

## НОВЫЙ КОМПЛЕКСНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ЭКЗО-ИНУЛИНАЗЫ И ПЕКТИНЛИАЗЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ ТОПИНАМБУРА

© 2023 г. А. М. Рожкова<sup>1, \*</sup>, Ю. А. Денисенко<sup>1</sup>, Е. С. Милова<sup>2</sup>, И. Н. Зоров<sup>1, 2</sup>,  
О. А. Сеницына<sup>2</sup>, Е. В. Ярошенко<sup>3</sup>, А. П. Сеницын<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Химический факультет, Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>ООО “ИстАгроДон”, Данков, Липецкая область, 399850 Россия

\*e-mail: amrojtkova@yahoo.com

Поступила в редакцию 21.09.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 30.10.2023 г.

Фруктозо-глюкозные сиропы (ФГС) широко применяются в пищевой промышленности в качестве подсластителей. Использование для их получения инулодержашего сырья, к которому относится топинамбур, приводит к увеличению доли фруктозы в конечном продукте до 80–85%, что позволяет отнести ФГС к натуральным сахарозаменителям. Современное производство ФГС в РФ основано на применении фермента экзо-инулиназы (КФ 3.2.1.80), гидролизующего β-2,1-гликозидные связи молекулы инулина с получением фруктозы и глюкозы. На практике ферментный препарат на основе этого фермента добавляют в ферментаторы к экстрагированному диффузионному соку топинамбура (ДСТ) перед стадией микрофльтрации. Однако помимо основного полисахарида – инулина (75–80%), ДСТ содержит пектин (до 5%), что создает дополнительную нагрузку на микрофльтрационную установку в связи с вязкостью ферментализатов топинамбура. На основе грибного штамма *Penicillium verruculosum* InuPel-10 был получен комплексный ферментный препарат (ФП) экзо-инулиназы/пектинлиазы, обеспечивающий снижение вязкости экстрактов топинамбура на 17–20%, при этом выход восстанавливающих сахаров в ходе гидролиза при помощи ФП экзо-инулиназы/пектинлиазы увеличился на 10%. Использование комплексного ФП InuPel-10 в производстве ФГС позволит сократить расходы на ФП на 10–16% за счет снижения операционных расходов, связанных с более полной загруженностью технологической линии получения этого ФП в отличие от производства индивидуальных ферментов и их дальнейшего смешивания в необходимой пропорции.

**Ключевые слова:** *Penicillium verruculosum*, экзо-инулиназа, пектинлиаза, топинамбур, ФГС

DOI: 10.56304/S0234275823050101

Фруктозо-глюкозные сиропы (ФГС) используются в пищевой промышленности в качестве подсластителей с середины семидесятых годов прошлого века и пользуются устойчивым спросом на мировом рынке [1].

Топинамбур (*Helianthus tuberosus*) – доступная сельскохозяйственная культура, которую выращивают в России в основном в Брянской, Костромской, Волгоградской, Липецкой, Нижегородской, Московской, Рязанской, Омской, Саратовской, Тульской, Тверской, Ярославской, Ульяновской

областях, республике Чувашия, Ставропольском и Краснодарском краях [2]. Топинамбур достаточно устойчив к различным климатическим условиям и обладает высокой урожайностью.

Инулин – запасной полисахарид топинамбура, представляющий собой линейную молекулу, состоящую из остатков фруктозы, соединенных β-2,1-гликозидными связями. Инулин содержится в клубнях топинамбура в количестве до 37% (табл. 1) [3]. Это делает топинамбур перспективной культурой в качестве источника этого полисахарида для производства ФГС методом ферментативного гидролиза [4–6].

Экзо-инулиназы (КФ 3.2.1.80) последовательно отщепляют концевые остатки фруктозы в мо-

Список сокращений: ВС – восстанавливающие сахара, ДСТ – диффузионный сок топинамбура, КЖ – культуральная жидкость, ФГС – фруктозо-глюкозный сироп, ФП – ферментный препарат, СВ – сухое вещество.

**Таблица 1.** Полисахаридный состав клубней топинамбура по СВ, %  
**Table 1.** Polysaccharide composition of Jerusalem artichoke tubers, %

Наименование компонента	Массовая доля, %	
	раннеспелый сорт	позднеспелый сорт
Белки	11.3	10.5
Зола	8.6	8.8
Инулин	35.0	37.1
Моносахариды	26.3	23.6
Пектины	3.7	4.5
Гемицеллюлозы	4.0	4.2
Целлюлозы	11.1	11.2

лекуле инулина. Природным продуцентом экзоинулиназы является мицелиальный гриб *Aspergillus awamori*, однако он обладает низкой продуктивностью, поэтому ген *inu1 A. awamori*, кодирующий этот фермент, был ранее клонирован и экспрессирован в системе гриба *Penicillium verruculosum* [7]. В результате был получен рекомбинантный штамм *P. verruculosum* INU13, секретирующий экзо-инулиназу *A. awamori* с активностью 2500–3000 ед/мл по отношению к инулину топинамбура [8]. На основе штамма *P. verruculosum* INU13 был получен ферментный препарат (ФП) “Топилаза К”, успешно применяющийся при производстве ФГС на заводе “ИстАгро Дон” (г. Данков, Липецкая обл., РФ).

В состав клубней топинамбура входит также пектин (табл. 1), являющийся гелеобразователем и затрудняющий фильтрацию диффузионного сока топинамбура (ДСТ) после ферментативного гидролиза под действием экзо-инулиназы. Пектинлиаза (КФ 4.2.2.10) – гликозилгидролаза, расщепляющая по механизму β-элиминирования α-1,4-гликозидную связь между остатками галактуроновой кислоты с образованием Δ-4,5-ненасыщенного продукта [9]. Из-за того, что в процессе деструкции пектина не образуется метанол, пектинлиазу, в отличие от других пектолитических ферментов, используют в пищевой промышленности для осветления фруктовых и ягодных соков, а также при изготовлении виноматериалов. Ранее, нами был получен ФП пектинлиазы *P. canescens* в системе экспрессии гриба *P. verruculosum* [10], который успешно применялся при осветлении яблочного сока [11], гидролизе свекловичного жома и яблочных выжимок [12–14], а также при получении виноматериала из плодово-ягодного сырья [15, 16].

