

OBTAINING SWEETENER BY MICROBIAL SYNTHESIS

Y. Hayduk, Y. Penchuk

National University of Food Technologies

Key words:

Sweeteners
Microorganisms
Biotransformation
Tagatose
Lactose

Article history:

Received 08.07.2019
Received in revised form
24.07.2019
Accepted 13.08.2019

Corresponding author:

Y. Hayduk
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The choice of the most active microorganism, the choice of a cheaper substrate, the provision of optimal cultivation conditions and other technological features affect the obtaining sweeteners.

The paper analyzes the modern scientific literature of the last five years concerning the increase of the synthesis of sweeteners by biotransformation, on different substrates, using bacteria and yeast. In addition, bioconversion with microorganisms is considered to be an alternative to a large-scale commercial chemical process.

Providing technological parameters such as temperature, both during the accumulation of biomass and during production biosynthesis, the speed of rotation agitator, the creation of aerobic or anaerobic conditions, finding the most active strain of the producer allow to increase the concentration of sweeteners.

The review of foreign scientific works, which provide the implementation of biotechnological obtaining sweeteners, has been carried out. The peculiarities of using sweeteners — xylitol, sorbitol, erythritol, mannitol and *D*-tagatose were analyzed. Obtaining sweeteners is carried out using various microorganisms: *Y. lipolytica*, *G. thailandicus*, *C. tropicalis*, *L. plantarum*, *L. brevis* etc. Today scientists are focusing on finding the cheapest substrate for cultivating producers. To obtain erythritol, the most economically feasible was substrate — glycerin, for mannitol — artichoke tubers, for *D*-tagatose — lactose. Nonetheless finding substrates for xylitol and sorbitol remains relevant, as these sweeteners are received using a more expensive substrate — glucose, fructose. Therefore, the paper presents main technological parameters that influence the high-yielding obtaining sweeteners.

ОДЕРЖАННЯ ПІДСОЛОДЖУВАЧІВ МІКРОБНИМ СИНТЕЗОМ

Ю. М. Гайдук, Ю. М. Пенчук

Національний університет харчових технологій

Вибір найбільш активного мікроорганізму, більш дешевого субстрату, забезпечення оптимальних умов культивування та інші технологічні особливості впливають на одержання підсолоджувачів.

У статті проаналізовано сучасну наукову літературу останніх двох-п'яти років щодо підвищення синтезу підсолоджувачів шляхом біотрансформації на різних субстратах з використанням бактерій і дріжджів. Біоконверсія за допомогою мікроорганізмів вважається альтернативною великомасштабному комерційному хімічному процесу. Забезпечення технологічних параметрів, зокрема температури як під час накопичення біомаси, так і під час виробничого біосинтезу, швидкості обертів мішалки, створення аеробних або анаеробних умов, знаходження найбільш активно штаму-продуцента дає змогу збільшити концентрації підсолоджувачів.

*Здійснено огляд досліджень зарубіжних вчених, які передбачають реалізацію біотехнологічного одержання підсолоджувачів. Проаналізовано особливості високопродуктивного одержання цукрозамінників — ксилітолу, сорбітолу, еритритолу, манітолу та D-тагатози. Одержання підсолоджувачів здійснюється з використанням різних мікроорганізмів: *Y. lipolytica*, *G. thailandicus*, *C. tropicalis*, *L. plantarum*, *L. brevis* тощо. На сьогодні вчені зосередженні на знаходженні найбільш дешевого субстрату для культивування продуцентів. Для одержання еритритолу найбільш економічно доцільний виявився субстрат гліцерину, для манітолу — сахаризований артишок, D-тагатози — лактоза. Актуальним залишається знаходження субстратів для ксилітолу та сорбітолу, оскільки ці підсолоджувачі одержують на більш дорожчому субстраті — глюкозі, фруктозі. Наведено основні технологічні параметри, які впливають на високопродуктивне одержання підсолоджувачів.*

Ключові слова: підсолоджувачі, мікроорганізми, біотрансформація, тагатоза, лактоза.

Постановка проблеми. Нині науковці активно займаються розробкою та вдосконаленням біотехнологій одержання підсолоджувачів. Розвиток технологій пов'язаний з великою кількістю захворювань, спричинених надмірним споживанням цукру, — порушення вуглеводного обміну, діабет другого типу тощо [1].

Дослідники пропонують одержувати підсолоджувачі саме мікробіологічним синтезом. Спочатку застосовували хімічний спосіб одержання підсолоджувачів, який має ряд недоліків (утворення хімічних відходів і високі енерговитрати). До того ж хімічний спосіб супроводжується досить високою температурою і тиском, утворенням побічних речовин. Таке одержання

призводить до низького виходу підсолоджувачів і високої вартості при відокремленні побічних речовин. В останні роки дослідження вчених були спрямовані на розвиток біотехнологічних процесів виробництва підсолоджувачів. Ця альтернатива пояснюється економічністю, автоматизацією процесів, зниженням споживання енергії і простотою у виділенні через оптимізацію процесів. Науковці активно займаються знаходженням та забезпеченням більш екологічно безпечного процесу [2; 3].

