

УДК 577.151.45:57.037+664.868

# Определение целесообразности предварительной декатионизации растительного сырья для ферментативной фрагментации протопектинового комплекса

В. В. Кондратенко<sup>1</sup>, Т. Ю. Кондратенко<sup>2</sup>
<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, г. Москва, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования — филиал ФГБНУ «Всероссийский научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН, Москва, Россия

## КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Кондратенко Владимир Владимирович  
E-mail: v\_kondratenko@vniimi.org

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

## ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Кондратенко, В. В., & Кондратенко, Т. Ю. (2023). Определение целесообразности предварительной декатионизации растительного сырья для ферментативной фрагментации протопектинового комплекса. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (2), 118-131. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.426>
**ПОСТУПИЛА:** 15.02.2023

**ПРИНЯТА:** 17.07.2023

**ОПУБЛИКОВАНА:** 30.07.2023

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## АННОТАЦИЯ

**Введение:** Использование ферментных препаратов для обработки растительного сырья налагает некоторые ограничения, определяемые структурой молекул ферментов и свойствами среды. Одним из основных лимитирующих факторов является возможное присутствие в среде ингибитора, подавляющего каталитическую активность. Потенциальным ингибитором могут являться катионы поливалентных металлов, поэтому определение целесообразности декатионизации среды перед ферментативной обработкой является актуальным.

**Цель** исследования является разработка подхода к определению целесообразности предварительной декатионизации сырья перед ферментативным процессом.

**Материалы и методы:** В качестве субстрата использовали негранулированный сухой немелассированный свекловичный жом. Ферментативную обработку проводили гомоферментным препаратом рамногалактуроназ лиазного действия в концентрации 0,00, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 и 0,8 % от массы сухого субстрата. Предварительную обработку набухшего сырья проводили 0,00, 0,20, 0,50 и 0,91 ед. от 2,87 % водного раствора комплексона (ЭДТА). Фактором отклика была удельная электрическая проводимость. Ферментативный процесс проводили при температуре 45 °С течение 8 часов. Аппроксимацией экспериментальных данных для каждого варианта исследований получали математическое описание динамик ферментативного процесса.

**Результаты:** По характеру зависимости обратных кинетических показателей было установлено, что в пределах каждой концентрации ферментного препарата значение асимптотического темпа процесса  $V_{max} = \text{const}$ , а константа Михаэлиса  $K_m$  непрерывно увеличивается. Для комплексной оценки исследуемых динамик была разработана система критериев, включающая критерий изменчивости константы Михаэлиса  $Q(K_m)$ , дискретный критерий оптимальности  $Z$ , комплексный критерий оптимальности декатионизации  $F$  и критерий оценки  $Q$ , сопровождаемые 4 постулируемыми условиями оптимизации.

**Выводы:** В результате разработанная система критериев позволяет решать сразу три задачи — определение целесообразности предварительной декатионизации, оптимальные концентрации комплексона и гомоферментного препарата.

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

ферментативная активность, фрагментация, протопектиновый комплекс, ингибирование, декатионизация, растительное сырьё



# Determination of the Feasibility of Preliminary Decationization of Plant Raw Materials for Enzymatic Fragmentation of the Protopectin Complex

<sup>1</sup> Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Russian Research Institute of Canning Technology – branch of Gorbato Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

## CORRESPONDENCE:

Vladimir V. Kondratenko

E-mail: v\_kondratenko@vniimi.org

## FOR CITATIONS:

Kondratenko, V. V., & Kondratenko, T. Yu. (2023). Determination of the feasibility of preliminary decationization of plant raw materials for enzymatic fragmentation of the protopectin complex. *Storage and Processing of Farm Products*, (2), 118-131. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.426>

RECEIVED: 15.02.2023

ACCEPTED: 17.07.2023

PUBLISHED: 30.07.2023

## DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.



Vladimir V. Kondratenko<sup>1</sup>, Tatyana Yu. Kondratenko<sup>2</sup>

## ABSTRACT

**Background:** The use of enzyme preparations for processing plant raw materials imposes some restrictions determined by the structure of enzyme molecules and the properties of the medium. One of the main limiting factors is the possible presence of an inhibitor in the medium that suppresses catalytic activity. Polyvalent metal cations can be a potential inhibitor, therefore, determining the expediency of decationization of the medium before enzymatic treatment is relevant.

**Purpose:** The aim of the work is to develop an approach to determining the feasibility of preliminary decationization of raw materials before the enzymatic process.

**Materials and Methods:** Non-granulated dry non-massaged beet pulp was used as a substrate. Enzymatic treatment was carried out with a homoenzyme preparation of rhamnogalacturonan lyase action at a concentration of 0.00, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 % by weight of the dry substrate. The pretreatment of the swollen raw materials was carried out by 0.00, 0.20, 0.50 and 0.91 units of 2.87 % aqueous solution of complexon. The response factor was electrical conductivity. The enzymatic process was carried out at a temperature of 45 °C for 8 hours. By approximating the experimental data for each research variant, a mathematical description of the dynamics of the enzymatic process was obtained.

**Results:** By the nature of the dependence of the inverse kinetic parameters, it was found that within each concentration of the enzyme preparation, the value of the asymptotic rate of the process  $V_{\max} = \text{const}$ , and the Michaelis constant  $K_m$  continuously increases. For a comprehensive assessment of the studied dynamics, a system of criteria was developed, including the criterion of variability of the Michaelis constant  $Q(K_m)$ , the discrete optimality criterion  $Z$ , the complex optimality criterion of decationization  $F$  and the evaluation criterion  $Q$ , accompanied by 4 postulated optimization conditions.

**Conclusion:** As a result, the developed system of criteria makes it possible to solve three tasks at once – determining the feasibility of pre-decationization, optimal concentrations of complexon and homoenzyme preparation.

## KEYWORDS

enzymatic activity, fragmentation, protopectin complex, inhibition, decationization, vegetable raw materials

## ВВЕДЕНИЕ

Благодаря проявлению высокой каталитической активности и специфичности к виду субстрата, ферменты находят широкое применение в пищевой промышленности при решении задач, связанных с увеличением темпа технологических процессов, получением целевого продукта с требуемыми физико-химическими характеристиками, увеличением выхода готовой продукции, улучшением её качества, а также — с увеличением глубины переработки сырья, уменьшением количества отходов и снижением себестоимости (Rimareva et al., 2017; Mandake et al., 2020). Однако практическое применение ферментов связано с рядом объективных ограничений, определяемых особенностями состава и структуры их молекулы, таких как активная реакция среды, температура процесса, а также — наличие или отсутствие в системе активатора или ингибитора.

Некоторые группы ферментов проявляют чувствительность к концентрации поливалентных катионов металлов: при отсутствии в среде катионов  $\text{Ca}^{2+}$  каталитическая активность ферментов практически всех семейств полисахарид-лиаз значительно снижается (Ochiai et al., 2007; Silva et al., 2011; Dhillon et al., 2016; Yuan et al., 2019; Wang et al., 2022). Это связано с присутствием катионов металлов в составе ферментов. Их удаление может частично или полностью ингибировать каталитическую активность. В то же время, не смотря на присутствие в составе молекул катионов  $\text{Ca}^{2+}$ , полисахарид-лиазы семейства PL4 выделяются на общем фоне отсутствием необходимости наличия данных катионов в среде (Jensen et al., 2010;

Laatu & Condemine, 2003; Iwai et al., 2015; Morales-Quintana et al., 2022). Это, вероятно, связано с пониженной подвижностью катионов в составе фермента.

