



МАРКОСЯН АВЕТИК АШОТОВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ
МИКРОБНЫХ ТРАНСГЛИКОЗИДАЗ**

Специальность: 03.00.23 – «Биотехнология»

АВТОРЕФЕРАТ

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

Уфа – 2008

Работа выполнена в Центральной научно-исследовательской лаборатории компании «PureCircle Sdn. Bhd.» (Малайзия).

Научный руководитель: доктор биологических наук
Абелян Варужан Амаякович

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук, доцент
Усанов Николай Глебович

доктор медицинских наук, профессор
Мавзютов Айрат Радикович

Ведущая организация: Центр «Биоинженерия» Российской академии наук

Защита состоится 10 октября 2008 года в 14.00 часов на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, д. 69. тел.: (347) 235-53-62, E-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии УНЦ РАН и на официальном сайте <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index.htm>

Автореферат разослан 9 сентября 2008 г.

Ученый секретарь
Объединенного диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Уразгильдин Р.В.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Биокатализ и биотрансформация составляют одну из перспективных и ключевых направлений современной биотехнологии. Биокаталитические процессы обладают рядом преимуществ перед традиционным органическим синтезом и широко внедряются в различные области промышленности для направленного синтеза различных высокоценных соединений. При этом обеспечивается избирательность и стереоспецифичность катализируемых реакций (Березин и др. 1976; Скрыбин, Головлева, 1976; Atkinson, 1995; Sheldrake et al., 1998; Abelyan, 2005; Hou 2005; Biocat – 2004, 2006).

Преимущества ферментов как промышленных катализаторов основаны на их способности проведения стерео- и региоселективных превращений без применения химических защитных групп, а также возможности осуществления труднореализуемых процессов с высоким выходом конечного продукта. Кроме того, применение биокатализаторов позволяет сократить стадии традиционного химического синтеза, обычно требующего несколько ступеней протекции и депротекции функциональных групп и таким образом существенно снизить экономические издержки. В некоторых случаях микробный катализ и трансформация являются единственно возможным подходом создания практически безотходных технологий и экологически чистых производств (Iizuka, Naito, 1981; Anastas, Williamson, 1998; Demain et al., 1999; Anastas, Kirchhoff, 2002).

Однако в настоящее время существует определенная нехватка действительно эффективных биокатализаторов, пригодных для использования в промышленном масштабе, что вызывает настоятельную необходимость проведения новых исследований в данном направлении. Часто только это является препятствием для получения новых продуктов с новыми более уникальными свойствами.

В биокаталитических процессах особое место занимают ферменты с ярко выраженной трансгликозилирующей активностью, достаточно широко применяющиеся для получения различных высокоценных продуктов. Так, циклодекстрингликозилтрансфераза (ЦГТаз), β -фруктофуранозидаза, α -глюкозилтрансфераза (изомальтулозсинтаза), β -галактозидаза, мальтаза и другие используются для ферментативного синтеза циклодекстринов и их производных, фруктоолигосахаридов, лактосахарозы, эрлозы, галактоолигосахаридов, изомеров сахарозы и прочих. С другой стороны, при подборе соответствующих исходных материалов и определенных условий реакции их можно использовать для получения совершенно новых соединений или улучшения некоторых характеристик известных соединений (Best et al., 1994; Demain et al., 1999; Stanbury et al., 1999).

Таким образом, в настоящее время применение различных биокатализаторов, в частности с трансгликозилирующей активностью, является актуальным направлением работ для получения новых продуктов и модификации различных физиологически активных соединений с целью улучшения их функциональных свойств.

Цели и задачи работы. Основной целью являлись выделение и использование ферментов микробного происхождения с трансгликозилирующей активностью для направленной трансформации и модификации витаминов, углеводов, дитерпеновых гликозидов и бензо[h]хиназолинов с целью улучшения их характеристик и выработки новых продуктов.

Для осуществления указанной цели поставлены следующие задачи:

- выделить и охарактеризовать культуры-микробов, в том числе их экстремофильные формы – активных продуцентов ЦГТаза, β -фруктофуранозидазы и α -глюкозилтрансферазы;
- изучить морфо-физиологические и биохимические свойства перспективных продуцентов;
- изучить и оптимизировать условия биосинтеза перспективных микробных ферментов;
- выделить, очистить наиболее перспективные ферменты и изучить их некоторые физико-химические и биохимические свойства;
- разработать эффективные методы трансглюкозилирования L-аскорбиновой кислоты, бензо[h]хиназолинов и дитерпеновых гликозидов;
- изучить и оптимизировать процесс получения изомальтулозы с применением свободной и иммобилизованной α -глюкозилтрансферазы;
- изучить и осуществить процесс получения фруктоолигосахаридов совместно с палатинозой с применением нативных и иммобилизованных α -глюкозилтрансферазы и β -фруктофуранозидазы.

Научная новизна работы. Из различных типов почв с применением оригинальной методики и направленной селекции выделены микробные штаммы активных продуцентов ЦГТаза, β -фруктофуранозидазы и α -глюкозилтрансферазы. Разработаны методы их очистки и иммобилизации.

Показано, что ЦГТаза экстремофильных форм микроорганизмов могут быть эффективными биокатализаторами в реакции трансглюкозилирования L-аскорбиновой кислоты и дитерпеновых гликозидов.

Впервые осуществлено трансглюкозилирование L-аскорбиновой кислоты с применением дрожжевой мальтазы в качестве биокатализатора.

Впервые с применением термофильной ЦГТаза осуществлено трансглюкозилирование бензо[h]хиназолинов.

Выявлена возможность получения изомальтулозы в проточных условиях.

С применением двух типов ферментов изучен и осуществлен эффективный процесс получения фруктоолигосахаридного сиропа совместно с палатинозой.

Впервые показана возможность совместного получения трансглюкозилированных гликозидов стевiola и фруктозо-концевых олигосахаридов.

Осуществлен процесс получения высокочистых производных гликозидов Стевии с улучшенными вкусовыми характеристиками.

Практическая ценность. С использованием термофильной ЦГТаза разработан эффективный метод трансглюкозилирования L-аскорбиновой кислоты с получением моноглюкозилированного производного.

Предложен экономичный способ получения трансглюкозилированных гликозидов стевiola с содержанием функциональных фруктозо-концевых олигосахаридов.

Предложен высокоэффективный метод получения высокочистых производных гликозидов Стевии.

