

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛАДІНА

на правах рукопису

ЛОБОВ Сергій Вікторович

ЕНЗИМАТИЧНЕ ТРАНСГЛІКОЗИЛОВАННЯ ПРОДУКТІВ
СТЕВІОЗИДУ ІЗ STEVIA REBAUDIANA BERTONI.

03.00.04 -біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття вченого ступеню
кандидата біологічних наук

Київ - 1993

AB 27.29

Робота виконана в Інституті цукрових буряків УААН

Наукові керівники : кандидат біологічних наук
Борисик В. О.
проф. О. Танака

Офіційні опоненти : доктор біологічних наук
головний науковий співробітник
Судьїна О. Г.

доктор біологічних наук
професор
Капля А. В.

Ведуча організація : Інститут мікробіології АН України

Захист відбудеться *24* травня 1993 року о *14* годині на засіданні
Спеціалізованої ради Д 016.07.01 в Інституті біохімії
ім. О. В. Паладіна АН України (252030, г. Київ, вул. Леонтовича, 9)

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту

Автореферат розісланий *22* квітня 1993 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої ради *Мурси* КІРСЕНКО О. В.

ЛННБ України ім. В. Стефаника



00803131 (G)

Актуальність проблеми.

В останні роки в усьому світі виникла проблема отримання цукру та інших цукристих сполук в достатній кількості, що задовольняють потреби населення та харчової промисловості. З іншого боку проблема захворювання людей цукровим діабетом та надмірною вагою вимагає шукати джерела нових низькокалорійних підсолоджувачих речовин. Підсолоджувачі речовини, що становлять інтерес в практичній точці зору, можна розділити на природні та синтетичні.

До природних речовин відносяться моно- та олігосахариди, продукти гідролізу крохмалю, а також цукрові спирти та підсолоджувачі речовини, що не відносяться до сахаридів. До другої групи можна віднести солодкі сполуки отримані хімічним шляхом, такі як сахарин, дульцин, цикламат, сорбіт, ксиліт, аспартам та інші. Всі ці речовини широко застосовуються в харчовій промисловості для виробництва консервів, кондитерських виробів, напоїв, морозива, а також в медицині та косметичній промисловості.

Після вивчення структури деяких природних підсолоджувачих речовин, вдалось розробити методи отримання даних речовин синтетичним шляхом, виключаючи виділення із природної сировини. Одним із джерел низькокалорійних цукрозамінників являється рослина *Stevia rebaudiana* Bertoni родини *Asteraceae*, батьківщиною якої являється Парагвай. Рослини стевії містять в собі низькокалорійні diterпенові глікозиди в високім ступенем солодості, але мають гіркуватий присмак.

Актуальність проблем полягає також в тому, що на Україні стевія інтродукується Інститутом цукрових буряків УААН в 1985 р. Застосування методу культури тканин дало можливість швидко розмножити придбані одиничні екземпляри рослини до промислових масштабів плантації. Розпочата селекційна робота, розробляється технологія її промислової переробки. проведені токсикологічні дослідження та є довідл МОЗ для використання продуктів на основі стевії в харчовій промисловості.

Мета та завдання досліджень.

Метою даної роботи було проведення реакції трансглікозидування за допомогою різноманітних ферментативних систем, основного diterпенового глікозиду стевіозиду для отримання нових продуктів трансглікозидування, що мають кращі смакові властивості та 1-6 гліко-

видний зв'язок.

Для досягнення мети роботи послідовно вирішувались декілька завдань:

1. Виділення та розділення дитерпенових глікозидів стевіозида, ребаудіозида А, С, Д, та Е, а також дульковида А із рослини *Stevia rebaudiana* Bertoni.
2. Визначення умов транsgлікозилювання за допомогою різноманітних ферментативних систем.
3. Виділення та накопичення продуктів транsgлікозилювання за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.
4. Визначення структури продуктів транsgлікозилювання стевіозиду.
5. Тестування смакових якостей синтезованих продуктів транsgлікозилювання.

Наукова новизна та практична цінність роботи.

В результаті виконаної роботи був досліджений цілий ряд ферментативних систем мікробіологічного походження. За їх допомогою синтезовані нові сполуки, що мають рівні смакові властивості. Деякі із отриманих продуктів мають високий ступінь солодості та гарні смакові якості. Виділення та накопичення продуктів транsgлікозилювання надало можливість вивчити будову та визначити структуру синтезованих речовин. Вперше були отримані продукти транsgлікозилювання стевіозиду, що мають в своєму складі 1-6 глікозидні зв'язки. Отримані дані дозволили вивчити залежність ступеню солодості та смакових якостей від структурного розміщення молекул глікози та кількості транsgлікозилюваних молекул. Отримання продуктів транsgлікозилювання при економічно вигідних умовах дозволить використовувати дані речовини в харчовій промисловості для вживання хворими, що страждають цукровим діабетом, а також дозволить значно скоротити вживання цукру, як основної солодкої речовини.

Структура та обсяг роботи.

Дисертація викладена на 101 сторінці машинописного тексту та складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини та обговорення результатів, закінчення та висновків. Робота ілюстрована 35 малюнками та 2 таблицями. Список цитованої літера-

тури містить 84 джерела.

Апробація роботи.

Матеріали дисертації представлені на в'язі Японського фармацевтичного товариства, Саппоро (1990), наукових семінарах Хіросімського університету та методичній Раді Інституту цукрових буряків УААН.

Публікації.

За матеріалами дисертації опубліковано 2 статті.

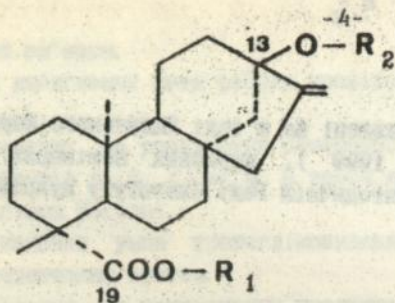
Матеріали та методи дослідження.