На сьогодні досить велика кількість літератури, в якій містяться нові відомості про технології, що передбачають використання біотрансформації для синтезу різних підсолоджувачів (тагатози, сорбітолу, манітолу, ксилітолу, еритритолу). Переваги використання таких технологій пов'язані з економією часу, оскільки відбувається пряма біотрансформація субстрату на 80% у підсолоджувач.

У зв'язку з викладеним вище **метою дослідження** є аналіз сучасної наукової літератури, у якій висвітлюються питання одержання підсолоджувачів мікробіологічним синтезом.

Викладення основних результатів дослідження. Дослідження розробки та вдосконалення біотехнологій одержання підсолоджувачів. На сьогодні перспективним є одержання нешкідливих натуральних цукрозамінників з пребіотичними властивостями з метою маскування неприємних смакових властивостей таблеток та інших фармацевтичних продуктів, а також створення функціональних продуктів харчування.

Останні роки призвели до швидкого розвитку методів біосинтезу підсолоджувачів з недорогих субстратів. Прикладом є біосинтез такого підсолоджувача, як еритритол. Недорогим субстратом для одержання еритритолу є чистий або сирий гліцерин. У [4] було досліджено, що за одержання еритритолу з чистого гліцерину вихід і продуктивність підсолоджувача була вищою на 20%, ніж при використанні мікроорганізмами *Y. lipolytica* сирого гліцерину [4]. Незважаючи на такий успіх в дослідженнях, необхідна подальша оптимізація умов для забезпечення вдалого технологічного процесу.

Дослідження з метою поліпшення біосинтезу підсолоджувачів пояснюється високою роздрібною ціною (тагатози, еритритолу тощо), що є перешкодою для споживачів, незважаючи на те, що значна частина світового населення має надмірну вагу чи ожиріння [4]. З цієї причини у [3—4] пропонується удосконалення технології виробництва цукрозамінників.

Регулювання температури також впливає на успіх в одержанні значної кількості підсолоджувачів. Як приклад можна навести одержання *D*-тагатози. Технологічні особливості полягають в тому, що за відносно високих температур (60—70°C), біотрансформація *D*-галактози в *D*-тагатузу здійснюється краще, ніж за дотриманні низьких температур (53°C).

З дотримання температур впливає ще одна технологічна особливість — пошук найбільш активного продуцента фермента. Наприклад, в одержанні підсолоджувача *D*-тагатози беруть участь різні мікроорганізми (*C. hylemonae*, *G. stearothermophilus*), які характеризуються біопродукцією *D*-тагатози за участю фермента *L*-арабінозоізомерази. Але у [5] досліджено, що завдяки

використанню біологічного агента *P. seruginosa*, який продукує глюкозофосфатизомеразу, вихід підсолоджувача можна значно збільшити. Оскільки цей фермент глюкозофосфатизомераза відрізняється від інших *L*-арабінозоізомераз його оптимальною температурою (60°C) для виробництва *D*-тагати з мезофільних бактерій [5].

Еритритол. Технологія одержання еритритолу передбачає біотрансформацію субстрату (гліцерину, глюкози) ферментом еритрозоредуктазою в еритрит за участі різних мікроорганізмів. Для виробництва еритритолу використовують продуценти: *Yarrowia lipolytica*, *Trichosporonoides oedocephalis*, *Moniliella sp.* тощо [4; 6].

Хоча еритрит може бути отриманий хімічно з диальдегідного крохмалю, проте цей процес ніколи не був індустріалізований через його низьку ефективність.

Замість цього еритрит найчастіше утворюється з глюкози шляхом ферментації з використанням осмофільних дріжджів (*Aurobasidium sp.*, *Trigonopsis variabilis*, *Torula sp.*, *Candida magnoliae*, *Pseudozyma tsubakaensis*, і *Moniliella sp.*). Деякі з цих технологій були впроваджені в промисловому масштабі, однак вони мають високу вартість ферментаційних середовищ і велику кількість побічних продуктів (маніт і органічні кислоти). Утворення побічних продуктів передбачає подальше очищення еритритолу, що є досить складним і затратним. Альтернативою є пошук біологічних агентів, які будуть синтезувати еритрит з більш дешевих середовищ.