В работах (Ochiai et al., 2007; Silva et al., 2011; Dhillon et al., 2016; Yuan et al., 2019; Iwai et al., 2015) отмечается, что наравне с  $\text{Ca}^{2+}$ , положительное влияние на активность лиазных ферментов может оказывать присутствие в среде также катионов  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Hg}^{2+}$ . При этом присутствие катионов  $\text{Ca}^{2+}$  в составе молекулярной структуры не является определяющим фактором чувствительности каталитической активности таких ферментов к поливалентным катионам. В ряде исследований (Fujimoto et al., 2013; O'Neill et al., 2015; Furusawa et al., 2021) в отношении некоторых катион-не-содержащих гидролазных ферментов косвенно показана такая возможность.

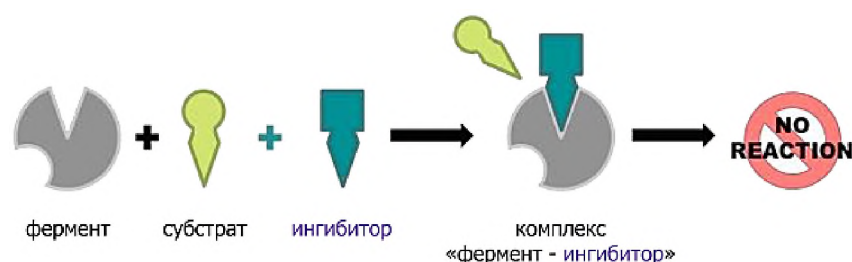
В то же время к ингибирующему действию может приводить не только отсутствие или недостаток поливалентных катионов металлов в среде, но и некоторый их избыток (Robin et al., 2018; Иванова, 2022). Один из возможных механизмов ингибирования представлен на Рисунке 1.

При этом активирующее или ингибирующее действие катионов металлов на каталитическую активность ферментов при прочих равных условиях в большинстве случаев определяется их концентрацией (Рисунок 2).

Применение ферментативной обработки для направленной деструкции биополимерного матрикса клеточных стенок растительного сырья неизбежно

**Рисунок 1**

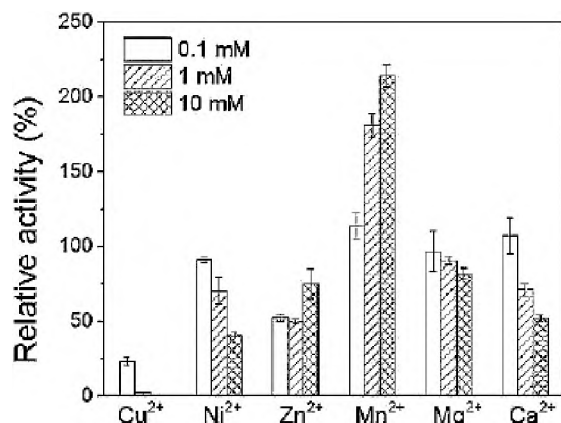
Механизм ингибирования ферментативного процесса



Примечание. Из «A Review on enzyme inhibitors», by N. Patadiya, N. Panchal, V. Vaghela, 2021, *International Research Journal of Pharmacy*, 12(6), 60–66. Copyright 2021 by IRJP.

Рисунок 2

Влияние концентрации катионов металлов на активность ферментов



Примечание. Из «Bioinspired immobilization of glycerol dehydrogenase by metal ion-chelated polyethyleneimines as artificial polypeptides», by Y. Zhang, H. Ren, Y. Wang, K. Chen, B. Fang, S. Wang, 2016, *Scientific Reports*, 6, Article 24163 (<https://doi.org/10.1038/srep24163>). Copyright 2016 by Springer Nature Limite.

связано с высвобождением катионов, нативно связанных в его составе (Joslyn, 1963). Поскольку интенсификация ферментативной обработки растительного сырья с целью его глубокой переработки связана с необходимостью оптимизации кинетики ферментативного процесса (Кондратенко с соавт., 2022а; Кондратенко с соавт., 2022б), решение её предполагает предварительное регулирование катионного состава среды «субстрат — фермент» для предотвращения ингибирования (Кондратенко с соавт., 2018). Соответственно, актуальным становится определение целесообразности такого регулирования и параметров его проведения.

Целью данной работы является разработка универсального подхода к определению целесообразности предварительной декатионизации растительного сырья перед ферментативным процессом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Для исследования ферментативной кинетики в качестве субстрата был использован негранулированный сухой немелассированный свекловичный жом (АО «Успенский сахарник», Краснодарский край).

В качестве ферментного препарата использовали гомоферментный препарат рамногалактуроназного (RGL) действия, относящийся к группе лиаз (ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва).

### Методы и инструменты

Удельную электрическую проводимость снимали в автоматическом режиме с дискретностью 1 с помощью оригинального программного обеспечения WTW MultiLab Importer 1.24.

### Процедура исследования

Для проведения ферментативного процесса в условиях декатионизации предварительно готовили раствор комплексона (ЭДТА) в концентрациях, соответствующих 0,00, 0,20, 0,50 и 0,91 ед. от 2,87 % водного раствора.

Процесс обработки свекловичного жома проводили следующим образом. В коническую колбу объёмом 100 см<sup>3</sup> брали навеску сухого субстрата массой 6 г, прибавляли 96 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды комнатной температуры, перемешивали и оставляли на 15 часов. Экстракт от набухшего субстрата осторожно полностью отделяли. В колбу к субстрату вносили 96 см<sup>3</sup> раствора ЭДТА, тщательно перемешивали и выдерживали 46 мин при комнатной температуре. Экстракт от субстрата осторожно полностью отделяли. В колбу с субстратом вносили 96 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, предварительно нагретой до температуры 45 °С, и тщательно перемешивали, отделяли образовавшийся экстракт.

Навеску ферментного препарата (0,05, 0,1, 0,2, 0,4 и 0,8 % от массы сухого субстрата) помещали в стеклянный стакан на 50 см<sup>3</sup>, прибавляли 40 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды с температурой 45 °С и тщательно перемешивали до полного растворения. Раствор гомоферментного препарата количественно переносили в колбу с субстратом, используя для этого дополнительные 56 см<sup>3</sup> 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 кон-

дуктометра WTW inoLab 7310 с чернёными платиновыми электродами.

Ферментативный процесс проводили при температуре теплоносителя 45 °С течение 8 часов.

## 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 Table Curve 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 (Seltman, 2018).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях авторов в области оценки кинетики биотехнологического фрагментирования протопектинового комплекса растительной ткани с использованием гомоферментных препаратов лиазного и гидролазного действия в условиях непрерывного изменения концентрации субстрата (Кондратенко с соавт., 2022а; Кондратенко с соавт., 2022б) был разработан алгоритм определения оптимальной концентрации ферментного препарата. При этом было установлено, что в процессе ферментативной обработки, при прочих равных условиях, происходит непрерывное увеличение одного из фундаментальных показателей кинетики ферментативного процесса — константы Михаэлиса, — что указывает на уменьшение эффективности процесса. Было показано, что наиболее вероятной причиной этого является ингибирующее действие катионов поливалентных металлов, нативно присутствующих в составе матрикса клеточных стенок, на активность ферментов, с увеличением его по мере перевода в раствор при ферментативном фрагментировании протопектинового комплекса. В этом случае перед процессом ферментирования

необходимо удаление некоторой части этих катионов из сырья, для чего необходимо разработать алгоритм определения оптимальных условий декатионизации.