Предложен эффективный способ непрерывного получения изомальтулозы и фруктоолигосахаридного сиропа совместно с палатинозой с применением иммобилизованных ферментов.

Методы получения трансглюкозилированных производных Стевии, изомальтулозы, трегалулозы и трансглюкозилированной L-аскорбиновой кислоты внедрены в производство в компании «PureCircle Sdn. Bhd.» (Малайзия).

Основные положения, выносимые на защиту:

- из различных типов почв можно выделить культуры микроорганизмов, в том числе их экстремофильные формы – активных продуцентов ЦГТаз, α -глюкозилтрансфераз, β -фруктофуранозидаз, они являются представителями различных групп микроорганизмов – неспороносных и спороносных бактерий и грибов;
- для трансглюкозилирования различных соединений применимы ЦГТазы из определенных продуцентов, которые максимально эффективно могут осуществлять реакцию межмолекулярного трансглюкозилирования;
- при трансглюкозилировании бензо[h]хиназолинов γ -циклодекстрин может служить как эффективным донором, так и комплексообразователем – повышающим водорастворимость и доступность вещества для ферментативной модификации;
- выделенные ферменты при выборе эффективного способа иммобилизации могут быть успешно использованы для синтеза различных трансглюкозилированных соединений.

Личный вклад соискателя: выполнение экспериментальных работ и решение основных задач исследований, анализ и обобщение литературы по разрабатываемым вопросам, обобщение полученных результатов и оформление диссертации. Постановка основных задач и разработка методологий прорабатывались под руководством д.б.н. В.А. Абеяна.

Публикации. Основные результаты исследований по теме диссертации опубликованы в 4-х научных работах.

Место выполнения работы. Работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории компании «PureCircle Sdn. Bhd.» (бывшая «Stevian Biotechnology Corp. Sdn. Bhd.», Малайзия) (2003-2006 гг.). Вкусовые характеристики полученных подсластителей определялись на факультете науки и технологии университета «Universiti Kebangsaan Malaysia» (Малайзия).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части из 8 глав, заключения, выводов, практических предложений и списка использованной литературы, включающего 275 ссылок, и приложений. Общий объем диссертации 144 страницы, включая 44 таблицы и 66 рисунков.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Культуры микроорганизмов продуцентов ферментов.

В качестве продуцентов **ЦГТаз** были использованы штаммы аэробных спорообразующих бактерий: мезофильные *Bacillus macerans* St-39 и *Bacillus circulans* St-40; термофильные *Bacillus stearothermophilus* St-88 и *B. stearothermophilus* St-100; галофильные *Bacillus halophilus* St-60; а также гипертермофильный штамм *Thermococcus sp.* St-1954. В качестве продуцентов **мальтазы** использованы штаммы *Saccharomyces cerevisiae* St-50, St-51, St-52, St-53, St-54 и St-55; **α -глюкозилтрансферазы** - выделенные нами штаммы неспороносных бактерий *Pseudomonas sp.* St-1372 и *Pseudomonas sp.* St-1391; **β -**

фруктофуранозидаз - штаммы микромицетов *Aspergillus niger* St-0018 и *Aspergillus foetidus* St-0194.

2.2. Выделение культур-продуцентов.

Культуры продуцентов ЦГГаз. Для выделения культур-продуцентов использовали почвенные образцы из различных эколого-географических регионов Малайзии по ранее описанной методике (Абелян, 2001). *Thermococcus sp.* St-1954 получен из коллекции культур «PureCircle Sdn. Bhd.» (Малайзия).

Культуры продуцентов мальтаз *Saccharomyces cerevisiae* получены из коллекции культур компании «PureCircle Sdn. Bhd.» (Малайзия).

Культуры продуцентов α -глюкозилтрансфераз и β -фруктофуранозидаз выделены из почвенных образцов тропических лесов Малайзии (штаты: Сабах, Саравак, Негери Сембилан). Идентификация полученных штаммов проводилась на основе комплекса морфофизиологических и биохимических свойств.

Изучение **морфо-физиологических и биохимических характеристик** культур проводили с помощью дифференцирующих тестов, используемых при исследовании аэробных спорообразующих бактерий (Gordon et al., 1973; Bergey's Manual, 1984, 1986). Для определения потребности культур в различных источниках углерода и азота использовали ауксанографический метод (Proom, Knight, 1955).

Выращивание штаммов в глубинных условиях осуществляли на термостатированных качалках типа «Certomat IS» (Германия) и в ферментере «Biostat В» (Германия) на следующих питательных средах:

Культуры-продуценты ЦГГаз:

Мезофилы (г/л): Крахмал – 10.0; кукурузный экстракт – 2.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5.0 и CaCO_3 – 2.0 (рН 7.0-7.5; 39°C) (Абелян и др., 2002).

Галофилы (г/л): Картофельный крахмал – 20.0; пептон – 10.0; дрожжевой экстракт – 1.0; NaCl – 120.0; KCl – 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 20.0 (рН 7.0-7.2; 37°C) (Абелян и др., 1995).

Термофилы (г/л): Крахмал – 7.0; кукурузный экстракт – 5.0; NH_4Cl – 5.3; CaCO_3 – 2.0 (рН 7.0; 56°C) (Абелян и др., 2002).

***Thermococcus sp.* (г/л):** Дрожжевой экстракт – 2.0; NaCl – 20.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 3.5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2.75; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1.0; KH_2PO_4 – 0.5; KCl – 0.325; NaBr – 0.05; H_3BO_3 – 0.015; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.0075; $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.002; сера – 10.0; $\text{Na}_2\text{Sx} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0.48 (рН 7.0; 85°C) (Tachibana et al., 1999).

Культуры-продуценты мальтаз:

***S. cerevisiae* (г/л):** меласса – 140.0; мочевины – 2.5; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0.5 (рН 5.0-5.2; 29°C; 48ч).

Культуры-продуценты α -глюкозилтрансфераз:

***Pseudomonas sp.* (г/л):** меласса – 50.0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0.5 (рН 7.0; 30°C; 24ч).

Культуры-продуценты β -фруктофуранозидаз

***A. niger* / *A. foetidus* (г/л):** сахароза – 20.0; дрожжевой экстракт – 12.0; карбоксиметилцеллюлоза – 2.0 (рН 5.0; 28°C; 24-48 ч) (Hidaka et al., 1988).

Циклизирующую активность ЦГГаз определяли по (Tilden, Hudson, 1942), **декстринизирующую активность** по (Hale, Rawlins, 1951), **диспропорционирующую и дециклизирующую активность** согласно (Akimaru et al., 1991).