Стевіозид був виділений із сухих листків *Stevia rebaudiana* Bertoni за методом O. Tanaka et. al. Листки стевії були надані Maruzen Kasei Co., Ltd. (Японія).

Трансглікозилування проводили таким чином :

Розчин, що містив стевіозид (1г), донор (1г мальтози або пуллулана) та фермент (2000 од. активності кожної в глікозидаз, що виробляється на комерційній основі), в 50 мл ацетатного буферу (рН 5,45 або 6,06), інкубували при 37°C або 50°C на протязі 32 год. Реакційна суміш аналізувалась за допомогою ВЕРХ після обробки за допомогою іонообмінної смоли Dialon HP-20 (Mitsubishi Kasei Co., Ltd.). Зразки брали через 1, 2, 4, 8, 16 та 32 години. Умови для проведення ВЕРХ : колонка Tosoh TSK- gel ODS- 120T (4,6 мм x 25 см); температура колонки 60°C ; реагент для розділення - 50 % метанол. Швидкість протікання 1 мл / хв , детектор УФ- 210 нм.

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) проводилась на пластинках Kiesel gel 60 TLC plate фірми Merk Co., Ltd. (ФРГ). Високоєфективна рідинна хроматографія ВЕРХ проводилась за допомогою хроматографа Tosoh CCPM та реєструвалась ультрафіолетовим детектором Tosoh UV-8 (210 нм) фірми Tosoh (Японія) Розділення глікозидів проводили на зворотньофазових колонках YMC D-ODS-5 (4,6 мм x 15 см для аналізу) та Tosoh TSK- gel ODS- 120 T (21,5 мм x 30 см для препаративного розділення) фірми Tosoh (Японія). ¹H- ЯМР та ¹³C-ЯМР проводили на ЯМР-спектрометрі JEOL JNM GX-400 . При 400 мегагерц для протон ¹H-ЯМР и при 100 мегагерц для вуглець ¹³C-ЯМР. Зразки розчиняли в піридині C₅D₅N. FAB- MS та EI- MS мас-спект-



	R_1	R_2
Стевіовид	glo	glo ² -1glo
Стевіол	H	H
Ребаудіовид А	glo	glo ² ₃ -1glo 1glo
Ребаудіовид С	glo	glo ² ₃ -1rham 1glo
-Дульковид В		
Ребаудіовид D	glo ² -1glo	glo ² ₃ -1glo 1glo
Ребаудіовид Е	glo ² -1glo	glo ² -1glo
Дульковид А	glo	glo ² -1rham

glo - D-глікопірановил rham - L-рамнопірановил

Мал. 1. Структурне розміщення молекул глюкози та рамнози в дитерпенових гліковидах, виділених із *Stevia rebaudiana* Bertoni.

ри записувались за допомогою JEOL JMS SX- 102 мас-спектрометру. Оптична ротація проводилась на автоматичному поляриметри UNION PM-101. Зразки розчинялись в етанолі.

Виділення та розділення дитерпенових глікозидів .

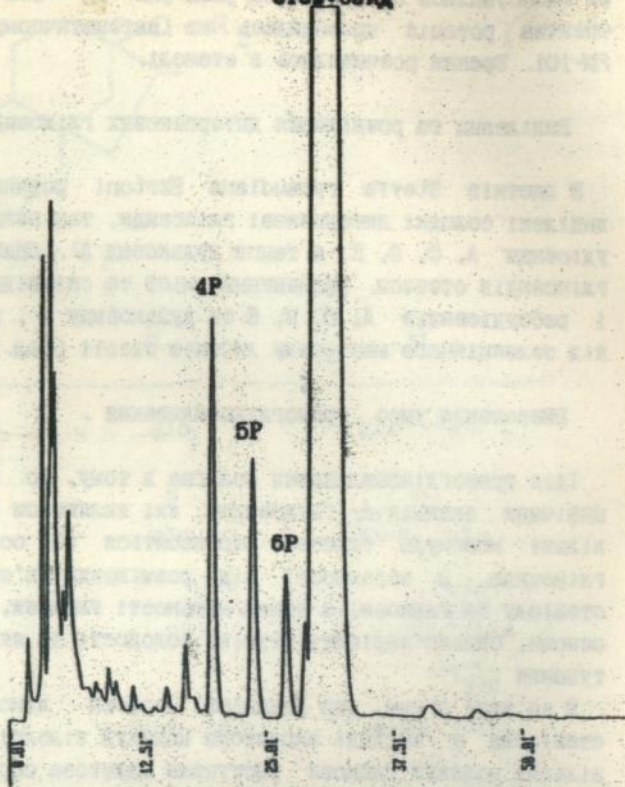
З листків *Stevia rebaudiana* Bertoni родини Asteraceae були виділені солодкі дитерпенові глікозиди, так звані стевіозид, ребаудіозиди А, С, D, Е, а також дульковид А . Однотипний аґлікон цих глікозидів стевіол. Процентний вміст та співвідношення стевіозиду і ребаудіозидів А, С, D, Е та дульковиду А , варіює в залежності від селекційного матеріалу листків стевії (мал. 1).

Визначення умов транsgлікозилування .