Целью данной работы являлось получение комплексного ФП, обладающего одновременно экзоинулиназной и пектинлиазной активностями для увеличения выхода ФГС и снижения вязкости диффузионного сока топинамбура на стадии ферментации.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы и среды

Для получения рекомбинантных штаммов серии *P. verruculosum* InuPel был использован реципиентный штамм мицелиального гриба *P. verruculosum* 537, дефектный по гену нитратредуктазы (*ΔniaD*) [17].

Состав питательной среды для скрининга грибных штаммов в качалочных колбах (СС, г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 10;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.3;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.3; дрожжевой экстракт – 10; целлюлоза (МКЦ 112) – 40; пшеничные отруби – 10.

Состав среды для культивирования грибных штаммов в ферментерах (СФ, г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 14;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 10;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.6;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.6; кукурузный экстракт – 30; целлюлоза (МКЦ 112) – 40; пшеничные отруби – 10, глюкоза моногидрат – 44, мочевины – 2.5, пеногаситель (лапрол) – 16 капель.

Для приготовления буферных растворов и ферментационных сред использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а. и о.с.ч. производства “Хеликон” и “Реахим” (Россия), а также Pharmacia (Швеция) и Sigma-Aldrich (США).

### Трансформация *P. verruculosum* 537 и отбор рекомбинантных штаммов серии *P. verruculosum* InuPel

Трансформацию реципиентного штамма *P. verruculosum* 537, ауксотрофного по гену *niaD*, проводили по  $\text{CaCl}_2$ -ПЭГ модифицированной методике [18]. Для этого плазмиду pPel, несущую ген *pela P. canescens* [10], плазмиду pInu1-G338A, несущую мутированный ген *inu1 A. awamori* [19] и плазмиду pSTA10, ген *niaD A. nidulans* [18] смешивали в соотношении 3 : 3 : 1 мкг ДНК с протопластами штамма *P. verruculosum* 537 в количестве  $3 \times 10^6$  протопластов. Трансформанты серий *P. verruculosum* InuPel

отбирали на селективных агаризованных средах с 10 мМ нитрата натрия.

Скрининг трансформантов проводили в колбах Эрленмейера со 100 мл среды СС. В качестве контроля использовали реципиентный штамм *P. verrucosum* 537. Отбор трансформантов проводили по критерию увеличения инулиназной и пектинлиазной активностей в культуральной жидкости (КЖ) грибных штаммов через 144 ч культивирования в сравнении с контролем.

Получение ФП осуществляли с использованием 3 л ферментеров КФ-108 фирмы ООО “Принтех” (Россия) на среде СФ. Культивирование проводили в течение 144 ч при 32°C и pH 4.5 с дробной подпиткой глюкозой (каждые 12 ч, начиная с 48 ч), с тремя добавками МКЦ и одной добавкой минеральных солей. После завершения процесса КЖ центрифугировали при 3300 g в течение 1 ч на центрифуге Avanti J-26 (Beckman Coulter, США) для удаления биомассы и нерастворимых компонентов питательной среды. Получение сухих ФП осуществляли путем высушивания супернатанта, полученного после центрифугирования КЖ, с помощью распылительной сушилки Buchi Mini Spray Dyer B-290 (Buchi, Швейцария). Подачу супернатанта в распылительную головку сушилки проводили с помощью перистальтического насоса со скоростью 10 мл/мин. Процесс высушивания происходил при выставленном значении ротаметра 40 ед., входящей температуре 135°C, выходящей температуре 60°C и степени аспирации 70% [20].

#### *Идентификация ферментов и денситометрический анализ*

Идентификацию ферментов проводили путем обработки трипсином вырезанных образцов геля, соответствующих по массе целевым ферментам после проведения электрофореза, с последующим картированием полученных пептидов методом МАЛДИ масс-спектрометрии [21], используя масс-спектрометр UltrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, ФРГ). Анализ полученных данных осуществляли с помощью онлайн-сервиса FindPept (<https://web.expasy.org/findpept/>).

Для количественной оценки содержания ферментов в ФП использовали денситометрический метод. С помощью программного обеспечения *GelAnalyzer 10* были проанализированы интенсивность и ширина каждой из полос в геле после проведения белкового электрофореза в соответствии с руководством пользователя.

#### *Определение активности ферментов*

Активность ФП и гомогенных ферментов по отношению к инулину топинамбура (“Реахим”, Россия), ксилану бука (Megazyme, Ирландия), МКЦ (ТУ 20.16.59-001-40693384-209 производства “Кри-

стацелл”, Россия) и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ, Sigma, США) при их концентрации в реакционной смеси 5 г/л определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) из этих субстратов модифицированным методом Шомоди-Нельсона [22]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль ВС за 1 мин при 50°C, pH 5.0 [23].

Активность по отношению к *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозиду (*n*НФГ) (0.9 мМ в реакционной смеси) определяли по скорости образования *n*-нитрофенола в качестве продукта при 50°C и pH 5.0, через 10 мин реакцию останавливали с помощью 1 М раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль *n*-нитрофенола в минуту [24].

Пектинлиазную активность определяли методом, основанным на измерении начальной скорости накопления  $\Delta$ -4,5-ненасыщенных продуктов деструкции цитрусового пектина [25]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое необходимо для образования 1 мкмоль продукта за 1 мин. Количество  $\Delta$ -4,5-ненасыщенных продуктов рассчитывали, используя коэффициент молярного поглощения, равный 5500 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

Концентрацию белка определяли методом Лоури [26], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта, а также по оптической плотности при 280 нм на спектрофотометре Varian Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies, США).

#### *Определение температурной стабильности ферментов*

Изучение термостабильности ФП проводили измеряя остаточную активность по отношению к субстрату. Раствор ФП (1–5 мкг/мл) в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.0 инкубировали при 60 и 65°C. Через определённые временные интервалы отбирали аликвоты фермента, быстро охлаждали и определяли активность как описано выше.

#### *Получение диффузионного сока топинамбура (ДСТ) и определение вязкости растворов*

Топинамбур (Липецкая область, Россия) промывали водой, очищали, отделяли кожицу. Резали клубни на стружку толщиной 3–5 мм. Экстракцию проводили горячей водой при 70–80°C в течение 10 мин. Процедуру экстракции повторяли дважды.