Гомогенность нативных ферментов проверяли методом электрофореза в ПААГ с 2%-ным ДДС-Na (Davis, 1964; Laemmly, 1970). Для определения **молекулярных масс** в качестве стандартов использовали овальбумин 45 кДа, БСА 66 кДа, фосфоорилазу 97 кДа и альдолазу 158 кДа («GE Healthcare», США).

Для **определения α -глюкозилтрансферазной активности** фермент инкубировали в 20% (в/в) растворе сахарозы при pH 5.5 и температуре 29°C в течение 15 мин. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента катализирует образование 1 мкмоль палатинозы за 1 мин.

Определение **мальтазной** активности проводили согласно (Полыгалина и др., 2003).

Определение β -фруктофуранозидазной активности проводили модифицированным методом (Sirisansaneeyakul et al., 2000). За единицу β -фруктофуранозидазной активности принимали количество фермента, которое высвобождало 1 мкмоль глюкозы за 1 мин в условиях эксперимента.

Количественное определение ЦД проводили с помощью ВЭЖХ на приборе «Agilent 1100 Series», (США) на колонке «Zorbax-NH₂» (5 мкм, 4.6x250 мм). Применяли подвижную фазу ацетонитрил-вода=70:30 об/об (скорость 2 мл/мин), в качестве детектора используя дифференциальный рефрактометр (Абеян и др., 2002).

Определение аскорбиновой кислоты и ее гликозилированных производных проводили методом ВЭЖХ на приборе «Agilent 1100 series» (США) с применением колонки «Zorbax SB C18» (5 мкм, 4.6x150мм) и воды с pH 2.2 (фосфорная кислота) в качестве подвижной фазы. Скорость протока 1мл/мин. В качестве детектора использовали УФ-детектор при 245нм.

Определение бензо[h]хиназолинов и их производных проводилось методом ВЭЖХ на приборе «Agilent 1100 series» (США) в следующих условиях: колонка – «Zorbax ODS» (5 мкм, 4.6x250 мм); подвижная фаза – ацетонитрил-вода (50:50, об/об); скорость протока 1 мл/мин; детектор – УФ-детектор при 210 нм.

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

Количественное определение отдельных фруктоолигосахаридов, палатинозы и трегалулозы осуществляли методом ВЭЖХ на приборе «Agilent 1100 series» (США) в следующих условиях: колонка – «Zorbax NH₂» (5 мкм, 4.6 x 250 мм); подвижная фаза – ацетонитрил-вода (70:30, об./об.); скорость протока 2 мл/мин; детектор - дифференциальный рефрактометр.

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ

Культуры-продуценты ЦГГаз. Изучение штаммов показало, что они имеют в целом близкие морфо-биохимические свойства. Галофильный штамм *B. halophilus* St-60 образует кремовые, гладкие, блестящие, округлые с ровными краями колонии. Вегетативные клетки палочковидные, однородные. Споры средние, сферические, терминального расположения и раздувают клетку.

По основным морфо-биохимическим характеристикам термофильные штаммы *B. stearothermophilus* St-88 и St-100 схожи. Они ферментируют рибозу, маннозу, глюкозу, мальтозу, маннит и глицерин. Не ферментируют ксилозу, рамнозу, арабинозу, сахарозу, галактозу, лактозу, раффинозу, инулин, дульцит, сорбит. Гидролизуют крахмал, гиппурат, казеин и желатин, не гидролизуют тирозин и эскулин. Усваивают цитрат. Клетки палочковидные, грамположительные. Споры эллипсоидные, терминального и паратерминального расположения. На пептон-кукурузном агаре образуют кремовые, влажно-блестящие, плоские, гладкие колонии с волнистыми краями, в среде не вырастают.

Культуры-продуценты α -глюкозилтрансфераз. По основным морфо-биохимическим характеристикам штаммы *Pseudomonas sp.* St-1372 и St-1391 схожи. На питательном агаре через 3 дня инкубирования в термостате при температуре 28°C вырастают круглые, выпуклые колонии с ровными краями и диаметром 1-3мм. Поверхность колоний гладкая, опалесцирующая, серо-белого цвета.

Культуры-продуценты β -фруктофуранозидаз. Штаммы *A. niger* St-0018 и *A. foetidus* St-0194 характеризовались по морфо-культуральным признакам (Билай, Коваль, 1988).

ГЛАВА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ

Характеристика ЦГТаз. Основные характеристики ЦГТаз приведены в табл. 1. Галофильная ЦГТаза синтезирует только β -ЦД и оптимальное значение pH находится несколько выше чем у мезофильных ЦГТаз. Термофильные ЦГТазы функционируют при более высоких значениях температуры и в качестве основного ЦД образуют преимущественно α -ЦД. ЦГТаза из *Thermococcus sp.* St-1954 отличается более высокой термостабильностью (110°C) и оптимальной температурой циклизации 90°C. Она способна осуществлять трансферазную реакцию в отношении многих соединений, но особенно важна ее высокая трансферазная активность в отношении гликозидов Стевии.

Таблица 1

Некоторые характеристики ЦГТаз

Продуцент	Мол. масса, кДа	Опт. температура, °C	Термостабильность, °C	Опт. pH	pH стабильность	Основной ЦД
<i>B. macerans</i> St-39	74	50-55	55	5.5	5.0-9.0	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. circulans</i> St-40	88	50-55	55	4.0-4.5	5.0-8.5	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>B. stearothermophilus</i> St-88	65	60-65	70	6.0-6.5	5.5-8.5	$\alpha > \beta > \gamma$
<i>B. stearothermophilus</i> St-100	68	65-70	70	6.0-6.5	6.0-9.0	$\alpha > \beta > \gamma$
<i>B. halophilus</i> St-60	70	50	50	6.5-7.0	6.0-9.0	β

Характеристика α -глюкозилтрансфераз. Фермент из штамма *Pseudomonas sp.* St-1372 образовывал изомальтулозу с большим выходом, чем фермент *Pseudomonas sp.* St-1391. Оптимальное значение pH у фермента из штамма *Pseudomonas sp.* St-1391 несколько выше чем у α -глюкозилтрансферазы из *Pseudomonas sp.* St-1372.

