

УДК 577.151.45:57.037+664.868

Всероссийский
научно-исследовательский институт
технологии консервирования –
филиал ФГБНУ «Всероссийский
научный центр пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Адрес: 142703, Россия,
Московская область,
Ленинский городской округ, г. Видное,
ул. Школьная, д.78,
e-mail: nauka@vniitek.ru

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:
данные текущего исследования
доступны по запросу
у корреспондирующего автора.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Петров, А. Н., & Кондратенко, Т. Ю.
(2022). О введении принципа насыщающей
дополнительности ферментативного
процесса в методологию глубокой
переработки растительного сырья. *Хра-
нение и переработка сельхозсырья*, (3).
<https://doi.org/10.36107/spfp.2022.365>

ПОСТУПИЛА: 05.08.2022

ПРИНЯТА: 07.09.2022

ОПУБЛИКОВАНА: 30.09.2022

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии
конфликта интересов.



О введении принципа насыщающей дополнительной ферментативного процесса в методологию глубокой переработки растительного сырья

А. Н. Петров, Т. Ю. Кондратенко

АННОТАЦИЯ

Введение. Биотехнологический подход к глубокой переработке растительного сырья с использованием ферментов позволяет эффективно использовать нативный биологический и/или технологический потенциал. Целевые компоненты сырья являются фрагментами молекулярных компонентов матрикса клеточных стенок с трудно устанавливаемой концентрацией целевых гликозидных связей, которая необходима для определения кинетических характеристик ферментных препаратов.

Цель. Разработка научной концепции, позволяющей на основе экспериментальных данных ферментативной динамики определять эффективную предельную концентрацию субстрата для установления рациональных параметров ферментативной обработки

Материалы и методы. Объектом исследования был негранулированный сухой немеласированный свекловичный жом, а также отечественные ферменты лиазного и гидролазного действия в концентрациях 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 и 0,8 % от количества субстрата. В работе использован подход, основанный на математическом описании зависимости отклика системы «субстрат – фермент» от продолжительности процесса с определением асимптотического предела для каждого варианта концентрации фермента и дальнейшем анализе влияния концентрации фермента на величину данного предела.

Результаты. Обоснована адекватность применения косвенных показателей, таких как удельная электрическая проводимость, при оценке кинетических показателей ферментов лиазного и гидролазного действия. Получен массив экспериментальных данных динамик удельной электрической проводимости от продолжительности обработки ферментными препаратами в интервале концентраций. В результате аппроксимации рассчитаны локальные пределы концентрации субстрата, выраженные в косвенных единицах. Экспериментально установлено, что в случае ферментов лиазного и гидролазного действия, рассчитанные локальные пределы концентрации субстрата монотонно увеличиваются при увеличении концентрации фермента, вырождаясь в горизонтальную асимптоту, соответствующую глобальному пределу концентрации субстрата, что подтверждает принцип насыщающей дополнительной и следствия из него. Экспериментально установлена применимость малых концентраций ферментов и нескольких последовательных этапов для ферментативной трансформации субстрата в продукт.

Выводы. В результате проведенных исследований разработан принцип насыщающей дополнительной ферментативного процесса, позволяющий на основе экспериментальных данных динамик трансформации субстрата заданными концентрациями фермента определить эффективную концентрацию целевого субстрата в условиях отсутствия определённости её значения, либо невозможности прямого определения, для установления кинетических характеристик ферментативного процесса. Принцип насыщающей дополнительной применим в отношении лиазных и гидролазных ферментов, является составляющей методологии глубокой переработки растительного сырья.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

ферментативный гидролиз, концентрация субстрата, принцип насыщающей дополнительной, концентрация фермента, концентрация продукта

Introduction the Principle of Saturation Additionality for Enzymatic Process into the Methodology of Plants Raw Materials Complete Processing

Andrey N. Petrov, Tatyana Yu. Kondratenko

Russian Research Institute of Canning Technology – branch of Gorbатов Research Center for Food Systems, Academician of Russian Academy of Science

CORRESPONDENCE:

78 Scholnaya Str., Vidnoye, Moscow region, 142703, Russia,
e-mail: nauka@vniitek.ru

FOR CITATIONS:

Petrov, A. N., & Kondratenko, T. Yu. (2022). Introduction the principle of saturation additionality for Enzymatic process into the methodology of plants raw materials complete processing. *Storage and Processing of Farm Products*, (3). <https://doi.org/10.36107/spfp.2022.365>

RECEIVED: 07.09.2022

ACCEPTED: 07.09.2022

PUBLISHED: 30.09.2022

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



ABSTRACT

Background. Biotechnological approach to complete processing of plant raw materials using enzyme preparations allows the efficient use of its native biological and/or technological potential. The point components are fragments of molecular components of the cell wall matrix with a target glycoside bonds' hard-to-find concentration which is necessary to determine the enzyme kinetic characteristics.

Purpose. Development the scientific concept allowing to determine the effective substrate concentration limit for establishment of enzymatic treatment rational parameters on the basis of experimental data of enzymatic dynamics

Materials and Methods. Non-granulated dry non-molassed sugar beet pulp as well as lyase and hydrolase enzymes in concentrations as 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 и 0,8 % were used as research objects. The approach used in this paper is based on the mathematical description of the substrate-enzyme system response as a function of the process duration, with determination the asymptotic limit for each variant of enzyme concentration, and further analysis of enzyme concentration effect on this limit.

Results. The adequacy of using an indirect indicators, such as specific electrical conductivity, for assessing the kinetic parameters of lyase and hydrolase enzymes is substantiated. An array of experimental data was obtained for dynamics of specific electrical conductivity during processing beet pulp with enzyme preparations in the range of concentration. As a result of the approximation, the local limits of the substrate concentration were calculated in indirect units. For dynamic of the "substrate - enzyme" system, a set of postulates was proposed. On the basis of this set, the principle of saturating complementarity for enzymatic process is formed. In according with it the local substrate concentration limit achieved at a given enzyme concentration is a fractional part of some global one, which can be completely converted into a product through several stages where the local limit of the duration of each stage tends to infinity. It has been experimentally established that, in the case of lyase and hydrolase enzyme, the calculated local substrate concentration limits increase monotonously with an increase of enzyme concentration, degenerating into a horizontal asymptote corresponding to the global substrate concentration limit, which confirms both the principle of saturating complementarity and its consequences. The applicability of low enzyme concentrations and several step-by-step stages for the enzymatic substrate transformation into a product has been experimentally established.

Conclusions. As a result of research, the principle of saturating complementarity for enzymatic process was developed. Based on experimental data on the enzymatic transformation dynamics for processed object, it allows an unambiguous determination of the effective substrate concentration in the absence of certainty about its quantity value, or the impossibility of direct determination. The resulting value can be used to establish the kinetic characteristics of enzymatic process. The principle of saturating complementarity is applicable for lyase and hydrolase homoenzymes. It is a one of the necessary components of the deep processing methodology for plant raw materials.

KEYWORDS

enzymatic hydrolysis, substrate concentration, principle of saturation additionality, enzyme concentration, product concentration

ВВЕДЕНИЕ

Растительное сырьё и вторичные продукты его переработки представляют собой сложную матрицу биохимических компонентов, находящихся как в относительно свободном состоянии (органические кислоты, их соли, низкомолекулярные биохимические компоненты, некоторые липиды и др.), так и в нативно связанном (компоненты органелл, цитоплазматического ретикулума, мембраны, клеточных стенок и межклетников). Каждый из компонентов, будучи выделенным в качестве самостоятельного продукта, имеет свою биологическую и/или технологическую ценности, а целесообразность практического воплощения процесса извлечения находится в тесной связи с экономической эффективностью, которая, в целом, строится на востребованности компонента, его себестоимости сырья и себестоимости извлечения, очистки и стабилизации целевых свойств компонента. Соответственно, максимальной степенью реализации нативного потенциала растительного сырья и вторичных продуктов его переработки является максимальная технологическая сепарация его на биологически- и/или технологически значимые нативные компоненты. По сути своей такой подход является глубокой переработкой, при которой степень глубины доведена до логического максимума. Однако в настоящее время практическая реализация максимальной глубокой переработки весьма ограничена в силу существующих особенностей технологий извлечения целевых компонентов: при извлечении одного компонента неизбежно происходит сопутствующая деградация в той или иной степени других.