Для измерения вязкости ДСТ использовали капиллярный стеклянный вискозиметр ВПЖ-4 (“Экохим”, Россия). Вискозиметр термостатировали при 40°C или 55°C, вносили 6 мл ДСТ и инкубировали при заданной температуре в течение

пяти мин. Определяли время истечения ДСТ при помощи секундомера.

#### Определение состава продуктов ферментализации

За составом продуктов ферментализации следили при помощи метода ВЭЖХ с использованием хроматографической системы высокого разрешения Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с бинарным насосом G1312B и автоматическим пробоотборником для микропланшетов G1377A. Детекцию вели с помощью электрохимического детектора ESA Coulochem III (ESA, США) в режиме пульсирующей амперометрии, использовали электрохимическую ячейку 5040 с золотым электродом. Разделение проводили на колонке Dionex Carborac PA200 3 × 250 мм, оснащенной префильтром Dionex CarboPac PA200 3 × 50 мм (Thermo Fisher Scientific, США). Скорость потока — 0,3 мл/мин, элюент А: NaOH 100 мМ, элюент В: NaOH 100 мМ + 500 мМ ацетат натрия. Программа элюции: А — 0–4 мин, 4–30 мин — линейный градиент до 60% В, 30–32 мин — градиент до 90% В, 32–34 мин — 90% В, 34–54 мин — элюент А. Объем вводимой пробы — 1 мкл с дополнительной промывкой иглы. Идентификацию и расчет концентрации сахаров проводили, сравнивая время удерживания и площадь пика со стандартами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение рекомбинантных штаммов серии *P. verruculosum InuPel*

Реципиентный ауксотрофный штамм *P. verruculosum* 537 ( $\Delta$ iaD) был одновременно трансформирован тремя плазмидами rPel, rInu1-G338A и rSTA10, из которых rPel и rInu1-G338A являлись целевыми плазмидами с генами *pela* *P. canescens* и *inu1* *A. awamori*, а rSTA10 обеспечивала возврат рекомбинантных штаммов к прототрофности и, соответственно, селекцию их на среде с 0,01 М NaNO<sub>3</sub>. Следует отметить, что в данном эксперименте был использован мутированный ген *inu1*, позволяющий вносить точечную замену G338A в белковую глобулу экзо-инулиназы *A. awamori*. По ранее полученным данным замена G338A увеличивала термостабильность экзо-инулиназы, соответственно повышая температуру плавления ( $T_m$ ) на 3,5°C за счет увеличения жесткости  $\alpha$ -спирали в белковой глобуле экзо-инулиназы (без изменения ее кинетических параметров [19]). Частота котрансформации составила в среднем 7–8 трансформантов на 1 мкг смеси ДНК, что соответствует стандартной частоте трансформации штамма *P. verruculosum* 537 при использовании CaCl<sub>2</sub>–ПЭГ методики [12].

В результате было получено 45 трансформантов, из которых проанализировали 15, обозначен-

ных InuPel (1–15). Скрининг трансформантов осуществляли в качалочных колбах с использованием 100 мл среды СС. На 6 сутки культивирования были отобраны КЖ для проведения электрофоретического анализа и определения ферментативных активностей.

В табл. 2 приведены удельные ферментативные активности по отношению к инулину топинамбура и цитрусовому пектину, а также концентрации белка, измеренные в КЖ штаммов *P. verruculosum* InuPel (1–15) в сравнении с контрольным реципиентным штаммом *P. verruculosum* 537.

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что анализируемые трансформанты обладали различным набором целевых (инулиназной и пектинлиазной) активностей, критерием отбора клонов для дальнейшего исследования являлось наличие максимальной инулиназной и пектинлиазной активностей. Были отобраны 4 штамма: InuPel-3, InuPel-7, InuPel-9 и InuPel-10.

### Активность сухих комплексных ФП InuPel-3, InuPel-7, InuPel-9 и InuPel-10

Сухие ФП InuPel-3, InuPel-7, InuPel-9 и InuPel-10 были получены после культивирования отобранных штаммов на ферментационных установках КФ-108. На ПААГ-электрофореграммах этих ФП (рис. 1) отчетливо видны полосы пектинлиазы (40 кДа) и экзо-инулиназы (56 кДа) — молекулярные массы этих ферментов были определены нами ранее в работах [12].

Для дополнительного подтверждения гетерологичной экспрессии целевых ферментов был проведен масс-спектрометрический анализ, который определил соответствие структуры пептидов, полученных после трипсинолиза, искомым пептидам инулиназы *A. awamori* и пектинлиазы *P. canescens*.

В сухих ФП были определены удельные активности пектинлиазы и экзо-инулиназы, а также активности по отношению к стандартным полисахаридным субстратам: КМЦ, МКЦ и ксилану бука, а также nНФГ. Данные субстраты характеризуют активность основных компонентов целлюлазного комплекса: эндо- и экзо-деполимераз и ксиланазы, а также  $\beta$ -глюкозидазы (табл. 3).

ФП серии InuPel обладают разным соотношением удельных активностей инулиназы и пектинлиазы. Наибольшей (50 ед/мг) активностью по отношению к инулину топинамбура обладал ФП InuPel-10, активность по цитрусовому пектину была наиболее высокой в ФП InuPel-9 (2,49 ед/мг). Ранее нами было показано, что разница в соотношении гетерологичных активностей в рекомбинантных штаммах и, соответственно, в получаемых с их помощью ФП, объясняется количеством копий при встраивании гетерологичных генов в геном штамма-реципиента [27].