Таблица 2

Некоторые характеристики α -глюкозилтрансфераз *Pseudomonas sp.*

Продуцент	Выход, %		Опт. температура, °С	Опт. рН	K_m (мМ)	V_{max} (мМ/мин)
	Изомальтулоза	Трегалулоза				
<i>Pseudomonas sp.</i> St-1372	85	8	29	5.5	50	638
<i>Pseudomonas sp.</i> St-1391	78	11	29	6.0	80	420

Характеристика β -фруктофуранозидаз. Основные характеристики использованных ферментов приведены в табл. 3.

Таблица 3

Некоторые характеристики β -фруктофуранозидаз

Продуцент	Мол. масса, кДа	Опт. температура, °С	Термостабильность, °С	Опт. рН	рН стабильность	Синтез ФОС, %		
						К	Н	ФН
<i>A. niger</i> St-0018	90	55	65	5.5	5.0-7.5	21.3	30.8	8.8
<i>A. foetidus</i> St-0194	82	55	65	6.0	4.5-7.5	34.0	9.9	-

Примечание: К-кестоза; Н-нистоза; ФН-фруктозилнистоза.

ГЛАВА 5. ТРАНСГЛЮКОЗИЛИРОВАНИЕ L-АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Изучены особенности получения 2-O- α -D-глюкопиранозил-L-аскорбиновой кислоты (АК-2Г) с применением ЦГТаз различных групп микроорганизмов, а также дрожжевых мальтаз.

Среди изученных ЦГТаз наибольшей эффективностью обладают ферменты из термофильных штаммов, при которых количество трансферных продуктов достигает 52-57%. ЦГТаза из галофильного штамма способна только незначительному трансглюкозилированию. При этом для всех ферментов наиболее подходящим донором глюкозных единиц является γ -ЦД. Дальнейшие эксперименты проводили с ЦГТазой *B.stearothermophilus* St-88.

С увеличением исходной концентрации субстратов до 50% скорость реакции существенно ускоряется и увеличивается количество трансферных продуктов. **Весовое соотношение АК : γ -ЦД = 1:3** является оптимальным.

Влияние количества фермента. С увеличением количества фермента до 500 единиц на 1 г АК наблюдалось увеличение скорости реакции и общего выхода трансферных продуктов. Дальнейшее увеличение приводило к снижению количества высокомолекулярных производных и общему снижению степени трансформации.

Влияние рН и температуры. Оптимальный рН находился в пределах 5.5-6.0, что несколько ниже, чем это установлено для реакции циклизации (рН 6.0-6.5). Оптимальная температура трансглюкозилирования находилась в пределах 60°C, что является также оптимальным значением процесса получения ЦД с применением этого фермента.

С увеличением продолжительности реакции повышается степень трансглюкозилирования. Типичная ВЭЖХ-грамма трансглюкозилирования АК с помощью ЦГТаза *B.stearothermophilus* St-88 приведена на рис. 1.

Таким образом, показано, что среди ЦГТаз фермент *B.stearotherophilus* St-88 является наиболее эффективным биокатализатором при трансгликозилировании аскорбиновой кислоты с использованием γ -ЦД в качестве донора глюкозильных единиц. Следует отметить, что в качестве донора с успехом могут быть использованы также мальтодекстрины. Выявлено, что мальтазы дрожжей также способны осуществлять трансгликозилирование АК.

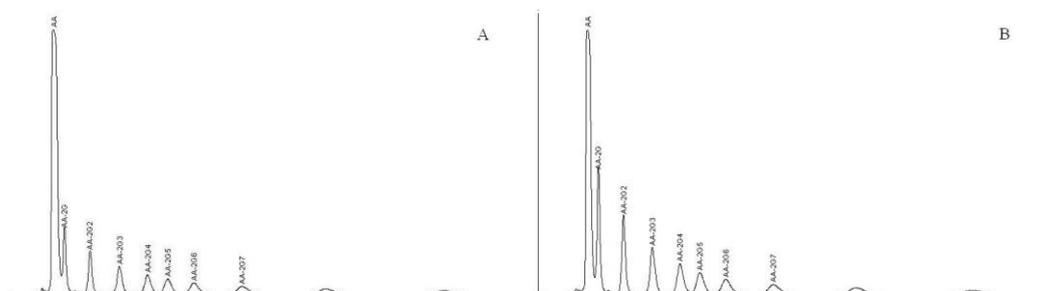


Рис.1. Типичная ВЭЖХ-грамма продуктов трансгликозилирования аскорбиновой кислоты ЦГТазой *B.stearotherophilus* St-88 за 24 ч (А) и 48 ч (В).

С целью осуществления процесса в проточных условиях изучали возможность иммобилизации ЦГТазы *B. stearotherophilus* St-88 на различных носителях методами адсорбции, ковалентного связывания и включения (Абелян 1989; 2001) Наилучшие результаты по остаточной активности получены при иммобилизации фермента методом включения в различные природные гели. Удовлетворительные результаты получены также при использовании метода адсорбции на различных ионнообменных смолах. Однако в обоих случаях иммобилизация не обеспечивала высокую жизнеспособность биокатализатора. В этом отношении метод ковалентного связывания ЦГТазы с активированным силикагелем дает возможность осуществлять реакцию трансгликозилирования в проточных условиях в течение 90 суток.

В оптимальных условиях реакции степень трансгликозилирования достигает до 65%, что примерно на 10-15% выше, чем у известных технологий. Разработан достаточно эффективный метод очистки и кристаллизации конечного продукта. Процесс успешно внедрен в крупномасштабное производство в компании «PureCircle Sdn. Bhd.» (Малайзия).

ГЛАВА 6. ТРАНСГЛЮКОЗИЛИРОВАНИЕ ДИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Цель наших исследований состояла в изучении возможности повышения эффективности процесса с использованием более высоких температур, улучшении пищевой характеристики продукта превращением остаточных мальтодекстринов в смесь фруктозо-концевых олигосахаридов, а также получении высокочистых производных с наилучшими вкусовыми характеристиками.

В качестве биокатализатора использовали ЦГТазу, продуцируемую культурой *Thermococcus sp.* St-1954.

Оптимальный **pH** процесса составляет 5.5. Оптимальная **температура** процесса находилась в пределах 70-75°C, т.е. несколько ниже, чем для циклизирующей активности (90°C). Увеличение **количества вносимого фермента** и количества сухих веществ приводит

к ускорению процесса трансгликозилирования. **Весовое соотношение** гликозидов и крахмала в пределах 1.0 : 2.0 – 1.0 : 0.2 не оказывало существенного влияния на степень трансгликозилирования. Однако, чем выше концентрация крахмала, тем ниже степень сладости получаемого продукта и наоборот. С коммерческой точки зрения соотношение компонентов 1:1 (вес/вес), приводящее к сладости продукта в пределах 160-170, является наиболее приемлемой. При 70°C и соотношении субстратов 1:1, реакция практически заканчивается за 18-20 часов (рис.2).