Одним из путей решения данной проблемы является активное переориентирование технологических процессов в сторону биотехнологии, при котором основным технологическим процессом является использование «молекулярных ножниц» — ферментных систем (Болтовский, 2021). Их специфичность к тем или иным молекулярным связям, а также спектр целевых активностей, присущий применяемому ферментному препарату, либо их комплексу, позволяет выделять из сырья либо один или несколько компонентов с максимальным сохранением некоторой совокупности нативных свойств (Hennessey-Ramos et al., 2021; Hassan et al., 2021), модифицировать в процессе выделения целевые компоненты и, соответственно их свойства (Marjamaa et al., 2018), либо кардинальным обра-

зом трансформировать нативный компонентный потенциал в целевые продукты, в него не входящие (Barron et al., 2021; Vitol et al., 2019). Соответственно, совершенствование биотехнологических подходов и ферментных систем, в них использующихся, является путём, имеющим большие перспективы в отношении практического воплощения максимальной реализации нативного потенциала сырья посредством глубокой переработки.

В основе разработки технологических процессов с участием ферментных систем лежит анализ кинетики ферментативных процессов (Punekar, 2018). Классическим представлением о реализации процесса ферментации является рассмотрение системы «субстрат — фермент», в которой происходит катализируемая ферментом двухступенчатая трансформация субстрата в продукт. При этом на первом этапе вследствие взаимодействия фермента с субстратом образуется фермент-субстратный комплекс, а на втором — последний распадается на фермент и продукт. Первый этап, соответственно, в некоторой степени, обратим, тогда как второй — нет (Srinivasan, 2021). Оба этапа протекают непрерывно, вследствие чего динамика процесса (в случае его периодической реализации) характеризуется монотонным уменьшением концентрации субстрата с параллельным монотонным увеличением концентрации продукта (Рисунок 1).

Кинетика процесса хорошо описывается известным уравнением Михаэлиса-Ментен (Choi et al., 2017; Andersen et al., 2018; Saganuwan, 2021; Benz et al., 2014), в котором роль независимой переменной играет концентрация субстрата, а эффективность комплекса «ферментирующая способность

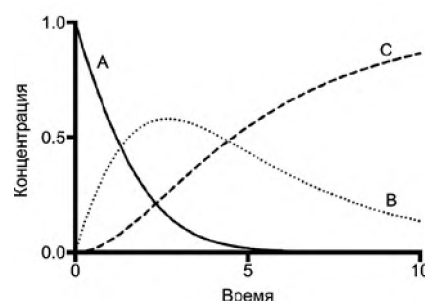


Рисунок 1

Динамики концентрации субстрата (A), фермент-субстратного комплекса (B) и продукта (C) в процессе ферментативной обработки. Адаптировано из "Parameter reliability and understanding enzyme function", by A. G. McDonald and K. F. Tipton, 2022, *Molecules*, 27(1), Article 263 (<https://doi.org/10.3390/molecules27010263>). Copyright 2022 by Molecules

препарата — сырьё — условия процесса» определяется на основании оценки коэффициентов (Srinivasan, 2021).

При этом появляются две проблемы. Одна связана с потенциальной нестационарностью системы вследствие непостоянства концентрации субстрата в процессе ферментативной обработки. Вторая — с некоторой неоднозначностью, возникающей при анализе того, что именно рассматривать в качестве субстрата и, следовательно, как определить концентрацию субстрата для расчёта кинетических характеристик фермента. Если первая проблема уже исследована, например в (Schnell, 2014), то вторая — на первый взгляд проблемой не является: практически для каждого промышленно применяемого ферментного препарата известен целевой компонент, на который действие данного фермента эффективно. Однако если рассматривать группу ферментных препаратов лиазного и гидролазного действия в отношении их использования для направленной фрагментации полимерных компонентов углеводной природы, то несложно видеть, что сам целевой объект обработки — растительное сырьё и вторичные продукты его переработки — представляет собой сложный комплекс надмолекулярных полимерных структур, образующих матрикс клеточных стенок и межклетников, связанных друг с другом сложной системой ковалентных, ионных и водородных связей (Zhang et al., 2021; Houston et al., 2016; Yilmaz et al., 2020; Rytioja et al., 2014; Zhao et al., 2019;

Holland et al., 2020; Carpita & Mccann, 2020). Так матрикс первичных клеточных стенок практически всех высших растений включает в себя целлюлозу, гемицеллюлозы, пектиновые вещества в виде надмолекулярного протопектинового комплекса (Рисунок 2). В то же время, за исключением фибрилл целлюлозы, остальные полимерные компоненты являются довольно гетерогенными в отношении компонентного состава.

Так, например, пектиновые вещества, несмотря на то, что основным их компонентом являются остатки α -(D+)-галактуроновой кислоты, могут включать в свой состав остатки до 17 различных углеводов и их производных (Sista Kameshwar & Qin, 2018; Phyo & Hong, 2019; Haas et al., 2021; Shin et al., 2021; He et al., 2021; Szerement et al., 2022). Кроме того, структурно молекулы пектиновых веществ могут быть условно зонированы на гомогалактуронановые участки, а также — на рамногалактуронаны I и II. Таким образом, для фрагментации пектиновых молекул в зависимости от конечной цели процесса может быть использован достаточно большой пул ферментных препаратов (Рисунок 3).

Для менее глубокой трансформации (например, для выделения только рамногалактуронана I) целесообразно использовать не весь возможный пул ферментных препаратов, а только те, что необходимы для достижения конечной цели. При этом в каждом отдельном случае субстратом выступает

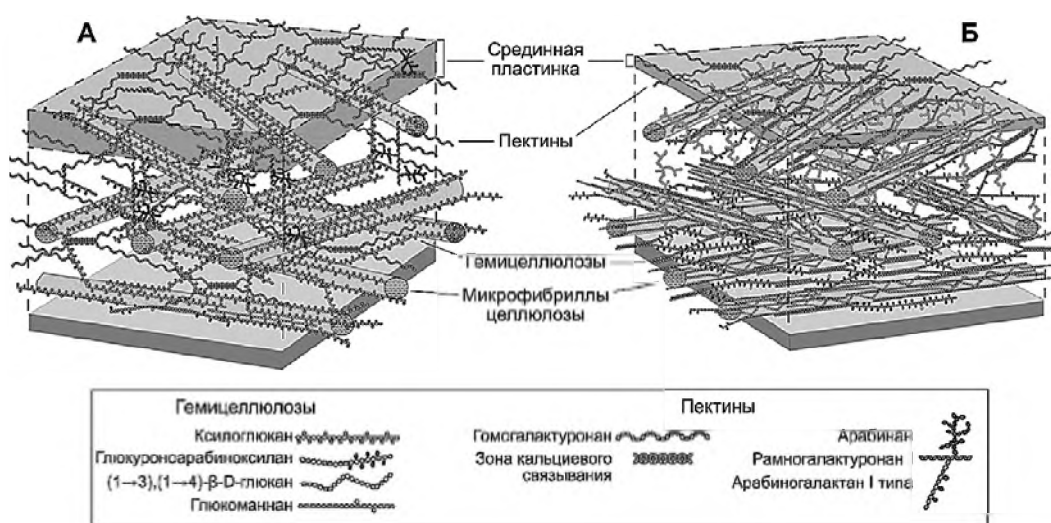


Рисунок 2

Структура первичных клеточных стенок двудольных, некоторых однодольных (А) и травянистых однодольных (Б) растений. Адаптировано из "Redesigning plant cell walls for the biomass-based bioeconomy" by N. C. Carpita & M. C. Mccann, 2020, *Journal of Biological Chemistry*, 295(44), 15144–15157. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.014561>. Copyright 2020 by Journal of Biological Chemistry

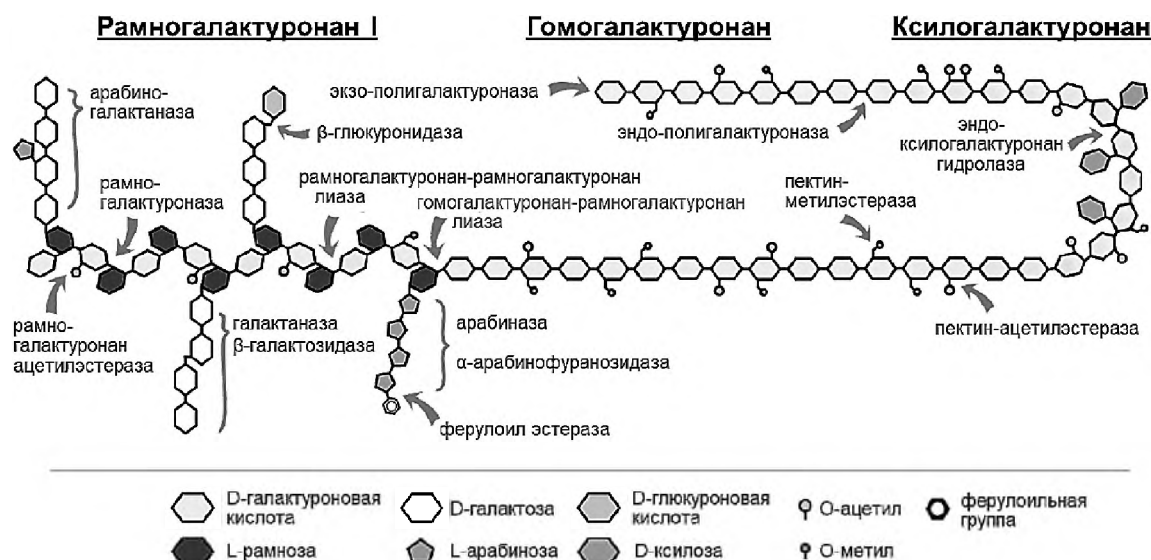


Рисунок 3

Ферменты фрагментации и модификации протопектинового комплекса растительной ткани (адаптировано из (Benz et al., 2014))