**Таблица 2.** Удельные ферментативные активности в КЖ рекомбинантных штаммов серии InuPel и контрольного штамма-реципиента

**Table 2.** Specific enzymatic activities in culture liquids of recombinant strains of the InuPel series and the control recipient strain

Номер клона	Белок, мг/мл	Ферментативная активность, ед/мг	
		Субстраты	
		цитрусовый пектин	инулин топинамбура
InuPel-1	6.0 ± 0.3	–	13.3 ± 0.7
InuPel-2	7.1 ± 0.4	0.7 ± 0.3	0.20 ± 0.02
InuPel-3	3.5 ± 0.2	2.9 ± 0.4	30.0 ± 0.7
InuPel-4	7.8 ± 0.4	–	3.9 ± 0.2
InuPel-5	4.5 ± 0.2	1.9 ± 0.3	11.0 ± 0.1
InuPel-6	5.8 ± 0.3	–	41 ± 2
InuPel-7	8.4 ± 0.4	5 ± 2	10.7 ± 0.5
InuPel-8	2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1	8.1 ± 0.4
InuPel-9	5.0 ± 0.2	2.6 ± 0.3	4.4 ± 0.2
InuPel-10	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.4	28 ± 1
InuPel-11	5.8 ± 0.3	–	6.5 ± 0.3
InuPel-12	11.2 ± 0.6	–	0.23 ± 0.02
InuPel-13	5.9 ± 0.3	–	0.21 ± 0.01
InuPel-14	6.9 ± 0.3	–	0.13 ± 0.01
InuPel-15	11.5 ± 0.6	–	7.6 ± 0.4
Контроль, ФП-537	2.3 ± 0.1	–	0.24 ± 0.01

**Таблица 3.** Удельная активность комплексных и контрольного ферментных препаратов (ед/мг белка) и содержание в них целевых ферментов (%)

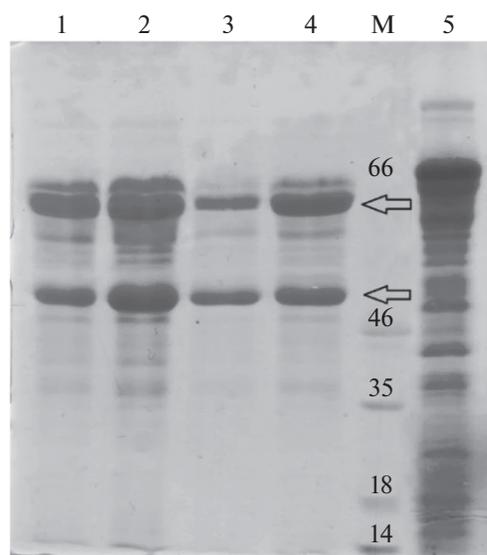
**Table 3.** Specific activity of complex and control enzyme preparations (units/mg protein) and the content of target enzymes in them (%)

ФП	Белок, мг/г	Субстраты						Ину. %	Пел. %
		КМЦ	ксилан	nНФГ	МКЦ	пектин	инулин		
InuPel-3	426 ± 21	6.9 ± 0.3	5.3 ± 0.3	2.6 ± 0.1	0.45 ± 0.04	1.51 ± 0.04	45 ± 5	55	24
InuPel-7	453 ± 27	5.1 ± 0.3	7.0 ± 0.2	2.7 ± 0.2	0.54 ± 0.05	2.06 ± 0.05	40 ± 2	41	35
InuPel-9	229 ± 9	2.9 ± 0.2	3.9 ± 0.3	3.4 ± 0.2	0.38 ± 0.05	2.49 ± 0.09	35 ± 2	48	30
InuPel-10	349 ± 17	2.5 ± 0.2	2.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.55 ± 0.06	2.09 ± 0.07	50 ± 7	55	22
К 537	490 ± 30	7.2 ± 0.8	9.8 ± 1.0	1.7 ± 0.1	2.5 ± 0.3	–	0.04 ± 0.01	–	–

Следует отметить, что целлюлазные и ксиланазная активности в комплексных ферментных препаратах серии InuPel в целом снизились (более, чем в 2.5 раза), что характерно для ФП, имеющих в своем составе гетерологичные ферменты. Так, например, удельные активности по МКЦ, КМЦ и березовому ксилану в комплексных ФП, в состав которых входили гетерологичные пектинлиаза и полигалактуроназа, снизились в 2.1, 3.8 и 1.9 раз соответственно [12].

*Термостабильность экзо-инулиназы и пектинлиазы в составе новых комплексных ферментных препаратов*

Технологическая стадия гидролиза ДСТ экзо-инулиназой (ФП “Топилаза К”) на производстве при получении ФГС (ООО “ИстАгроДон”, Липецкая обл., г. Данков) проводится при температуре 60–65°C в течение 60 мин. Относительно высокая температура процесса обусловлена необходимостью



**Рис. 1.** Электрофореграмма ферментных препаратов. 1 – ФП InuPel-3, 2 – ФП InuPel-7, 3 – ФП InuPel-9 и 4 – ФП InuPel-10, М – маркер молекулярной массы белков, 5 – ФП-537. Стрелками отмечены целевые рекомбинантные ферменты.

**Fig. 1.** Electropherogram of enzyme preparations. 1 – EP InuPel-3, 2 – EP InuPel-7, 3 – EP InuPel-9 and 4 – EP InuPel-10, M – protein molecular weight marker, 5 – EP-537. Arrows indicate target recombinant enzymes.

максимально снизить возможность бактериальной контаминации ДСТ и продуктов гидролиза мезофильными микроорганизмами. Поэтому термостабильность ФП серии InuPel была изучена при 60°C.

На рис. 2 приведены зависимости остаточной активности экзо-инулиназы (рис. 2a) и пектинлиазы (рис. 2b) от времени инкубирования при 60°C.

Все ФП серии InuPel сохраняют около 90% активности по отношению к инулину через час термостатирования при 60°C, что согласуется с ранее полученными данными (с учетом того, что экзо-инулиназа имеет термостабилизирующую точечную мутацию G338A [19]).

В составе всех исследуемых ФП меньшую термостабильность, при 60°C проявляет пектинлиаза, период ее полуинактивации составляет не более 18 мин (что согласуется с полученными нами ранее данными [12]). Тем не менее, проведенный эксперимент показал, что комплексные ФП серии InuPel могут быть эффективно использованы в течение 20–60 мин. в технологической стадии ферментативного гидролиза ДСТ.