Для этого на основании анализа полученных данных и опираясь на постулируемые положения, был проведён анализ динамики кинетических показателей основного уравнения ферментативной кинетики (уравнения Михаэлиса — Ментон) в процессе ферментирования в зависимости от степени декатионизации:

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

где  $V$  — темп ферментативного процесса, моль/см<sup>3</sup> · с;  $S$  — молярная концентрация субстрата, моль/см<sup>3</sup>;  $V_{\max}$  — максимальный (асимптотический) темп ферментативного процесса, моль/см<sup>3</sup> · с;  $K_m$  — константа Михаэлиса, моль/см<sup>3</sup>.

Руководствуясь приведёнными выше соображениями, используемые единицы измерения анализируемых показателей были отличны от канонических, не меняя при этом суть и кинетическое описание процессов (Kondratenko, Petrov, *et al.*, 2022).

Для определения кинетических показателей основного уравнения ферментативной кинетики применили его преобразование методом двойных обратных координат по Лайнуиверу-Бэрку:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S}. \quad (2)$$

При этом, руководствуясь представлением, что  $S = \omega_0 - P = \omega_0 - f_p(\tau)$ , где  $\omega_0$  — предельная концентрация субстрата при данной степени декатионизации, ед., а  $V = f_p'(\tau)$ , для удобства оперирования формула (2) была преобразована следующим образом:

$$A = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot B, \quad (3)$$

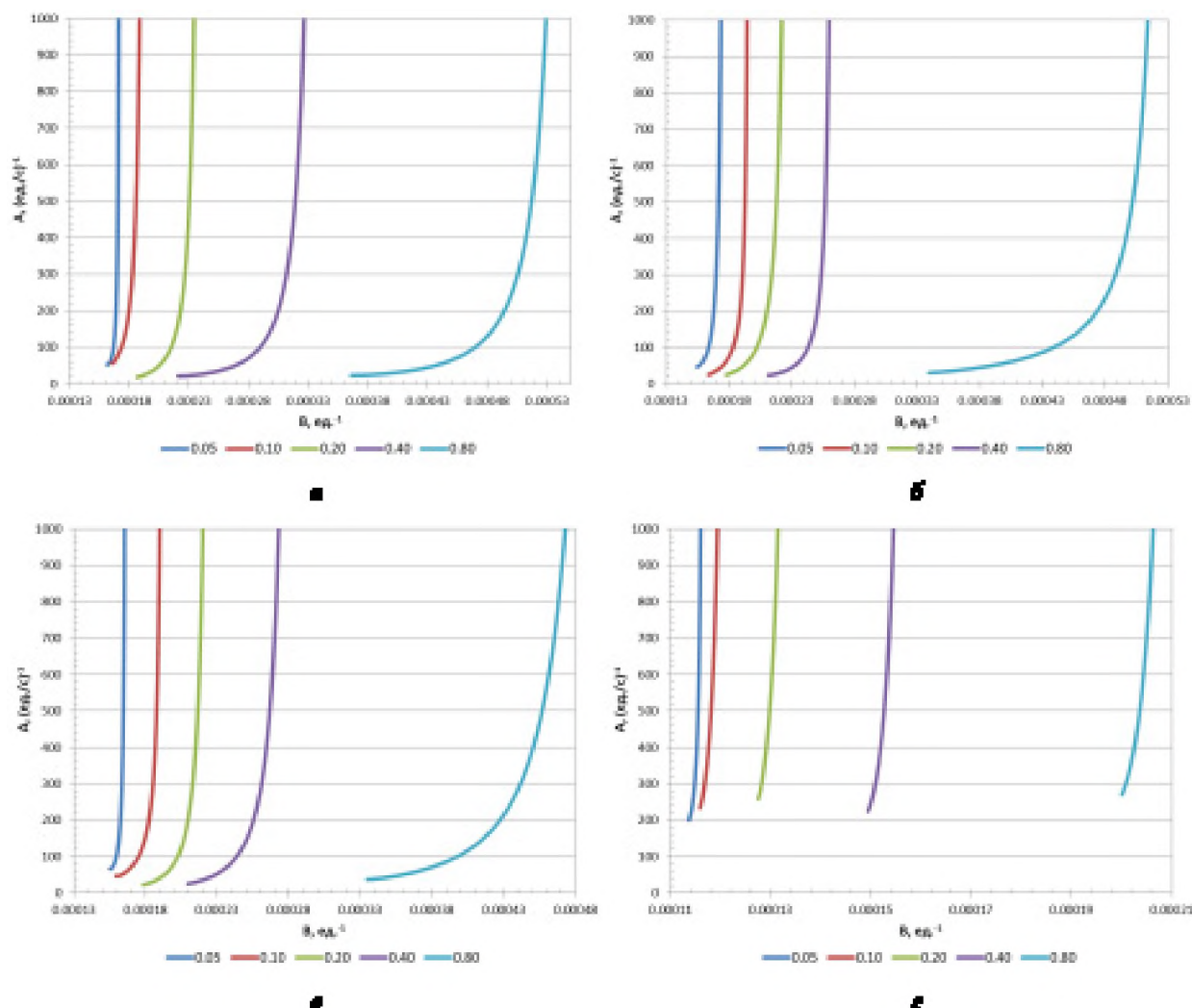
где  $A = \frac{1}{f_p'(\tau)}$ , (ед./с)<sup>-1</sup>;  $B = \frac{1}{\omega_0 - f_p(\tau)}$ , ед<sup>-1</sup>.

Результаты преобразования представлены на Рисунке 3.



### Рисунок 3

Влияние концентрации субстрата (в обратных координатах) на темп ферментативного процесса при разной концентрации ферментного препарата при разной в зависимости от степени предварительной декатионизации



Примечания: а – концентрация ЭДТА 0 ед.; б – концентрация ЭДТА 0,2 ед.; в – концентрация ЭДТА 0,5 ед.; г – концентрация ЭДТА 0,91 ед.

Анализ полученных результатов показывает, что во всех вариантах проведения исследования зависимость  $A$  от  $B$  имеет выраженный нелинейный характер, в силу чего непосредственное решение задачи нахождения кинетических характеристик ферментативного процесса в некоторой степени затруднительно.

В этом случае, как и в наших предыдущих исследованиях (Кондратенко с соавт., 2022а), был применён следующий подход – виду того, что во всех исследованных вариантах вид кривой динамики

накопления продуктов ферментативной обработки демонстрировал монотонное возрастание на всей положительной области определения продолжительности процесса, следовательно, на этой области определения темп накопления, равно как и обратная ему величина  $A$  не может быть отрицательной.

В свою очередь, в соответствии с принципом насыщающей дополнительности, значение остаточной концентрации субстрата, равно как и обратной ей величине  $B$  не может быть отрицательным.