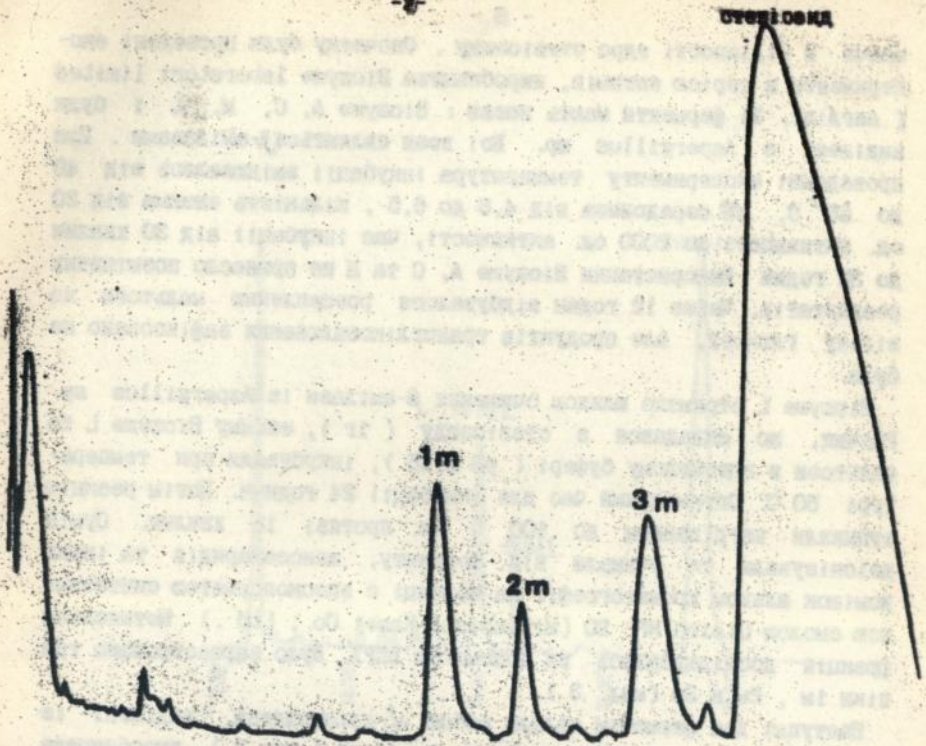
Ідея транsgлікозилування полягає в тому, що за допомогою специфічних ензимів α - глікозидаз, які являються екзокарбогідразами, вільні молекули глікози переносяться на основу дитерпенового глікозида. В залежності від розміщення зв'язків між молекулами стевіолу та глікози, а також кількості глікози, що приєднується до основи, сильно варіюють ступінь солодості та якість смакового тестування .

В зв'язку з цим для подальшої роботи використовували чистий стевіозид у вигляді акцептора молекул вільної глікози . Як донор вільних молекул глікози виступали мальтоза або пуллулан. Пуллулан являє собою лінійний водорозчинний полісахарид, що складається із мальтотриоз та мальтотетраоз, що пов'язані між собою 1-6 глікозидним зв'язком . Компанія Maruzen Kasei Co., Ltd. надала для досліджень десять різних трансфераз. До класу трансфераз належать ферменти, що каталізують перенос цілих атомних угруповань від однієї сполуки до іншої. Аналогічним чином в молекулах полісахаридів може відбуватися процес ферментативного переглікозилування, тобто заміщення залишку одного моносахариду на другий. При транsgлікозилуванні необхідно було визначити оптимальне співвідношення донора та акцептора, температуру та час інкубації, рН середовища інкубування та кількість ферменту, достатню для проведення реакції. Середовище інкубування містило ацетатний буфер із слабо кислим рН, який був здатний гідролізувати вільні глікозидні зв'язки , зали-

стероїд



Мал. 2. Хроматограма продуктів траногліковилування
отриманих за допомогою ферменту пуллулани
ВЕРХ умови : колонка YVC-pack ODS-AM-302
Елюент : 50% метанол
Швидкість струму : 0,8 мл / хв.
Температура колонки : 60°С



Мал. 3. Хромограма продуктів трансглікозидування
отриманих за допомогою ферменту Вісзуле I.

ВРХ умови такі самі як на мал. 2

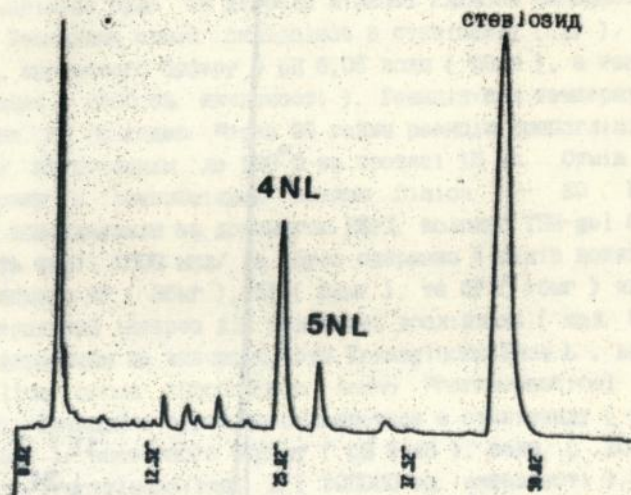
шамчи в цілісності ядро стевіовиду . Спочатку були проведені експерименти в серію ензимів, виробництва Biozyme laboratorі limited (Англія). Ці ферменти мають назви : Biozyme A, C, M, L і були виділені в *Aspergillus* sp. Всі вони являються β -амілазами . При проведенні експерименту температура інкубації змінювалась від 40 до 55 ° С, рН середовища від 4,5 до 6,5 , кількість ензима від 20 од. активності до 2000 од. активності, час інкубації від 30 хвилин до 32 годин . Використання Biozyme A, C та M не принесло позитивних результатів. Через 12 годин відбувалося розщеплення мальтози на вільну глюкозу, але продуктів трансглікозилювання зафіксовано не було.

Biozyme L отримано шляхом очищення β -амілази із *Aspergillus* sp. Ровчин, що складався з стевіовиду (1г), ензиму Biozyme L та мальтози в ацетатному буфері (рН 5,45), інкубували при температурі 50 С. Оптимальний час для інкубації 24 години. Потім реакцію зупиняли нагріванням до 100 С на протязі 15 хвилин. Суміш деіонізували та очищали від ферменту, моносахаридів та інших домішок шляхом хроматографії на колонці з високопористою синтетичною смолою Dialon HP- 20 (Mitsubishi Kasei Co., Ltd.) Метанольна фракція досліджувалась за допомогою ВЕРХ. Було зареєстровано три піки 1м, 2м і 3м (мал. 3).