#### Испытание ФП серии InuPel на модельном ДСТ

Для испытания новых ФП серии InuPel в условиях, приближенных к технологическим, в лаборатории был смоделирован процесс экстракции ДСТ из клубней топинамбура сорта “Омский Бе-

лый”. Для этого стружку клубней топинамбура экстрагировали горячей водой. Содержание сухих веществ в экстракте было определено гравиметрическим методом и составило 167 мг/мл. Экстракт топинамбура был обработан ФП серии InuPel при дозировке 10 мг ФП на 1 г сухого вещества экстракта, а также двумя контрольными ФП: ФП 537 (представляющем собой высушенную КЖ штамма-реципиента *P. verruculosum* 537), и коммерческим ФП “Топилаза К” (высушенная КЖ штамма-производителя немутированной экзо-инулиназы, полученного нами ранее [8]). Обработку ДСТ проводили при 60°C.

Зависимости концентрации ВС от времени воздействия ФП представлены на рис. 3.

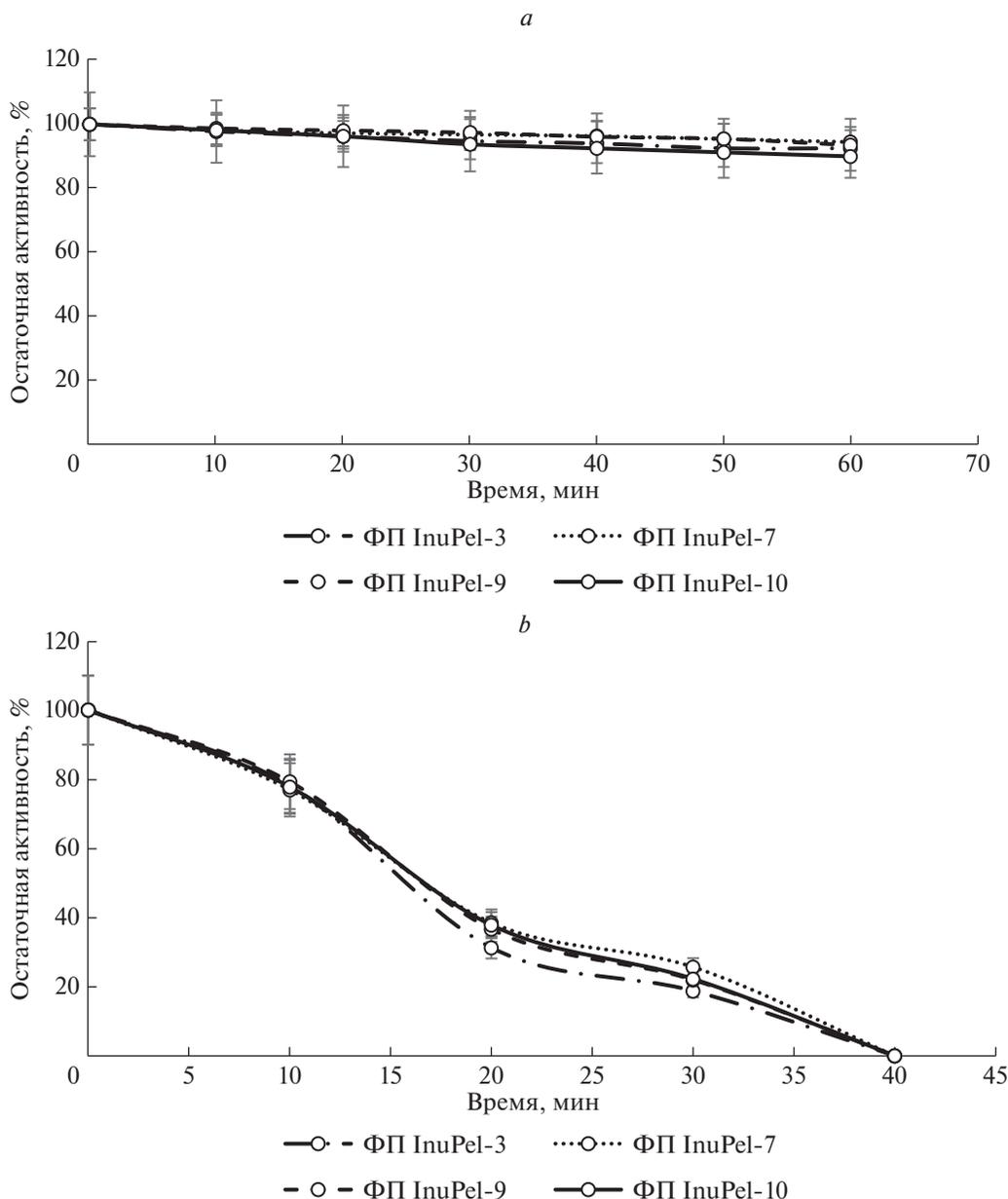
Уже через 10 мин после начала воздействия ФП, обладающими гетерологичной активностью экзо-инулиназы, концентрация ВС выходит на плато. При этом наибольший выход ВС обеспечивал ФП InuPel-10 – около 120 мг/мл, что примерно на 10% больше, чем выход ВС при применении других ФП.

Содержание гетерологичных экзо-инулиназы и пектинлиазы в новых комплексных ФП, определенное денситометрическим методом, приведено в табл. 3.

Для ФП InuPel-3 и ФП InuPel-10 соотношение этих ферментов было примерно одинаково (55% экзо-инулиназы и 24–26% пектинлиазы), при этом содержание экзо-инулиназы в обоих ФП было по сравнению с другими ФП максимальным. По-видимому, в случае ФП InuPel-10 увеличение выхода ВС объясняется оптимальным соотношением собственных целлюлаз, что неоднократно наблюдалось для других комплексных ФП, полученных в системе экспрессии *P. verruculosum* [28, 29].

Для определения действия пектинлиазы в составе ФП серии InuPel была определена динамическая вязкость в необработанном ДСТ и ДСТ, обработанном новыми и контрольными ФП. Результаты измерения вязкости после 60 мин обработки каждым из ФП при 60°C представлены в табл. 4.

ФП 537 (отрицательный контроль) не снижает вязкость ДСТ, что связано с отсутствием собственной пектинлиазы, а ФП “Топилаза К” (ФП экзо-инулиназы, применяемый на производстве ФГС) снижает вязкость ДСТ лишь на 5%. Несмотря на различное содержание пектинлиазы в новых комплексных ФП (табл. 3), снижение значения вязкости ДСТ после обработки ФП InuPel-3, ФП InuPel-7, ФП InuPel-9 и ФП InuPel-10 было максимальным (на 17% в сравнении с необработанным ДСТ), что свидетельствует о достаточности содержания пектинлиазы в новых ФП для расщепления пектиновой матрицы в ДСТ. Для дальнейшего исследования был отобран ФП InuPel-10, обеспечивавший максимальный выход ВС при обработке ДСТ.



