликозилированных. Выделение и очистку индивидуальных производных осуществляли колонках с смолой Diaion HP-20,

/Перевод с английского языка на русский язык/

соединенных между собой параллельно.

Через колонки пропускали 20%-ный раствор модифицированного гликозида в 5% этиловом спирте после обработки глюкоамилазой или р-амилазой и очистки на крупнопористой смоле.

Проводили органолептическую оценку вкуса ферментативно модифицированных сладких гликозидов стевии РебD, РебM, РебA, их моно-, ди- и три-гликозирированных производных, а также немодифицированных форм содержащихся в листьях стевии. Дескрипторами являлись: сладость, горечь, сладкое послевкусие, горькое послевкусие, посторонние привкусы, общая приемлемость.

Полученные результаты свидетельствуют об успешном внедрении технологии трансгликозилирования минорных сладких гликозидов стевии и их очистке в производство, с возможностью использования полученных продуктов в качестве как самостоятельных сахарозаменителей, так и модификаторов вкуса в пищевых продуктах и напитках.

Генеральный директор по производству **ЭкажевЗ.Д.**
ОАО «PureCircle Sdn. Bhd»

[Штамп: ОАО «Pure Circle Sdn. Bhd» 578803-К
<Подпись>
Заурбек Экажев
Генеральный директор]

Начальник отдела кадров

Алагесваранатан В.

Начальник отдела кадров

Алагесваранатан Ватманатам

<Подпись>

[Штамп: Алагесваранатан В.
Начальник отдела кадров
ОАО «Pure Circle Sdn. Bhd» (578803-К)]

Научный сотрудник лаборатории

Чхан К. В.

Российская Федерация

Город Москва

Двадцать шестого апреля две тысячи девятнадцатого года

Я, Васько Петр Андреевич, нотариус города Москвы, свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2035-п/77-2019-2-435

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 60 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 300 руб. 00 коп.



П.А. Васько

Всего прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 5 (пять) листов.

П.А. Васько



ПРИЛОЖЕНИЕ 3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(10) International Publication Number
WO 2017/106577 A1(43) International Publication Date
22 June 2017 (22.06.2017)(51) International Patent Classification:
A23L 27/30 (2016.01) *C07H 15/24* (2006.01)
A23L 2/00 (2006.01) *C13K 13/00* (2006.01)(74) Agents: **BABCOCK, Audrey J.** et al.; Briggs and Morgan, P.A., 2200 IDS Center, 80 South Eighth Street, Minneapolis, MN 55402 (US).(21) International Application Number:
PCT/US2016/067053

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
15 December 2016 (15.12.2016)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
62/267,521 15 December 2015 (15.12.2015) US(71) Applicant: **PURECIRCLE USA INC.** [US/US]; 915 Harger Road, Suite 250, Oak Brook, IL 60523-1492 (US).(72) Inventors: **PURKAYASTHA, Siddhartha**; 1250 South Indiana Avenue, Apt. 1003, Chicago, IL 60605 (US). **MARTIN, John**; 507 North Ada Street, Chicago, IL 60642 (US). **PETIT, Marcia**; 9264 S. Burnside Avenue, Chicago, IL 60619 (US). **MARKOSYAN, Avetik**; 10-54 Babujanyan Street, Yerevan, 375064 (AM). **CHKHAN, Kristina**; 4B-6-5 Tivelli Villa, Jalan Medan Tanduk, Bukit Baraduraya, Bangsar, Kuala Lumpur, 59100 (MY). **ADAMYAN, Mariam**; 5/D Persada Aman, Alam Milenia, Bandar Enstek, Negeri Sembilan, 71760 (MY).

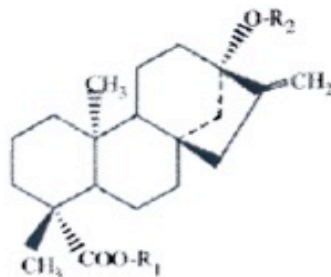
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: STEVIOL GLYCOSIDE COMPOSITIONS

(57) Abstract: Steviol glycoside compositions having improved sweetness and flavor profiles are described.