На сьогодні досить популярним та ефективним у виробництві еритритолу є *Y. lipolytica*. Цей продуцент є нестандартною моделлю дріжджів, яка добре відома своїми незвичайними метаболічними властивостями. *Y. lipolytica* може використовувати як основне джерело вуглецю гліцерин, замість глюкози. Таке використання джерела вуглецю є найбільш економічно доцільним, оскільки сирий гліцерин є побічним продуктом виробництва біодизелю або жирової промисловості (тобто омилення жирів, синтез стеарину), а отже, доступний у великих кількостях за нижчою ціною, ніж глюкоза. Більше того, гліцерин підвищує вихід еритритолу порівняно з глюкозою, що робить процес виробництва еритриту більш прибутковим [2].

Carly із співавт. стверджують, що еритритол одержують шляхом ферментації з використанням молочнокислих бактерій, осмофільних дріжджів або грибів. Але науковці, як і в літературному джерелі [2], вважають, що виробництво еритриту з осмофільних дріжджів є найбільш ефективним. Вченими були проведені різні дослідження з метою визначення ключових генів у *Y. lipolytica*, що беруть участь у синтезі еритриту. У дріжджів виявили ряд змін експресії білка при осмотичному стресі. Зміна білків, пов'язаних із захистом від стресу або енергетичним обміном вказує на те, що *Y. lipolytica* є ефективним мікроорганізмом для синтезу еритриту.

Виробництво еритриту залежить від умов культивування. Тому у [7] встановлено, що культивування продуценту еритриту потребує високого осмотичного тиску, який, зазвичай, досягається за рахунок високих концентрацій глюкози в діапазоні від 200 г/л до 400 г/л. Високих концентрацій солей

можна уникнути, оскільки осмотичний тиск, спричинений солями, має більший негативний вплив на ріст клітин [7]. Однак існує багато інших параметрів, які можуть впливати на синтез еритриту. Наприклад, у [7] дотримуються таких технологічних параметрів, як температура (30°C) і рН. Ці показники виявили значний вплив на виробництво еритриту в *Y. lipolytica*. При використанні гліцерину як джерела вуглецю рН 3,0 виявився оптимальним, що призвело як до більш високої продуктивності еритриту (до 2,86 г/л), так і до більш низького утворення побічних продуктів, особливо лимонної кислоти. Концентрація еритритолу склала 175 г/л.

Але у [8] повідомляється, що був вирощений штам *Y. lipolytica* DSM70562 у середовищі на основі глюкози (концентрацією 100 г/л) з більш високою продуктивністю при рН 5,5 (до 5,31 г/л). Концентрація еритритолу була 27,8 г/л. Тому, порівнюючи дві праці [7; 8], можна стверджувати, що такі параметри, як температура, тиск, поживне середовище (зокрема джерело вуглецю) впливають на технологічний процес у цілому.

У [9] дослідили підвищення виробництва еритриту *T. oedocephalis* ATCC 16958 шляхом регулювання активності ключового ферменту (еритрозоредуктази). Зокрема, для поліпшення продукції еритриту додавання іонів металів у поживні середовища є зручною й ефективною стратегією. Технологія передбачає вирощування *T. oedocephalis* ATCC 16958 на поживному середовищі з глюкозою (20 г/л) при температурі 30°C, рН 7,0 і 200 об/хв протягом 48 год. Під час виробничого біосинтезу було використано 50 г/л глюкози та 30 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ для біотрансформації в еритритол за участю фермента еритрозоредуктази. Швидкість мішалки доводили до 350 об/хв, при цьому рН підтримували автоматично при 4,5 додаванням 10 М NaOH.

Виробництво еритриту підвищилося у *T. oedocephalis* ATCC 16958 при додаванні іонів Cu^{2+} і Mn^{2+} . Причиною збільшення виробництва еритриту є головним чином те, що Cu^{2+} підвищує активність еритрозоредуктази, тоді як Mn^{2+} змінює проникнення клітин. Cu^{2+} збільшив вміст еритриту на 86% (44,27 г/л) і зменшив утворення побічних продуктів на 31%.

Дослідження [9] показали, що рівні експресії еритрозоредуктази за наявності 30 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ були вищими, ніж рівні, отримані після обробки іншими дослідженими іонами металів Al^{3+} або Ni^{2+} (34,83 г/л).

Отже, вдосконалення біотехнологій вплинуло на регулювання технологічних процесів виробничого біосинтезу, зокрема йдеться про додавання іонів Cu^{2+} в поживне середовище під час біотрансформації.

Ксилітол. Для біотехнологічного одержання заміника цукру ксилітолу використовують такі мікроорганізми: *Saccharomyces cerevisiae*, *Gluconobacter thailandicus* та *Candida tropicalis* [10; 11].