**Рис. 2.** Термостабильность ФП серии InuPel при  $T = 60^{\circ}\text{C}$ , определенная по различным субстратам: *a* – инулин топинамбура, *b* – цитрусовый пектин (условия: 0.1 М Na-ацетатный буфер, pH 5.0).  
**Fig. 2.** Thermal stability of the EP of the InuPel series at  $T = 60^{\circ}\text{C}$ , determined on various substrates: *a* – Jerusalem artichoke inulin, *b* – citrus pectin (conditions: 0.1 M Na-acetate buffer, pH 5.0).

*Состав продуктов ферментализации ДСТ*

Для определения состава сахаров после обработки ДСТ контрольными ФП и ФП InuPel-10 был применен метод ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Результаты анализа приведены на рис. 4 и в табл. 5.

Состав ДСТ представлен моно-сахарами (фруктозой и глюкозой), дисахарами (сахарозой и дифруктозой), а также инулином и олигофруктозой со степенью полимеризации до 27 (верхняя панель рис. 4 и табл. 5).

После 60 минутной обработки коммерческим ФП “Топилаза К” при  $60^{\circ}\text{C}$  на хроматограмме сохраняются пики высокомолекулярного инулина, а также наблюдается пик сахарозы (нижняя панель рис. 4 и табл. 5). Можно предположить, что неполный гидролиз инулина в ДСТ в данном случае связан с недостаточной термостабильностью ФП “Топилаза К” при  $60^{\circ}\text{C}$ . Другими словами, экзо-инулиназа в составе “Топилазы К” инактивируется раньше, чем проходит полный гидролиз инулина. Этим же объясняется и наличие пика

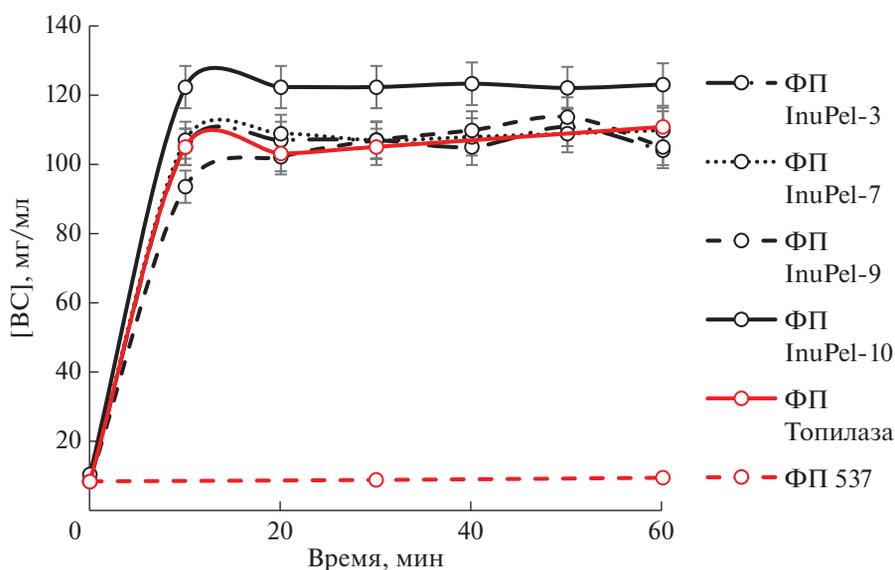


Рис. 3. Зависимость концентрации ВС от времени воздействия ферментными препаратами на ДСТ при 60°C.

Fig. 3. Dependence of reducing sugars concentration on the time of exposure to diffusion juice of Jerusalem artichoke by enzyme preparations at 60°C.

Таблица 4. Динамическая вязкость необработанного ДСТ и ДСТ, обработанного ФП серии InuPel, ФП Топилаза К и ФП исходного штамма после 60 мин при 60°C

Table 4. Dynamic viscosity of untreated DST and DST treated with FP of the InuPel series, FP Topilase K and FP of the original strain after 60 min at 60°C

Ферментный препарат	Динамическая вязкость, Па с	% вязкости от исходной вязкости экстракта
Без ФП	1.10 ± 0.05	100
ФП InuPel-3	0.91 ± 0.05	83 ± 5
ФП InuPel-7	0.91 ± 0.05	83 ± 5
ФП InuPel-9	0.91 ± 0.05	83 ± 5
ФП InuPel-10	0.91 ± 0.05	83 ± 5
ФП 537	1.10 ± 0.05	100
ФП Топилаза К	1.04 ± 0.05	95 ± 5

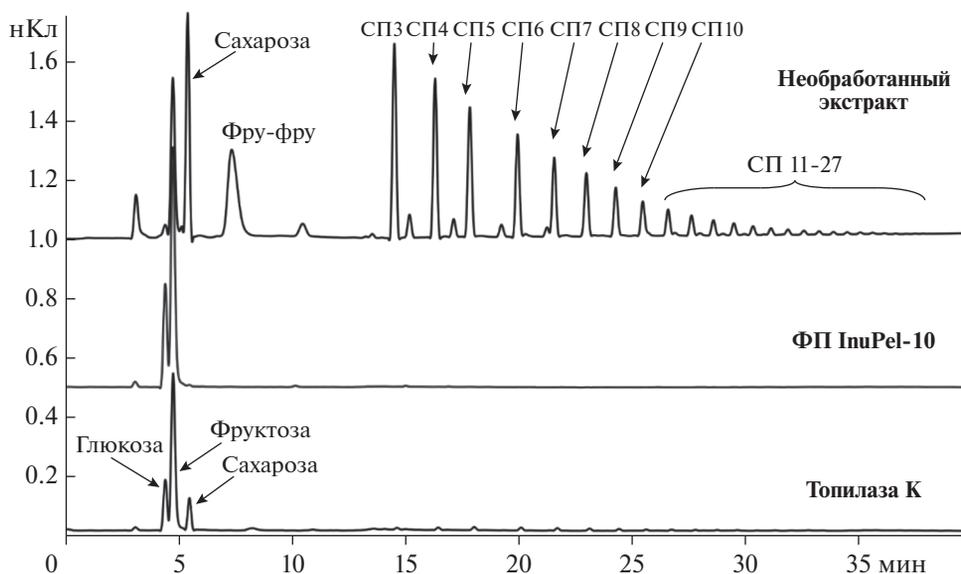
сахарозы. Известно, что экзо-инулиназа *A. awamori* обладает значительной инвертазной активностью [30], что приводит к гидролизу сахарозы на фруктозу и глюкозу. В случае обработки ДСТ “Топилазой К” наблюдается остаточная сахароза,

что может объясняться преждевременной инактивацией экзо-инулиназы.