уже не вся молекула пектина, а лишь некоторые — целевые — гликозидные связи. В этом случае задача определения в обрабатываемом сырье молярной концентрации именно этих связей, что в условиях неопределённости представлений о точном химическом строении протопектинового комплекса именно данного сырья, как в части распределения остатков, так и в части распределения и молекулярных характеристик целевых участков, становится практически неразрешимой. А это, в свою очередь, делает актуальным необходимость решения задачи определения эффективной концентрации субстрата, целевого по отношению к применяемому ферменту.

Цель работы — разработать подход к определению эффективной концентрации целевого субстрата, на базе принципа насыщающей дополнителности процесса ферментации сложного матрикса препаратами лиазного и гидролазного действия с использованием косвенных показателей.

Задачи исследований: (1) определить применимость использования косвенных показателей при оценке кинетических показателей ферментных препаратов, (2) разработать комплекс постулатов динамики системы «субстрат — ферментный препарат», (3) определить практическую применимость принципа насыщающей дополнителности процесса ферментации на примере обработки матрикса клеточных стенок растительной ткани препаратами лиазного и гидролазного действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Пектиносодержащее сырьё — негранулированный сухой немелассированный свековичный жом производства АО «Успенский сахарник» (с. Успенское, Краснодарский край). Ферменты лиазного и гидролазного действия — гомоферментные препараты «Пектиназа RCA RGL» (RGL) и «Целлюлаза без пектиназы» (CLS), соответственно (Лаборатория физико-химии ферментативной трансформации полимеров кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Россия). Информация по целевым активностям гомоферментных препаратов представлена в Таблице 1.

Таблица 1

Характеристики гомоферментных препаратов RGL и CLS

| Препарат | Активность, ед./г | | | |
|-------------------------------|-------------------|------------|---------|--------------|
| | пектин-лиаза | ксила-наза | КМЦ-аза | β-глюка-наза |
| Пектиназа RCA RGL (RGL) | 190 | — | — | — |
| Целлюлаза без пектиназы (CLS) | — | 30 644 | 21 054 | 30 371 |

Методы и инструменты

В работе использован подход, основанный на математическом описании зависимости отклика системы «субстрат — фермент» от продолжительности процесса с определением асимптотического предела для каждого варианта концентрации фермента и дальнейшем анализе влияния концентрации фермента на величину данного предела.

Процедура исследования

Для проведения ферментативного процесса в коническую колбу объёмом 100 см³ вносили навеску сухого немелассированного негранулированного свекловичного жома массой 6 г, прибавляли 50 см³ бидистиллированной воды комнатной температуры, перемешивали и оставляли на 15 часов. Навеску фермента (0,05; 0,1; 0,2; 0,4 и 0,8 % от массы жома для *RGL* и 0,1; 0,2; 0,4 и 0,8 % — для *CLS*) помещали в стеклянный стакан на 50 см³, прибавляли 20 см³ бидистиллированной воды с температурой 45 °С и тщательно перемешивали до полного растворения. Раствор гомоферментного препарата количественно переносили в колбу с жомом, используя для этого дополнительные 26 см³ бидистиллированной воды с температурой 45 °С. Смесь тщательно перемешивали, колбу со смесью переносили на водяную баню. В смесь помещали и фиксировали на одинаковом расстоянии от дна погружную ячейку кондуктометра WTW inoLab 7310 с чёрными платиновыми электродами. Ферментативный процесс проводили при температуре теплоносителя 45 °С течение 8 часов. Удельную электрическую проводимость снимали в автоматическом режиме с дискретностью 1 с помощью оригинального программного обеспечения WTW MultiLab Importer 1.24.

Анализ данных

Математическую обработку проводили с использованием табличного процессора Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) с установленными надстройками «Анализ данных», «Поиск решения» и «Подбор параметра», а также специализированного программного обеспечения TableCurve 2D v.5.01 (SYSTAT Software Inc.).

Для уменьшения статистической погрешности, каждый эксперимент проводили в трёхкратной повторности с отбраковкой статистически ненадёжных экспериментальных данных в повторностях по существующим методикам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В основе любого ферментативного процесса лежит фундаментальный принцип ферментативной кинетики, основанный на механизмах взаимодействия фермента с субстратом, стехиометрических соотношениях эквивалентных (молярных) концентраций компонентов системы «субстрат — фермент — продукт — ингибитор» и их промежуточных комплексов, законе действующих масс и законе сохранения фермента. Основная закономерность ферментативной кинетики представлена уравнением Михаэлиса-Ментен, связывающая темп ферментативного процесса и концентрацию субстрата:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S}, \quad (1)$$

где V — темп ферментативного процесса, моль/см³ · с; S — молярная концентрация субстрата, моль/см³; V_{\max} — максимальный (асимптотический) темп ферментативного процесса, моль/см³ · с; K_m — константа Михаэлиса, моль/см³.

Физический смысл константы Михаэлиса заключается в том, что она численно равна концентрации субстрата, при которой темп ферментативного процесса равен половине V_{\max} .

Соответственно, ферментативный процесс происходит тем эффективнее с точки зрения максимизации использования потенциала фермента, чем большее значение имеет V_{\max} и чем меньшее значение — K_m . Последнее утверждение справедливо в силу того, что чем меньше K_m , тем при меньшей концентрации субстрата темп ферментативного процесса находится ещё на уровне, превышающем половину от максимально возможного.

Проблема использования основного уравнения ферментативной кинетики для анализа состояния и дальнейшей оптимизации реального ферментативного процесса состоит в том, что сам процесс

сопровождается непрерывным изменением концентрации субстрата с таким же непрерывным накоплением продукта. При этом, если в качестве субстрата выступает матрица растительной ткани, то в процессе ферментативного разрушения (фрагментирования) одного или нескольких компонентов матрицы, с продуктом в систему потенциально могут переходить в окружающую матрицу среду и сопутствующие нецелевые компоненты, которые (так же потенциально) могут в некоторой степени изменять условия протекания ферментативного процесса, в силу чего элементы основного уравнения ферментативной кинетики, константные для стационарных — «чистых» — условий, в свою очередь, могут переставать быть таковыми. Таким образом, вся система непрерывно изменяется во времени. В этом случае существующие базовые подходы к определению констант ферментативной кинетики не позволяют достигать поставленной цели.

Дополнительной проблемой является выраженная дискретность контроля концентрации как субстрата, так и продукта, поскольку (в случае сложного целевого компонента матрицы, — например, гомолактуронановых участков протопектинового комплекса растительной ткани) каждое такое определение ресурсо- и времезатратно, и последнее — особенно критично.

В этих условиях одним из эффективных вариантов может являться использование методов, позволяющих получать численные значения косвенного показателя, фундаментально эквивалентные S , когда справедливо следующее:

$$Z \propto S \Leftrightarrow Z = k \cdot S, \quad (2)$$

где Z — косвенный показатель; k — коэффициент, связывающий косвенный и целевой показатели.

В этом случае, логично принимая, что $(K_{m(z)} = k \cdot K_m)$, справедливо:

$$\frac{V_{\max} \cdot k \cdot S}{k \cdot K_m + k \cdot S} = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} = V. \quad (3)$$

Пусть $V_{\max(z)} = k \cdot V_{\max}$ и $V_{(z)} = k \cdot V$, тогда из условия (2) и равенства (3) явно следует, что

$$\frac{V_{\max(z)} \cdot Z}{K_{m(z)} + Z} = V_{(z)}. \quad (4)$$

Таким образом, формула (4) представляет собой полный эквивалент формулы (1), но оперирующий косвенными показателями.