У [10] пропонується одержувати ксилітол за допомогою біотрансформації, з використанням рекомбінантної *E. coli*. Як субстрат використовується ксилозу. Концентрація ксиліту 21,2 г/л/год досягалася шляхом біотрансформації. Культивування проходило з використанням як джерела вуглецю 10 г/л ксилози 10 г/л глюкози. Особливістю ферментації було дотримання таких технологічних параметрів, як температура і рН. Досліджено вплив рН і тем-

пературу на біотрансформацію. Це дослідження проводили при рН в межах від 5,0 до 9,0. Оптимальну температуру реакції синтезу ксиліту визначали при температурі від 15 до 45°C. Співвідношення концентрації глюкози і ксилози оптимізували від 0,2:1 до 1,5:1 (г/г). Максимальна активність ксиліту була отримана при рН 8. Це було пов'язано з тим, що вихід різко знизився (до 40%) з подальшим підвищенням рН від 8 до 9. Оптимальна температура для біотрансформації ксиліту — 30°C, оскільки при зменшенні температури вихід ксилітолу зменшувався (до 20%) [10]. Отже, такі технологічні умови, як температура, рН, співвідношення концентрацій субстратів, які наведені вище, впливають на продуктивність культури.

Для підвищення синтезу замітника цукру ксилітолу використовують такі мікроорганізми: *C. tropicalis* МТСС 6192, *G. thailandicus* СGMCC1.3748 тощо.

У праці [11] досліджено виробництво ксилітолу з *G. thailandicus* СGMCC1.3748. Два ключових ферменти відіграють важливу роль у біотрансформації ксиліту з *D*-арабітолу, зокрема *D*-арабітолдегідрогеназа і НАДН-залежні ксилітодегідрогенази. Для забезпечення високої продуктивності необхідна достатня активність і регенерація ферменту ксилітдегідрогенази. Іноді мікроорганізми позбавлені системи регенерації НАДН самими клітинами, навіть якщо є достатній запас НАДН, необхідний для функціонування ферменту ксилітдегідрогенази. Вчені спробували під час технологічного процесу додавати екзогенний НАДН. Виявилось, що така технологія є неекономічною.

Один з найбільш ефективних способів продукування НАДН клітинами — введення ксилітдегідрогенази в клітину разом з додаванням субстрату, зокрема етанолу. Штам *G. thailandicus* СGMCC1.3748 вирощували на LB-середовищі з глюкозою (100 г/л). Культивування проводилось аеробно при 30°C і 150 об/хв протягом 48 год. Подальші дослідження базувались шляхом клонування й експресії нових генів ксилітолдегідрогенази та алкогольдегідрогенази у *E. coli* BL21 з *G. thailandicus* СGMCC1.3748. Під час виробничого біосинтезу був використаний субстрат *D*-арабітол (40 г/л). Процес біотрансформації проходив при 37°C і 150 об/хв.

Біотрансформація *D*-арабітолу у *G. thailandicus* призвела до збільшення кількості ксилітолу (32,8 г/л) без використання екзогенного постачання НАДН. Тому штам з саморегенеративною системою НАДН можна розглядати як перспективний біологічний агент для біотрансформації *D*-арабітолу в ксилітол [11].

Отже, аналіз літературних джерел [10-11] свідчить, що вчені зосереджені на пошуку найбільш економічно-доцільного способу одержання підсолоджувачів, а також на забезпеченні сприятливих умов для штамів *C. tropicalis* МТСС 6192 та *G. thailandicus* СGMCC1.3748.

Манітол. Технологія одержання манітолу передбачає біотрансформацію субстрату (фруктози, сахаризованого артишоку) манітолдегідрогенази в манітол за участю різних мікроорганізмів.

Існують різні мікроорганізми, які мають здатність до синтезу манітолу, зокрема молочнокислі бактерії, осмофільні дріжджі, гриби тощо [3].

Для виробництва манітолу використовують такі продуценти, як *Fructobacillus tropaeoli* [12], *L. brevis* [3], *Zygomonas mobilis*, *L. lactis* тощо. Серед них декілька гетероферментативних лактобацил, які могли б перетворювати фруктозу в манітол шляхом одностадійної ферментативної реакції. Такі молочнокислі бактерії вважаються найбільш ефективними манітольними виробниками [3]. Проте у [13; 14] передбачається використання високоцінних джерел вуглецю (фруктоза) [13] і джерела азоту (екстракт дріжджів і пептон) [14], що значно збільшило вартість.

У [3] пропонується одержувати манітол шляхом вирощування *Lactobacillus brevis*, який здатний біотрансформувати дешевий субстрат (оцукрений артишок із загальною концентрацією цукру 169 г/л). Доведено, що мікроорганізм *L. brevis* здатний продукувати 215,02 г/л манітолу [3].

Для високопродуктивного одержання манітолу використовують такі штами мікроорганізмів: *L. pseudomensenteroides* ATCC 12291, *L. pseudomesenteroides* STCC G123, *L. lactis* Δldh, *L. intermedius* NNRL B-3693 тощо.

