

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
INSTYTUT INŻYNIERII CHEMICZNEJ I URZĄDZEŃ CIEPLNYCH

praca doktorska

**KINETYKA REAKCJI HYDROLIZY SKROBI ZIEMNIACZANEJ
Z UDZIAŁEM ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH**

Autor: mgr inż. Anna Karaban

Promotor: prof. dr hab. inż. Andrzej Noworyta

Wrocław 1999

Moim Rodzicom pracę tę dedykuję

Spis treści

1. Wprowadzenie	3
2. Przegląd literatury	6
2.1. Charakterystyka surowca - skrobi ziemniaczanej	6
2.2. Charakterystyka enzymów amylolitycznych	11
2.3. Charakterystyka procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi	17
2.4. Kinetyka i modele reakcji hydrolizy skrobi	20
2.5. Warunki procesowe	24
3. Cel pracy	28
4. Materiały i metody	29
5. Charakterystyka stosowanych enzymów amylolitycznych i preparatów enzymatycznych	35
6. Wyniki i ich dyskusja	39
6.1. Sformułowanie modelu kinetyki	39
6.2. Kinetyka reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi ziemniaczanej	46
6.2.1. Hydroliza skrobi z udziałem α -amylazy	47
6.2.2. Hydroliza skrobi z udziałem β -amylazy	55
6.2.3. Hydroliza skrobi z udziałem glukoamylazy	58
6.2.4. Dyskusja modelu	64
6.3. Weryfikacja modelu matematycznego	72
6.3.1. Charakterystyka nośnika	73
6.3.2. Hydroliza skrobi z udziałem α -, β - i glukoamylazy w reaktorach ciągłych	79
7. Podsumowanie	84
8. Literatura	87
9. Spis oznaczeń	87
10. Załączniki	90

1. Wprowadzenie

Praktyczne wykorzystanie naturalnych produktów pochodzenia roślinnego - cennych surowców odnawialnych - oraz ubocznych produktów przemysłu rolno-spożywczego (melasy, serwatki) jest niewielkie w porównaniu z potencjalnymi możliwościami przetwórstwa jakie te surowce stwarzają. Dużym zainteresowaniem, z uwagi na szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach życia, cieszą się produkty hydrolizy polocukrów. Skrobia, obok celulozy, dzięki powszechnemu występowaniu (bulwy, łodygi, nasiona, liście, owoce)¹ ma ogromne znaczenie wśród polimerów naturalnych. Jest jednym z cenniejszych surowców w przemyśle spożywczym². Wykorzystywana jest także w przemyśle gorzelniczym, włókienniczym, papierniczym, wydobywczym, farmaceutycznym³.

Skrobia znalazła technologiczne zastosowanie m.in. w produkcji:

- ♦ krochmalu,
- ♦ syropów (maltozowych, glukozowych, skrobiowych, itp.),
- ♦ preparatów skrobiowych odznaczających się silnym stopniem wiązania wody, które stosuje się w przemyśle mięsnym do wiązania soków mięsnych, zamiast polifosforanów⁴,
- ♦ karmeli i dekstryn typu gumy brytyjskie,
- ♦ skrobi chemicznie modyfikowanych, np. skrobi utlenionych, acetylowanych, tiosemikarbozanów skrobi dialdehydowej użytecznej w taksonomii gruźlicy oraz skrobi zawierających siarkę, posiadających właściwości grzybo- i bakteriobójcze⁵,
- ♦ innych preparatów skrobiowych, które dzięki niezaprzeczalnym zaletom użytkowym (duża siła zagęszczania, zdolność żelowania, emulgowanie) są niezbędnym składnikiem wielu produktów spożywczych⁶.

¹ M.Pałasiński¹, *Jakość skrobi w świetle badań w 20-lecie Oddziału Technologii Żywności*, Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie nr 290, Kraków 1994

² A. Walkowski, G.Lewandowicz, *Własności użytkowe krajowych spożywczych skrobi modyfikowanych*, Przemysł Spożywczy, 5, 1993

³ A.Golachowski, *Stosowanie skrobi i jej produktów w przemyśle spożywczym*, Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu, Technologia Żywności, XII nr 328, 1998

⁴ M.Pałasiński², *45 lat badań nad skrobią w Krakowie*, Przemysł Spożywczy, 8, 1994

⁵ M.Pałasiński², op.cit.

⁶ G.Lewandowicz, A.Walkowski, *Aspekty żywieniowe i toksykologiczne stosowania skrobi modyfikowanych*, Przemysł Spożywczy, 11, 1994

Prowadzone są wciąż badania nad budową i własnościami skrobi pochodzących z różnych źródeł. Szeroko prowadzone są badania nad enzymami amylolitycznymi (nad mechanizmem ich działania, najkorzystniejszymi warunkami reakcji hydrolizy polocukrów). Obserwując światowe tendencje w przemyśle enzymatycznym i kierunki badań w dziedzinie produkcji i zastosowania enzymów hydrolizujących skrobię, można spodziewać się rozszerzenia rodzajów produkowanych hydrolizatów skrobiowych i ulepszania istniejących technologii enzymatycznych⁷.

Stosowaną dotąd hydrolizę skrobi na drodze kwasowej zastąpiła metoda łączona (wstępna hydroliza kwasowa, następnie kontrolowana hydroliza enzymatyczna)⁸. Najlepszą jednak metodą jest całkowita hydroliza enzymatyczna. Daje ona trzy zasadnicze korzyści:

- (1) specyficzność działania,
- (2) łagodne warunki reakcji,
- (3) wysoką wydajność⁹.

Prócz tego hydroliza enzymatyczna sprawia, że produkty procesu nie są zabarwione, nie mają gorzkiego smaku i zapachu, z czym spotykano się w produktach pochodzących z hydrolizy kwasowej.

Coraz częściej w procesach enzymatycznych wykorzystuje się immobilizowane biokatalizatory. W pracach nad tymi preparatami dostrzega się dwa główne trendy: poszukiwanie nośników i metod immobilizacji oraz efektywnych rozwiązań procesowych. Immobilizowane enzymy znalazły szerokie zastosowanie między innymi w analityce (np. w oznaczaniu mocznika, kwasu moczowego, glukozy, cholesterolu we krwi, moczu i innych biologicznych „objektach”), w kontroli stężenia fenolu, związków siarki i fosforu, aromatycznych amin w powietrzu i wodzie, i w analizie wielu innych substancji poprzez pomiary elektrodami enzymatycznymi¹⁰.

Bardzo istotny jest matematyczny opis reakcji hydrolizy skrobi. Ujęcie procesu równaniem umożliwia jego szybszą optymalizację i lepszy dobór reaktora. Ważne jest, aby model mógł przewidywać przebieg reakcji w szerokim zakresie zmiennych procesowych. Przemiany chemiczne rozważa się najczęściej w dwóch aspektach,

⁷ L.Ślomińska¹, *Nowości w produkcji enzymów stosowanych w hydrolizie skrobi*, *Przemysł Spożywczy*, 12, 1993

⁸ A.Golachowski, *Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu*, 328, 1998, op.cit.