Действительно, если изменение косвенного показателя Z_p эквивалентно накоплению в растворе продукта ферментативного процесса, следовательно, при начальной концентрации субстрата w_0 , эквивалентной значению Z_0 и связанной с ним, в соответствии с условием (2), соотношением $Z_0 = k \cdot w_0$, концентрация субстрата может быть представлена следующим образом:

$$S = w_0 - P \Rightarrow w_0 - S = P \Leftrightarrow k \cdot w_0 - k \cdot S = k \cdot P \Leftrightarrow Z_0 - Z = Z_p, \quad (5)$$

где P — молярная концентрация продукта, моль/см³.

Откуда явно следует, что $Z = Z_0 - Z_p$. Тогда темп ферментативного процесса в силу константности w_0 и динамики P по времени может быть представлен как

$$V = \frac{\partial}{\partial \tau}(w_0 - P) \Rightarrow V = \frac{\partial P}{\partial \tau}, \quad (6)$$

В этом случае, в соответствии с выражением (6), следствием перехода от действительных к косвенным показателям является

$$V_{(z)} = \frac{\partial Z_p}{\partial \tau} = k \cdot \frac{\partial P}{\partial \tau} = k \cdot V, \quad (7)$$

что подтверждает эквивалентность уравнений (4) и (1), и соответствие каждого из их показателей в парах друг другу через единый коэффициент k .

Таким образом, использование косвенных показателей для определения параметров ферментативной кинетики вполне оправдано, что в достаточной мере согласуется с (Wu et al., 2006; Jepsen et al., 2019; Hewitt et al., 2019) и др., при том, что авторы данных работ принимают эквивалентность косвенного и непосредственного показателей априорно.

В отношении ферментов семейств лиаз и гидролаз в качестве одного из таких косвенных показателей может быть принята удельная электрическая проводимость (УЭП): при гидролитическом ферментативном расщеплении, например, гликозидных связей, одному молю продукта соответствует фиксированное число молей образовавшихся свободных функциональных групп, приобретающих

в процессе сольватации фиксированный частичный заряд, вследствие чего проводимость раствора пропорционально увеличивается.

Динамика увеличения УЭП в зависимости от исходной концентрации ферментов на примере обработки гомоферментными препаратами рамногалакту-

ронанлиазного (RGL) и целлюлазного (CLS) действия предварительно подготовленных образцов свекловичного жома представлена на Рисунках 4 и 5.

Для действия обоих ферментных препаратов характерно как увеличение отклика — УЭП — при увеличении их концентрации, так и наличие динамики

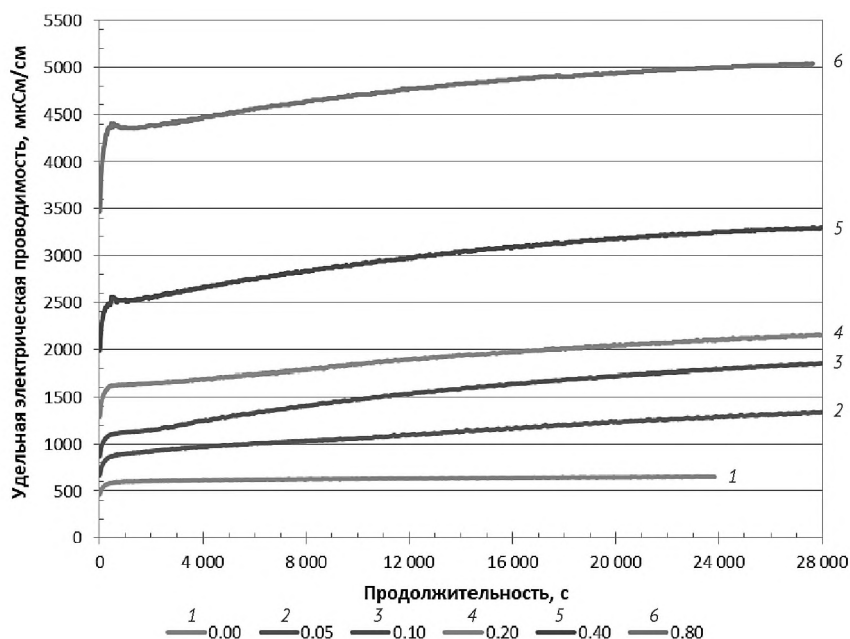


Рисунок 4

Влияние концентрации препарата RGL на динамику удельной электрической проводимости в системе «субстрат — фермент» в процессе ферментирования

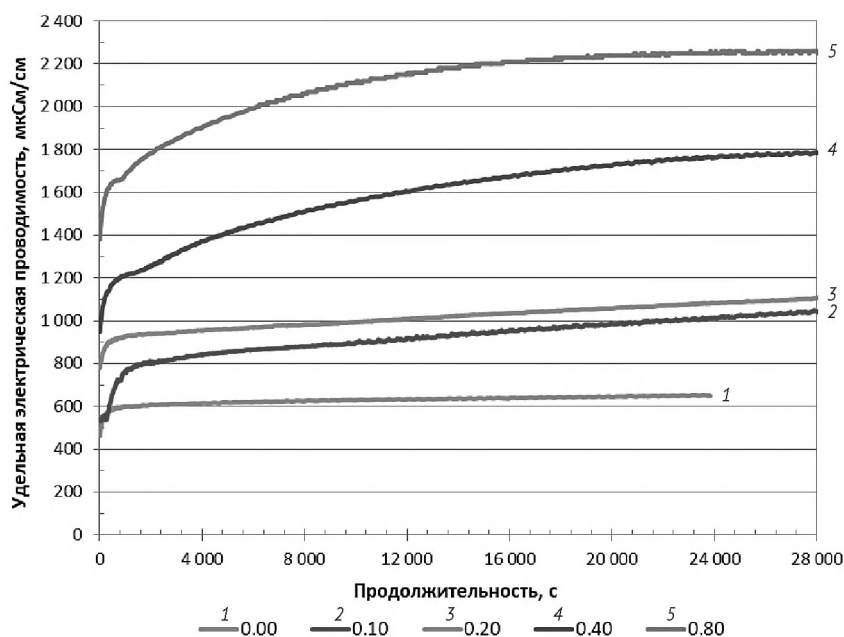


Рисунок 5

Влияние концентрации препарата CLS на динамику удельной электрической проводимости в системе «субстрат — фермент» в процессе ферментирования

прироста целевого показателя с течением времени. В качестве сравнения использовали динамику УЭП без внесения ферментных препаратов. В последнем случае динамику отклика определяли диффузионные процессы, связанные с переходом нативно растворимых компонентов свекловичного жома в окружающий раствор до достижения динамического равновесия. Более выраженная динамика прироста УЭП, соответственно, может быть интерпретирована как результат накопления в растворе продуктов ферментативного процесса. При этом в случае с препаратом RGL данный процесс визуально более выражен, чем в случае для CLS, что вероятно, связано с более высокой активностью RGL.

Для каждого варианта, включая соответствующий концентрации фермента 0%, аппроксимацией экспериментальных данных были определены математические описания вида $Z_{p(i,j)} = f_{Z_{p(i,j)}}(\tau)$, где i — гомоферментный препарат, а j — концентрация гомоферментного препарата, %. Результаты обработки данных представлены в Таблице 2.

Следует отметить, что все математические описания имеют асимптотический характер, что в целом хорошо согласуется с существующими представлениями о динамике ферментативного процесса (Boeckx et al., 2017; Wang et al., 2020; Ritonja et al., 2021).