У [15] вчені дослідили та описали біотехнологію одержання манітолу з фруктози з використанням ферменту манітолдегідрогеназа. Як високопродуктивний продуцент манітолдегідрогенази, з подальшою біотрансформацією фруктози, вчені пропонують використовувати такі штами мікроорганізмів: *L. intermedius* NNRL B-3693, *L. lactis* Δldh та генетично модифіковані — *E. coli*, *S. glutamicum*. Дослідники, в основному, фокусувались на останніх досягненнях щодо підвищення економічної ефективності мікробного виробництва манітолу. Використання генно-інженерних штамів збільшує вихід манітолу. Проте безпека манітолу, виробленого генетично модифікованими продуцентами, може викликати занепокоєння, особливо якщо манітол буде застосовуватись у медицині [15].

З вище запропонованих мікроорганізмів найвища концентрація манітолу була у *L. intermedius* NNRL B-3693 — 104,8 г/л. Технологія одержання манітолу базувалась на культивуванні *L. intermedius* при суміші меляси і фруктозного сиропу (1:1, загальний вміст цукрів — 150 г/л). Культуру вирощували при 37°C протягом 24 год. Вчені спостерігали ефективно отримання маніту шляхом регулювання рН в періодичному і ферментативному бродінні. Значення рН контролювали на 5,5 протягом перших 12 год для поліпшення росту клітин. Згодом значення були зміщені до 4,5 для посилення накопичення маніту. Процес виробничого біосинтезу передбачав біотрансформацію фруктози (150 г/л) за участю ферменту манітолдегідрогенази. Спостерігалось посилене виробництво манітолу 104,8 г/л через 22 год з додаванням соєвого пептону і кукурудзи як джерела азоту.

У [12] пропонується одержувати манітол з використанням штаму *F. tropaeoli* CRL 2034. Технологія одержання передбачає біотрансформацію субстрату фруктози (70 г/л) за участю ферменту манітол-2-дегідрогенази. *F. tropaeoli* CRL 2034 вирощували в аеробних умовах при 30°C протягом 48 год. Використовували MRS середовище для культивування мікроорганізму *F. tropaeoli* з 20% глюкози та фруктози. Ферментація була проведена при 30°C і рН 5,0 протягом 24 год при перемішуванні 350 об/хв. Під час біотрансформації фруктози концентрацією 70 г/л одержано — 56,84 г/л манітолу [12].

Сорбітол. Одержувати сорбітол можна з використанням таких мікроорганізмів: *Synechocystis* PCC 6803, *Z. mobilis*, *L. plantarum* тощо.

Для цього у [16] рекомендується використовувати бактерію *Z. mobilis*. Мікроорганізм є дуже популярним завдяки його ферменту глюкоза-фруктозооксидоредуктази. Цей фермент здатний біотрансформувати фруктозу і глюкозу в сорбітол і глюконолактон (з подальшим перетворенням в глюконову кислоту). Однак вчені зробили висновок, що необхідна подальша оптимізація умов культури *Z. mobilis*, щоб подолати багато недоліків, які можуть обмежувати промислову біотрансформацію сорбітолу. Серед цих проблем — відносно висока вартість субстратів, особливо фруктози, порівняно з вартістю продукції [16].

У [17] вчені рекомендують використовувати бактерію *L. plantarum* NCIM8826. Технологія одержання передбачає культивування бактерії на MRS-середовищі з додаванням 2% різних цукрів (глюкози, фруктози, мальтози, сахарози). Інокуляція відбувалась при 30 або 37°C, рН 5,5 та швидкістю перемішування 120 об/хв. Процес ферментації базувався на додаванні глюкози концентрацією 50 г/л, також підтримували температуру 37°C. Завдяки біотрансформації глюкози за участю ферменту сорбітолгідрогенази було утворено 42,3 г/л сорбітолу.

L. plantarum NCIM8826 здатний змінювати метаболічний шлях від фруктози-6-фосфат до виробництва сорбітолу з надзвичайно високою ефективністю (61—65% конверсії глюкози), яка близька до максимального теоретичного значення 67% [17].

Jan із співавт. дослідили використання різних субстратів для біотрансформації з метою одержання сорбітолу з *L. plantarum* sp. NCIM 2912. Було запропоновано використовувати (г/г⁻¹): 20 — глюкози або 7,3 — сахарози, 5,8 — фруктози або 6,4 — мальтози. В результаті досліджень для подальшої біотрансформації обрана глюкоза, оскільки штам NCIM 2912 здатний біотрансформувати глюкозу в сорбітол з концентрацією 19,7 г/л.