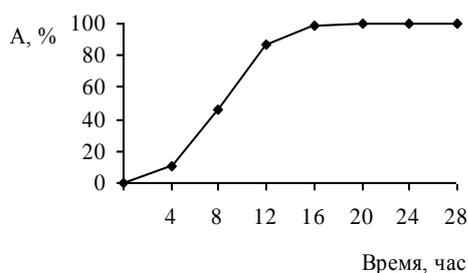


Рис.2. Степень трансформации (A,%) в зависимости от продолжительности реакции.

Образовавшийся продукт содержит значительное количество (15–20%) мальтоолигосахаридов. Для улучшения функциональных и вкусовых свойств продукта было предложено трансформировать образовавшиеся мальтоолигосахариды в фруктозо-концевые олигосахариды (ФКО). С этой целью после 12 часов процесса трансгликозилирования гликозидов Стевии к реакционной смеси добавляли сахарозу в количестве 60% от расчетного количества мальтоолигосахаридов и продолжали реакцию в течение 6 часов при тех же условиях. Типичная ВЭЖХ-грамма образовавшихся ФКО представлена на рис 3.

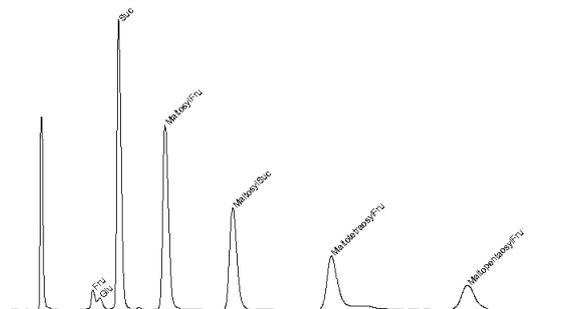


Рис.3. Типичная ВЭЖХ-грамма ФКО образовавшихся в результате трансформации остаточных мальтоолигосахаридов под действием ЦГТазы *Thermococcus sp.* St-1954.

С целью получения продукта с большим содержанием высокоценных моно- и диглюкозилированных производных стевииозиды реакционную смесь полученную после трансгликозилирования подвергали дополнительной обработке β-амилазой и очищали на специфическом адсорбенте «Diaion HP-20».

Таким образом, показана возможность применения высоких температур для трансгликозилирования сладких гликозидов Стевии. Разработанный метод позволяет в 2-3 раза сократить время реакции без какого-либо ухудшения качества продукта, что приводит к существенному экономическому эффекту. Также впервые предложено трансформирование остаточных мальтоолигосахаридов в ФКО, что значительно улучшает функциональные и вкусовые свойства полученного продукта. Предложен также метод очистки гликозилированных производных с наилучшими вкусовыми характеристиками, в частности

моно- и диглюкозилированного стевииозиды. Процессы успешно внедрены в крупномасштабное производство в компании «PureCircle Sdn. Bhd.» (Малайзия).

ГЛАВА 7. ТРАНСГЛЮКОЗИЛИРОВАНИЕ БЕНЗО[h]ХИНАЗОЛИНОВ

Изучена возможность трансгликозилирования бензо[h]хиназолинов под действием различных ферментов, таких как ЦГТаза, пуллуланаза, β -амилаза, β -галактозидаза и β -фруктофуранозидаза.

Бензо[h]хиназолины со свободными гидроксильными или кетонными группами синтезированы в лаборатории синтеза спирогетероциклических соединений Института тонкой органической химии НАН РА.

Трансгликозилирование осуществляли в гетерогенных условиях с использованием соответствующих доноров в водных средах или в двухфазных системах.

В условиях эксперимента образование какого либо производного не было идентифицировано в случае пуллуланазы, β -амилазы, β -галактозидазы и β -фруктофуранозидазы. С другой стороны ЦГТаза осуществляла трансгликозилирование как в гетерогенных, так и двухфазных системах. При этом были использованы ЦГТазы различных групп микроорганизмов: из мезофильных *B. macerans* St-39 и *B. circulans* St-40; термофильных *B. stearothermophilus* St-88, *B. stearothermophilus* St-100, а также галофильного штамма *B. halophilus* St-60. Среди них только ЦГТазы термофильных штаммов проявляли способность к трансгликозилированию бензо[h]хиназолинов. Наиболее эффективной была ЦГТаза, продуцируемая *B. stearothermophilus* St-88, а среди бензо[h]хиназолинов наиболее склонными к трансгликозилированию оказались соединения МА-4215 и МА-4217. В качестве доноров гликозильных единиц применяли крахмал, мальтодекстрин, а также α -, β - и γ -ЦД.

Выявлено, что вследствие незначительной водорастворимости во всех случаях степень трансгликозилирования была очень низкой и находилась в пределах 10-15%.

Для более эффективного трансгликозилирования проводили предварительное комплексообразование с γ -ЦД. При данном методе наблюдалось увеличение количества трансгликозилированных производных примерно на 30%. Вероятно это связано с тем, что γ -ЦД образует комплекс с бензо[h]хиназолинами с сравнительно большей растворимостью в воде и одновременно выступает в качестве донора гликозильных единиц. Это создает благоприятные условия для трансгликозилирования.

С увеличением исходной **концентрации субстратов** до 40% реакция существенно ускоряется и увеличивается количество трансферных продуктов. **Весовое соотношение** бензо[h]хиназолин : γ -ЦД = 1:3 является оптимальным.

Влияние количества фермента. С увеличением количества вносимого фермента до 150 единиц на 1 г бензо[h]хиназолинов наблюдалось увеличение скорости реакции и общего выхода трансферных продуктов. Дальнейшее увеличение не влияло на эффективность процесса.

Влияние pH и температуры. Оптимальный pH находился в пределах 5.5-6.0, температура – 60°C, что является также оптимальным значением процесса циклизации для данного фермента. С увеличением **продолжительности реакции** повышается степень

трансглюкозилирования. Однако, после 72 ч реакции общее количество трансферных продуктов почти не увеличивалось.

Типичные ВЭЖХ-граммы продуктов реакции приведены на рис. 4.