⁹ L.Ślomińska², *Scukrzanie skrobi wybranymi preparatami enzymatycznymi*, *Roczniki AR Poznań*, z.239. - 22, 1993

¹⁰ A.Szewczuk, A.Rapak, *Immobilizowane enzymy-otrzymywanie i zastosowanie*, *Wiadomości chemiczne*, 39, 1985

jako równowagę oraz kinetykę chemiczną. W zakres kinetyki chemicznej, zwanej makrokinetyką, wchodzi zagadnienia związane z szybkością reakcji chemicznej bez głębszego wnikania w zachowania międzycząsteczkowe. Z punktu widzenia inżynierii procesowej takie rozpatrywanie kinetyki jest wystarczające. Kompleksowe opracowanie kinetyki hydrolizy biopolimeru powinno obejmować analizę mechanizmów cząsteczkowych (mikrokinetyka) oraz wpływ czynników zewnętrznych (np. charakteru przepływu reagentów, rozwinięcia powierzchni międzyfazowej)^{11,12} na przebieg reakcji. Korzystne byłoby usystematyzowanie istniejących już rozwiązań i na bazie tego stworzenie w miarę jednolitych prawideł rządzących procesem enzymatycznej hydrolizy polimerów naturalnych. Opracowanie choćby ogólnego schematu procesów hydrolizy biopolimerów powiększyłoby z pewnością produkcję biotechnologiczną (bazę produktów i półproduktów dla biotechnologii).

Obecnie, problem matematycznego przedstawienia procesu hydrolizy skrobi nie jest zadowalająco rozwiązany. Zastosowanie, używanego powszechnie, równania Michaelis-Menten do opisu tego procesu jest dyskusyjne. Przyczyny należy szukać:

- w niejednorodności substratu (skrobia jest mieszaniną amylozy i amylopektyny, występują dwa typy wiązań glikozydowych α -1,4 i α -1,6),
- w brak możliwości opisu stechiometrii reakcji,
- w inaktywacji enzymów oraz występowaniu inhibicji substratem i produktem reakcji,
- we wpływie warunków zewnętrznych na reakcję (np. lepkości roztworu skrobi),
- w występujących reakcjach odwrotnych (np. rewersji glukozy do izomaltozy)¹³.

¹¹ E.Klimiuk, B.Lossow, M.Bulińska, *Kinetyka reakcji i modelowanie reaktorów biochemicznych w procesach oczyszczania ścieków*, Wydawnictwo ART, Olsztyn 1995

¹² S.M.Walas, *Inżynieria chemiczna, Kinetyka reakcji dla inżynierów chemików*, WNT, Warszawa 1977

¹³ G.M. Zanin, F.F. De Moraes, *Modeling Cassava starch saccharification with amyloglukosidase*, App. Biochem. Biotech., 57/58, 1996

2. Przegląd literatury

2.1. Charakterystyka surowca – skrobi ziemniaczanej

Skrobia jest naturalnym polimerem wytwarzanym przez rośliny. Biopolimer ten jest głównym źródłem węglowodanów w diecie ludzi i zwierząt. Największe znaczenie gospodarcze ma skrobia pozyskiwana z surowców roślinnych jako krochmal (obserwuje się znaczny rozwój przetwarzania ziemniaków na krochmal) oraz skrobia do produkcji syropów^{14,15}.

Skrobia jest mieszaniną: amylozy i amylopektyny. Jednostką budującą łańcuchy skrobi jest D-glukoza. Zawartość % obu składników zależy od pochodzenia surowca i wynosi dla skrobi ziemniaczanej średnio 25% amylozy i 75% amylopektyny oraz kilka procent struktur pośrednich (tzn. cząsteczek amylozy z małymi rozgałęzieniami i grupami fosforanowymi)¹⁶.

W zależności od sposobu rozpuszczania skrobi oraz metody określania zdolności redukcyjnej uzyskuje się różne masy cząsteczkowe składników skrobi. Masa cząsteczkowa amylozy ze skrobi ziemniaczanej wynosi od stu do kilkuset kDaltonów, amylopektyny od jednego do kilku milionów Daltonów^{17,18}.

Bulwy ziemniaka zawierają skrobię w ilości $\frac{3}{4}$ suchej masy. Skrobia ziemniaczana ma duże, elipsoidalne lub muszelkowe ziarna, obok których mogą znajdować się ziarenka mniejsze o owalnym kształcie. Ziarenka skrobi mają warstwową, regularną strukturę wewnętrzną¹⁹. Zbudowane są z występujących naprzemiennie warstw krystalicznych i amorficznych (przemawiają za tym różne zjawiska optyczne, np. dwójłomność, widmo Roentgena)^{20,21,22}. Podstawowe dane dotyczące granulki skrobi ziemniaczanej zamieszczono w tabeli 2.1.1. Krystaliczną część ziarna skrobi tworzą upakowane,

¹⁴ M.Pałański¹, Zeszyty Naukowe AR w Krakowie, 290, 1994, op.cit.

¹⁵ A.Golachowski, Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu, 328, 1998, op.cit.

¹⁶ G.Murugesan, K.Shibanuma, S.Hizukuri, *Characterisation of hot-water-soluble components of starches*, Carbohyd. Research, 242, 1993

¹⁷ W.Leszczynski, G.Lisińska, *Potato science and technology*, Elsevier Applied Science, London and New York, 1992

¹⁸ J.Rollings, *Enzymatic depolymerization of polysaccharides*, Carbohyd. Polymers, 5, 1985

¹⁹ F. Nowotny¹, *Technologia przetwórstwa ziemniaczanego*, WNT, Warszawa, 1965

²⁰ F.Nowotny², *Skrobia*, WNT, Warszawa 1969

²¹ J.Rollings, Carbohyd. Polymers, 5, 1985, op.cit.

²² V.Planchot, P.Colonna, A.Buleon, *Enzymatic hydrolysis of alpha-glucan crystallites*, Carbohyd. Research, 298, 1997

podwójne helisy amylopektyny, część amorficzną - pojedyncze łańcuchy amylozy i amylopektyny. W skrobi wyróżnia się struktury: jednoskośne, heksagonalne i mieszane²³.

Tabela 2.1.1. Charakterystyka granulek skrobi ziemniaczanej.

średnia powierzchnia granulki skrobi ziemniaczanej	$29,47 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2$
średnia objętość ziarna	$17,16 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^3$
powierzchnia właściwa ziarna	$0,853 \text{ cm}^2/\text{g}$
średnica ziarna	6-100 μm
gęstość ziarna	$1,65 \text{ g/cm}^3$ (masa w wodzie)
temperatura żelowania	58-62 °C

dane zaczerpnięto z „Potato science and technology” G.Lisińska, W.Leszczynski oraz ze „Skrobi” pod redakcją F.Nowotnego

Przypuszcza się, że rozkład amylozy i amylopektyny w ziarnie skrobi jest równomierny. Amylopektyna w ziarenku układa się promieniowo, w struktury o charakterze klastrowym, a amyloza jest rozproszona wokół amylopektyny²⁴. Ziarenka powiększają się wraz ze wzrostem ziemniaka, a materiał jest odkładany na istniejących już warstwach, zależnie od ilości dostarczonego węglowodanu. Większe ziarenka skrobi wykazują luźniejszą strukturę wewnętrzną i bardziej rozproszony system porów na powierzchni ziarna, podczas gdy struktura ziarenek małych jest bardziej zbita.

Z uwagi na właściwości higroskopijne, skrobia silnie chłonie wodę z otoczenia (choć ziarenka skrobi w zasadzie nie rozpuszczają się w zimnej wodzie). Jest to wynikiem obecności licznych aktywnych grup hydroksylowych, zdolnych do tworzenia mostków wodorowych z cząsteczkami wody (wiązanie wody na drodze adsorpcji, solwatacji). Granulki skrobi ziemniaczanej absorbują więcej wody niż skrobie innego pochodzenia. Skrobia ziemniaczana ma także bardziej rozgałęzione i dłuższe łańcuchy, a jej roztwory z reguły mają wyższą lepkość. Obserwuje się proces samoczynnej hydrolizy wiązań glikozydowych i estrowych wiązań fosforanowych w skrobi. Zjawisko to zachodzi podczas długotrwałego przechowywania skrobi i zwane jest starzeniem się skrobi. Znane jest również zjawisko retrogradacji. W wyniku kleikowania między sąsiednimi

²³ E.Bertoft, Carbohydr. Research., 288, 1996, op.cit.