Також досліджено, що при збільшенні концентрації глюкози і подальшої оптимізації процесів продуктивність сорбітолу збільшується, тому технологія виробництва сорбітолу передбачає використання глюкози концентрацією 20 г/л⁻¹ і забезпечення технологічних параметрів, таких як температура (37°C, рН 7,0) і швидкість перемішування (300 об/хв). Однією з умов виробництва сорбітолу є додавання амінокислоти цистеїну в концентрації 3,5 г/л⁻¹. Через 42 год ферментативного виробництва максимум виявлено, що виробництво сорбіту становить 19,7 г/л⁻¹ [18].

D-гагатаза. В біотрансформації підсолонкувача беруть участь такі мікроорганізми: *L. brevis*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Clostridium hylemonae* (DSM 15053), *L. plantarum*, *S. cerevisiae* та ін. [19—23].

У [19] вчені досліджують підвищення продуктивності *D*-гагатази за допомогою ферменту *L*-арабінозоізомерази від ізольованого *L. brevis* PC16. Науковці стверджують, що біотрансформація *D*-галактози (за допомогою ключового каталізатора *L*-арабінозоізомерази) в *D*-гагатазу краще здійснюється за відносно високих температур (60—70°C). З огляду на це багато термофільних

мікроорганізмів були зареєстровані як продуценти *L*-арабінозоізомерази. Така технологія одержання *D*-тагатози передбачає вирощування *L. brevis* PC16 на DSM-середовищі з глюкозою при 37 °С при 160 об/хв протягом 48 год. Процес біотрансформації *D*-галактози (125 г/л) в *D*-тагатозу здійснювали за участі ферменту *L*-арабінозоізомерази. Також підтримували температуру 67°С, рН становив 6,5. Через 36 год було одержано 96,4 г/л *D*-тагатози при максимальній швидкості перетворення 77,2%.

У [19] був ідентифікований високопродуктивний новий штам *L. brevis* PC16, який здатний продукувати 96,4 г/л *D*-тагатози.

Для одержання високого виходу *D*-тагатози необхідно враховувати всі нюанси ферментаційних процесів, а також вибір біологічного агента. У [5] науковці займаються пошуками найбільш активного продуценту ферменту *L*-арабінозоізомерази для подальшого одержання підсолоджувача. Вчені досліджують біотрансформацію *D*-галактози в *D*-тагатозу саме з використанням фосфоглюкозоізомерази *P. aeruginosa* PAO1. Незважаючи на те, що різноманітні *L*-арабінозоізомерази характеризувалися біопродукцією *D*-тагатози, глюкозофосфатізомераза *P. aeruginosa* відрізняється від інших *L*-арабінозоізомераз його оптимальною температурою (60°С) для виробництва *D*-тагатози з мезофільних бактерій [5].

Технологія одержання базується на культивуванні *P. aeruginosa* PAO1 на LB-середовищі при 30°С, протягом 24 год. Вчені детально дослідили саме процес біотрансформації. Для максимальної ізомеризації *D*-галактози (1000 мМ) до *D*-тагатози підтримували температуру при 60°С, рН 7,0. Рівноважне співвідношення між *D*-галактозою і *D*-тагатозою досягається після 180 хв, з отриманням 567,51 мкМ від 1000 мМ *D*-галактози [5].

У праці [20] досліджувалось одержання ферменту *L*-арабінозоізомерази саме з *C. hylemonae* (DSM 15053) для подальшої біотрансформації [20]. Як і в [20; 21], досліджено та запропоновано використовувати саме фермент *L*-арабінозоізомерази, оскільки його каталітична ефективність (3,69 мМ⁻¹сек⁻¹) значно вища, ніж в інших раніше зареєстрованих ферментів [20].

У [21] обґрунтовано, які саме субстрати є більш економічно доцільними для подальшої біотрансформації в *D*-тагатозу. Вчені не рекомендують використовувати галактитол як субстрат, тому що галактитол має низький потенціал для комерційного виробництва тагатози, переважно через високу вартість, незважаючи на його високий коефіцієнт конверсії. Як альтернативу галактитолу пропонують використовувати більш дешеву сировину галактозу, яка зробить виробництво *D*-тагатози більш економічним [21].

У [22] одержання підсолоджувача *D*-тагатози базувалось на двостадійному процесі. На першому етапі відбувається накопичення біомаси на одному поживному середовищі MRS з концентрацією лактози і глюкози 20 г/л (протягом 18 год). Умови культивування $t = 37^{\circ}\text{C}$ і рН 6,7. *L. plantarum* (ендометаболіт) продукує фермент *L*-арабінозоізомеразу (L-AI). На другій стадії відбувається біотрансформація галактози (150 г/л) під дією ферменту *L*-арабінозоізомерази у *D*-тагатозу (34 год). Біотрансформація на 80% дає змогу

одержати 138 г/л тагатози. Вчені також дослідили, що додавання борату до *D*-галактози призводить до значного посилення виходу *D*-тагатози [22].