Для формирования логики дальнейших этапов исследования, в силу априорной конечности концентрации субстрата в системе «субстрат — ферментный препарат», примем следующие постулаты её динамики:

- (1) в течение всего ферментативного процесса концентрация субстрата непрерывно убывает, а концентрация продукта также непрерывно возрастает;
- (2) ферментативный процесс идёт монотонно до тех пор, пока концентрация субстрата в системе не будет стремиться к нулю;
- (3) максимально возможная эквивалентная концентрация продукта в глобальный момент времени $\tau \rightarrow \infty$ численно равна максимальной

Таблица 2

Характеристики математических описаний

| <i>i</i> | <i>j</i> | Математическое описание | Коэффициенты | | | | | r^2 |
|-------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|-------|
| | | | <i>a</i> | <i>b</i> | <i>c</i> | <i>d</i> | <i>e</i> | |
| RGL, CLS | 0.00 | $a+b \cdot \left(1 - \frac{1}{1+b \cdot c \cdot \tau}\right) + d \cdot \left(1 - \frac{1}{1+d \cdot e \cdot \tau}\right)$ | 441.67 | 164.58 | 7.59×10^{-5} | 110.10 | 2.58×10^{-7} | 0.996 |
| RGL | 0.05 | $a+b \cdot [1 - \exp(-c \cdot \tau)] + d \cdot [1 - \exp(-e \cdot \tau)]$ | 692.42 | 184.64 | 5.37×10^{-3} | 1208.5 | 1.72×10^{-5} | 0.998 |
| RGL | 0.10 | $a+b \cdot [1 - \exp(-c \cdot \tau)] + d \cdot \left(1 - \frac{1}{1+d \cdot e \cdot \tau}\right)$ | 1035.3 | 348.73 | 6.66×10^{-5} | 1051.9 | 3.30×10^{-8} | 0.998 |
| RGL | 0.20 | $a + \frac{b \cdot \tau}{c + \tau}$ | 1556.7 | 1473.7 | 40872.6 | – | – | 0.993 |
| RGL | 0.40 | $a + \frac{b}{1 + \left(\frac{\tau}{c}\right)^d}$ | 2480.9 | 1235.2 | 16312.9 | -1.271 | – | 0.992 |
| RGL | 0.80 | $a+b \cdot [1 - \exp(-c \cdot \tau)] + d \cdot \left(1 - \frac{1}{1+d \cdot e \cdot \tau}\right)$ | 3386.0 | 818.26 | 1.33×10^{-2} | 1363.8 | 4.26×10^{-8} | 0.988 |
| CLS | 0.10 | $a+b \cdot [1 - \exp(-c \cdot \tau)] + d \cdot [1 - \exp(-e \cdot \tau)]$ | 520.59 | 285.38 | 1.10×10^{-3} | 878.48 | 1.13×10^{-5} | 0.991 |
| CLS | 0.20 | $a+b \cdot [1 - \exp(-c \cdot \tau)] + d \cdot \left(1 - \frac{1}{1+d \cdot e \cdot \tau}\right)$ | 545.44 | 628.60 | 1.19×10^{-5} | 380.89 | 1.29×10^{-3} | 0.999 |
| CLS | 0.40 | $a+b \cdot [1 - \exp(-c \cdot \tau)] + d \cdot [1 - \exp(-e \cdot \tau)]$ | 1016.8 | 165.47 | 2.86×10^{-3} | 667.30 | 8.40×10^{-5} | 0.998 |
| CLS | 0.80 | $a+b \cdot [1 - \exp(-c \cdot \tau)] + d \cdot \left(1 - \frac{1}{1+d \cdot e \cdot \tau}\right)$ | 1378.8 | 633.88 | 1.38×10^{-4} | 264.50 | 3.40×10^{-5} | 0.999 |

концентрации субстрата в глобальный начальный момент времени $\tau \rightarrow 0$;

- (4) темп ферментативного процесса непрерывно убывает во времени до достижения нуля при $\tau \rightarrow \infty$;
- (5) каждой i -й концентрации фермента соответствует свой локальный предел концентрации субстрата, которая может быть трансформирована в продукт к наступлению локального момента времени $\tau_i \rightarrow \infty$.

Для обеспечения необходимого непротиворечия постулата 5 постулату 2, в свою очередь обобщающе постулируем принцип насыщающей дополнителности, согласно которому локальный предел концентрации субстрата, достигаемый при данной концентрации фермента, составляет дробную часть некоторого глобального предела концентрации, который может быть полностью переведён в продукт посредством нескольких этапов, локальный предел продолжительности каждого из которых стремится к бесконечности (Рисунок 6).

Соответственно, сформулированный принцип насыщающей дополнителности ферментативного процесса, по сути, включает в себя предложенный комплекс из пяти постулатов, объединяя их в единое целое.

Анализ постулируемого принципа позволяет определить следующие следствия из него:

- (1) для каждой системы «субстрат — фермент» существует некоторый глобальный предел

концентрации субстрата, соответствующий концентрации фермента, стремящейся к бесконечности;

- (2) локальный предел концентрации субстрата, соответствующий некоторой (не максимальной) концентрации фермента, может быть полностью трансформирован в продукт за конечный период времени при использовании данного фермента в большей концентрации;
- (3) если на каждом этапе потенциал используемой концентрации фермента реализовывать не полностью достигая состояния $\tau_i \rightarrow \infty$, а лишь в дробной части, соответствующей некоторой конечной продолжительности каждого этапа, то, в соответствии с принципом насыщающей дополнителности, существует конечное количество этапов, соответствующее полному переводу всего субстрата в продукт за конечное совокупное время;
- (4) любой произвольно взятой концентрации субстрата будет соответствовать некоторая концентрация фермента, для которой данная концентрация субстрата будет предельной при $\tau_i \rightarrow \infty$.

Таким образом, на основании постулируемого принципа насыщающей дополнителности ферментативного процесса и следствий из него можно сделать промежуточный вывод, что локальный предел концентрации субстрата, в том числе и выраженный в косвенных единицах, может быть определён из асимптотического значения динамической функции, описывающей процесс измене-

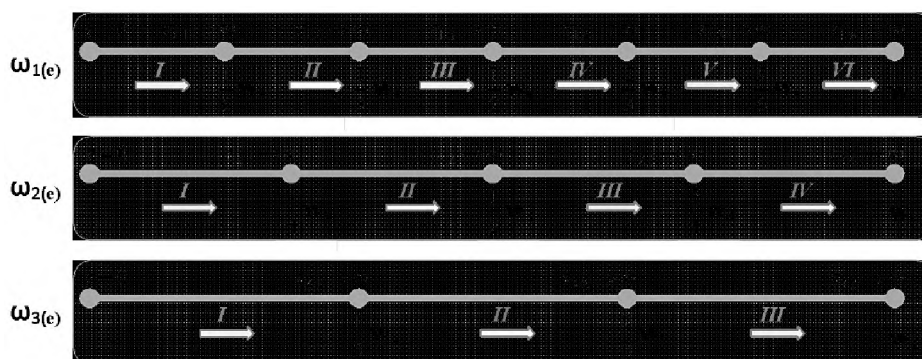


Рисунок 6

Принцип насыщающей дополнителности ферментативного процесса при разной концентрации субстрата

$\omega_{1(e)}, \omega_{2(e)}, \omega_{3(e)}$ — концентрации фермента; I, II, III, IV, V и VI — этапы ферментирования субстрата; τ — начальный момент времени; $\tau_{i,j}$ — продолжительность j -го этапа ферментирования субстрата ферментом i -й концентрации; w_s — глобальный предел концентрации субстрата; $1/6, 1/4, 1/3, 1/2, 2/3, 3/4, 5/6$ — доли w_s , частные пределы концентрации субстрата

Таблица 3

Характеристики функций, аппроксимирующих зависимость частного предела концентрации субстрата от концентрации ферментного препарата

| <i>i</i> | Математическое описание | Коэффициенты | | | | | r^2 |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|-------|
| | | <i>a</i> | <i>b</i> | <i>c</i> | <i>d</i> | <i>e</i> | |
| <i>RGL</i> | $a \cdot \left\{ 1 - \exp(b \cdot w) - \frac{c \cdot \left[1 + \frac{b \cdot \exp(-e \cdot w) - e \cdot \exp(-b \cdot w)}{e - b} \right]}{e} \right\}$ | 81073.6 | 1.01035 | 63.6358 | 6.86678 | 70.5026 | 0.997 |
| <i>CLS</i> | | 13431.9 | 0.96024 | 15.8755 | 3.68415 | 19.5596 | 0.994 |

ния косвенного показателя в процессе ферментирования, при $\tau_i \rightarrow \infty$. В свою очередь, на основании результатов аппроксимации локальных асимптот, представленных в координатах «концентрация — величина косвенного показателя», динамической функцией, можно определить глобальный предел концентрации w_s субстрата как асимптотическое значение функции $Z_{p(as)} = f_{Z_{p(as)}}(w_{(e)})$ при $w_{(e)} \rightarrow \infty$.

В результате применения данного подхода к процессу ферментирования препаратами *RGL* и *CLS*, для каждого из них по каждому из вариантов концентрации препарата были определены локальные асимптотические значения УЭП, на основании которых — рассчитаны частные пределы концентрации субстрата $w_{i,j}$ по формуле

$$w_{i,j} = Z_{p_{i,j}(as)} - Z_{p_{i,0}(as)} \mid j \neq 0, \quad (8)$$

где $Z_{p_{i,j}(as)}$ — асимптотическое значение динамической функции $Z_{p_{i,j}}$ для *i*-го препарата *j*-й кон-

центрации; $Z_{p_{i,0}(as)}$ — асимптотическое значение динамической функции при концентрации препарата 0%.