²⁴ J.Jay-Lin, J.Shen, *Internal structure of the potato starch granule reveled by chemical gelatinization*, Carbohydr. Research, 247, 1993

cząsteczkami wytwarzają się wiązania wodorowe i powstają struktury krystaliczne, które ulegają wytrąceniu.

W trakcie żelowania zostaje zniszczona struktura ziarna (następuje stopniowy wzrost hydratacji i rozrywanie wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami polisacharydów). Ze wzrostem temperatury granulki skrobi puchną, zanika krzyż polaryzacyjny. Kleikowanie zaczyna się w łatwo dostępnym obszarze amorficznym, gdzie połączenia są słabe. Ochładzanie zżelowanego roztworu powoduje ograniczenie ruchliwości granulek skrobi, rezultatem czego jest tworzenie się „miceli”. Powstaje przestrzenna „sieć skrobiowa”, której szczeliny wypełnia woda^{25,26}. Proces kleikowania podwyższa koszty eksploatacyjne, ale podnosi również wydajność hydrolizy skrobi. Podczas hydrotermicznej „obróbki” zachodzą zmiany w obrębie struktur wewnętrznych cząsteczek skrobi. Następuje to wskutek: transformacji amorficznej amylozy do form helisy, wzrostu interakcji między łańcuchami amylozy i amylopektyny w obszarze amorficznym, interakcji między krystalicznymi i amorficznymi obszarami ziarna skrobi²⁷. W zależności od stężenia skrobi w roztworze, jej własności reologiczne determinowane są przez inne parametry. Dla niskich koncentracji skrobi parametrem ograniczającym jest udział objętościowy, przy koncentracjach bliskich punktowi nasycenia (kiedy całą przestrzeń w kleiku wypełniają spęczniałe ziarenka skrobi) - sztywność spęczniałych ziaren surowca.

Ograniczona zdolność hydrolizy surowej skrobi ziemniaczanej przez enzymy amylolityczne jest znana od ponad pięćdziesięciu lat. Jednym z powodów niskiej aktywności enzymów jest mniejsza, niż dla skrobi z innych źródeł, adsorpcja enzymów na powierzchni ziarna natywnego skrobi ziemniaczanej²⁸. Skrobia ziemniaczana jest bardziej oporna na działanie enzymów *in vivo* oraz *in vitro*. Wrażliwość surowej skrobi na działanie enzymów amylolitycznych wzrasta, gdy podda się skrobię wcześniej działaniu promieniowania γ lub wysokiej temperatury.

Przykładowe wydajności reakcji hydrolizy różnego rodzaju skrobi przez α -i glukoamylazę przedstawiono w tabeli 2.1.2.

²⁵ W.Leszczżyński, G.Lisińska, op.cit.

²⁶ J.Rollings, Carbohydr. Polymers, 5,1985, op.cit.

²⁷ R.C.Eerlinger, H.Jacobs i in., *Effects of hydrothermal treatments on the rheological properties of potato starch*, Carbohydr. Research, 297, 1997

²⁸ S.Gorinstein, *Kinetic studies during enzyme hydrolisis of potato & cassava starches*, Starch, 45, 1993

Tabela 2.1.2. Hydroliza surowej skrobi przez α -amylazę i glukoamylazę.

rodzaj skrobi	α -amylaza	glukoamylaza
	μg glukozy produkowanej przez 10 mg skrobi w temp. 35 °C w czasie 24 h	
pszenica	709	160
kukurydza	293	1232
ryż	227-304	249-3180
ziemniaki	28	137

dane zaczerpnięto z „Potato science and technology” G.Lisińska, W.Leszczżyński

Od dawna wiadomo, że zróżnicowanie jakości i właściwości skrobi zależy od pochodzenia botanicznego oraz od metody i stopnia jej wyizolowania z komórek roślinnych. Ziarna prócz skrobi zawierają jeszcze średnio $\sim 0,04$ - $0,09\%$ tłuszczu, 2% związków azotu, do $\sim 1\%$ różnych soli mineralnych i duże ilości kwasu fosforowego estrowo związanego z amylopektyną $\sim 0,1$ - $\sim 0,2\%$ ^{29,30,31}.

Naturalne polimery są degradowane przez enzymy z różną szybkością, zależnie od długości łańcuchów, ilości rozgałęzień w polisacharydzie. Szybkość reakcji maleje ze wzrostem stopnia rozgałęzienia policukru. Jest to częściowo spowodowane budową przestrzenną substratów. Budowa strukturalna składników skrobi ma zatem duże znaczenie w mechanizmie reakcji i szybkości hydrolizy, stąd szersze zainteresowanie tym tematem.

Amyloza - bardziej podatna na działanie enzymów część skrobi - w rozpuszczalnikach wodnych może mieć trzy różne formy:

1. helisy (zwój zawiera 5-7 reszt glukozy),
2. przerwane helisy,
3. nieregularne zwoje (brak struktury helisy) ^{32,33}.

Dwie pierwsze formy amylozy są stabilizowane wiązaniami wodorowymi. Długie łańcuchy amylozy mogą zawierać także rozgałęzienia. Cząsteczki amylozy zawierają od kilkudziesięciu do kilku tysięcy reszt glukozy. Łańcuchy amylozy w miarę zbliżania się do zewnętrznych warstw granulki stają się coraz krótsze i jest ich coraz mniej.

²⁹ J.Jay-Lin, J.Shen, Carbohydr. Research, 247, 1993, op.cit.

³⁰ F.Nowotny², op.cit.

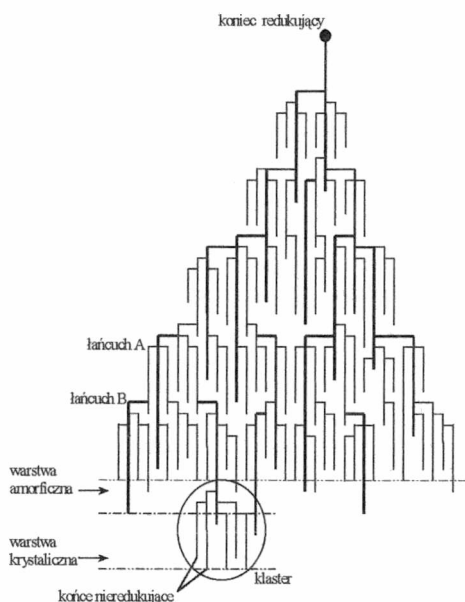
³¹ K.M.Stecka, *Ziemniaki jako surowiec dla przemysłu gorzelniczego*, Przemysł Spożywczy, 50, 1996

³² W.Leszczżyński, G.Lisińska, op.cit.

³³ M.Richter, S.Augustat, *Ausgewählte Methoden der Stärkechemie, Isolierung, Charakterisierung und Analytik von Stärkepolysacharides*, Leipzig, 1968

W przypadku amylopektyny jest podobnie. W centrum granulki cząsteczki amylopektyny są bardziej rozgałęzione, mają więcej reszt fosforanowych i dłuższe łańcuchy³⁴. Amyloza, ulegając retrogradacji, tworzy nierozpuszczalne w wodzie krystaliczne agregaty, które są w niewielkim stopniu hydrolizowane przez enzymy.

Amylopektyna jest polisacharydem rozgałęzionym, ma tzw. budowę klastrową (rys. 2.1.1), zaproponowaną przez Frencha [1972], a potwierdzoną przez licznych badaczy. Głównym założeniem tego modelu jest, że cząsteczka zbudowana jest ze „zbitych”, odpowiednio zorientowanych łańcuchów z licznymi rozgałęzieniami. Łańcuchy boczne są z zasady przypadkowo rozmieszczone, ale zdarzają się również regularne rozgałęzienia. Z powodu takiego ułożenia amylopektyna jest odporniejsza na działanie enzymu niż amyloza. Klastry przyłączone są do długich łańcuchów B. 80-90% łańcuchów buduje klastry proste, pozostałe 10-20% łańcuchów to formy międzyklastrowych połączeń^{35,36}.