У [23] вчені дослідили ефективну біотрансформацію *D*-тагатози. Технологія полягала в культивуванні *S. cerevisiae* NL22 в бульйоні YPG, з 20 г/л *D*-галактози при 30°C і 150 об/хв протягом 24 год. Початковий рН доводили до 6,0. Подальший процес ферментації полягав у використанні лактози з утворенням *D*-галактози. Для цього лактозу (100 г/л) піддавали гідролізу, підтримуючи температуру 50°C. При біотрансформації лактози при 150 об/хв, через 24 год було отримано 43,6 г/л *D*-тагатози. Ефективність процесу пояснюється правильно підібраними технологічними характеристиками. Це температура для біотрансформації (50°C), поживне середовище (лактоза), біологічний агент (*S. cerevisiae* NL22) [23].

Узагальнені дані щодо утворення різних підсолоджувачів мікробним синтезом наведено у таблиці.

Таблиця. Продуценти підсолоджувачів

Підсолоджувач	Біологічний агент	Концентрація цільового продукту, г/л	Тривалість культивування, год	Біотрансформація субстрату	Література
1	2	3	4	5	6
Еритритол	<i>Y lipolytica</i>	175	52	Глюкози (200 г/л), за участю фермента еритрозоредуктази	[7]
	<i>Y. lipolytica</i> DSM70562	27,8	72	Глюкози (100 г/л), за участю фермента еритрозоредуктази	[7]
	<i>T. oedocephalis</i> ATCC 16958	44,27	72	Глюкози (50 г/л), за участю фермента еритрозоредуктази	[9]
Ксилітол	<i>E. coli</i>	21,2	52	Ксилози (10 г/л) та глюкози (10 г/л), у співвідношенні 1,5:1 (г/г), за участю фермента ксилітолдегідрогенази	[10]
	<i>G. thailandicus</i> CGMCC1.3748	32,8	48	<i>D</i> -арабітолу (40 г/л), за участю фермента ксилітолдегідрогенази	[11]
Манітол	<i>L. brevis</i> 3-A5	215,02	48	Сахаризованого артишоку (169 г/л), за участю фермента манітолдегідрогенази	[3]
	<i>L. intermedius</i> NNRL B-3693	104,8	46	Суміші меляси і фруктозного сиропу (1:1; загальний вміст цукрів, 150 г/л) за участю фермента манітолдегідрогенази	[15]
	<i>F. tropeoli</i> CRL 2034	56,84	72	Фруктози (70 г/л) за участю фермента манітол-2-дегідрогенази	[12]
Сорбітол	<i>L. plantarum</i> NCIMB8826	42,3	52	Глюкози (50 г/л), за участю фермента сорбітолдегідрогенази	[17]

1	2	3	4	5	6
	<i>L. plantarum</i> sp. NCIM 2912	19,7	42	Глюкози (20 г/л), за участю фермента сорбітолдегідрогенази	[18]
<i>D</i> -тагатоza	<i>L. brevis</i> PC16	96,4	84	Галактози (125 г/л) за участю фермента <i>L</i> -арабінозоізомерази	[19]
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	66,3	72	Галактози (116,9) за участю фермента <i>L</i> -арабінозоізомерази	[5]
	<i>L. plantarum</i>	138	52	Галактози (150) за участю фермента <i>L</i> -арабінозоізомерази	[22]
	<i>S. cerevisiae</i> NL22	43,6	48	Лактози (100) за участю фермента <i>L</i> -арабінозоізомерази	[23]

Висновок

Отже, технології високопродуктивного одержання підсолоджувачів — сорбітолу, *D*-тагатоzi, еритритолу, ксилітолу та манітолу, є досить різними та відрізняються своєю унікальністю і полягають у забезпеченні умов для мікроорганізмів та їх ферментів. Технології одержання підсолоджувачів передбачають біотрансформацію субстрату за участі різних ферментів. Для високої продуктивності необхідно дотримуватися технологічних умов: температури, рН, концентрації субстратів, при яких буде зберігатись активність продуцентів підсолоджувачів та активність ферментів. Такі умови забезпечать максимальний синтез цільових продуктів (підсолоджувачів).