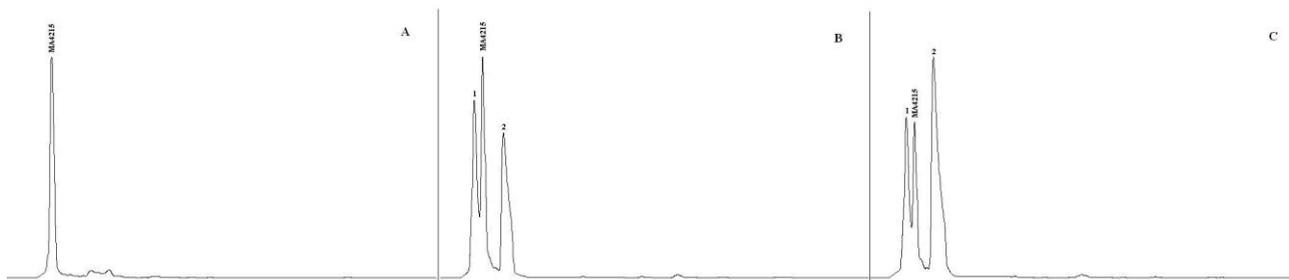


Рис. 4. Типичная ВЭЖХ-грамма продуктов трансглюкозилирования соединения МА-4215 ЦГТазой *B.stearothermophilus* St-88. (А) исходная смесь, (В) реакционная смесь после 36ч и (С) 72ч протекания реакции.

Таким образом, впервые осуществлен ферментативный синтез глюкозилированных бензо[*h*]хиназолинов. Показано, что при правильном подборе соответствующих условий реакция может протекать с достаточной эффективностью. Полученные производные водорастворимы, что очень важно при приготовлении лекарственных средств.

ГЛАВА 8. ПОЛУЧЕНИЕ ПАЛАТИНОЗЫ (ИЗОМАЛЬТУЛОЗЫ)

Изучены особенности образования палатинозы из сахарозы с использованием свободной и иммобилизованной α -глюкозилтрансферазы вновь выделенных штаммов *Pseudomonas sp.* St-1372 и *Pseudomonas sp.* St-1391 – продуцентов внутриклеточного фермента.

Выявлено, что трансформация имеет четкую зависимость от **pH** и достигает своего максимума при pH 5.5-6.0. Оптимальная **температура** для обоих ферментов находилась около 29°C. С увеличением **концентрации субстрата** вплоть до 60%, увеличивается степень трансформации и, соответственно выходы палатинозы и трегалулозы, в то время как при низких концентрациях образуются значительные количества фруктозы и глюкозы. С увеличением **количества фермента** до 15 ед/г сахарозы повышается степень конверсии в случае с обоими катализаторами. Дальнейшее увеличение не приводит к какому-нибудь заметному эффекту. С увеличением **продолжительности реакции** увеличивается степень трансформации и реакция практически заканчивается через 24 часа.

Однако, с технологической точки использование очищенных или получищенных ферментных препаратов связано с существенно большими затратами, поэтому была изучена возможность применения иммобилизованных целых клеток в качестве биокатализатора.

С этой целью иммобилизацию клеток осуществляли методом включения в различные гели, такие как полиакриламид (ПААГ), триацетат целлюлозы, агар, каррагинан и альгинат кальция. Для ионного прикрепления и адсорбции клеток на различных носителях, последние смешивали с 0.5 г клеток в 10 мл деионизированной воды и при 4°C перемешивали в течение 18 часов. Биокатализатор тщательно промывали деионизированной водой. Наилучшие результаты получены при их включении в 2%-ный гель альгината кальция.

Для осуществления эффективного синтеза палатинозы с применением иммобилизованных клеток определены оптимальные параметры реакции. Установлено, что

аналогично интактным клеткам, иммобилизованные формы проявляют свою наилучшую активность в пределах рН 5.5-6.5 с оптимумом при рН 6.0, т.е. на 0.5 единиц больше, чем в случае с интактными клетками. Кроме того, после иммобилизации область значений рН для эффективного ведения процесса расширилась. Оба биокатализатора проявляли свою максимальную активность при 30°C. При более высоких температурах наблюдалось существенное падение ферментативной активности. Однако данное падение было более резким для интактных клеток.

Непрерывное получение палатинозы осуществляли в условиях 4-х секционного биореактора сплошного заполнения.

Для определения оптимальной рабочей температуры, была исследована зависимость между скоростью потока раствора субстрата и образованием палатинозы при различных температурах. Наилучшие результаты получены при температурах 30-35°C. При более низких температурах, хотя и обеспечивается высокая стабильность, для полного превращения субстрата в продукт требуется слишком много времени.

Изучена динамика инактивации биокатализатора в условиях четырехсекционного биореактора. Для этого раствор 50%-ной сахарозы (рН 6.0) при 30°C и удельной скорости 0.3 час⁻¹ пропускали через колонки снизу вверх. Через определенные отрезки времени определяли количество образовавшейся палатинозы на выходе каждой колонки. Выявлено, что иммобилизованные клетки во всех секциях «активизируются» в течение 7-8 суток, а на 24-е сутки их активность выше первоначальной в среднем 1.46-1.70; 1.50-1.74; 1.58-1.78 и 1.66-1.81 раза для первой, второй, третьей и четвертой секций соответственно (табл.4).

Данная «активация» может быть результатом роста клеток или их акклиматизацией к применяемым условиям, а различие между эффективностями начальных и конечных колонок - различной стабильностью иммобилизованных клеток в растворах сахарозы и палатинозы. Они более стабильны в растворе продукта, чем субстрата.

Таблица 4

Изменение активности иммобилизованных клеток *Pseudomonas sp.* St-1372 (а) и St-1391 (б) во времени в секциях

Секция, №	Относительная активность, %						Соотношение активностей			
	Исходная (A ₀)		через 8 сут. (A ₁)		через 24 сут. (A ₂)		A ₁ /A ₀		A ₂ /A ₀	
	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б
1	48	41	82	78	70	70	1.70	1.95	1.46	1.70
2	50	43	83	80	75	80	1.66	1.78	1.50	1.74
3	55	49	87	87	87	87	1.58	1.74	1.58	1.78
4	60	55	100	100	100	100	1.66	1.81	1.66	1.81

Время полужизни катализатора на основе иммобилизованных клеток *Pseudomonas sp.* St-1372 и St-1391 составляет около 70 и 65 суток соответственно. Процесс с применением иммобилизованных клеток *Pseudomonas sp.* St-1372 внедрен в производство в компании «PureCircle Sdn. Bhd.» (Малайзия).