Rys. 2.1.1. Klastrowy model amylopektyny, bazujący na modelu Frencha i Robina, wykonany w oparciu o ilustracje Rollingsa i Mannersa.

Amylopektynę budują tysiące krótkich łańcuchów A, zawierających średnio 15 glukozydów α -1,4 (zachowujących się podobnie do amylozy), przyłączonych do innych, dłuższych łańcuchów B wiązaniami α -1,6-glikozydowymi.

³⁴ J.Jay-Lin, J.Shen, Carbohydr. Research, 247, 1993, op.cit.

³⁵ S.Hizukuri, Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectin and its significance, Carbohydr. Research, 147, 1986

³⁶ J.Rollings, Carbohydr. Polymers, 5, 1985, op.cit.

Łańcuchy B stanowią szkielet cząsteczki³⁷. Klastry z łańcuchami A są głównie odpowiedzialne za strukturę krystaliczną w ziarnie. Regiony amorficzne w amylopektynie pojawiają się co 6-7 nm, zawierają wiązania α -1,4 i α -1,6-glikozydowe. Cząsteczka amylopektyny ma 10-15 nm średnicy i 120-140 nm długości. Zawiera 94-96% wiązań α -1,4-glikozydowych i 4-6% wiązań α -1,6. Stosunek ilości łańcuchów A do ilości łańcuchów B = 4:1 do 9:1^{38,39}. Badania wskazują na kulisty kształt cząsteczki amylopektyny bez wyraźnego łańcucha głównego. Amylopektyna trudniej pozbywa się wody hydratacyjnej i wskutek tego nie ulega retrogradacji.

Istnieje bardzo wiele hipotez na temat budowy skrobi. Przedstawione w tym rozdziale wiadomości mają na celu przybliżyć istotę problemu jakim jest niejednorodny skład surowca.

2.2. Charakterystyka enzymów amylolitycznych

Świat enzymów jest bardzo bogaty. Scharakteryzowano i opisano ponad 2000 enzymów. Wszystkie enzymy podzielono na 6 klas głównych, spośród których hydrolazy znalazły najszersze zastosowanie przemysłowe⁴⁰.

Enzymami produkowanymi i stosowanymi w dużych ilościach są m.in. glikozydazy, enzymy działające na wiązania glikozydowe. Obecnie większość technicznych preparatów enzymatycznych jest otrzymywana z dwóch gatunków mikroorganizmów: bakterii *Bacillus* i grzybów *Aspergillus*. Preparaty te prócz odpowiedniej jakości, powinny charakteryzować się niską ceną. Na rynku preparatów enzymatycznych istnieją również enzymy specjalistyczne, produkowane w znacznie mniejszych ilościach, za to w bardzo czystej formie⁴¹.

Enzymy stosowane w przemyśle skrobiowym należą do klasy hydrolaz [EC 3.2]. Istnieje wiele sposobów klasyfikowania tych enzymów. Najbardziej użyteczny w tej pracy

³⁷ J.Park, J.Rollings¹, *Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerization of mixed, linear and branched polysaccharides, I Amylose/Amylopectin α -amylolysis*, Biotech. Bioeng., 44, 1994

³⁸ W.Leszczynski, G.Lisińska, op.cit.

³⁹ S.Hizukuri, Carbohydr. Research, 147, 1986, op.cit.

⁴⁰ M.L.Shuler, F.Kargi, *Bioprocess Engineering. Basic Concepts*, PTR Prentice Hall, 1992

⁴¹ K.W.Szewczyk¹, *Technologia biochemiczna*, Oficyna wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1995

będzie podział enzymów ze względu na miejsca cięcia w cząsteczce substratu:

- endoenzymy (m.in. α -amylaza),
- egzoenzymy (m.in. glukozamylaza i β -amylaza),

i typu rozcinanego wiązania:

- hydrolizujące wiązania α -1,4-glikozydowe (endo- i egzoamylazy),
- hydrolizujące wiązania α -1,6-glikozydowe,
- hydrolizujące wiązania α -1,4- i α -1,6-glikozydowe⁴².

Specyficzność enzymów jest ściśle związana z mechanizmem ich działania. Enzymy charakteryzują się specyficznością funkcyjną (tzn. zdolnością katalizowania jedynie określonej przemiany) i specyficznością substratową (tzn. zdolnością katalizowania przemiany określonego substratu lub substratów bardzo do siebie podobnych)⁴³. Umożliwia to prowadzenie reakcji określonego typu lub hydrolizy wiązań w danej strukturze przestrzennej. Substrat przyłącza się do centrum aktywnego enzymu, tworzy się kompleks aktywny, w którym dopiero następuje przemiana substratu w produkt. Centrum aktywne jest strukturą ulegającą modyfikacji na skutek związania substratu⁴⁴. Aktywność biologiczna enzymu zależy od określonej konformacji cząsteczek białka, polegającej na odpowiednim sfałdowaniu łańcucha polipeptydu w przestrzeni trójwymiarowej. Rozwinięcie tego łańcucha prowadzi do utraty aktywności. Zarówno na enzym, jak i na kompleks aktywny mogą oddziaływać inne substancje powodujące efekt aktywacji, inaktywacji i hamowania reakcji enzymatycznej. Kompleks aktywny może podlegać przekształceniom, jeszcze zanim odłączy się produkt⁴⁵. Centrum katalityczne enzymu złożone jest z podcentrów wiążących (szeregu przylegających do siebie podmiejsc, z których każde specyficznie oddziałuje z jednym merem substratu) oraz z podmiejsca katalitycznego. Właściwe miejsce katalityczne, odpowiedzialne za reakcję hydrolizy lub syntezy wiązania glikozydowego, znajduje się pomiędzy określonymi podmiejskami wiążącymi. Przykładowo dla α -amylazy upłynniającej z *Bacillus subtilis* podmiejsc wiążących jest 8, a podmiejsce katalityczne usytuowane jest pomiędzy 6 a 7 podmiejscem wiążącym, dla glukozamylazy z *Aspergillus niger* podmiejsc wiążących jest 5, podmiejsce

⁴² L. Słomińska¹, Przemysł Spożywczy, 12, 1993, op.cit.

⁴³ K. W. Szewczyk², *Bilansowanie i kinetyka procesów biochemicznych*, Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1993

⁴⁴ A. Tanaka, S. Takeda, *Random attack as the hydrolytic reaction mode of oligosaccharides by Rhizopus glukozamylase*, Biosci. Biotech. Biochem., 59 (7), 1995

⁴⁵ K. W. Szewczyk², op.cit.

katalityczne znajduje się pomiędzy 1 a 2, dla β -amylazy z jęczmienia, pszenicy, odpowiednio 5 i pomiędzy 2 a 3. W podgrupie enzymów α obok dużych różnic w ilości podmiejsk wiążących (5-10), występuje duża różnorodność ulokowania podmiejsk katalitycznych enzymów⁴⁶. Hydrolizując skrobię enzymami z podgrupy α otrzymuje się bardzo zróżnicowane produkty pośrednie i finalne.

Generalnie enzymy amylolityczne mogą działać na trzy sposoby:

1. przypadkowy atak - enzym przyłącza się do substratu, rozcina wiązanie i pozostawia ten substrat, przyłączając się do innego,
2. atak na pojedynczy łańcuch - enzym przyłącza się do danego łańcucha, hydrolizuje go całkowicie, odłącza się i atakuje następny łańcuch,
3. wielokrotny atak na łańcuch - enzym przyłącza się do łańcucha, rozcina kilka wiązań (ślizganie się enzymu), po czym odłącza się i atakuje następny łańcuch.