Кроме того, в соответствии с физическим смыслом показателей  $A$ ,  $B$  и  $V_{\max}$ , значение последнего соответствует положению

$$V_{\max} = \lim_{B \rightarrow 0} A. \quad (4)$$

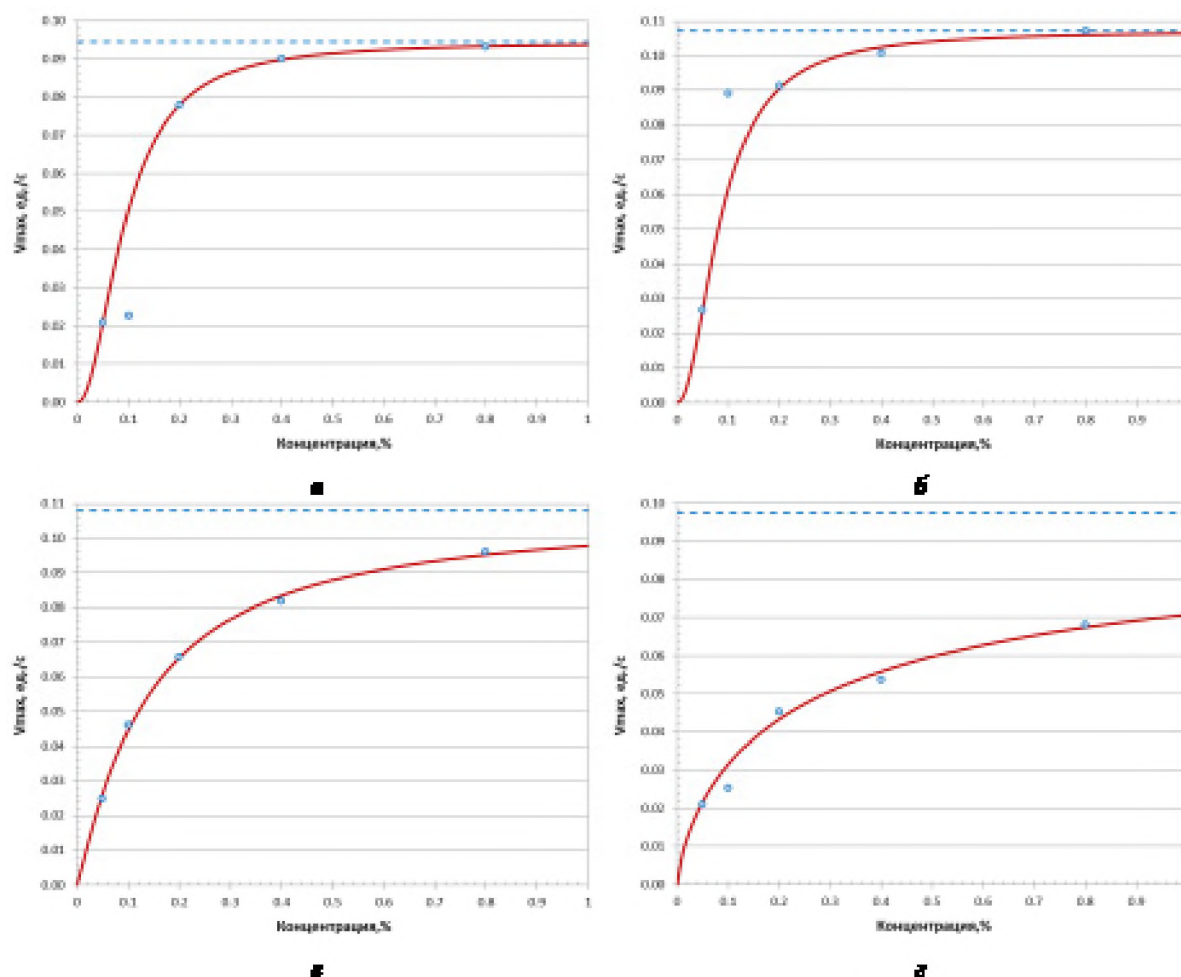
В силу криволинейности зависимости вида  $A = f_A(B)$  и специфики преобразования по Лайнуиверу-Берку неотрицательные решения в отношении кинетических характеристик возможны только при условии, что

$$\frac{f_A(B)}{B \cdot f'_A(B)} \geq 1 \quad \Big|_{B \geq 0} \quad (5)$$

на всей положительной области определения значений  $B$ .

#### Рисунок 4

Влияние концентрации ферментного препарата на динамику  $V_{\max}$  в зависимости от степени предварительной декатионизации



Примечания: а – концентрация ЭДТА 0 ед.; б – концентрация ЭДТА 0,2 ед.; в – концентрация ЭДТА 0,5 ед.; з – концентрация ЭДТА 0,91 ед.

В отношении всех вариантов, представленных на Рисунке 3, данное требование не выполняется, что указывает на единственность решения задачи, вытекающую из формулы (5).

На основании изложенного подхода для каждого из вариантов были определены значения  $V_{\max}$ .

Анализ полученных результатов показал, что, частные значения  $V_{\max}$  находятся в функциональной зависимости от концентрации ферментного препарата, монотонно возрастаая при её увеличении, и это справедливо для всех исследованных вариантов предварительной декатионизации (Рисунок 4).

Для каждого варианта предварительной декатионизации было определено математическое описание данной зависимости вида  $V_{\max} = f_{V_{\max}}(E)$ . Во всех вариантах математическое описание имело асимптотический характер. В результате анализа исследованных зависимостей были определены асимптотические значения  $V_{\max}$  при  $E \rightarrow \infty$ , где  $E$  — концентрация ферментного препарата, %.

Для определения наличия и выраженности функциональной зависимости  $V_{\max}$  от концентрации комплексона для каждого варианта концентрации ферментного препарата, а также для асимптотической концентрации, были получены математические описания вида  $V_{\max} = f_{V_{\max}}(C_c)$ , где  $C_c$  — концентрация комплексона, ед. (Рисунок 5).

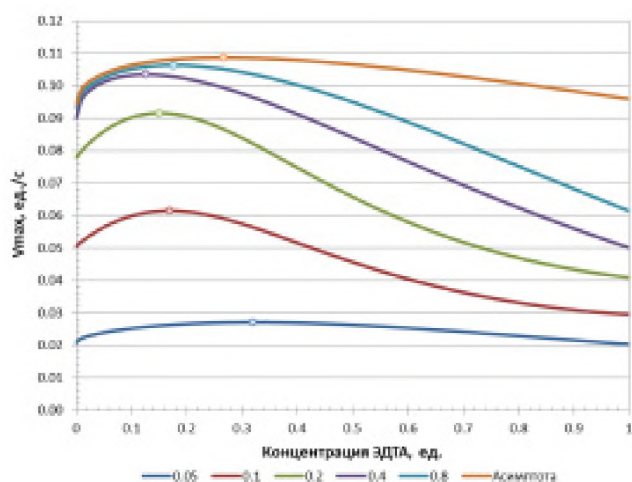
Особенностью полученных математических зависимостей является наличие экстремума, соответствующего некоторому единственному максимальному значению  $V_{\max}$  для каждого варианта концентрации ферментного препарата (включая асимптотическую) для соответствующего ему единственного значения концентрации комплексона.