При обработке ДСТ ФП InuPel-10, содержащим термостабильную форму экзо-инулиназы *A. awamori*, пиков инулина и сахарозы не наблюдается

Таблица 5. Концентрация сахаров в необработанном ДСТ и ДСТ после 60 минут обработки каждым из ФП при 60°C

Концентрация, мг/мл	Необработанный ДСТ	Обработка ФП InuPel-10	Обработка ФП Топилаза К	Обработка ФП 537
Глюкоза	0.20 ± 0.01	19 ± 1	17 ± 0.9	0.20 ± 0.01
Фруктоза	6 ± 0.3	100 ± 5	79 ± 4	6 ± 0.3
Сахароза	14 ± 1	0.6 ± 0.03	24 ± 1	16 ± 1



**Рис. 4.** Хроматографические профили необработанного ДСТ и ДСТ, обработанного ФП InuPel-10 и ФП “Топилаза К” (Условия обработки: 60 мин, 60°C, pH 6.0).

**Fig. 4.** Chromatographic profiles of untreated and treated with EP InuPel-10 and EP “Topilase K” diffusion juice of Jerusalem artichoke (Processing conditions: 60 min, 60°C, pH 6.0).

(средняя панель рис. 4 и табл. 5), что свидетельствует о наиболее полном гидролизе инулина ДСТ.

Немаловажным аспектом является экономическая эффективность нового комплексного ФП в сравнении с индивидуальными ФП пектинлиазы и экзо-инулиназы (“Топилаза К”), которые потенциально могут быть смешаны в эффективном соотношении 1 : 2. Однако использование комплексного ФП InuPel-10 в производстве ФГС позволит сократить расходы на ФП на 10–16%. Данный экономический эффект связан с тем, что производство ФП индивидуальной пектинлиазы (например, на заводе ООО “Агрофермент”, Тамбовская обл.) в меньшем необходимом объеме требует использования всей технологической линии, рассчитанной на более крупные объемы. В связи с этим, удельная стоимость ФП “Топилаза К” и ФП пектинлиазы будет выше стоимости ФП InuPel-10.

Таким образом, замена ФП “Топилаза К”, используемого при производстве фруктозо-глюкозных сиропов, на ФП InuPel-10 потенциально позволяет увеличить выход фруктозы и глюкозы, повысить эффективность процесса, а также снизить нагрузку на технологическое оборудование на стадии микрофильтрации за счет снижения вязкости ДСТ.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. White J.S. Straight talk about high-fructose corn syrup: What it is and what it ain't. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 88(6), 1716–1721. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.25825B>
2. Старовойтова О.А., Старовойтов В.И., Манохина А.А. Особенности хранения топинамбура. *Вестник ФГОУ ВПО МГАУ*, 2018, 85(3), 7–12. <https://doi.org/10.26897/1728-7936-2018-3-7-12>
3. Шаззо Р.И., Тамазова С.Ю., Фаткина Е.В., Купин Г.А. Изменение химического состава топинамбура позднеспелого сорта Интерес в период роста растения. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2013, 12, 12–13.
4. Loo J., Coussement P., Leenheer L., Hoebreg H., Smits G. On the Presence of Inulin and Oligofructose as Natural Ingredients in the Western Diet. *Crit. Rev. Food Sci.*, 1995, 35(6), 525–552. <https://doi.org/10.1080/10408399509527714>
5. Chi Z.M., Zhang T. Cao T.S., Liu X.Y., Cui W., Zhao C.H. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresour. Technol.*, 2011, 102(6), 4295–4303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.086>
6. Rubel I.A., Iraporda C., Novosad R., Cabrera F.A., Genovese D.B., Manrique G.D. Inulin rich carbohydrates extraction from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers and application of different drying methods. *Food Res. Int.*, 2018, 103, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.041>
7. Волков П.В., Сеницына О.А., Федорова Е.А., Рожкова А.М., Сатрутдинов А.Д., Зоров И.Н., Окунев О.Н., Гусаков А.В., Сеницын А.П. Выделение и свойства рекомбинантных инулина Aspergillus sp. *Биохимия*, 2012, 77(5), 611–621.