Typy ataku (1) i (2) mogą być rozpatrywane jako dwa skrajne przypadki typu (3)⁴⁷.



α -amylaza

α -Amylazy atakują amylozę losowo, a w amylopektynie rozcinają najpierw wiązania α -1,4-glikozydowe ulokowane na zewnątrz klastra⁴⁸.

Atak α -amylazy z *Bacillus licheniformis* na amylopektynę jest w pierwszym etapie przypadkowy. Z czasem, gdy zaczyna brakować wiązań łatwo dostępnych, a jest dużo dekstryn, wyłania się szablon nieprzypadkowej hydrolizy (trzeba zaznaczyć, że wiązania α -1,4-glikozydowe w bliskim sąsiedztwie wiązań α -1,6, z uwagi na przestrzenne ułożenie, nie ulegają hydrolizie, wg Rollingsa i Parka dwa, trzy najbliższe są niereaktywne)^{49,50}. Nieprzypadkowy atak w końcowym etapie reakcji zauważył również Bertoft⁵¹ dla α -amylazy z *Bacillus subtilis*. Uporządkowana struktura cząsteczki amylopektyny zmusza enzym, by atakował kilka pozostałych, „atrakcyjnych” dla niego wiązań.

Zdaniem wielu badaczy atak wielokrotny jest najbardziej prawdopodobny. Sugerował go Nowotny⁵², a zaobserwowali dla α -amylazy z trzustki między innymi Robin i French⁵³

⁴⁶ J. Bryjak¹, *Enzymatyczna hydroliza skrobi do syropów maltodekstrynowych i skrobiowych. Część I – Enzymy*, Biotechnologia, 1 (44), 1999

⁴⁷ A. Tanaka, S. Takeda, Biosci. Biotech. Biochem, 59 (7), 1995, op.cit.

⁴⁸ J. Park, J. Rollings², *Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerization of mixed, linear and branched polysaccharides, I Amylose/Amylopectin α -amylolysis*, Biotech. Bioeng., 45, 1995

⁴⁹ K. W. Szewczyk², op.cit.

⁵⁰ S. Gorinstein, *Kinetics studies during enzyme hydrolysis of potato and cassava starches*, Starch, 45, 1993

⁵¹ E. Bertoft, *Hydrolysis of amylopectin by the alpha-amylase of B. subtilis*, Carbohydr. Research, 149, 1986

⁵² F. Nowotny³, *Mechanizm rozkładu skrobi przez α - i β -amylazy*, Postępy biochemii, t. I, zeszyt 3-4, 1955

oraz Nakatani⁵⁴. Do takich wniosków skłonił badaczy fakt pojawiania się maltooligosacharydów (maltozy, maltotriozy itp.) w początkowych etapach reakcji. Uważa się, że cząsteczka α -amylazy scukrzającej może dokonać kilku cięć substratu, przesuwając się wzdłuż łańcucha. W przypadku α -amylazy z *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis* ten typ ataku nie był obserwowany. α -Amylasy ze szczepów *Bacillus* atakują skrobię jednorazowo, w początkowym okresie przypadkowo. Przy krótkich czasach reakcji α -amylaza z *Bacillus* sp. daje produkty o wysokich masach cząsteczkowych (nie byłoby to możliwe w przypadku ataku wielokrotnego, powstałyby również zauważalne ilości oligocukrów). Stwierdzono, że enzym ma większe powinowactwo do dłuższych łańcuchów (większe szanse utworzenia kompleksu aktywnego)⁵⁵. Jeżeli czas reakcji jest długi, pojawiają się frakcje zawierające duże ilości maltooligosacharydów⁵⁶.

Podczas procesu hydrolizy skrobi z udziałem α -amylazy z *Bacillus subtilis* Colonna i współpracownicy zaobserwowali dwie fazy reakcji: szybką i wolniejszą. Govindasamy⁵⁷ i inni też potwierdzają model dwuetapowej hydrolizy enzymatycznej skrobi. Używając α -amylazy z *Bacillus licheniformis* zaobserwowali najpierw gwałtowną hydrolizę mączki skrobiowej do oligosacharydów G7 i G6 oraz dekstryn, następnie powolną hydrolizę oligocukrów do G5-G1.

Henriksnas⁵⁸ zauważył, że skrobia zawierająca cząsteczki o dużych masach cząsteczkowych jest hydrolizowana wolniej. Gorinstein pokazał, że te same warunki hydrolizy α -amylazą (z *Bacillus* species) skrobi z różnych źródeł dają inne wyniki. Stopień hydrolizy skrobi z manioku (34%) był wyższy niż skrobi ziemniaczanej (4%). Można to wytłumaczyć różną strukturą surowców. Skrobia ziemniaczana ma dłuższe łańcuchy i więcej rozgałęzień. Początkowa prędkość hydrolizy manioku i skrobi ziemniaczanej jest proporcjonalna do stężenia użytego enzymu (α -amylaza z *Bacillus* species), ale stałe szybkości reakcji są różne, zależnie od typu skrobi.

⁵³ H.Henriksnas, T.Lovgren, *Chain-length distribution of starch hydrolyzate after α - and β -amylase action*, Biotech. Bioeng., 20, 1978

⁵⁴ H.Nakatani, *Monte Carlo simulation of multiple attack mechanism of α -amylase*, Biopolymers, 39, 1996

⁵⁵ V.Komolprasert, R.Ofoli, *Starch hydrolysis kinetic of *B.licheniformis* α -amylase*, J. Chem. Tech. Biotech., 51, 1991

⁵⁶ S.Gorinstein, *Starch*, 45, 1993, op.cit.

⁵⁷ S.Govindasamy, C.G. Oates, H.A. Wong, *Characterization of changes of sago starch components during hydrolysis by a thermostable α -amylase*, Carbohydr. Polymers, 18, 1992

⁵⁸ H.Henriksnas, T.Lovgren, *Biotech. Bioeng.*, 20, 1978, op.cit

Fujii i Kawamura⁵⁹ zauważyli, że w procesie hydrolizy skrobi (o różnych masach cząsteczkowych) z udziałem α -amylazy szybkość reakcji jest funkcją ilości wiązań glikozydowych w substracie (podobne założenie przyjął Marchal⁶⁰). Szybkość reakcji nie jest ich zdaniem funkcją stężenia molowego, lecz stężenia masowego.

β -amylaza

β -Amylaza, maltogenna egzoamylaza, hydrolizuje tylko wiązania α -1,4-glikozydowe, zaczynając działanie od nieredukującego końca łańcucha skrobi. Enzym hydrolizuje amylozę prawie całkowicie do maltozy (75-90%), natomiast amylopektynę w 55-60%. β -Amylaza produkuje duże ilości dekstryn granicznych (z amylopektyny), maltotrioz oraz około 55% maltozy. Działanie jej wstrzymują liczne rozgałęzienia łańcucha⁶¹. Z uwagi na to ograniczenie, łączy się β -amylazę z innymi enzymami⁶², np. pululanazą, izoamylazą. Taka współpraca daje 80-90% maltozy⁶³. Atak enzymów odgałęziających daje jeden nowy koniec redukujący i żadnych nowych końców nieredukujących, nie stwarza więc nowych miejsc ataku dla β -amylazy. Dużo bardziej korzystnie wypada α -amylaza, która hydrolizując w środku łańcuch biopolimeru, tworzy jeden koniec redukujący i jeden nieredukujący⁶⁴. Literatura podaje, że pierwsze próby otrzymania syropów maltozowych przy zastosowaniu unieruchomionej β -amylazy, dały około 50% maltozy [Deleyn i Stauffs 1990].