Совокупность значений частных пределов концентрации в пределах каждого из исследованных препаратов демонстрирует монотонное возрастание с увеличением концентрации фермента (Рисунки 7 и 8). Для *RGL* и *CLS* данные значения хорошо аппроксимируются функцией одного вида, имеющей, в свою очередь, горизонтальную асимптоту (Таблица 3).

Соответственно, для каждого ферментного препарата асимптотические значения данной функции эквивалентны глобальной концентрации субстрата.

Масштабируя шкалу концентрации фермента, несложно видеть, что увеличение данного показателя в системе достаточно быстро приближает значение результирующей функции к интегральному

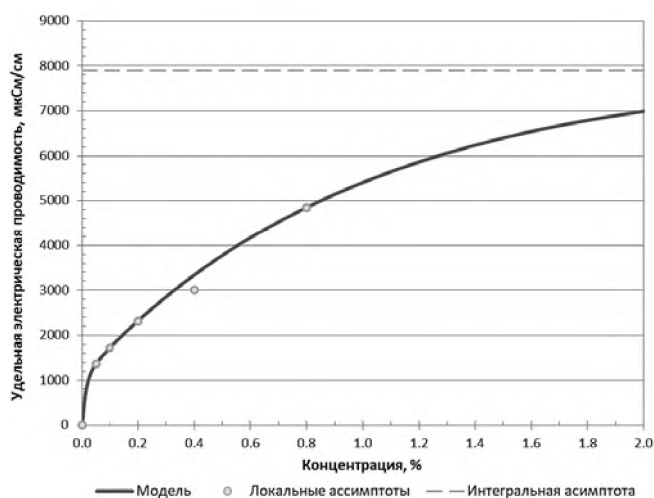


Рисунок 7

Динамика локальных асимптот при ферментировании субстрата препаратом *RGL* в зависимости от его концентрации

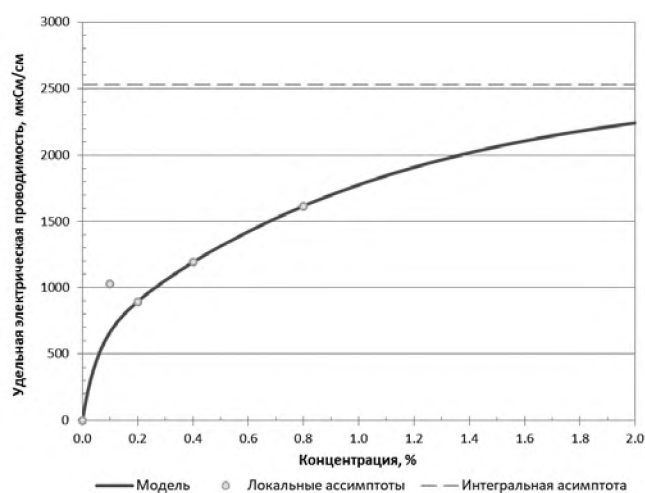


Рисунок 8

Динамика локальных асимптот при ферментировании субстрата препаратом *CLS* в зависимости от его концентрации

пределу концентрации субстрата. Если представить значения результирующей функции в долях от интегрального предела концентрации (Рисунки 9 и 10), можно видеть, что 95 персентилю соответствует концентрация фермента 4,41 % для препарата RGL и 4,53 % для препарата CLS, что наглядно подтверждает следствие 4 из принципа насыщающей дополнителности ферментативного процесса.

При этом 25 персентилю соответствует концентрация RGL 0,14 % и CLS – 0,09 %. То есть уже при малых концентрациях ферментов локальные асимптоты достигают 25% от интегрального предела концентрации субстрата, что косвенно показывает на перспективность оперирования в реальном промышленном ферментативном процессе именно малыми концентрациями ферментов.

В свою очередь, высокий темп приращения локального предела концентрации субстрата от асимптотического значения при увеличении концентрации фермента в области его малых концентраций позволяет, опираясь на следствия 2 и 3 из принципа насыщающей дополнителности ферментативного процесса, в первом приближении прогнозировать достаточность последовательного применения малых концентраций ферментного препарата в несколько этапов для достаточного в практическом смысле количественного перевода субстрата в продукт за технологически значимый конечный интервал времени.

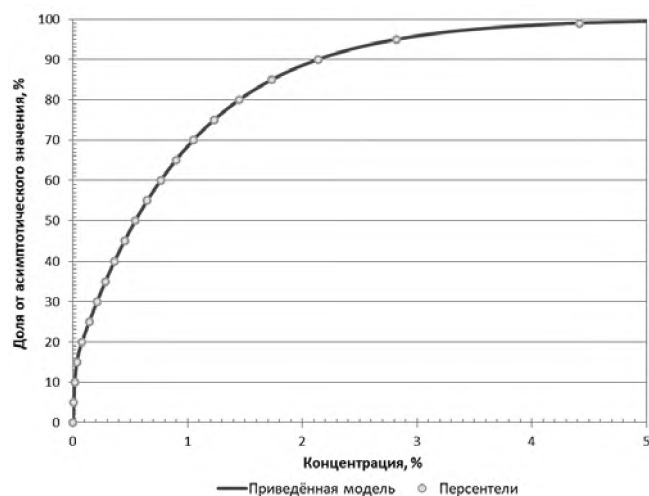


Рисунок 9

Влияние концентрации препарата *RGL* на долю интегрального предела концентрации субстрата

Следует отметить, что в описанный подход разработан впервые. Не смотря на то, что зависимость между концентрацией ферментного препарата и концентрацией субстрата отмечали и другие авторы, например, в (Dourado et al., 2021), данный эффект рассматривался ими как побочный и дальнейшего развития не находил.

Однако основное преимущество практического применения принципа насыщающей дополнителности при анализе динамики ферментативного процесса заключается в возможности однозначного определения эффективной предельной концентрации целевого субстрата в условиях отсутствия определённости относительно её численного значения, либо невозможности прямого определения, особенно когда сам субстрат является составным компонентом нативного сложного матрикса обрабатываемого сырья и/или сложной нативной молекулярной структуры компонента матрикса (как, например, гомолактуронановая составляющая протопектинового комплекса).

В этом случае эффективная концентрация целевого субстрата эквивалентна интегральному пределу таковой. Её значение может быть использовано для установления кинетических характеристик ферментативного процесса, таких как V_{max} и K_m , выраженных, в том числе, и в косвенных единицах.

Предложенный принцип справедлив в отношении ферментных препаратов, как минимум лиазного

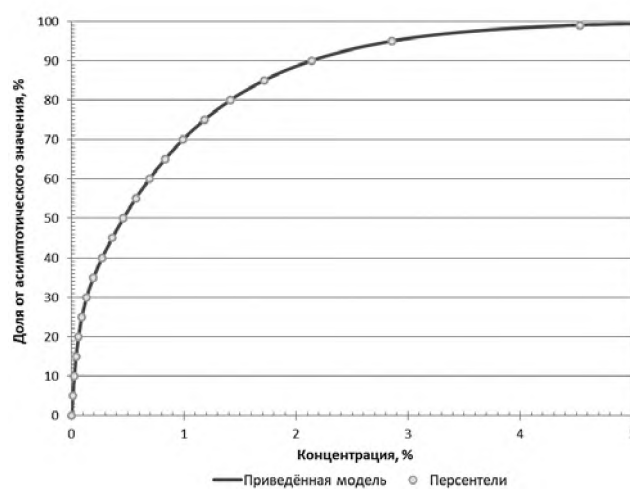


Рисунок 10

Влияние концентрации препарата *CLS* на долю интегрального предела концентрации субстрата

и гидролазного действия и является составляющей дерева принятия решений для разработки технологий промышленного производства растительных полигликанов с гарантированными физико-химическими характеристиками, начало формирования которого положено в наших предыдущих исследованиях (Kondratenko et al., 2020; Kondratenko et al., 2021).

ВЫВОДЫ

В результате проведённых исследований обосновано применение косвенных единиц измерения для описания кинетики ферментативных процессов. Разработан принцип насыщающей дополнительности ферментативного процесса, позволяющий на основе экспериментальных данных по динамике ферментативной трансформации обрабатываемого объекта препаратами в заданных концентрациях однозначно определить эффективную концентрацию целевого субстрата в косвенных единицах в условиях отсутствия определённости относительно её истинного численного значения, либо невозможности прямого определения. Результирующее значение может быть использовано для установления кинетических характеристик ферментативного процесса, таких как V_{max} и K_m .