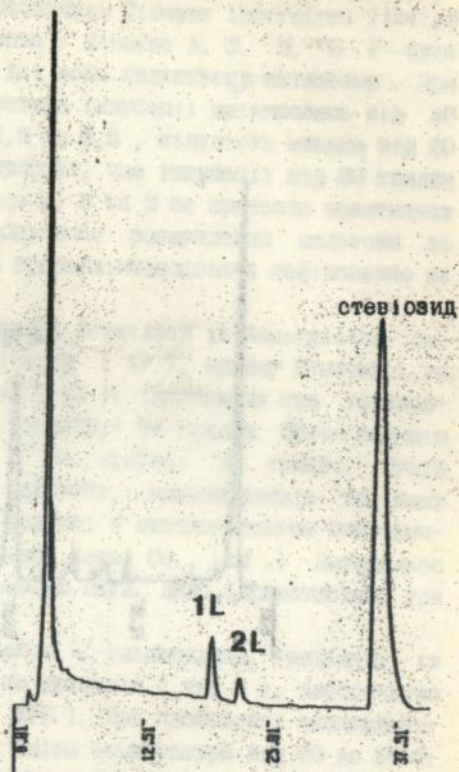
Наступні два ферменти являли собою α -глікозидази, виділені із дріжджів Бакера (тип 1) та дріжджів (тип 2), виробництва Boehringer Mannheim Biochemica (ФРН). При проведенні експерименту з даними ферментами проводили зміни температури від 40 до 55 С; рН середовища від 5 до 7,15 ; кількість ферменту від 50 до 2000 од. активності ; час інкубації від 30 хвилин до 32 годин. Продукти трансглікозилювання зафіксовані не були .

Ще два ензими Finizum и Cereflo являє собою β -гліканази, виробництва Novo Enzymes Foundation (Данія). Вони застосовуються в харчовій промисловості. Фермент Finizum виділений із *Aspergillus niger* , а Cereflo із *Bacillus subtilis* . Дані ензими досліджувались в тих же режимах, що і попередні ферменти . Як донор глюкози використовували мальтозу. Finizum розщеплював мальтозу через 30 хвилин після початку інкубації . Cereflo не розщеплював мальтозу на протязі 32 годин . Продуктів трансглікозилювання виявлено не було .

Фермент пуллуланаза, виділений із *Klebsiella pneumonia*, виробля-



Мал. 4. Хроматограма продуктів трансглікозилювання отриманих за допомогою ферментативної системи Transglucosylase L - мальтова



Мал. 5. Хроматограма продуктів трансглікозильовання
отриманих за допомогою ферментативної системи
Transglucosylase L - пулдулан

ється компанією Ameno Pharmaceutical Co., Ltd. (Японія). Використання пуллуланази в реакційній суміші, де донором глікози виступала мальтова, не дало позитивних результатів. Мальтова розщеплювалась на вільну глікозу, але продуктів трансглікозилювання виявлено не було .

Тоді вирішено було як джерело вільної глікози використати пуллулан . Реакційна суміш складалась з стевіовиду (1г), пуллулану (2,5г), ацетатного буферу з рН 6,05 води (50мл), а також ензиму пуллуланази (1500 од. активності). Реакція при температурі 50 °С проходила за 96 годин. Через 96 годин реакцію трансглікозилювання зупиняли нагріванням до 100°С на протязі 15 хв. Суміш наносили на колонку з іонообмінною смолою Diaion HP- 20 . Метанольну фракцію досліджували за допомогою ВЕРХ, колонка TSK-gel ODS-120 T, швидкість течії 1500 мкл / хв. Було одержано 6 піків нових з'єднань, з яких номери 4Р (36мг), 5Р (24мг), та 6Р (16мг) являють собою комерційний інтерес для подальших досліджень (мал. 2) . Останнім ферментом що вивчався, був Transglucosylase L, виділений в *Aspergillus genus* виробництва Ameno Pharmaceutical Co., Ltd. (Японія). Реакційна суміш, що складається з стевіовиду (1г), мальтози (20г), ацетатного буферу (рН 5,45), води (100мл) та ферменту Transglucosylase L (300000 од. активності), інкубувалась на протязі 6 годин при температурі 50°С . Потім продукти трансглікозилювання виділяли за допомогою іонообмінної колонки Diaion HP- 20 . Метанольна фракція випаровувалась на ротаційному випарювачі. Осад досліджувався за допомогою ВЕРХ, колонка TSK- gel ODS-120 T, швидкість течії 1500 мкл / хв. В результаті досліджень було одержано 6 піків продуктів трансглікозилювання . Вихід даних продуктів складав до 30 % від початкового стевіовиду. Особливий інтерес являють речовини 4NL (262,3 мг) та 5NL (57,1 мг) (мал. 4) .

Були проведені експерименти з даним ферментом, в присутності донора глікози - пуллулана . Реакційна суміш, складалась з стевіовиду (2г), пуллулану (20г), ацетатного буферу (рН 5,45), води (200мл), фермента Transglucosylase L (300000 од. активності) при температурі 50°С, інкубувалась на протязі 24 годин . Потім продукти трансглікозилювання очищались за допомогою іонообмінної смоли Diaion HP-20. Метанольна фракція випаровувалась за допомогою ротаційного випарювача. Осад вивчався за допомогою ВЕРХ .

В результаті досліджень були отримані два нових продукти трансглікозилування 1L (21мг) та 2L (15мг) (мал. 5).

Визначення структури продуктів трансглікозилування стевіовиду .