Полагаясь на априорное утверждение, что максимальному значению интенсивности ферментативного процесса при прочих равных условиях соответствует максимальное значение  $V_{\max}$ , постулируем условие оптимизации ферментативного процесса:

$$V_{\max} \Big|_{\text{opt}} \rightarrow \max. \quad (6)$$

Рисунок 5

Влияние концентрации комплексона на  $V_{\max}$  в зависимости от концентрации ферментного препарата



Для проведения сравнительного анализа эффективности влияния предварительной декатионизации для каждой зависимости, представленной на Рисунке 4, в условиях единственности значения  $V_{\max}$  для каждого исследованного варианта, были определены динамики константы Михаэлиса в процессе ферментирования

$$K_m = f_{K_m}(\tau) = \frac{A \cdot V_{\max} - 1}{B}. \quad (7)$$

В рамках каждого из вариантов имела место некоторая динамика рассчитанного показателя. В то же время изменение константы Михаэлиса в процессе ферментации указывает на некоторую его не стационарность.

Для интегральной оценки степени изменчивости константы Михаэлиса введём критерий изменчивости  $Q(K_m)$ :

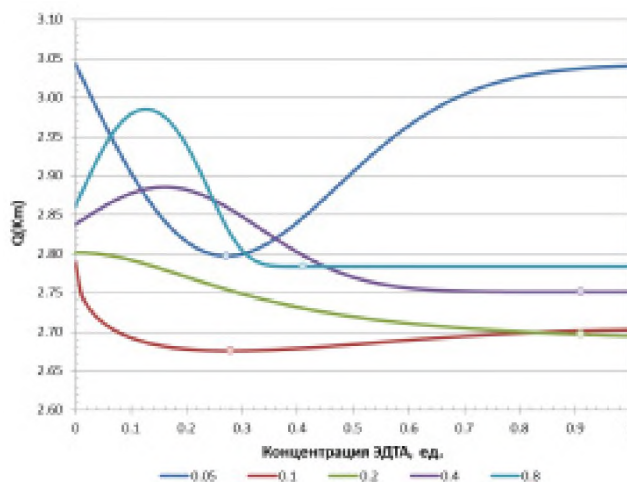
$$Q(K_m) = \int_{\tau_1}^{\tau_2} \log_{10} \left( \frac{K_m}{K_{m(\min)}} \right) d\tau, \quad (8)$$

где  $K_{m(\min)}$  — минимальное значение  $K_m$  на интервале  $\tau \in [\tau_1; \tau_2]$ .

Таким образом, каждому варианту концентрации ферментного препарата для каждого варианта концентрации комплексона соответствует единственное значение критерия изменчивости. Для оценки динамики данного критерия в зависимости от концентрации комплексона для каждой концентрации

Рисунок 6

Влияние концентрации комплексона на критерий  $Q(K_m)$  в зависимости от концентрации ферментного препарата





ферментного препарата было определено математическое вида  $Q(K_m) = f_{Q(K_m)}(C_c)$ . Результаты представлены на Рисунке 6.

На основании особенностей влияния изменчивости константы Михаэлиса на кинетику ферментативного процесса было принято априорное утверждение о максимизации эффективности ферментативного процесса при минимизации критерия изменчивости.

В этой связи постулируем II условие оптимизации ферментативного процесса:

$$Q(K_m) \Big|_{\text{opt}} \rightarrow \min. \quad (9)$$

Анализ данных динамики критерия  $Q(K_m)$  показывает его нелинейное непрерывное изменение с увеличением концентрации комплексона.

При этом в каждом варианте динамики либо присутствует область локального минимума, либо имеет место полная минимизация критерия изменчивости при достижении некоторого максимального значения концентрации комплексона. Соответственно, наличие данных минимумов соответствует II постулируемому условию оптимизации.

Сравнительный анализ экстремумов  $V_{\max}$ , соответствующих I условию оптимизации, и экстремумов  $Q(K_m)$ , соответствующих II условию оптимизации, показывает их некоторое несовпадение по значениям концентрации комплексона (Таблица 1).

Следствием такого рода несовпадений является невозможность непосредственного определения оптимальных параметров декатионизации только лишь на основе комплексного анализа экстремумов  $V_{\max}$  и  $Q(K_m)$ .

В этой связи необходим некоторый компромисс. Для достижения его введём второй критерий — дискретный критерий оптимальности  $Z$ , интегрирующий оба постулируемых условия оптимизации ферментативного процесса:

$$Z = \frac{V_{\max}}{Q(K_m)} = \frac{f_{V_{\max}}(C_c)}{f_{Q(K_m)}(C_c)} = f_Z(C_c). \quad (10)$$

В соответствии с физическим смыслом и положением входящих в критерий параметров, постулируем III условие оптимизации:

$$Z \Big|_{\text{opt}} \rightarrow \max. \quad (11)$$

Согласно математическому описанию критерия  $Z$ , отражённому в формуле (10), в пределах каждого значения концентрации ферментного препарата существует как минимум одно значение критерия  $Z$ , удовлетворяющее III постулируемому условию:

$$Z_{\max} = f_Z(C_c) \Big|_{\max}. \quad (12)$$

В этом случае, в пределах каждого значения концентрации ферментного препарата существует одна определённая комбинация значений  $Z_{\max}$  и со-

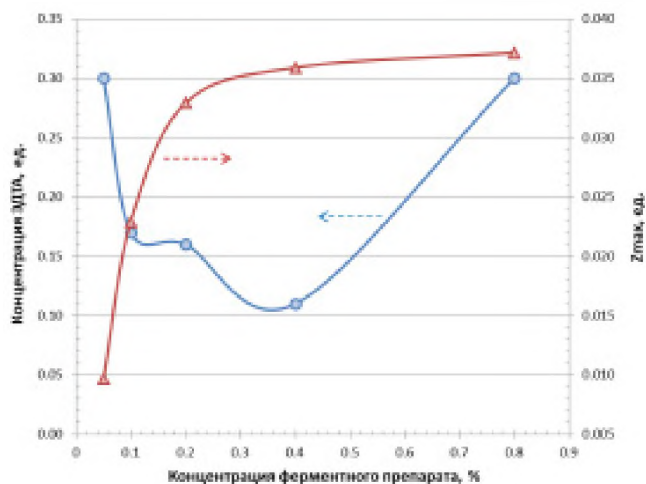
**Таблица 1**

Значения экстремумов в координатах «концентрация ЭДТА –  $V_{\max}$ » и «концентрация ЭДТА –  $Q(K_m)$ »

Концентрация RGL, %	Экстремумы по $V_{\max}$		Экстремумы по $Q(K_m)$	
	$V_{\max(\text{extr})}$	$C_c$	$Q(K_m)_{(\text{extr})}$	$C_c$
0.05	0.0271	0.320	2.797	0.272
0.10	0.0615	0.169	2.676	0.279
0.20	0.0915	0.151	2.697	0.910
0.40	0.1035	0.126	2.751	0.910
0.80	0.1063	0.176	2.784	0.410

**Рисунок 7**

Влияние концентрации ферментного препарата на критерий  $Z_{\max}$  и оптимальную концентрацию комплексона



ответствующего ему  $C_c|_{Z_{\max}}$ . Динамики  $Z_{\max}$  и  $C_c|_{Z_{\max}}$  в зависимости от концентрации RGL представлены на Рисунке 7.

Сравнительный анализ полученных данных, показывает, что если увеличению концентрации ферментного препарата соответствует монотонное нелинейное увеличение  $C_c|_{Z_{\max}}$  с постепенным замедлением прироста показателя, то в отношении динамики  $Z_{\max}$  всё сложнее — максимумы этого критерия приходится на противоположные границы интервала варьирования экспериментальных значений концентраций ферментного препарата, также имеет место локальный минимум, соответствующий концентрации RGL 0,36 %.