FIG. 1



WO 2017/106577 A1

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(10) International Publication Number
WO 2017/075034 A1(43) International Publication Date
4 May 2017 (04.05.2017)

- (51) International Patent Classification:
A23L 2/60 (2006.01) A23L 33/20 (2016.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2016/058834
- (22) International Filing Date:
26 October 2016 (26.10.2016)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
62/246,412 26 October 2015 (26.10.2015) US
62/255,838 16 November 2015 (16.11.2015) US
- (71) Applicant: PURECIRCLE USA INC. [US/US]; 915 Har-
ger Road, Suite 250, Oak Brook, IL 60523-1492 (US).
- (72) Inventors: PURKAYASTHA, Siddhartha; 1250 South
Indiana Avenue, Apt. 1003, Chicago, IL 60605 (US).
MARTIN, John; 507 North Ada Street, Chicago, IL
60642 (US). PETTIT, Marcia; 9264 S. Burnside Avenue,
Chicago, IL 60619 (US).
- (74) Agents: BABCOCK, Audrey J. et al.; Briggs and Mor-
gan, P.A., 2200 IDS Center, 80 South Eighth Street, Min-
neapolis, MN 55402 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report (Art. 21(3))

 WO 2017/075034 A1

(54) Title: STEVIOL GLYCOSIDE COMPOSITIONS

(57) Abstract: Steviol glycoside compositions having improved sweetness and flavor profiles are described.



1. (WO2017075034) STEVIOL GLYCOSIDE COMPOSITIONS

PCT Biblio. Data	Description	Claims	Drawings	National Phase	Notices	Documents
Latest bibliographic data on file with the International Bureau Submit observation						PermaLink
Pub. No.:	WO/2017/075034	International Application No.:	PCT/US2016/058834			
Publication Date:	04.05.2017	International Filing Date:	26.10.2016			
IPC:	A23L 2/60 (2006.01) ,A23L 33/20 (2016.01)					
Applicants:	PURECIRCLE USA INC.[US/US]; 915 Harger Road, Suite 250 Oak Brook, IL 60523-1492, US					
Inventors:	PURKAYASTHA, Siddhartha; US MARTIN, John; US PETIT, Marcia; US CHKHAN, Kristina; MY					
Agent:	BABCOCK, Audrey J.; US HELGET, Gerald, E.; US ROSENBERG, Daniel, A.; US					
Priority Data:	62/246,412 26.10.2015 US 62/255,838 16.11.2015 US					
Title	(EN) STEVIOL GLYCOSIDE COMPOSITIONS (FR) COMPOSITIONS DE GLYCOSIDE DE STÉVIOL					
Abstract:	(EN) Steviol glycoside compositions having improved sweetness and flavor profiles are described. (FR) L'invention concerne des compositions de glycoside de stéviol ayant des profils sucré et aromatisé améliorés.					
Designated States:	AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Eurasian Patent Office (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM) European Patent Office (EPO) (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR) African Intellectual Property Organization (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)					
Publication Language:	English (EN)					
Filing Language:	English (EN)					



US 20150125571A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
PURKAYASTHA et al.(10) **Pub. No.:** US 2015/0125571 A1
(43) **Pub. Date:** May 7, 2015(54) **FERMENTED DAIRY PRODUCTS
CONTAINING SWEETENER AND FLAVOR
MODIFIER DERIVED FROM STEVIA AND
METHODS OF PRODUCING SAME****Related U.S. Application Data**(60) Provisional application No. 61/881,030, filed on Sep.
23, 2013.(71) Applicant: **PURECIRCLE USA INC.**, Oak Brook,
IL (US)**Publication Classification**(72) Inventors: **Siddhartha PURKAYASTHA**,
Lombard, IL (US); **Avetik
MARKOSYAN**, Yerevan (AM); **Marcia
PETT**, Chicago, IL (US); **Kristina
CHKHAN**, Kuala Lumpur (MY);
Mariam ADAMYAN, Bandar Enstek
(MY)(51) **Int. Cl.**
A23C 9/13 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)(52) **U.S. CL.**
CPC *A23C 9/1307* (2013.01); *A23C 9/123*
(2013.01)(21) Appl. No.: **14/494,322**(22) Filed: **Sep. 23, 2014**(57) **ABSTRACT**

Sweetener compositions including mainly highly purified steviol glycosides, and methods for making and using these compositions as a sweetener to sweeten fermented dairy products, are described.