Література

1. Monique C. B., Thiago D. Sweeteners and sweet taste enhancers in the food industry. *Food Sci. Technol.* 2018. Vol. 38, Iss. 2. P. 181–187. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/fst.31117>
2. Carly F., Vandermies M., Telek S. Enhancing erythritol productivity in *Yarrowia lipolytica* using metabolic engineering. *Metab. Eng.* 2017. Vol. 42. P. 19–24. doi: 10.1016/j.ymben.2017.05.002.
3. Cao H., Yue M., Liu G. Microbial production of mannitol by *Lactobacillus brevis* 3-A5 from concentrated extract of Jerusalem artichoke tubers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2018. Vol. 65, Iss. 3. P. 484–489. doi:10.1002/bab.1590
4. Rzechonek D., Dobrowolski A., Rymowicz W. Recent advances in biological production of erythritol. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. Vol. 38, Iss. 4. P. 620–633. doi: 10.1080/07388-551.2017.1380598
5. Patel M., Patel A., Akhani R. Rational bioproduction of D-tagatose from D-galactose using phosphoglucose isomerase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016. Vol. 179, Iss. 5. P. 715–721. doi:10.1007/s12010-016-2026-7
6. Liu X., Yu X., Zhang T. Novel two-stage solid-state fermentation for erythritol production on okara-buckwheat husk medium. *Bioresour. Technol.* 2018. Vol. 266. P. 439–446. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.009
7. Carly F., Fickers P. Erythritol production by yeasts: a snapshot of current knowledge. *Yeast.* 2018. Vol. 35, Iss. 7. P. 455–463. doi: 10.1002/yea.3306
8. Ghezbash, G., Nahvi, I., Rabbani, M. Study of polyols production by *Yarrowia lipolytica* in batch culture and optimization of growth condition for maximum induction. *Jundishapur J. Microbiol.* 2012. Vol. 5, Iss. 1. P. 546–549.

9. Li L., Kang P., Ju X. Enhancement of erythritol production by *Trichosporonoides oedocephalis* ATCC 16958 through regulating key enzyme activity and the NADPH/NADP ratio with metal ion supplementation. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2018. Vol. 48, Iss. 3. P. 257—263. doi: 10.1080/10826068.2018.1425712
10. Jin L., Xu W., Yang B. Efficient biosynthesis of xylitol from xylose by coexpression of xylose reductase and glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2018. Vol. 3. P. 1—15. doi: 10.1007/s12010-018-2878-0
11. Zhang H., Yun J., Zayed H. Production of xylitol by expressing xylitol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter thailandicus* and co-biotransformation of whole cells. *Bioresour. Technol.* 2018. Vol. 257. P. 223—228. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.095
12. Ruiz L., Aller K., Bru E. Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 101, Iss. 15. P. 6165—6177. doi: 10.1007/s00253-017-8395-1
13. Papagiannia, M., Legisa, M. Increased mannitol production in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 production strain with a modified 6-phosphofructo-1-kinase. *J. Biotechnol.* 2014. Vol. 181. P. 20—26. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.007
14. Ortiz M., Raya R., Mozzi F. Efficient mannitol production by wild-type *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 is attained at constant pH using a simplified culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99. P. 8717-8729. doi: 10.1007/s00253-015-6730-y
15. Zhang M., Gu L., Cheng C. Recent advances in microbial production of mannitol: utilization of low-cost substrates, strain development and regulation strategies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. Vol. 34, Iss. 3. P. 17. doi: 10.1007/s11274-018-2425-8
16. Marques C., Tarek R., Sara M. Sorbitol production from biomass and its global market. *Future Gr Ind.* 2016. Iss. 12. P. 217—227. doi: doi.org/10.1016/B978-0-12-802980-0.00012-2
17. Ladero V., Ramos A., Wiersma A. High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 73, Iss. 6. P. 1864—1872. doi: 10.1128/AEM.02304-06
18. Jan N., Tripathi A., Singh S. Enhanced sorbitol production under submerged fermentation using *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 4, Iss. 2. P. 1—7. doi: <https://doi.org/10.22037/afb.v4i2.13514>
19. Qi G., Yingfeng A., Junhua Y. Enhanced D-tagatose production by spore surface-displayed L-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation. *Bioresour Technol.* 2017. Vol. 247. P. 940—946. doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.187
20. Nguyen T., Hong M., Chang P. Biochemical properties of L-arabinose isomerase from *Clostridium hylemonae* to produce D-tagatose as a functional sweetener. *PLoS One.* 2018. Vol. 13, Iss 4. P. 1—12. doi: 10.1371/journal.pone.0196099
21. Jayamuthunagai J., Gautam P., Srisowmeya G. Biocatalytic production of D-tagatose: a potential rare sugar with versatile applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017. Vol. 57, Iss 16. P. 3430—3437. doi: 10.1080/10408398.2015.1126550
22. Jayamuthunagai J., Srisowmeya G., Chakravarthy M. D-tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. *Bioresour Technol.* 2017. Vol. 235. P. 250—255. doi: 10.1016/j.biortech.2017.03.123
23. Zheng Z., Xie J, Liu P. Elegant and efficient biotransformation for dual production of D-tagatose and bioethanol from. *J. Agric. Food Chem.* 2019. Vol. 14. P. 1—7. doi: 10.1021/acs.jafc.8b05150