Potwierdzono po raz kolejny, że skrobia zawierająca dużo cząsteczek o wysokich masach cząsteczkowych (rozgałęzione) jest wolniej trawiona przez enzym. β -Amylaza hydrolizuje amylozę z pszenicy i kukurydzy w 90%, a z ziemniaka w ok. 82%. Cząsteczki amylozy z kukurydzy i pszenicy są mniejsze, średnia długość ich łańcuchów wynosi 195-240 glukozy, mają nieliczne rozgałęzienia. W cząsteczce amylozy ze skrobi ziemniaczanej liczba rozgałęzień może wynieść nawet 18. Nawet po wcześniejszym odgałęzieniu amylozy izoamylazą, β -amylaza nie hydrolizuje skrobi ziemniaczanej

⁵⁹ M.Fujii, Y.Kawamura, *Synergistic action of alpha- and glucoamylases on hydrolysis of starch*, Biotech. Bioeng., 27 (3), 1985

⁶⁰ L.M.Marchal, J.Jonkers i in., *The effect of process condition on the α -amylolysis hydrolysis of amylopectin potato starch: An experimental design approach*, Biotech. Bioeng., 62, 1999

⁶¹ D.J.Manners, N.K.Matheson, *The fine structure of amylopectin*, Carbohydr. Research, 90, 1981

⁶² F.Shivaishi, K.Kawakami, *Kinetic expression for maltose production from soluble starch by simultaneous use of β -amylase and debranching enzyme*, Biotech. Bioeng., 30, 1987

⁶³ L.Słomińska², *Roczniki AR Poznań*, 239, 1993, op.cit.

⁶⁴ J.Zhou, *Kinetic model for the co-action of β -amylase and debranching enzymes in the production of maltose*, Biotech.Bioeng., 62, 1999

całkowicie, tylko w 86%, pozostałe skrobię w 95%⁶⁵. β -Amylaza hydrolizuje amylopektynę otrzymaną z ziemniaka w 53%, przy czym po wcześniejszym odgałęzieniu wartość ta wzrasta do 85%. β -Amylaza przynależy do enzymów scukrzających, którym wielu badaczy przypisuje mechanizm ataku wielokrotnego lub ataku na pojedynczy łańcuch⁶⁶. U β -amylaz stwierdzono występowanie 5-7 podmiejszc wiążących w centrum aktywnym, z podmiejszczem katalitycznym umiejscowionym między 2 i 3 podmiejszczem wiążącym⁶⁷.

glukoamylaza

Glukoamylaza, hydrolizując wiązania α -1,4-glikozydowe i α -1,6-glikozydowe, „obiera” ziarenko skrobi i odsłania jego głębsze warstwy. Enzym rozcina wiązania α -1,4-glikozydowe od nieredukującego końca łańcucha, dając duże ilości glukozy. Glukoamylaza rozcina również wiązania α -1,6-glikozydowe, ale z dużo mniejszą szybkością. Proces scukrzania skrobi do glukozy, wyłącznie przy zastosowaniu glukoamylazy, wymaga bardzo długiego czasu reakcji. Stosując kombinację glukoamylazy z enzymami rozgałęziającymi można w stosunkowo krótkim czasie uzyskać ~95% glukozy⁶⁸.

Glukoamylazy posiadają 5-7 podmiejszc z miejscem katalitycznym zlokalizowanym pomiędzy 1 a 2 podmiejszczem wiążącym⁶⁹. Glukoamylaza z *Aspergillus niger* zawiera 5 podmiejszc, z których każdy łączy się z resztą glukozową (specyficzność substratowa). Przypuszcza się, analizując struktury podmiejszc, że po hydrolizie wiązań glikozydowych (surowcem były oligosacharydy), produkty opuszczają cząsteczkę enzymu bez kolejnego cięcia wiązania - przypadkowy atak. Taki charakter ataku jest typowy dla wszystkich enzymów amylolitycznych (α -amylazy, glukoamylazy, β -amylazy), gdy substratem są oligosacharydy⁷⁰. Kondo i in. obserwując rozkład produktów hydrolizy amylozy i porównując dane doświadczalne z danymi wynikającymi z budowy centrum katalitycznego, doszli do wniosku, że tylko atak wielokrotny wyjaśnia uzyskane wyniki. Enzymy scukrzające najczęściej przejawiają mechanizm ataku wielokrotny lub atak

⁶⁵ G.Murugesan, K.Shibanuma, S.Hizukuri, *Characterisation of hot-water-soluble components of starches*, Carbohydr. Research, 242, 1993,

⁶⁶ T.Nakoshima, Y.Matsumoto, M.Kohno, *Kinetic study on maltal binding site of sweet potato β -amylase*, Biosci. Biotech. Biochem., 60, 1996

⁶⁷ J.Bryjak¹, *Biotechnologia*, 1, 1999, op.cit.

⁶⁸ L.Słomińska², *Roczniki AR Poznań*, 239, 1993, op.cit.

⁶⁹ J.Bryjak¹, *Biotechnologia*, 1, 1999, op.cit.

na pojedynczy łańcuch. W amylopektynie enzym przypuszcza atak wielokrotny na łańcuchy A. Fujii, Homma, Taniguchi⁷¹ pokazali, że model Michaelis-Menten może opisywać działanie glukoamylazy.

2.3. Charakterystyka procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi

Depolimeryzację skrobi można dokonać na wiele sposobów: stosując ultradźwięki, radiolizę, termiczny rozkład, działanie kwasami oraz, często spotykany, rozkład enzymatyczny. Hydroliza enzymatyczna skrobi jest bardzo ważnym komercyjnie procesem⁷². W hydrolizie enzymatycznej można, wykorzystując specyficzne działanie enzymów, stosować różne procesy (upłynnianie, scukrzanie, cyklizację, transglukozyzację, utlenianie, izomeryzację). Na drodze enzymatycznej degradacji makrocząsteczek skrobi otrzymuje się produkty o składzie zależnym od stopnia degradacji oraz sposobu i czasu działania stosowanych preparatów. W pierwszym etapie otrzymuje się najczęściej mieszaninę wyższych i średnich oligosacharydów, które tworzą syrop skrobiowy^{73,74}. Dobierając odpowiednio długi czas hydrolizy można uzyskać mieszaninę o bardzo wysokiej zawartości glukozy (syropy wysokoglukozowe)⁷⁵. Główne typy enzymów stosowane w przemyśle skrobiowym zamieszczono w tabeli 2.3.1.

Tabela 2.3.1. Enzymy amylolityczne stosowane w przemyśle skrobiowym.

enzym	uwagi
α -amylaza (upłynniająca)	pochodzenia grzybowego lub bakteryjnego - rozkłada wiązania α -1,4-glikozydowe wewnątrz łańcucha (w sposób przypadkowy) omijając wiązania α -1,6-glikozydowe
β -amylaza (scukrzająca)	rozcina wiązania α -1,4-glikozydowe od nieredukującego końca łańcucha, zatrzymując się średnio trzy reszty glukozowe przed wiązaniem α -1,6-glikozydowym, odcina cząsteczki maltozy

⁷⁰ A.Tanaka, S.Takeda, Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1995, op.cit.

⁷¹ M.Fujii, T.Homma, M.Taniguchi, *Synergism of alpha- and glucoamylases on hydrolysis of native starch granules*, Biotech Bioeng, 35, 1988

⁷² L.M.Marchal, J.Jonkers i in., Biotech. Bioeng., 62, 1999, op.cit.