При этом в отношении последнего показателя может быть постулировано IV условие оптимизации:

$$Z_{\max} \Big|_{\text{opt}} \rightarrow \max. \quad (13)$$

Принимая во внимание, что при прочих равных условиях оптимальной является та комбинация концентрации комплексона для предварительной декатионизации субстрата и — ферментного препарата для осуществления непосредственно процесса ферментирования, при которой находят одновременное удовлетворение все четыре условия оптимизации при минимизации концентрации участвующих в процессе обработки активных ре-

агентов — комплексона и ферментного препарата. Для реализации этого условия введём комплексный критерий оптимальности декатионизации  $F$ :

$$F = \frac{Z_{\max}}{C_c|_{Z_{\max}} \cdot E}. \quad (14)$$

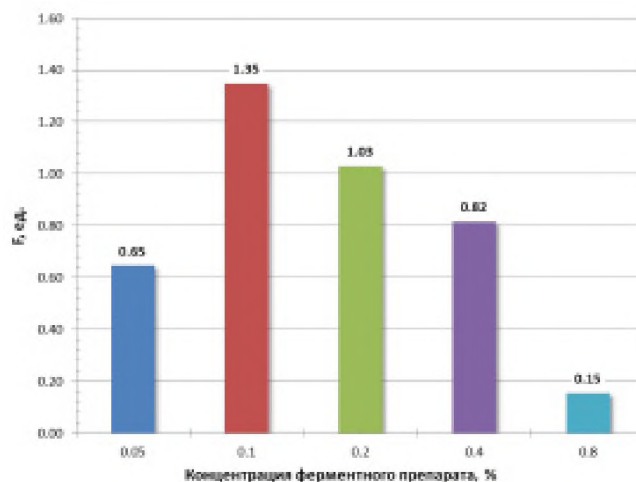
При этом однозначно оптимальным является та комбинация искомых факторов, которая соответствует максимуму данного критерия по вариантам концентрации ферментного препарата ( $F|_{\text{opt}} \rightarrow \max$ ).

Данные по влиянию концентрации фермента на критерий  $F$  представлены на Рисунке (8).

Сравнительный анализ значений критерия  $F$  показал, что однозначным оптимумом в отношении как расхода комплексона и ферментного препарата, так и в отношении кинетических показателей ферментативного процесса является концентрация RGL и комплексона 0,1% и 0,17 ед., соответственно. При этом остаётся открытым вопрос целесообразности предварительной декатионизации как необходимой составляющей процесса биотехнологической переработки растительного сырья. Ответом на него является анализ изменчивости критерия  $F$  по вариантам концентрации ферментного препарата. В случае отсутствия целесообразности декатионизации анализируемая изменчивость будет практически нивелирована в силу малого изменения кинетики ферментативного процесса при обработке растительной ткани комплексонам.

**Рисунок 8**

Влияние концентрации ферментного препарата на критерий  $F$



Для практической оценки целесообразности декатионизации формализуем процесс оценки изменчивости, сведя его в единый критерий. Логика такой формализации следующая. Большей изменчивости критерия  $F$  будет соответствовать большая площадь геометрической фигуры под кривой, соответствующей зависимости  $F = f_F(C)$ , за вычетом «холостой» площади, включающей прямоугольник шириной, равной интервалу области определения экспериментальных значений концентраций ферментного препарата, и высотой, равной минимальному значению ( $F_{\min}$ ) критерия  $F$  на данном интервале, —  $S_F$ :

$$S_F = \int_{E_1}^{E_2} F dE - F_{\min} \cdot (E_2 - E_1). \quad (15)$$

При этом практическая реализация процесса интегрирования — непрерывное либо дискретное — существенной роли не играет. На основании определённой площади находим приведённый прирост критерия  $F$  на интервале концентраций:

$$\Delta F_{av} = \frac{S_F}{E_2 - E_1}, \quad (16)$$

после чего соотносим полученное значение с максимальным значением функции  $F = f_F(E)$  (либо дискретное значение максимума критерия  $F$ ), определяя тем самым величину относительного прироста критерия  $F$  на интервале концентраций:

$$\Delta F_{rel} = \frac{\Delta F_{av}}{F_{\max}}. \quad (17)$$

Для удобства оперирования введём критерий оценки  $Q$ :

$$Q = 1 - \Delta F_{rel}. \quad (18)$$

В общем виде, объединяя формулы (15)–(18), после небольшого алгебраического упрощения получим конечную формулу расчёта критерия  $Q$ :

$$Q = \frac{(F_{\max} + F_{\min}) \cdot (E_2 - E_1) - \int_{E_1}^{E_2} F dE}{F_{\max} \cdot (E_2 - E_1)}. \quad (19)$$

В силу специфики физического содержания показателя  $\Delta F_{rel}$  и формулы (18), критическим значением критерия  $Q$ , при котором изменчивость показателя

$F$  по вариантам концентрации ферментного препарата практически отсутствует, составляет 0,98.

Значение  $Q \geq 0,98$  указывает на отсутствие целесообразности проведения декатионизации, и — наоборот.

В отношении динамики критерия  $F$  в диапазоне концентраций ферментного препарата  $Q = 0,574$ , что указывает на целесообразность проведения предварительной декатионизации свекловичного жома перед ферментативной обработкой гомоферментным препаратом RGL.

Разработанная система критериев позволяет решить сразу три актуальных задачи оптимизации ферментативного процесса:

- (1) определение целесообразности предварительной декатионизации;
- (2) определение оптимальной концентрации ферментного препарата;
- (3) определение оптимальной концентрации комплексона.

В основу методологии проведённых исследований положено ядро алгоритма определения оптимальной концентрации ферментных препаратов лизазного и гидролазного действия для ферментативной обработки растительного сырья, разработанного наших предыдущих исследованиях (Кондратенко с соавт., 2022б). При этом данный алгоритм был значительно усовершенствован с введением в него системы критериев определения целесообразности и оптимальных условий декатионизации сырья перед основной ферментативной обработкой.

## ВЫВОДЫ

В результате проведённых исследований было экспериментально установлено, что в процессе предварительной декатионизацией растительного сырья перед основной ферментативной обработкой концентрация комплексона оказывает нелинейное влияние на величину кинетического показателя  $V_{\max}$  как в каждой из использованных в работе фиксированных значений концентрации ферментного препарата, так и в их динамике. В этой связи для определения целесообразности и оптимальных параметров предварительной декатионизации была разработана и апробирована последовательность

нетривиальных критериев, позволяющая дать интегральную оценку процесса эффективности процесса ферментирования после предварительного частичного удаления катионов металлов в развёртке концентраций ферментного препарата с учётом наличия и выраженности его проявления. На основании результатов исследования был разработан алгоритм определения целесообразности и оптимальных параметров предварительной декатионизации растительного сырья перед ферментативной обработкой. Данный алгоритм является значительно переработанной и усовершенствованной версией алгоритма определения параметров ферментативной кинетики, оптимальной концентрации и продолжительности процесса ферментирования для гомоферментных препаратов групп лиаз и гидролаз на основе экспериментальных данных динамики косвенного показателя, коррелирующего с молярной концентрацией продукта реакции, разработанного авторами в результате предыдущего этапа исследований (Kondratenko, Petrov et al., 2022). В результате разработанная система критериев позволяет решать сразу три задачи — определение целесообразности предварительной декатионизации, оптимальные концентрации комплексона и гомоферментного препарата. Разработанные критерии и алгоритм в целом позволяют получать адекватную оценку процесса декатионизации в отношении последующей биотехнологической трансформации протопектинового комплекса растительного гомоферментными препаратами лиазного и гидролазного действия. Предположительно, разработанный авторами подход является универсальным в силу сходственности общей структуры протопектинового комплекса растительной ткани и особенностей

ферментализации его основной — рамногалактуроновой — цепи.