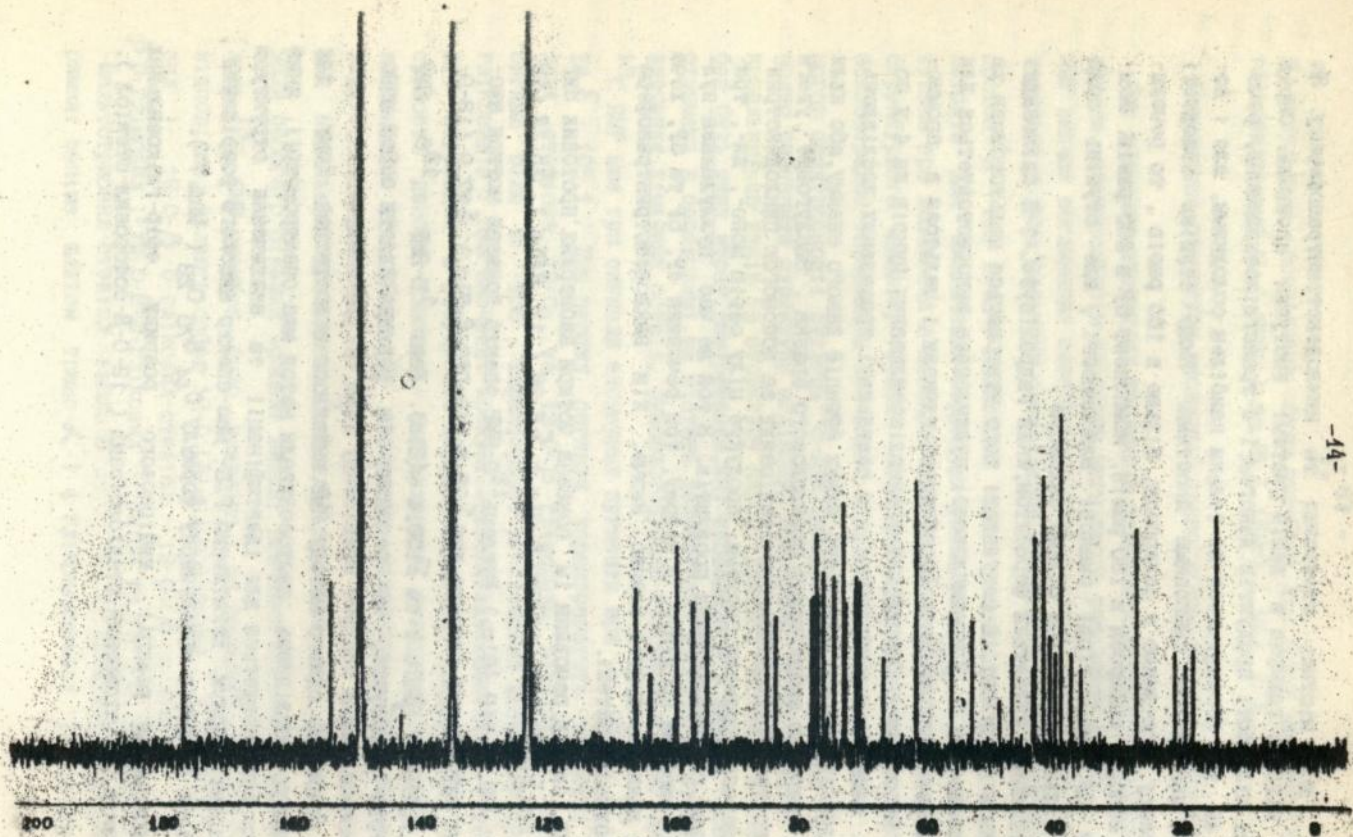
Для вивчення структури продуктів трансглікозилування використовували спектрометрів ядерного магнітного резонансу (ЯМР). Метод ЯМР вивчає поглинання електромагнітної радіації речовиною, яка знаходиться в дуже сильному однорідному магнітному полі. Спектрометрія протон ^1H - ЯМР хоча і являється одним з найбільш розповсюджених методів для визначення структури речовини, все ж дає відомості тільки про положення в молекулі атомів водню. Разом з тим для структурного аналізу більше значення має вуглецевий скелет, безпосередня інформація про який може бути отримана за допомогою спектроскопії вуглець ^{13}C -ЯМР. Використовуючи вуглець ^{13}C - ЯМР, можна визначити структуру аглікону, положення, конфігурації глікозильних зв'язків та структуру карбогідратної частини глікозидів без будь яких втрат. Вимірювання, які проводились в данній роботі, отримані в середовищі, що містить дейтерієвий піридин. Як еталон для вивчення хімічних зсувів, використовували тетраметилсилан. Вуглець ^{13}C -ЯМР має три сигнали аномерних вуглеців при δ - 95,2 ; δ - 96,9 та δ - 106,1 . Два перших сигнали характеризують аномерні вуглеці стевіола 19-0- та 13-0- β -глікозиди відповідно. Останній сигнал біля δ - 106, характеризує β -глікозил аномерний вуглець глікозидів . При вивченні продуктів трансглікозилування стевіовиду, отриманих в результаті обробки ферментом пулдуланава, в присутності донора глікози - полісахариду пулдулана, перші три компоненти 1Р, 2Р та 3Р виявились мінорними. Збільшення виходу даних речовин не було успішним. Тому зацікавленість для подальших досліджень являли речовини 4Р, 5Р та 6Р, які мали набагато більший процент виходу. Вивчаючи протон ^1H -ЯМР и вуглець ^{13}C - ЯМР спектри, було виявлено, що речовини 4Р, 5Р та 6Р відповідно, являють собою 13-0 (β -мальтотриозил (1-2)- β -D-глікозил) - 19-0- β -D-глікозил-стевіол, 13-0-(β -мальтозил (1-2) - β -D-глікозил)-19-0- β -D-глікозил -стевіол та 13-0- β -софорозил-19-0- β -мальтотриозил-стевіол (мал. 6). Ці продукти були вже отримані раніше шляхом транс- α -1-4-глікозилування із реакційної

суміші, що містить стевіозид та циклодекстринтрансферазу. Як донор вільної гліकोзи в даній системі виступав крохмаль. Серед великої кількості продуктів даного α -1-4-трансгліковилування, речовини 4Р та 5Р являються не тільки найбільш солодкими, але і володіють найкращими смаковими якостями. Якщо ступінь солодості стевіозиду порівняно в сахарозу, більше в 160 разів, то речовина 4Р солодше сахарозі в 180 разів, компонент 5Р в 205 разів. Компонент 6Р має гірші смакові властивості, але ступінь солодості тільки в 133 рази більше сахарозі.