8. Синецкин А.П., Рожкова А.М., Зоров И.Н., и др. Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* (варианты) и способ получения ферментного препарата и его использование (варианты). Патент РФ 2646136, приор. 02.12.2015, опублик. 01.03.2018.
9. Синецкина О.А., Федорова Е.А., Семенова М.В., Гусаков А.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Синецкин А.П. Выделение и свойства внеклеточной пектинализы *Penicillium canescens*. *Биохимия*, 2007, 72(5), 699–706.
10. Бушина Е.В., Рубцова Е.А., Рожкова А.М., Синецкина О.А., Кошелев А.В., Матыс В. Ю., Немашкалов В.А., Синецкин А.П., Создание продуцентов целлюлолитических и пектолитических ферментов на основе гриба *Penicillium verruculosum*. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2015, 51(4), 402–411. <https://doi.org/10.7868/S0555109915040042>
11. Волчок А.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербачев С.С., Синецкин А.П. Ферментные комплексы нового поколения для соковой промышленности. *Биотехнология*, 2013, 5, 78–89.
12. Бушина Е.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Сатрутдинов А.Д., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Синецкин А.П. Создание комплексных ферментных препаратов пектиназы и целлюлазы для переработки свекловичного жома, *Прикладная биохимия и микробиология*, 2012, 48(5), 543–549.
13. Семенова М.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Сатрутдинов А.Д., Синецкина О.А., Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г., Синецкин А.П. Подбор оптимального комплекса ферментов для гидролиза углеводов свекловичного жома. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2019, 55(6), 586–593. <https://doi.org/10.1134/S0555109919050118>
14. Семенова М.В., Курьшикина М.С., Синецкин А.П. Синергетическое взаимодействие арабиназа разного типа действия при биоконверсии свекловичного жома и яблочных выжимок. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2023, 59(5), 182–190. <https://doi.org/10.31857/S0555109923020137>
15. Volchok A.A., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Scherbakov S.S., Sinitsyn A.P. Production of fruit wines using novel enzyme preparations. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 2015, 49, 205–215. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2015.49.3.80>
16. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербачев С.С., Синецкин А.П. Предобработка виноградной мезги ферментами нового поколения при изготовлении столовых вин. *Виноделие и Виноградарство*, 2014, 1, 36–39.
17. Синецкин А.П., Синецкина О.А., Рожкова А.М. Получение промышленно важных ферментов на основе экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum*. *Биотехнология*, 2020, 36(6), 17–34. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-17-34>
18. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene. *Curr. Genet.*, 1995, 28(5), 474–477. <https://doi.org/10.1007/BF00310818>
19. Dotsenko A.S., Denisenko Y.A., Zorov I.N., Wasserman L., Semenova M.V., Korolev A., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. Single substitution in  $\alpha$ -helix of active center enhanced thermostability of *Aspergillus awamori* exo-inulinase. *J. Mol. Graf. Model.*, 2023, 119, 108381. <https://doi.org/10.1016/j.jmngm.2022.108381>
20. Sinitsyn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A., Kondrat'eva E.G., Zorov I.N., Okunev O.N., Nemashkalov V.A., Matys V.Y., Koshelev A.V. The production of highly effective enzyme complexes of cellulases and hemicellulases based on the *Penicillium verruculosum* strain for the hydrolysis of plant raw materials. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2014, 50(8), 761–772. <https://doi.org/10.1134/S0003683814080055>
21. Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P. Mass spectrometry in the study of extracellular enzymes produced by filamentous fungi. *J. Anal. Chem.*, 2010, 65(14), 1446–1461. <https://doi.org/10.1134/S1061934810140030>
22. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*? 1952, 195, 19–23.
23. Синецкин А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. Учебное пособие. М: Изд-во МГУ, 1995, 224.
24. Синецкин А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1990, 25, 30–37.
25. Collmer A., Ried J.L., Mount M.S. *Methods in Enzymol.*, 1988, 161, 329–335.
26. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М: Мир, 1991, 544.
27. Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Синецкин А.П., Рожкова А.М. Определение копийности целевых генов карбогидраз в рекомбинантных штаммах гриба *Penicillium verruculosum*. *Биотехнология*, 2019, 35(5), 51–57. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57>
28. Karp S.G., Osipov D.O., Semenova M.V., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyna O.A., Soccol C.R., Sinitsyn A.P. Effect of novel *Penicillium verruculosum* enzyme preparations on the saccharification of acid- and alkali-pretreated agro-industrial residues. *Agronomy*, 2020, 10, 1348. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091348>
29. Семёнова М.В., Гусаков А.В., Телицин В.Д., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Немашкалов В.А., Рожкова А.М., Синецкин А.П. Новый ферментный препарат, содержащий полисахаридмонооксигеназу и  $\beta$ -глюкозидазу – синергетические добавки к целлюлазам. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2022, 58(4), 366–373. <https://doi.org/10.31857/S0555109922040146>
30. Синецкина О.А., Рубцова Е.А., Осипов Д.О., Кондратьева Е.Г., Семенова М.В., Королев А.И., Ярошенко Е.В., Рожкова А.М., Немашкалов В.А., Синецкин А.П. Сравнительный анализ свойств рекомбинантных эндоинуликазы, экзоинуликазы, сахаразы и  $\alpha$ -галактозидазы С. *Биотехнология*, 2022, 38(2), 14–25. <https://doi.org/10.56304/S0234275822020077>

## New Complex Enzyme Preparation of Exo-Inulinase and Pectinlyase for Use in Jerusalem Artichoke Processing Technology

A. M. Rozhkova<sup>a, #</sup>, Y. A. Denisenko<sup>a</sup>, E. S. Milova<sup>b</sup>, I. N. Zorov<sup>a, b</sup>,  
O. A. Sinitsyna<sup>b</sup>, E. V. Yaroshenko<sup>c</sup>, and A. P. Sinitsyn<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup>Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>c</sup>LLC “EastAgroDon”, Dankov, Lipetsk region, 399850 Russia

<sup>#</sup>e-mail: amrojkova@yahoo.com

**Abstract**—Fructose-glucose syrups (FGS) are widely used in the food industry as sweeteners. The use of inulo-containing raw materials, to which Jerusalem artichoke belongs, to obtain FGS leads to an increase in the proportion of fructose in the final product up to 80-85%. That makes it possible to attribute FGS to natural sweeteners. The modern production of FGS in the Russian Federation is based on the use of the enzyme exo-inulinase (EC 3.2.1.80), which hydrolyzes  $\beta$ -2,1-glycosidic bonds of the inulin molecule to obtain fructose and glucose. In practice, an enzyme preparation based on exo-inulinase is added to the fermenters to the extracted Jerusalem artichoke diffusion juice (DJ) before the microfiltration step. However, in addition to the main polysaccharide – inulin (75–80%), DJ contains pectin (up to 5%), which creates an additional load on the microfiltration unit due to the viscosity of Jerusalem artichoke fermentolysates. Based on the fungal strain *Penicillium verruculosum* InuPel-10, a complex enzyme preparation (EP) of exo-inulinase/pectin lyase was obtained, which reduces the viscosity of Jerusalem artichoke extracts by 17–20%, while the yield of reducing sugars during hydrolysis using the EP of exo-inulinase/pectin lyase increased by 10%. The use of complex FP InuPel-10 in the production of FGS will reduce the cost of FP by 10–16% due to the reduction of operating costs associated with a fuller workload of the technological line for the production of this FP as opposed to the production of individual enzymes and their further mixing in the required proportion.

**Keywords:** *Penicillium verruculosum*, exo-inulinase, pectinlyase, Jerusalem artichoke, FGS