Данное исследование является органичным этапом большого комплекса многолетних исследований авторов, нацеленных на разработку единой парадигмы формирования технологических процессов получения пектина и пектинопродуктов с прогнозируемыми потребительскими свойствами из растительного сырья с учётом максимизации использования ресурсного потенциала.

Соответственно, на следующем этапе исследований необходимо, опираясь на полученные результаты, разработать систему формирования технологических процессов глубокой переработки растительного сырья для получения продуктов направленной фрагментации протопектинового комплекса матрикса клеточных стенок на основе дерева принятия решений.

## АВТОРСКИЙ ВКЛАД

**Кондратенко Владимир Владимирович:** научное руководство исследованием, концептуализация, разработка методологии исследования, написание — рецензирование и редактирование рукописи.

**Татьяна Юрьевна Кондратенко:** проведение исследования, верификация данных, формальный анализ — применение статистических и математических методов, визуализация, написание — подготовка черновика рукописи, подготовка и создание рукописи.

## ЛИТЕРАТУРА

- Иванова, Ю. В. (2022). Ферменты глазами реставраторов, или остроумный и изобретательный идадьго Дон-Кихот Ламанчский. Художественное наследие. Исследования. Реставрация. Хранение, (4), 7–20.
- Кондратенко, В. В., Петров, А. Н., & Кондратенко, Т. Ю. (2022a). Основные представления о кинетике ферментативных процессов и подходах к её определению. Всё о мясе, (6), 12–19. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2022-6-12-19>
- Кондратенко, В. В., Петров, А. Н., & Кондратенко, Т. Ю. (2022b). Разработка методов определения оптимальной концентрации ферментов на основании анализа динамики ферментирования. Пищевая промышленность, (11), 67–74. <https://doi.org/10.52653/PPI.2022.11.11.016>
- Кондратенко, В. В., Царёва, М. А., Кондратенко, Т. Ю., Давыдова, А. Ю., & Алабина, Н. М. (2018). О декатионизации пектинсодержащего сырья на примере свекловичного жома. Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия, 21, 42–48.
- Dhillon, A., Fernandes, V. O., Dias, F. M. V., Prates, J. A. M., Ferreira, L. M. A., Fontes, C. M. G. A., Centeno, M. S., & Goyal, A. (2016). A new member of family 11 polysaccharide lyase, rhamnogalacturonan lyase (CtRGLf) from *Clostridium thermocellum*. *Molecular Biotechnology*, 58, 232–240. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9921-6>
- Fujimoto, Z., Jackson, A., Michikawa, M., Maehara, T., Momma, M., Henrissat, B., Gilbert, H. J., & Kaneko, S. (2013). The



- structure of a streptomyces avermitilis  $\alpha$ -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 12376–12385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460097>
- Furusawa, G., Azami, N. A., & The, A.-H. (2021). Genes for degradation and utilization of uronic acid-containing polysaccharides of a marine bacterium *Catenovulum* sp. CCB-QB4. *PeerJ*, 9, Article 10929. <http://doi.org/10.7717/peerj.10929>
- Iwai, M., Yamada, H., Ikemoto, T., Matsumoto, S., Fujiwara, D., Takenaka, S., & Sakamoto, T. (2015). Biochemical characterization and overexpression of an endo-rhamnogalacturonan lyase from *penicillium chrysogenum*. *Molecular Biotechnology*, 57(6), 539–548. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9847-4>
- Jensen, M. H., Otten, H., Christensen, U., Borchert, T. V., Christensen, L. L. H., Larsen, S., & Leggi, L. L. (2010). Structural and biochemical studies elucidate the mechanism of rhamnogalacturonan lyase from *aspergillus aculeatus*. *Journal of Molecular Biology*, 404(1), 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.013>
- Joslyn, M. A. (1963). The chemistry of protopectin: A critical review of historical data and recent developments. *Advances in Food Research*, 11, 1–107. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60064-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60064-6)
- Laatu, M., & Condemine, G. (2003). Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the out system in *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1642–1649. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1642-1649.2003>
- Mandake, M. B., Das, U., Phad, L., & Busamwar, S. (2020). Application of enzyme immobilization in the food industry. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 7(2), 6–10. <http://dx.doi.org/10.20431/2349-0403.0702002>
- Morales-Quintana, L., Ramos, P., & Méndez-Yáñez, A. (2022). Rhamnogalacturonan endolyase family 4 enzymes: An update on their importance in the fruit ripening process. *Horticulturae*, 8(5), 465. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050465>
- Ochiai, A., Itoh, T., Kawamata, A., Hashimoto, W., & Murata, K. (2007). Plant cell wall degradation by saprophytic *Bacillus subtilis* strains: Gene clusters responsible for rhamnogalacturonan depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3803–3813. <https://doi.org/10.1128/aem.00147-07>
- O'Neill, E. C., Stevenson, C. E., Paterson, M. J., Rejzek, M., Chauvin, A. L., Lawson, D. M., & Field, R. A. (2015). Crystal structure of a novel two domain GH78 family  $\alpha$ -rhamnosidase from *Klebsiella oxytoca* with rhamnose bound. *Protein*, 83(9), 1742–1749. <https://doi.org/10.1002/prot.24807>
- Patadiya, N., Panchal, N., & Vaghela, V. (2021). A Review on enzyme inhibitors. *International Research Journal of Pharmacy*, 12(6), 60–66. <http://doi.org/10.7897/2230-8407.1206145>
- Rimareva, L. V., Serba, E. M., Sokolova, E. N., Borshcheva, Yu. A., & Ignatova, N. I. (2017). Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry. *Problems of Nutrition*, 86(5), 62–74. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2017-00078>
- Robin, T., Reuveni, S., & Urbakh, M. (2018). Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nature Communications*, 9, Article 779. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02995-6>
- Seltman, Y. J. (2018). *Experimental design and analysis*. Pittsburgh: Carnegie Mellon University.
- Silva, I. R., Larsen, D. M., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2011). Identification, expression, and characterization of a novel bacterial RGI lyase enzyme for the production of bio-functional fibers. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.04.015>
- Wang, W., Wang, Y., Yi, H., Liu, Y., Zhang, G., Zhang, L., Mayo, K. H., Yuan, Y., & Zhou, Y. (2022). Biochemical characterization of two rhamnogalacturonan lyases from *bacteroides ovatus* ATCC 8483 with preference for RG-I substrates. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 799875. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.799875>
- Yuan, Y., Zhang, X.-Y., Zhao, Y., Zhang, H., Zhou, Y.-F., & Gao, J. (2019). A Novel PL9 pectate lyase from *paenibacillus polymyxa* KF-1: Cloning, expression, and its application in pectin degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), Article 3060. <https://doi.org/10.3390/ijms20123060>
- Zhang, Y., Ren, H., Wang, Y., Chen, K., Fang, B., & Wang, S. (2016). Bioinspired immobilization of glycerol dehydrogenase by metal ion-chelated polyethyleneimines as artificial polypeptides. *Scientific Reports*, 6, Article 24163. <https://doi.org/10.1038/srep24163>