US 20180317534A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
PURKAYASTHA et al.(10) **Pub. No.:** US 2018/0317534 A1(43) **Pub. Date:** Nov. 8, 2018(54) **STEVIOL GLYCOSIDE COMPOSITIONS**(71) Applicant: **PureCircle USA Inc.**, Oak Brook, IL (US)(72) Inventors: **Siddhartha PURKAYASTHA**, Chicago, IL (US); **John MARTIN**, Chicago, IL (US); **Marcia PETTIT**, Chicago, IL (US); **Kristina CHKHAN**, Kuala Lumpur (MY)(21) Appl. No.: **15/771,248**(22) PCT Filed: **Oct. 26, 2016**(86) PCT No.: **PCT/US2016/058834**

§ 371 (c)(1),

(2) Date: **Apr. 26, 2018****Related U.S. Application Data**

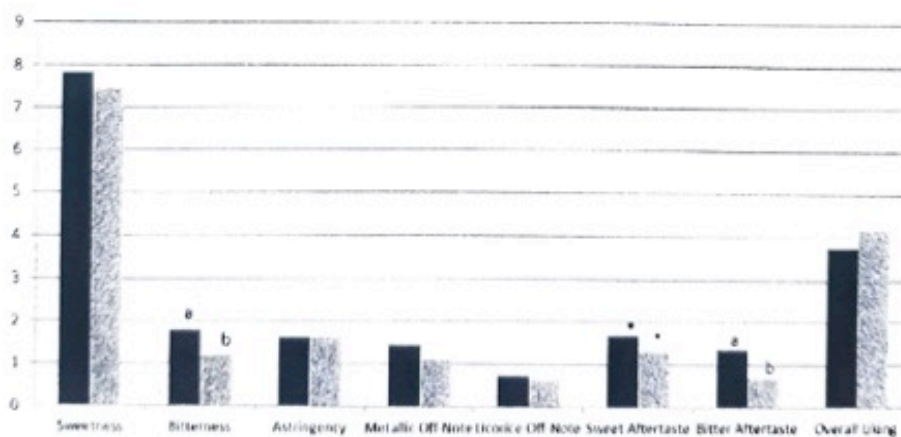
(60) Provisional application No. 62/246,412, filed on Oct. 26, 2015, provisional application No. 62/255,838, filed on Nov. 16, 2015.

Publication Classification(51) **Int. Cl.**
A23L 27/30 (2006.01)
(52) **U.S. Cl.**
CPC **A23L 27/36** (2016.08); **A23V 2002/00** (2013.01); **A23V 2250/258** (2013.01); **A23V 2200/15** (2013.01); **A23V 2250/262** (2013.01); **A23V 2200/132** (2013.01)(57) **ABSTRACT**

Steviol glycoside compositions having improved sweetness and flavor profiles are described.

600ppm Reb A97 in acidified water (first bars)

500ppm of fructosylated Reb A in acidified water (second bars)



ПРИЛОЖЕНИЕ 4

XIII Международный биотехнологический Форум-выставка «РосБиоТех -2019»

24 - 26 апреля 2019 г.



ДИПЛОМ

награждается золотой медалью

ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет пищевых производств»

**«Улучшение вкусовых характеристик гликозидов
Стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) методом
ферментативной биотрансформации»**

Чхан Кристина Викторовна, аспирант

Председатель Организационного комитета,
Академик Российской академии наук

Лисицын А.Б.