Пулдуланава являється ферментом, який гідролізує α -1-6-гліковидні зв'язки в пулдулані, в результаті чого утворюються мальтотриози та мальтотетраози. В промисловості пулдуланава використовується для перетворення крохмалю та виробництва глікози і мальтози в промислових масштабах. Специфічне трансгліковилування цукрів на 4-у позицію глікозної субодиниці, в результаті проведених досліджень, дозволяє судити про наявність нових функцій даного ензиму, або являється причиною забруднення промислового зразка. Заслугує уваги те, що трансгліковилування стевіозиду за допомогою циклодекстринтрансфераза-крохмаль системи, продукує цілу серію моно-, ди-, три- і більше гліковилуваних продуктів. В той же час пулдуланава-пулдулан система продукує, в цілому, три речовини 4Р, 5Р та 6Р, хоча вихід даних продуктів значно нижче, ніж циклодекстринтрансфераза-крохмаль системи.

$^1\text{H-NMR}$ спектр речовини 1м показав чотири аномерних протонних сигнали при δ 5,99 (1H, 1 α -COO- β -Glc), δ 5,26 (1H, β Glc), δ 5,12 (1H, β Glc), δ 5,33 (1H, α Glc). Вуглець $^{13}\text{C-NMR}$ спектр показав чотири аномерних вуглецевих сигнали при δ 95,5 (1 α -COO- β -Glc), δ 97,9 (13-O- β Glc), δ 106,7 (β Glc) та δ 100,4 (α Glc). Дані $^1\text{H-NMR}$ і $^{13}\text{C-NMR}$ спектрів показують, що речовина 1м повинна являти собою моно-гліковилуваний продукт стевіозиду (мал. 6). Для визначення структури речовини, одного методу ЯМР виявилось недостатньо. Тому для подальших досліджень застосовували метод мас-спектрометрії, який широко застосовується для ідентифікації та визначення структури природних сполук. Негативний FAB-мас-спектр високого розрішення, речовини 1м вивів молекулярну формулу $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{23}$ (мал. 7).

За допомогою реакції вибіркового розриву ефір-гліковильних зв'язків, був отриманий стевіолбіозид (13-O- β -софоровил-стевіол).



Мал. 6. Спектр ^{13}C ИФР вещества треногликоминами 1м

MASS SPECTRUM

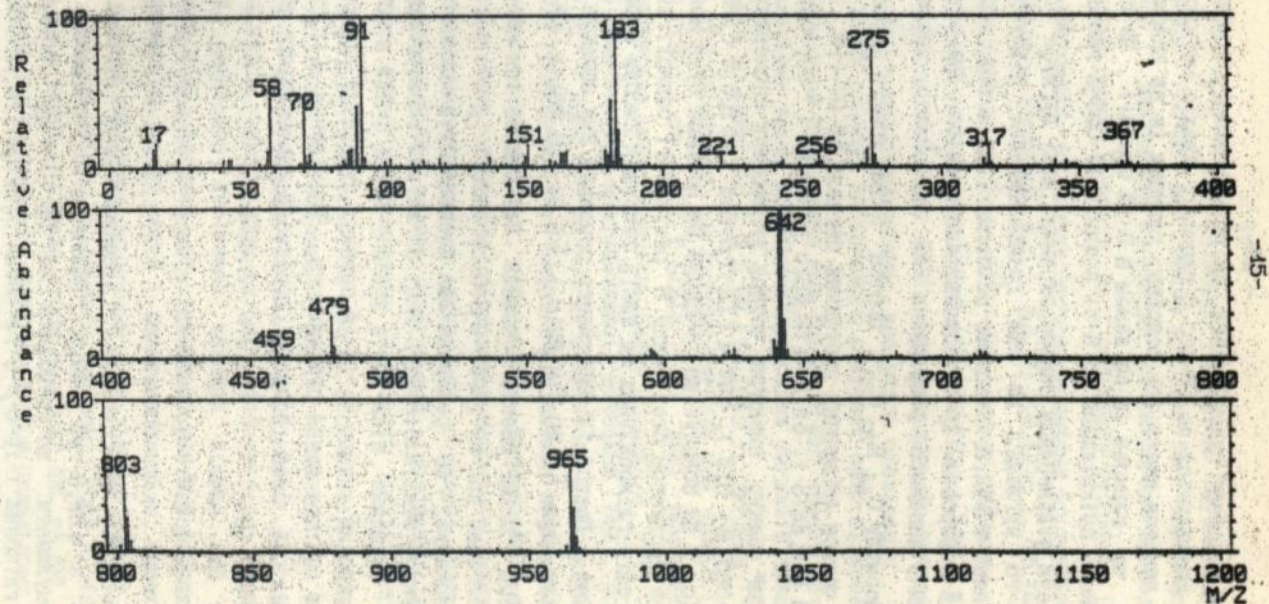
Data File: 1M

18-APR-98 13:48

Sample: 1m

RT 0'18" FAB(Neg.) GC 1.4c BP: m/z 642.0000 Int. 77.3987 Lv 8.00

Scan# (4)