## REFERENCES

- Ivanova, Yu. V. (2022). Fermenty glazami restavratorov, ili ostroumnyi i izobretatel'nyi idal'go Don-Kikhot Lamanchskii [Enzymes through the eyes of restorers, or the witty and inventive Hidalgo Don Quixote of La Mancha]. *Khudozhestvennoe nasledie. Issledovaniya. Restavratsiya. Khranenie* [Artistic Heritage. Researches. Restoration. Keeping], (4), 7–20.
- Kondratenko, V. V., Petrov, A. N., & Kondratenko, T. Yu. (2022a). Osnovnye predstavleniya o kinetike fermentativnykh protsessov i podkhodakh k ee opredeleniyu [Basic ideas about the kinetics of enzymatic processes and approaches to its definition]. *Vse o myase* [All about Meat], (6), 12–19. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2022-6-12-19>
- Kondratenko, V. V., Petrov, A. N., & Kondratenko, T. Yu. (2022b). Razrabotka metodov opredeleniya optimal'noi kontsentratsii fermentov na osnovanii analiza dinamiki fermentirovaniya [Development of methods for determining the optimal concentration of enzymes based on the analysis of the dynamics of fermentation]. *Pishchevaya*

- promyshlennost'* [Food Industry], (11), 67–74. <https://doi.org/10.52653/PPI.2022.11.11.016>
- Kondratenko, V. V., Tsareva, M. A., Kondratenko, T. Yu., Davydova, A. Yu., & Alabina, N. M. (2018). O dekationizatsii pektinsoderzhashchego syr'ya na primere sveklovichnogo zhoma [On decationization of pectin-containing raw materials on the example of beet pulp]. *Nauchnye trudy Severo-Kavkazskogo federal'nogo nauchnogo tsentra sadovodstva, vinogradarstva, vinodeliya* [Scientific Works of the North Caucasus Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking], 21, 42–48.
- Dhillon, A., Fernandes, V. O., Dias, F. M. V., Prates, J. A. M., Ferreira, L. M. A., Fontes, C. M. G. A., Centeno, M. S., & Goyal, A. (2016). A new member of family 11 polysaccharide lyase, rhamnogalacturonan lyase (CtRGLf) from *Clostridium thermocellum*. *Molecular Biotechnology*, 58, 232–240. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9921-6>
- Fujimoto, Z., Jackson, A., Michikawa, M., Maehara, T., Momma, M., Henrissat, B., Gilbert, H. J., & Kaneko, S. (2013). The structure of a streptomyces avermitilis  $\alpha$ -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 12376–12385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460097>
- Furusawa, G., Azami, N. A., & The, A.-H. (2021). Genes for degradation and utilization of uronic acid-containing polysaccharides of a marine bacterium *Catenovulum* sp. CCB-QB4. *PeerJ*, 9, Article 10929. <http://doi.org/10.7717/peerj.10929>
- Iwai, M., Yamada, H., Ikemoto, T., Matsumoto, S., Fujiwara, D., Takenaka, S., & Sakamoto, T. (2015). Biochemical characterization and overexpression of an endo-rhamnogalacturonan lyase from *penicillium chrysogenum*. *Molecular Biotechnology*, 57(6), 539–548. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9847-4>
- Jensen, M. H., Otten, H., Christensen, U., Borchert, T. V., Christensen, L. L. H., Larsen, S., & Leggi, L. L. (2010). Structural and biochemical studies elucidate the mechanism of rhamnogalacturonan lyase from *aspergillus aculeatus*. *Journal of Molecular Biology*, 404(1), 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.013>
- Joslyn, M. A. (1963). The chemistry of protopectin: A critical review of historical data and recent developments. *Advances in Food Research*, 11, 1–107. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60064-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60064-6)
- Laatu, M., & Condemine, G. (2003). Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the out system in *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1642–1649. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1642-1649.2003>
- Mandake, M. B., Das, U., Phad, L., & Busamwar, S. (2020). Application of enzyme immobilization in the food industry. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 7(2), 6–10. <http://dx.doi.org/10.20431/2349-0403.0702002>
- Morales-Quintana, L., Ramos, P., & Méndez-Yáñez, A. (2022). Rhamnogalacturonan endolyase family 4 enzymes: An update on their importance in the fruit ripening process. *Horticulturae*, 8(5), 465. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050465>
- Ochiai, A., Itoh, T., Kawamata, A., Hashimoto, W., & Murata, K. (2007). Plant cell wall degradation by saprophytic *Bacillus subtilis* strains: Gene clusters responsible for rhamnogalacturonan depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3803–3813. <https://doi.org/10.1128/aem.00147-07>
- O'Neill, E. C., Stevenson, C. E., Paterson, M. J., Rejzek, M., Chauvin, A. L., Lawson, D. M., & Field, R. A. (2015). Crystal structure of a novel two domain GH78 family  $\alpha$ -rhamnosidase from *Klebsiella oxytoca* with rhamnose bound. *Protein*, 83(9), 1742–1749. <https://doi.org/10.1002/prot.24807>
- Patadiya, N., Panchal, N., & Vaghela, V. (2021). A Review on enzyme inhibitors. *International Research Journal of Pharmacy*, 12(6), 60–66. <http://doi.org/10.7897/2230-8407.1206145>
- Rimareva, L. V., Serba, E. M., Sokolova, E. N., Borshcheva, Yu. A., & Ignatova, N. I. (2017). Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry. *Problems of Nutrition*, 86(5), 62–74. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2017-00078>
- Robin, T., Reuveni, S., & Urbakh, M. (2018). Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nature Communications*, 9, Article 779. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02995-6>
- Seltman, Y. J. (2018). *Experimental design and analysis*. Pittsburgh: Carnegie Mellon University.
- Silva, I. R., Larsen, D. M., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2011). Identification, expression, and characterization of a novel bacterial RGI lyase enzyme for the production of bio-functional fibers. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.04.015>
- Wang, W., Wang, Y., Yi, H., Liu, Y., Zhang, G., Zhang, L., Mayo, K. H., Yuan, Y., & Zhou, Y. (2022). Biochemical characterization of two rhamnogalacturonan lyases from *bacteroides ovatus* ATCC 8483 with preference for RG-I substrates. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 799875. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.799875>
- Yuan, Y., Zhang, X.-Y., Zhao, Y., Zhang, H., Zhou, Y.-F., & Gao, J. (2019). A Novel PL9 pectate lyase from *paenibacillus polymyxa* KF-1: Cloning, expression, and its application in pectin degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), Article 3060. <https://doi.org/10.3390/ijms20123060>
- Zhang, Y., Ren, H., Wang, Y., Chen, K., Fang, B., & Wang, S. (2016). Bioinspired immobilization of glycerol dehydrogenase by metal ion-chelated polyethyleneimines as artificial polypeptides. *Scientific Reports*, 6, Article 24163. <https://doi.org/10.1038/srep24163>