ГЛАВА 9. ПОЛУЧЕНИЕ ФРУКТООЛИГОСАХАРИДОВ СОВМЕСТНО С ПАЛАТИНОЗОЙ

Изучены особенности получения ФОС с применением β -фруктофуранозидаз *A. niger* St-0018 и *A. foetidus* St-0194 и улучшение диетических свойств полученного продукта трансформацией остаточной сахарозы в палатинозу и трегалулозу под действием α -глюкозилтрансферазы *Pseudomonas sp.* St-1372.

Влияние pH и температуры. Ферменты сильно ингибировались при щелочных значениях pH реакционной среды. Оптимум pH составил 5.5 и 6.0 для β -фруктозофуранозидаз *A. niger* St-0018 и *A. foetidus* St-0194, соответственно.

Трансферазная реакция на 40%-ной сахарозе для обоих ферментов наиболее эффективно протекает в пределах температур 50-65°C с оптимумом при 55°C.

Концентрация субстрата. При низких концентрациях субстрата наблюдается образование преимущественно глюкозы и фруктозы, т.е. протекает реакция гидролиза. Эффективность трансфруктозилирования увеличивается с повышением исходной концентрации субстрата. Одновременно уменьшается количество моносахаридов и увеличивается выход трансферных продуктов. В случае с ферментом *A. foetidus* St-0194 не выявлено образования фруктозил-нистозы (табл.5).

Влияние количества фермента. С увеличением количества вносимого фермента наблюдалось определенное ускорение реакции и повышение выхода трансферных продуктов. Оптимальным является количество фермента 3-5 ед на 1 г сахарозы при продолжительности реакции около 24 ч.

Продолжительность реакции также играет важную роль для эффективного трансфруктозилирования. Для изучения динамики накопления отдельных продуктов реакцию осуществляли при 55°C в течение 24 ч с использованием 55%-ного раствора сахарозы и 2.5 ед фермента на 1 г сахарозы.

Таблица 5

Влияние концентрации сахарозы на образование ФОС β -фруктофуранозидазой

Сахароза, %	Трансферные продукты, %										Общий выход ФОС, %	
	Глюкоза		Сахароза		1-Кестоза		Нистоза		Фруктозил-нистоза			
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
10	40.7	38.5	17.1	33.1	19.7	25.3	21.0	3.1	1.5	-	42.2	28.4
20	33.6	36.4	16.2	29.8	20.4	30.1	25.2	3.7	4.6	-	50.2	33.8
40	31.7	31.5	11.7	29.4	23.9	33.0	27.3	6.1	5.4	-	56.6	39.1
50	30.2	30.7	10.5	26.5	24.6	34.9	28.8	7.9	5.9	-	59.3	42.8
60	26.4	28.6	8.0	25.3	29.2	37.7	29.4	8.4	6.8	-	65.6	46.1

Примечание: (А) *A. niger* St-0018; (Б) *A. foetidus* St-0194

В случае с ферментом *A. niger* St-0018 в начале реакции происходит образование преимущественно 1-кестозы, концентрация которой достигает своего максимума примерно через 5 ч после начала реакции. В дальнейшем ее количество постепенно снижается, в то время как накопление более высокомолекулярных производных продолжается. Количество нистозы нарастает вплоть до 14 ч, после чего также постепенно снижается. С другой стороны, синтез фруктозил-нистозы начинается после 5 ч реакции и за 24 ч ее содержание в

реакционной смеси достигает 8.0%. Однако, оно может быть существенно выше при использовании более высоких концентраций фермента. Общее количество ФОС достигает своего максимума через 5 ч реакции и остается практически неизменным вплоть до 14 ч процесса; меняется только соотношение продуктов. В дальнейшем содержание кестозы, нистозы и фруктозил-нистозы несколько снижается, в то время как количество сахарозы остается неизменным.

Типичные ВЭЖХ-граммы продуктов реакций с применением β -фруктофуранозидаз *A. niger* St-0018 и *A. foetidus* St-0194 представлены на рис. 5.

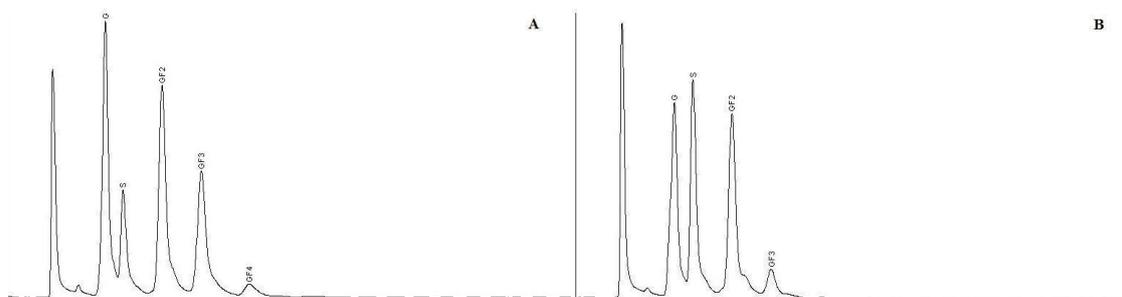


Рис. 5. Типичная ВЭЖХ-грамма продуктов трансфруктозилирования β -фруктофуранозидазой *A. niger* St-0018 (A) и *A. foetidus* St-0194 (B).

Непрерывное получение ФОС. Для непрерывного получения ФОС клетки *A. niger* иммобилизовали методом включения в 2%-ный альгинат кальция. Полученный биокатализаторы использовали без дополнительной обработки или после дополнительной сшивки полученных гранул полиэтиленимином, а затем –глутаровым альдегидом (Kida et al., 1988). Выявлено, что иммобилизация в 2%-ном альгинате приводит к наибольшему сохранению исходной активности. Операционная стабильность полученного биокатализатора в непрерывных условиях находится в пределах 180-200 суток.

Трансформация остаточной сахарозы в палатинозу и трегалулозу. Для превращения остаточной сахарозы в палатинозу и трегалулозу использовали иммобилизованные клетки *Pseudomonas sp.* St-1372. Для этого, полученную на выходе биореактора с иммобилизованными клетками с β -фруктофуранозидазной активностью смесь фруктоолигосахаридов пропускали через вторую колонку, заполненную иммобилизованными клетками *Pseudomonas sp.* (при 29°C). Удельную скорость устанавливали в пределах 0.2-0.3 час⁻¹. В указанных условиях практически вся остаточная сахароза превращалась в палатинозу и трегалулозу.