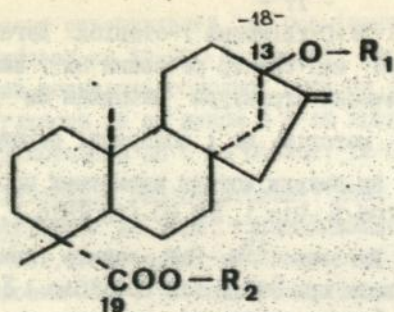


Мал. 7. Мас-спектр продукту трансгліковилування 1м

Це дає підставу стверджувати, що розміщення α -глікозидної субодиниці знаходиться на 19- $\text{COO-}\beta$ -глікозі. Аналіз метилювання-ацетилювання показав наявність основної глікози із зв'язком на 2-ій позиції та глікози із зв'язком в 6-ій позиції. Це підтверджує, що α -глікоза прикріплена до 6-ої позиції 19- $\text{COO-}\beta$ -глікози. Ці результати підтвердили раніше отримані дані вуглець ^{13}C -ЯМР: по сигналу 6-го вуглеця, де при глікозилюванні відбувся зсув $\delta 67,8$, порівняно з $\delta 62,6$. Кінцева, речовину ім можна сформулювати, як 13- $\text{O-}\beta$ -софоровил-19- $\text{O-}\beta$ -ізомальтозил-стевіол. Для речовини 2м негативний, високого розрешення FAB-мас-спектр, визначив молекулярну формулу $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{23}$. Протон ^1H -ЯМР спектр речовини 2м визначив чотири аномерних протонних сигнали $\delta 6,07$ (1H, 19- $\text{COO-}\beta$ -Glc), $\delta 5,22$ (1H, β Glc), $\delta 5,20$ (1H, β Glc), $\delta 5,48$ (1H, α Glc). Вуглець ^{13}C -ЯМР спектр визначив чотири вуглецевих аномерних сигнали $\delta 95,8$ (19- $\text{COO-}\beta$ -Glc), $\delta 97,4$ (13- $\text{O-}\beta$ -Glc), $\delta 106,5$ (β Glc) та $\delta 100,4$ (α Glc). Це показує, що речовина 2м повинна бути моно- α -глікозилюваним продуктом стевіовиду. В результаті реакції вибіркового розриву ефір-глікозильних зв'язків речовини 2м, був отриманий проаглікон 2мА. Протон ^1H -ЯМР спектр речовини 2мА показав три аномерних сигнали при $\delta 5,20$ (1H, β Glc), $\delta 5,24$ (1H, β Glc), $\delta 5,52$ (1H, α Glc). Вуглець ^{13}C -ЯМР спектр речовини 2мА виявив три аномерних вуглецевих сигнали при $\delta 97,5$ (13- $\text{O-}\beta$ -Glc), $\delta 106,5$ (β -Glc), $\delta 100,4$ (α Glc). Це показує, що речовина 2мА повинна бути моно- α -глікозилюваним продуктом стевіолбіовиду. Дані EI-MS мас-спектру ацетата речовини 2мА, показували піки іонів при m/z 331, 619 і 907. Це доказує, що цукровий ланцюг на 13-ій позиції являється прямою перацетилюваною глікотриовил субодиницею. Розміщення α -глікозильної субодиниці на 6-ій позиції основної β -глікозильної субодиниці було визначено за допомогою аналізу метилювання-ацетилювання речовини 2мА. Цей аналіз показав наявність основної глікози, глікози, пов'язаної в 2-ому положенні та глікози, пов'язаної в 6-ому положенні. Це розміщення було також підтверджено наявністю вуглець ^{13}C -ЯМР сигналу. Глікозилюваний вуглець C-6 викликав зсув в $\delta 62,8$ на $\delta 68,6$. Виходячи із отриманих даних, можна сформулювати, що речовина 2м це 13- $\text{O-}\beta$ -ізомальтозил (1-2)- β -D-глікозил)-19- $\text{O-}\beta$ -D-глікозил-стевіол, а речовина 2мА це 13

-O-(β -ізомальтозил (1-2)- β -D-гліковил)-стевіол. Негативний, високого розрешення FAB-MS мас-спектр речовини 3м, вивів формулу $C_{44}H_{70}O_{23}$ (М-Н). Визначення структури речовини 3м проводилось за допомогою таких самих методів, що і попередні речовини. Протон 1H -ЯМР спектр речовини 3м виявив чотири аномерних протонних сигнали при δ 6,09 (1H, 19-COO- β -Glc), δ 5,20 (1H, β Glc), δ 5,09 (1H, β Glc), δ 5,91 (1H, α Glc). Вуглець ^{13}C -ЯМР спектр виявив чотири аномерних вуглецевих сигнали при δ 95,8 (19-COO- β Glc) δ 97,9 (13-O- β Glc), δ 106,3 (β Glc) та δ 101,8 (α Glc) що доводять, що речовина 3м повинна бути моно-гліковильованим продуктом стевіовиду. В результаті проведення реакції вибіркового розриву ефір-гліковильних зв'язків, був отриманий проаглікон 3МА. Протон 1H -ЯМР спектр речовини 3МА показав наявність трьох аномерних протонних сигналів при δ 5,20 (1H, β Glc), δ 5,10 (1H, β Glc), δ 5,98 (1H, α Glc). Вуглець ^{13}C -ЯМР спектр виявив три аномерних вуглецевих сигнали при δ 98,0 (13-O- β Glc), δ 106,3 (β Glc) та δ 101,7 (α Glc). Ці дані показують, що речовина 3МА являється моно-гліковильованим продуктом стевіолбіовиду. EI-MS мас-спектр ацетилюваної речовини 3МА, показав піки іонів при m/z 331, 619 та 907. Ці результати дозволяють сказати, що цукровий ланцюг на 13-ій позиції являється перацетилюваною прямолінійною глікотриовил субодиницею. Розміщення α -гліковильної субодиниці було визначено за допомогою реакції метилювання - ацетилювання, яка показала наявність основної глюкози, глюкози, пов'язаної в 2-ій позиції та глюкози, пов'язаної в 3-ій позиції. Це було також підтверджено наявністю всушу сигналів ^{13}C -ЯМР з δ 78,4 на δ 84,8, що говорить про зв'язок в 3-ій вуглецевій субодиниці. Грунтуючись на отриманих даних, компонент 3МА можна визначити як 13-O-(β -нигеровил (1-2)- β -D-гліковил)-стевіол, а речовину 3м як 13-O-(β -нигеровил (1-2)- β -D-гліковил)-19-O- β -D-гліковил-стевіол.