⁷³ M.Kearsley, S.Z.Dziedzic, *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives*, London:Blackie Acad. And Professional, 1995

⁷⁴ R.J.Alexander, H.F.Zobel, *Developments in carbohydrate chemistry*, St.Paul, Am. Ass. of Cereal Chem., 1994

⁷⁵ R.Bogoczek, E.Kociolek-Balawejder, *Technologia chemiczna organiczna*, Wydawnictwo AE we Wrocławiu, Wrocław, 1992

glukoamylaza	egzoamylaza hydrolizująca wiązania α -1,4-glikozydowe z wytworzeniem glukozy, rozcina również wiązania α -1,6-glikozydowe
α -D-glukozydaza	amylaza hydrolizująca wiązania α -1,4-glikozydowe od nieredukującego końca łańcucha skrobi z większą szybkością niż glukoamylaza
egzo- α -D-glukanaza	amylaza hydrolizująca wiązania α -1,4-glikozydowe do maltooligosacharydów (4-7 reszt glukozy)
pululanaza i izomeraza	endoenzymy hydrolizujące wiązania α -1,6-glikozydowe
transferaza glukozowa cyklodekstryn	odcina pętlę helikalnej cząsteczki amylozy i łączy ją w pierścień ⁷⁶

dane zaczerpnięto z „Immobilized enzymes for food processing” P.J.Reilly⁷⁷

Ze względu na szczególną rolę w procesie hydrolizy skrobi wyróżnić należy α -amylazy upłynniające i glukoamylazy. W wyniku upłynniania skrobi powstaje duża ilość dekstryn. Są one głównym składnikiem syropu skrobiowego (DE>20) i dekstrynowego (DE<20). Wstępne upłynnianie skrobi α -amylazą pozwala na :

- * uzyskanie roztworu skrobi w stopniu umożliwiającym szybkie działanie innych enzymów,
- * redukcję wysokiej lepkości,
- * degradację cząsteczki skrobi do krótkich łańcuchów, nie ulegają one wtedy np. retrogradacji.

Scukrzenie upłynnionej już skrobi prowadzi do powstania syropu maltozowego (DE~40-80), wysokoscukrzonego (DE~60-70), glukozowego (DE~80-90)⁷⁸. Ze wzrostem cukrów prostych w produkcie końcowym wzrasta słodycz i rozpuszczalność. Syropy skrobiowe spełniają rolę czynnika wiążącego, wypełniającego, stabilizującego. Syropy maltozowe charakteryzują się łagodną, słodową słodyczą, niską lepkością i obniżoną tendencją do krystalizacji, przedłużają trwałość produktów, wykorzystywane są więc w cukiernictwie. W zależności od stosowanego preparatu enzymatycznego uzyskuje się różne ilości maltozy w syropie. W syropach wysokoscukrzonych dominuje glukoza,

⁷⁶ L.Słomińska³, *Enzymatyczne metody transformacji skrobi*, Przemysł Spożywczy, 12, 1995

⁷⁷ P.J.Reilly, *Immobilized enzymes for food processing*, Ed.W.H.Pitcher Jr., CRC Press Inc., Florida, 1980

⁷⁸ B.R.Pieters, G.Berdeletti i in., *Glucoamylase immobilization on a magnetic microparticle for the continuous hydrolysis of maltodextrin in a fluidized bed reactor*, App. Biochem. Biotechnol., 32, 1992

są też zauważalne ilości maltozy. Do ich wytworzenia stosuje się m.in. pleśniową α -amylazę i glukoamylazę. Syropy glukozowe stosuje się m.in. w medycynie.

Rozkład enzymatyczny skrobi dokonuje się dzięki endo- i egzoamylazom. Endoamylazy to głównie α -amylazy upłynniające. Produktami ich hydrolizy są oligosacharydy o różnej długości łańcuchów oraz dekstryny.

- ♦ **α -amylaza z *Bacillus subtilis*** - produkuje oligosacharydy G1-G6 oraz dekstryny graniczne; Fuwa i in. zaobserwowali, pod mikroskopem scaningowym, że enzym ten atakuje granulę skrobi w jednym miejscu, tworząc rysę, początkowo niewielką, prowadzącą do rozerwania, a z czasem do całkowitego zhydrolizowania ziarenka⁷⁹,
- ♦ **α -amylaza z *Bacillus licheniformis*** - produkuje głównie maltozę, maltotriozę, maltopentaozę oraz dekstryny; produkowana początkowo przez nią maltoheksaoza jest następnie prawie całkowicie hydrolizowana,
- ♦ **α -amylaza z *Bacillus amyloliquefaciens*** - produktami hydrolizy z jej udziałem są znaczne ilości dekstryny oraz minimalne ilości glukozy, maltozy i maltotriozy.

Egzoamylazy odszczepiają niskomolekularne produkty, tj. glukozę lub maltozę od nieredukującego końca łańcucha. Niektóre posiadają też zdolność hydrolizy wiązań α -1,6-glikozydowych.

- ❖ **β -amylaza** pochodzenia mikrobiologicznego np. z *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* sp. - hydrolizuje skrobię do maltozy i dekstryn granicznych. Maltoheksaoza i wyższe cukry są chętniej hydrolizowane niż mniejsze cząsteczki. Obecność maltozy i maltotetraozy zmniejsza szybkość działania enzymu. Znaczenie przemysłowe ma β -amylaza z jęczmienia,
- ❖ **glukoamylaza np. z *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp.** - szybkość hydrolizy z ich udziałem zależy od procentowej zawartości w nim monocukrów (odwrotnie proporcjonalnie) i policukrów. Wyższe oligocukry są szybciej hydrolizowane niż np. maltoza. Obecność łańcuchów 2-6 glukozowych może utrudniać hydrolizę glukoamylazą, enzym hamowany jest przez glukozę,
- ❖ **maltogenna endo- α -amylaza z *Aspergillus oryzae*** (grzybowa) - hydrolizuje skrobię głównie do maltozy i maltotriozy.

⁷⁹ M.Fujii, T.Homma, M.Taniguchi, Biotech Bioeng, 35, 1988, op.cit.

2.4. Kinetyka procesu enzymatycznej hydrolizy biopolimerów

Reakcje enzymatyczne towarzyszą człowiekowi na każdym kroku. Część z nich jest niepożądana, jak chociażby psucie się produktów żywnościowych. Jednak coraz większą ilość tych reakcji wykorzystuje się racjonalnie technologicznie, np. w produkcji piwa, serów, antybiotyków. Jednym z pierwszych badaczy, który świadomie wykorzystał działanie enzymów był Kirchhoff [1812]^{80,81}. Zaobserwował on, że wyciąg ze słodu jęczmiennego rozkłada skrobię do cukrów prostych. Autorem pierwszego ogólnego równania opisującego reakcje z udziałem enzymów był Henri [1903]. Równanie to wykorzystali nieco później Michaelis i Menten [1913].

Szybkość reakcji katalizowanych przez enzymy może być opisana na przykład równaniem Michaelis-Menten. Jest to jeden z najprostszych modeli kinetycznych opisujących reakcję enzymu z substratem. Równanie to nie jest ogólnym równaniem kinetycznym, a stanowi jedynie uproszczony opis dość często występującego mechanizmu^{82,83}. Autorzy modelu przyjęli, że enzym łączy się z substratem ze stałą szybkości k_1 , tworząc kompleks aktywny [ES]. Kompleks może dysocjować na [E] i [S] ze stałą k_2 lub może się przekształcać, tworząc produkt ze stałą szybkości k_3 .