Типичная ВЭЖХ-грамма полученного сиропа представлена на рис.6.

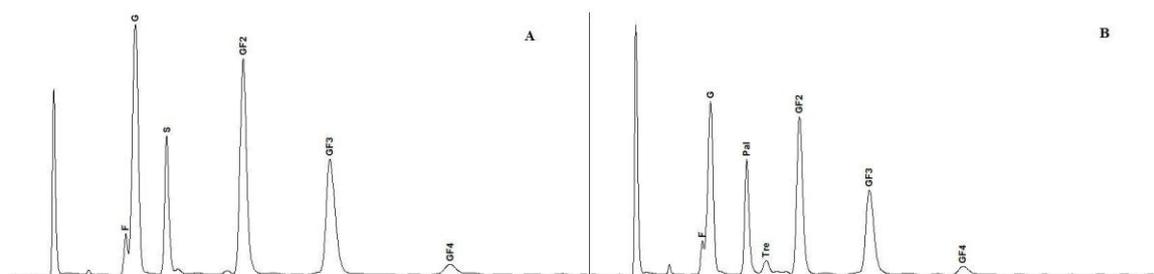


Рис.6. Типичная ВЭЖХ-грамма продуктов трансформации остаточной сахарозы в палатинозу и трегалулозу иммобилизованными клетками *Pseudomonas sp.* (A), исходная смесь; (B), смесь после трансформации.

Таким образом, разработан эффективный метод получения сиропа ФОС с применением свободных и иммобилизованных клеток *A. niger* St-0018 и *A. foetidus* St-0194 с β -фруктофуранозидазной активностью. Впервые показана возможность превращения остаточной сахарозы в палатинозу и трегалулозу, которые существенно улучшают качественные характеристики ФОС и могут расширить области их применения. Процесс с применением иммобилизованных клеток *A. niger* St-0018 и *Pseudomonas sp.* St-1372 внедрен в производство в компании «PureCircle Sdn. Bhd.» (Малайзия).

ВЫВОДЫ

1. В результате микробиологических анализов образцов различных типов почв с применением метода накопительной культуры выделены перспективные культуры микроорганизмов – активных продуцентов ЦГТаз, α -глюкозилтрансфераз и β -фруктофуранозидаз.
2. На основе комплекса микробиологических исследований морфо-физиологических и биохимических особенностей культуры активных продуцентов трансфераз идентифицированы как представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Aspergillus*.
3. Изучены и оптимизированы условия биосинтеза наиболее перспективных ЦГТаз, α -глюкозилтрансфераз и β -фруктофуранозидаз, в том числе экстремофильных форм.
4. Показано, что реакция межмолекулярного трансглюкозилирования наиболее выражено проявляется у ЦГТаз термофильных штаммов.
5. Установлено, что при трансглюкозилировании аскорбиновой кислоты наиболее эффективным донором глюкозных единиц является γ -ЦД.
6. Выявлено, что трансглюкозилирование бензо[h]хиназолинов протекает с наибольшей эффективностью при их предварительном комплексообразовании с γ -ЦД.
7. Выявлено, что ЦГТаза *Thermococcus sp.* осуществляет эффективное трансглюкозилирование сладких гликозидов *Stevia rebaudiana* Bertoni при высоких температурах в присутствии крахмала в качестве донора глюкозных единиц. Разработан эффективный метод получения высокочистых гликозилированных производных стевиозида. Остаточные мальтодекстрины могут быть трансформированы в фруктозо-концевые олигосахариды под действием ЦГТаз.
8. Исследованы особенности получения изомальтулозы из высококонцентрированных растворов сахарозы под действием свободной и иммобилизованной форм α -глюкозилтрансфераз *Pseudomonas sp.* Установлено, что степень и эффективность процесса находятся в строгой зависимости как от концентрации субстрата и фермента, так и от внешних факторов: pH, температуры и длительности реакции.
9. Установлена возможность биокаталитического получения фруктоолигосахаридов под действием свободной и иммобилизованной форм β -фруктофуранозидаз *A.niger* из концентрированных растворов сахарозы. Выявлено, что остаточная сахароза с успехом может быть превращена в палатинозу под действием α -глюкозилтрансферазы *Pseudomonas sp.*

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Циклодекстрингликозилтрансферазы высокоактивного штамма *Bacillus stearothermophilus* St-88 рекомендуются для производства ферментативно модифицированной L-аскорбиновой кислоты в присутствии γ -ЦД в качестве донора.
2. Метод предварительного комплексообразования с γ -ЦД перед трансгликозилированием рекомендуется для биокаталитической модификации нерастворимых в воде органических соединений со свободными гидроксильными или кетонowymi группами.
3. Термофильная циклодекстрингликозилтрансфераза *Thermococcus* sp. St-1954 рекомендуется для организации производства высокочистых трансгликозилированных гликозидов *Stevia rebaudiana* Bertoni и их смеси с фруктозо-концевыми олигосахаридами.
4. α -Глюкозилтрансферазы *Pseudomonas* sp. St-1372 и St-1391 рекомендуются для организации производства изомальтулозы в проточных и непрерывных условиях.
5. β -Фруктофуранозидазы, продуцируемые штаммами *Aspergillus niger* St-0018 и *Aspergillus foetidus* St-0194 и α -глюкозилтрансферазы *Pseudomonas* sp. St-1372 рекомендуются для организации производства фруктоолигосахаридного сиропа совместно с палатинозой.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Markosyan A.A. Transglycosylation of L-ascorbic acid by free and immobilized cyclomalto-dextrin glucanotransferases, *Electronic Journal of Natural Sciences of National Academy of Sciences of RA*, 2005, V.2(5), p.15-19.
2. Markosyan A.A. Synthesis of Palatinose. *Electronic Journal of Natural Sciences of National Academy of Sciences of RA*, 2005, V.2(5), p.20-23.
3. Маркосян А.А., Абелян Л.А., Адамян М.О., Акопян Ж.И., Абелян В.А. Трансгликозилирование L-аскорбиновой кислоты. *Прикл. биохим. и микробиол.*, 2007, т.43, №1, с.42-46.
4. Маркосян А.А., Абелян Л.А., Адамян М.О., Экажев З.Д., Акопян Ж.И., Абелян В.А. Получение фруктоолигосахаридного сиропа из сахарозы совместно с палатинозой и трегалозой. *Прикл. биохим. и микробиол.*, 2007, т.43, №4, с.424-431.