Принцип насыщающей дополнительности применим в отношении гомоферментных препаратов лиазного и гидролазного действия, и является составляющей частью дерева принятия решений для

разработки технологий промышленного производства растительных полигликанов и неотъемлемой частью методологии глубокой переработки растительного сырья

Предположительно, применимость данного принципа можно экстраполировать и на другие группы ферментов. Однако это нуждается в экспериментальном подтверждении. Основы, заложенные в физический смысл принципа насыщающей дополнительности, определяют основные направления связанных с ним дальнейших исследований. В качестве таковых следует отметить разработку методологических подходов к определению целесообразности и оптимальных условий предварительной обработки сырья для интенсификации процессов его ферментативной трансформации, определению оптимальной концентрации ферментных препаратов, определению рационального количества этапов последовательной ферментативной обработки.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Петров А. Н.: руководство исследованием; концептуализация; методология; создание рукописи и ее редактирование.

Кондратенко Т. Ю.: проведение исследования; верификация данных; формальный анализ; визуализация; создание черновика рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

- Болтовский, В. С. (2021). Ферментативный гидролиз растительного сырья: Состояние и перспективы. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук*, 57(4), 502–512. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-502-512>
- Andersen, M., Kari, J., Borch, K., & Westh, P. (2018). Michaelis-Menten equation for degradation of insoluble substrate. *Mathematical Biosciences*, 296, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2017.11.011>
- Barron, C., Devaux, M. F., Foucat, L., Falourd, X., Looten, R., Joseph-Aime, M., Durand, S., Bonnin, E., Lapierre, C., Saulnier, L., Rouau X., & Guillon F. (2021). Enzymatic degradation of maize shoots: monitoring of chemical and physical changes reveals different saccharification behaviors. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01854-1>
- Benz, J. P., Chau, B. H., Zheng, D., Bauer, S., Glass, N. L., & Somerville, Ch. R. (2014). A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in *Neurospora crassa* reveals carbon source-specific cellular adaptations. *Molecular Microbiology*, 91(2), 275–299. <https://doi.org/10.1111/mmi.12459>
- Boeckx, J., Hertog, M., Geeraerd, A., & Nicolai B. (2017). Kinetic modelling: An integrated approach to analyze enzyme activity assays. *Plant Methods*, 13, Article 69. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0218-y>
- Carpita, N. C., & McCann, M. C. (2020). Redesigning plant cell walls for the biomass-based bioeconomy. *Journal of*

- Biological Chemistry*, 295(44), 15144–15157. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.014561>
- Choi, B., Rempala, G. A., & Kim, J. K. (2017). Beyond the michaelis-menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Scientific Reports*, 7(1), Article 17018. <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-017-17072-z>
- Dourado, H., Mori, M., Hwa, T., & Lercher, M. J. (2021). On the optimality of the enzyme-substrate relationship in bacteria. *PLoS Biology*, 19(10), Article e3001416. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001416>
- Haas, K. T., Wightman, R., Peaucelle, A., & Höfte, H. (2021). The role of pectin phase separation in plant cell wall assembly and growth. *The Cell Surface*, 7, Article 100054. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100054>
- Hassan, M. L., Berglund, L., Abou Elseoud, W. S., Hassan, E. A., & Oksman, K. (2021). Effect of pectin extraction method on properties of cellulose nanofibers isolated from sugar beet pulp. *Cellulose*, 28, 10905–10920. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04223-9>
- He, Q., Yang, J., Zabolina, O. A., & Yu, C. (2021). Surface-enhanced Raman spectroscopic chemical imaging reveals distribution of pectin and its co-localization with xyloglucan inside onion epidermal cell wall. *PLoS ONE*, 16(5), Article e0250650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250650>
- Hennessey-Ramos, L., Murillo-Arango, W., Vasco-Correa, J., & Paz Astudillo, I. C. (2021). Enzymatic Extraction and Characterization of Pectin from Cocoa Pod Husks (*Theobroma cacao* L.) Using Celluclast 1.5 L. *Molecules*, 26(5), Article 1473. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules26051473>
- Hewitt, S. H., Ali, R., Mailhot, R., Antonen, C. R., Dodson, C. A., & Butler, S. J. (2019). A simple, robust, universal assay for real-time enzyme monitoring by signal-ling changes in nucleoside phosphate anion concentration using a europium(iii)-based anion receptor. *Chemical Science*, 10(20), 5373–5381. <https://doi.org/10.1039/c9sc01552c>
- Holland, C., Ryden, P., Edwards, C. H., & Grundy, M. M.-L. (2020). Plant cell walls: Impact on nutrient bioaccessibility and digestibility. *Foods*, 9(2), 201. <https://doi.org/10.3390/foods9020201>
- Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2016). The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 984. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>
- Jepsen, S. T., Jørgensen, T. M., Sørensen, H. S., & Kristensen, S. R. (2019). Realtime interferometric refractive index change measurement for the direct detection of enzymatic reactions and the determination of enzyme kinetics. *Sensors*, 19(3), 539. <https://doi.org/10.3390/s19030539>
- Kondratenko, V. V., Kondratenko, T. Y., & Petrov, A. N. (2021). Directed homoenzymatic fragmentation of the plant protopectin complex: Assessment criteria. *Foods and Raw Materials*, 9(2), 254–261. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-254-261>
- Kondratenko, V. V., Kondratenko, T. Y., Petrov, A. N., & Belozero, G. A. (2020). Assessing protopectin transformation potential of plant tissue using a zoned criterion space. *Foods and Raw Materials*, 8(2), 348–361. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-348-361>
- Marjamaa, K., & Kruus, K. (2018). Enzyme biotechnology in degradation and modification of plant cell wall polymers. *Physiologia Plantarum*, 164(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/ppl.12800>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2022). Parameter reliability and understanding enzyme function. *Molecules*, 27(1), 263. <https://doi.org/10.3390/molecules27010263>
- Phyo, P., Gu, Y., & Hong, M. (2019). Impact of acidic pH on plant cell wall polysaccharide structure and dynamics: Insights into the mechanism of acid growth in plants from solid-state NMR. *Cellulose*, 26, 291–304. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2094-7>
- Punekar, N. S. (2018). Henri-Michaelis-Menten Equation. In: *Catalysis, kinetics and mechanisms* (pp 155–176). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_15
- Ritonja, J., Goršek, A., Pecar, D., Petek, T., & Polajžer, B. (2021). Dynamic modeling of the impact of temperature changes on CO₂ production during milk fermentation in batch bioreactors. *Foods*, 10(8), 1809. <https://doi.org/10.3390/foods10081809>
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., & Mäkelä, M. R. (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>
- Saganuwan, S. A. (2021). Application of modified Michaelis-Menten equations for determination of enzyme inducing and inhibiting drugs. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 22, Article 57. <https://doi.org/10.1186/s40360-021-00521-x>
- Schnell, S. (2014). Validity of the Michaelis-Menten equation — steady-state or reactant stationary assumption: That is the question. *The FEBS Journal*, 281(2), 464–472. <https://doi.org/10.1111/febs.12564>
- Shin, Y., Chane, A., Jung, M., & Lee, Y. (2021). Recent advances in understanding the roles of pectin as an active participant in plant signaling networks. *Plants*, 10(8), 1712. <https://doi.org/10.3390/plants10081712>
- Sista Kameshwar, A. K., & Qin, W. (2018). Structural and functional properties of pectin and lignin-carbohydrate complexes de-esterases: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5, Article 43. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0230-8>
- Srinivasan, B. (2021). A guide to the Michaelis-Menten equation: Steady state and beyond. *The FEBS Journal*, 289(20), 6086–6098. <https://doi.org/10.1111/febs.16124>
- Szerement, J., & Szatanik-Kloc, A. (2022). Cell-wall pectins in the roots of Apiaceae plants: Adaptations to Cd stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44, Article 53. <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03386-7>

- Vitol, I. S., Igoryanova, N. A., & Meleshkina, E. P. (2019). Bio-conversion of secondary products of processing of grain cereals crops. *Food Systems*, 2(4), 18–24. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2019-2-4-18-24>
- Wang, Y., Chan, K.-L., Abdel-Rahman, M. A., Sonomoto, K., & Leu, Sh.-Y. (2020). Dynamic simulation of continuous mixed sugar fermentation with increasing cell retention time for lactic acid production using *Enterococcus mundtii* QU 25. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 13, Article 112. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01752-6>
- Wu, J., Barbero, R., Vajjhala, S., & O'Connor, S. D. (2006). Real-time analysis of enzyme kinetics via micro parallel liquid chromatography. *ASSAY and Drug Development*