При дослідженні продуктів трансгліковильовання стевіовиду, отриманих за допомогою Transglucosylase L-мальтова системи, із шести компонентів чотири виявились мінорними. Збільшення виходу речовин 1NL, 2NL, 3NL та 6NL не увінчалися успіхом. Тому інтерес для подальших досліджень являли собою речовини 4NL та 5NL, які мали до 30% виходу від первісного стевіовиду. При подальшому вивченні спектрів ЯМР, було виявлено, що зразок 4NL являє собою



Compd.	R ₁	R ₂
1m	-glc ² - ¹ glc	-glc ⁶ - ¹ glc
2m	-glc ⁶ ¹ glc ² ¹ glc	-glc
3m	-glc ² - ¹ glc ³ - ¹ glc	-glc
4NLa	-glc ² - ¹ glc	-glc ⁶ - ¹ glc
4NLb	-glc ² - ¹ glc ⁶ - ¹ glc	-glc
5NL	-glc ⁶ ¹ glc ² ¹ glc	-glc
4P	-glc ² - ¹ glc ⁴ - ¹ glc ⁴ - ¹ glc	-glc
5P	-glc ² - ¹ glc ⁴ - ¹ glc	-glc
6P	-glc ² - ¹ glc	-glc ⁴ - ¹ glc ⁴ - ¹ glc

4NLa = 1La 4NLb = 1Lb 5NL = 2L

Мал. 8. Структурне розміщення молекул глюкози в дитерпенових глікозидах, отриманих в результаті проведення реакції трансглікозилювання

суміш речовин. Використовуючи колонку TSK-gel ODS-120T, вдалось виділити два компоненти 4NLa и 4NLb .

Вивчаючи протон ^1H -ЯМР та вуглець ^{13}C -ЯМР, негативний FAB-MS мас-спектри, дані тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії, було визначено, що зразки 4NLa, 4NLb та 5NL являють собою 13-О-софоровил - 19-О-ізомальтовил-стевіол, 13-О-(β -гентіобіовил (1-2)- β -D-гліковил)-19-О- β -D-гліковил-стевіол та 13-О-(β -ізомальтовил (1-2)- β -D-гліковил)-19-О- β -D-гліковил-стевіол. Ці продукти трансгліковилування були отримані раніш при використанні пулдулан-пулдуланава системи. Можна стверджувати, що речовини 4NLa та 5NL аналогічні зразкам 1м, та 2м відповідно.

При вивченні продуктів трансгліковилування стевіовиду, отриманих за допомогою Transglucosylase L - пулдулан системи, зразок 1L виявився сумішшю двох речовин 1La та 1Lb. На основі спектрів протон ^1H -ЯМР и вуглець ^{13}C -ЯМР, мас-спектрів, даних ТМХ та ВЕРХ можна стверджувати, що зразки 1La, 1Lb, 2L аналогічні речовинам 4NLa, 4NLb та 5NL відповідно (має 8).

3.5. Визначення ступеню солодості та смакових якостей продуктів трансгліковилування.

Інтенсивність солодості по відношенню до сахарози та смакові якості кожного із отриманих продуктів трансгліковилування, досліджували в компанії Marusen Kasei Co., Ltd. Шість професіональних дегустаторів опробували 6% водні розчини продуктів трансгліковилування та порівнювали з 6% водним розчином сахарози. Речовина 4P має відмінні смакові якостями та ступінь солодості, порівняно з сахарозою більше в 180 разів. Речовина 5P має відмінні смакові якості та солодше сахарози в 205 разів. Речовина 6P має добрі смакові якості та солодше сахарози в 133 рази. Речовина 1м має відмінні смакові якості та солодше сахарози в 110 разів. Речовина 2м має кращі по зрівнянню з стевіовидом смакові властивості і солодше сахарози в 40 разів. Речовина 3м має гірші смакові якості та має гіркий присмак. Речовини 4P, 5P та 6P, варає використовуються харчовою промисловістю Японії. Ступінь солодості речовин 1м та 2м менше, ніж стевіовиду, а речовина 3м має взагалі гіркий смак. Проте, з точки зору смакових якостей, якщо добитися збільшення виходу речовини 1м, то це речо-

вину можна рекомендувати для практичного використання в промислових масштабах .

ВИСНОВКИ

1. Із листків рослини *Stevia rebaudiana* Bertoni родини Asteraceae (складноцвіті) були виділені дитерпенові гліковиди-стевіовид, ребаудіовиди А, С, D і Е, а також дульковид А .

2. Визначені умови трансгліковилування за допомогою ферментативних систем : Biozyme L - мальтова , Pullulanase - пуллулан, Transglucosilase L - мальтова и Transglucosilase L - пуллулан.

3. За допомогою сучасних методів ВЕРХ визначені умови та виділені продукти трансгліковилування в достатній кількості для ґрунтового їх дослідження .

4. Визначені структури продуктів трансгліковилування за допомогою сучасних методів ^1H -ЯМР , ^{13}C -ЯМР , FAB-MS , EI-MS , газорідинної хроматографії - мас-спектрометрії.

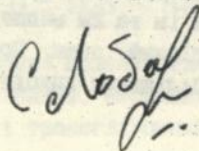
5. Вперше були отримані продукти трансгліковилування, які мають в своєму складі 1-6 гліковидні зв'язки. Це речовини 1m , 2m , 4NLa, 4NLb та 5NL .

6. Визначені ступінь солодості та смакові властивості синтезованих речовин. Речовини 4P та 5P мають відмінні смакові якості та мають ступінь солодості вище , ніж у стевіовиду. Речовини 1m та 2m мають високу ступінь солодості та смакові властивості кращі ніж у стевіовиду.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації.

1. Лобов С. В. Синтез и выделение продуктов трансглицозилирования. - В кн.: Введение в культуру стевии-источника низкокалорийного заменителя сахара. К.: ВНИС, 1990. - С. 102-109.

2. Lobov S. V., Kasai R., Ohtani K., Tanaka O., Yamasaki K., Enzymic Production of Sweet Stevioside Derivatives : Transglucosylation by Glucosidases // Agric. Biol. Chem. - 1991. - N 55 (12). - p. 2959-2965.



МГП "Киев" Заказ № 253 тир. 100 шт.
Печать офсетная. ул. Клиническая 25

AB 27.29

AB 27.295