Technologies, 4(6), 653–660. <https://doi.org/10.1089/adt.2006.4.653>

- Yilmaz, N., Kodama, Y., & Numata, K. (2020). Revealing the architecture of the cell wall in living plant cells by bioimaging and enzymatic degradation. *Biomacromolecules*, 21(1), 95–103. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00979>
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 251–272. <https://doi.org/10.1111/jipb.13055>
- Zhao, Y., Man, Y., Wen, J., Guo, Y., & Lin, J. (2019). Advances in imaging plant cell walls. *Trends in Plant Science*, 24(19), 867–878. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.009>

REFERENCES

- Boltovskii, V. S. (2021). Fermentativnyi gidroliz rastitel'nogo syr'ya: Sostoyaniye i perspektivy [Enzymatic hydrolysis of plant raw materials: State and prospects]. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk [News of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Sciences Series]*, 57(4), 502–512. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-502-512>
- Andersen, M., Kari, J., Borch, K., & Westh, P. (2018). Michaelis-Menten equation for degradation of insoluble substrate. *Mathematical Biosciences*, 296, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2017.11.011>
- Barron, C., Devaux, M. F., Foucat, L., Falourd, X., Looten, R., Joseph-Aime, M., Durand, S., Bonnin, E., Lapiere, C., Saulnier, L., Rouau X., & Guillon F. (2021). Enzymatic degradation of maize shoots: monitoring of chemical and physical changes reveals different saccharification behaviors. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01854-1>
- Benz, J. P., Chau, B. H., Zheng, D., Bauer, S., Glass, N. L., & Somerville, Ch. R. (2014). A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in *Neurospora crassa* reveals carbon source-specific cellular adaptations. *Molecular Microbiology*, 91(2), 275–299. <https://doi.org/10.1111/mmi.12459>
- Boeckx, J., Hertog, M., Geeraerd, A., & Nicolai B. (2017). Kinetic modelling: An integrated approach to analyze enzyme activity assays. *Plant Methods*, 13, Article 69. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0218-y>
- Carpita, N. C., & McCann, M. C. (2020). Redesigning plant cell walls for the biomass-based bioeconomy. *Journal of Biological Chemistry*, 295(44), 15144–15157. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.014561>
- Choi, B., Rempala, G. A., & Kim, J. K. (2017). Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Scientific Reports*, 7(1), Article 17018. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z>
- Dourado, H., Mori, M., Hwa, T., & Lercher, M. J. (2021). On the optimality of the enzyme-substrate relationship in bacteria. *PLoS Biology*, 19(10), Article e3001416. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001416>
- Haas, K. T., Wightman, R., Peaucelle, A., & Höfte, H. (2021). The role of pectin phase separation in plant cell wall assembly and growth. *The Cell Surface*, 7, Article 100054. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100054>
- Hassan, M. L., Berglund, L., Abou Elseoud, W. S., Hassan, E. A., & Oksman, K. (2021). Effect of pectin extraction method on properties of cellulose nanofibers isolated from sugar beet pulp. *Cellulose*, 28, 10905–10920. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04223-9>
- He, Q., Yang, J., Zabolina, O. A., & Yu, C. (2021). Surface-enhanced Raman spectroscopic chemical imaging reveals distribution of pectin and its co-localization with xyloglucan inside onion epidermal cell wall. *PLoS ONE*, 16(5), Article e0250650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250650>
- Hennessey-Ramos, L., Murillo-Arango, W., Vasco-Correa, J., & Paz Astudillo, I. C. (2021). Enzymatic Extraction and Characterization of Pectin from Cocoa Pod Husks (*Theobroma cacao* L.) Using Celluclast 1.5 L. *Molecules*, 26(5), Article 1473. <https://doi.org/10.3390/molecules26051473>
- Hewitt, S. H., Ali, R., Mailhot, R., Anttonen, C. R., Dodson, C. A., & Butler, S. J. (2019). A simple, robust, universal assay for real-time enzyme monitoring by signal-ling changes in nucleoside phosphate anion concentration using a europium(iii)-based anion receptor. *Chemical Science*, 10(20), 5373–5381. <https://doi.org/10.1039/c9sc01552c>
- Holland, C., Ryden, P., Edwards, C. H., & Grundy, M. M.-L. (2020). Plant cell walls: Impact on nutrient bioaccessibility and digestibility. *Foods*, 9(2), 201. <https://doi.org/10.3390/foods9020201>
- Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2016). The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 984. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>

- Jepsen, S. T., Jørgensen, T. M., Sørensen, H. S., & Kristensen, S. R. (2019). Realtime interferometric refractive index change measurement for the direct detection of enzymatic reactions and the determination of enzyme kinetics. *Sensors*, 19(3), 539. <https://doi.org/10.3390/s19030539>
- Kondratenko, V. V., Kondratenko, T. Y., & Petrov, A. N. (2021). Directed homoenzymatic fragmentation of the plant protopectin complex: Assessment criteria. *Foods and Raw Materials*, 9(2), 254–261. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-254-261>
- Kondratenko, V. V., Kondratenko, T. Y., Petrov, A. N., & Belozero, G. A. (2020). Assessing protopectin transformation potential of plant tissue using a zoned criterion space. *Foods and Raw Materials*, 8(2), 348–361. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-348-361>
- Marjamaa, K., & Kruus, K. (2018). Enzyme biotechnology in degradation and modification of plant cell wall polymers. *Physiologia Plantarum*, 164(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/ppl.12800>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2022). Parameter reliability and understanding enzyme function. *Molecules*, 27(1), 263. <https://doi.org/10.3390/molecules27010263>
- Phyo, P., Gu, Y., & Hong, M. (2019). Impact of acidic pH on plant cell wall polysaccharide structure and dynamics: Insights into the mechanism of acid growth in plants from solid-state NMR. *Cellulose*, 26, 291–304. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2094-7>
- Punekar, N. S. (2018). Henri-Michaelis-Menten Equation. In: *Catalysis, kinetics and mechanisms* (pp 155–176). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_15
- Ritonja, J., Goršek, A., Pecar, D., Petek, T., & Polajžer, B. (2021). Dynamic modeling of the impact of temperature changes on CO₂ production during milk fermentation in batch bioreactors. *Foods*, 10(8), 1809. <https://doi.org/10.3390/foods10081809>
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., & Mäkelä, M. R. (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>
- Saganuwan, S. A. (2021). Application of modified Michaelis-Menten equations for determination of enzyme inducing and inhibiting drugs. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 22, Article 57. <https://doi.org/10.1186/s40360-021-00521-x>
- Schnell, S. (2014). Validity of the Michaelis-Menten equation — steady-state or reactant stationary assumption: That is the question. *The FEBS Journal*, 281(2), 464–472. <https://doi.org/10.1111/febs.12564>
- Shin, Y., Chane, A., Jung, M., & Lee, Y. (2021). Recent advances in understanding the roles of pectin as an active participant in plant signaling networks. *Plants*, 10(8), 1712. <https://doi.org/10.3390/plants10081712>
- Sista Kameshwar, A. K., & Qin, W. (2018). Structural and functional properties of pectin and lignin-carbohydrate complexes de-esterases: A review. *Bioresources and Bio-processing*, 5, Article 43. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0230-8>
- Srinivasan, B. (2021). A guide to the Michaelis-Menten equation: Steady state and beyond. *The FEBS Journal*, 289(20), 6086–6098. <https://doi.org/10.1111/febs.16124>
- Szerement, J., & Szatanik-Kloc, A. (2022). Cell-wall pectins in the roots of Apiaceae plants: Adaptations to Cd stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44, Article 53. <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03386-7>
- Vitol, I. S., Igoryanova, N. A., & Meleshkina, E. P. (2019). Bio-conversion of secondary products of processing of grain cereals crops. *Food Systems*, 2(4), 18–24. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2019-2-4-18-24>
- Wang, Y., Chan, K.-L., Abdel-Rahman, M. A., Sonomoto, K., & Leu, Sh.-Y. (2020). Dynamic simulation of continuous mixed sugar fermentation with increasing cell retention time for lactic acid production using *Enterococcus mundtii* QU 25. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 13, Article 112. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01752-6>
- Wu, J., Barbero, R., Vajjhala, S., & O'Connor, S. D. (2006). Real-time analysis of enzyme kinetics via micro parallel liquid chromatography. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 4(6), 653–660. <https://doi.org/10.1089/adt.2006.4.653>
- Yilmaz, N., Kodama, Y., & Numata, K. (2020). Revealing the architecture of the cell wall in living plant cells by bioimaging and enzymatic degradation. *Biomacromolecules*, 21(1), 95–103. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00979>
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 251–272. <https://doi.org/10.1111/jipb.13055>
- Zhao, Y., Man, Y., Wen, J., Guo, Y., & Lin, J. (2019). Advances in imaging plant cell walls. *Trends in Plant Science*, 24(19), 867–878. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.009>