Przy założeniu stanu pseudoustalonego ($d[ES]/dt=0$) oraz przyjmując, że $[E_0] \ll [S]$ otrzymuje się:

$$\frac{([E_0] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M \quad (2.4.1)$$

Przekształcając powyższe równanie względem [ES] otrzymuje się:

$$[ES] = \frac{E_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2.4.2)$$

Wykorzystując założenie, że rozpad kompleksu [ES] na produkt i enzym jest nieodwracalny, a szybkość reakcji rozpadu tego kompleksu decyduje o ogólnej szybkości reakcji enzymatycznej:

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_3 \cdot [ES] \quad (2.4.3)$$

⁸⁰ B. Filipowicz, W. Więchowski, *Biochemia*, tom I, PWN Warszawa-Lódź, 1986

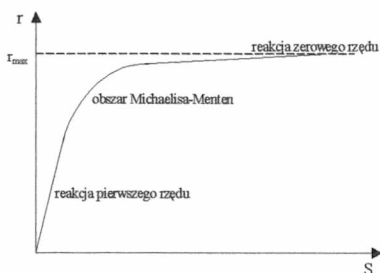
⁸¹ P.J.Reilly, op.cit.

⁸² J.Segel, *Enzyme kinetics*, Ed. J.Wiley&Sons, New York-London-Sydney-Toronto, 1975

⁸³ K.J.Laidler, *Chemical kinetics*, International Student Edition, Second Edition, McGraw-Hill, London

i uwzględniając równanie (2.4.2) otrzymuje się:

$$r = \frac{k_3 \cdot E_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{r_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2.4.4)$$



Przy niskich stężeniach substratu szybkość reakcji jest proporcjonalna do jego stężenia (odpowiada to reakcji pierwszego rzędu). Przy dużych stężeniach substratu szybkość reakcji nie zależy od $[S]$ i równa się wartości maksymalnej $r_{\max}$.

Stała szybkości reakcji k_3 nazwana została liczbą obrotów enzymu i oznacza liczbę cząsteczek substratu przekształconych w produkt reakcji w jednostce czasu, w warunkach pełnego wysycenia enzymu substratem. Stała k_3 dla większości enzymów, pracujących ze swoimi fizjologicznymi substratami, wynosi $1 \div 10^4$ na sekundę. Stała K_M nosi nazwę stałej Michaelisa; jej odwrotność jest miarą powinowactwa enzymu do substratu. K_M ma dwa znaczenia: (1) wiąże się ze stałymi szybkości reakcji, (2) oznacza takie stężenie substratu, przy którym połowa miejsc aktywnych enzymu jest obsadzona przez substrat^{84,85}. Stała Michaelisa dla większości enzymów mieści się w zakresie ($10^{-1}, 10^{-6}$) [mol/dm³] i zależy od rodzaju substratu oraz warunków zewnętrznych, przede wszystkim od siły jonowej, wartości pH i temperatury⁸⁶.

Stała kinetyczna k_3 rozpadu kompleksu $[ES]$ na produkt i enzym jest zależna od temperatury i można tę zależność opisać równaniem Arrheniusa. Zgodnie z nim, szybkość reakcji enzymatycznej powinna rosnąć wraz z temperaturą⁸⁷. Z uwagi na występowanie inaktywacji enzymu zależność ta jest jednak bardziej złożona. Spadek aktywności enzymatycznej jest skutkiem oddziaływania np. czynników środowiska: pH, temperatury, substratu, produktów, inhibitorów⁸⁸. Szybkość inaktywacji (denaturacji) enzymu zależy także od jego pochodzenia, stopnia oczyszczenia enzymu oraz środowiska, w którym enzym się znajduje. Szybkość utraty aktywności enzymu zależy również od warunków prowadzenia procesu, składu roztworu oraz metody immobilizacji⁸⁹.

⁸⁴ R. Streyer, *Biochemia*, PWN, Warszawa, 1986

⁸⁵ D.V. Roberts, *Enzyme kinetics*, Cambridge University Press, Cambridge, 1977

⁸⁶ E. Klimiuk, B. Losow, M. Bulińska, op.cit.

⁸⁷ K. W. Szewczyk², op.cit.

⁸⁸ D. Voet, J. Voet, *Biochemistry*, Ed. J. Wiley & Sons, New York-Chichester-Toronto-Singapore, 1990

⁸⁹ K. W. Szewczyk¹, op.cit.

Sposób unieruchamiania enzymów może wpływać na utratę ich aktywności. Przyczyną tego może być:

- ❖ związanie enzymu z nośnikiem np. w takiej konfiguracji, że centrum aktywne enzymu jest niedostępne dla substratu,
- ❖ związanie enzymu z nośnikiem w taki sposób, że zniszczony zostaje układ przestrzenny centrum katalitycznego, przez co powstaje nieaktywna konfiguracja,
- ❖ uwalnianie materiału biologicznego z nośnika,
- ❖ zmniejszenie się powierzchni kontaktu enzym-substrat w wyniku pokrywania nośnika różnymi substancjami,
- ❖ uszkodzenie lub zniszczenie mechaniczne nośnika, wpływ naprężeń.

Często zdarza się tak, że proste pozornie (np. jednoetapowe) reakcje rozkładu biopolimeru nie spełniają założeń modelu Michaelis-Menten⁹⁰, a obwarowany założeniami model nie zawsze daje się zastosować do opisu kinetyki z udziałem niektórych enzymów^{91,92}. Model Michaelis-Menten wyprowadzono dla warunków, gdy $E_0/S \rightarrow 0$, a w procesach biochemicznych istnieją sytuacje, kiedy stężenie enzymu jest porównywalne ze stężeniem substratu. Może to mieć miejsce w dwóch przypadkach:

- 1) w końcowym etapie reakcji biochemicznej, gdy większość substratu już przereagowała,
- 2) gdy reakcja przebiega na granicy faz, np. dla enzymów immobilizowanych, stężenie substratu na granicy faz warstewka cieczy-powierzchnia nośnika może być małe w porównaniu z całkowitym stężeniem enzymu na powierzchni nośnika⁹³.

W takich przypadkach mogą wystąpić poważne odchylenia pomiędzy wynikami obliczonymi z równania Michaelis-Menten a uzyskanymi w doświadczeniach. Również mechanizm ataku enzymu, inny od założonego w modelu Michaelis-Menten, może powodować rozbieżności w wynikach doświadczalnych i obliczeniowych. Dużą rolę przy opisie procesu odgrywać może: wielkość i struktura cząsteczek surowca, pochodzenie enzymu, lepkość roztworu, mieszanie układu. Mimo licznych trudności wielu naukowców wykorzystuje model Michaelis-Menten, stosując czasami pewne modyfikacje, dodatkowe założenia i wielkości w równaniu matematycznym. Reakcje enzymatyczne hamowane przez substancje, będące analogami strukturalnymi substratu, można opisać równaniem

⁹⁰ S.Aiba, *Inżynieria Biochemiczna*, WNT, Warszawa, 1977

⁹¹ M.Fujii, T.Homma, M.Taniguchi, *Biotech Bioeng*, 35, 1988, op. cit.

⁹² R.M.Costa, F.X.Malcata, *Multisubstrate Michaelis-Menten kinetics: Explicit dependence of substrate concentration on time for batch process*, *Bioprocess Eng.*, 10, 1994

Michaelis-Menten z inhibicją, uwzględniając odpowiednią stałą inhibicji^{94,95}. Przy czym należy pamiętać, że założenie równowagi przyjęte w modelu Michaelis-Menten nie jest sprzeczne tylko dla inhibitorów działających w sposób odwracalny.

Law i współprac.⁹⁶ rozpatrywali hydrolizę maltodekstryn glukoamylazą. W swoich rozważaniach przyjęli trzy ważne założenia: (1) - nieodwracalną hydrolizę każdego maltooligosacharydu zgodnie z multisubstratowym modelem Michaelis-Menten, (2) - inhibicję kompetycyjną produktem, (3) - inaktywację enzymu.

Otrzymali równanie postaci:

$$E_0 \cdot k_2 \cdot \frac{\ln(1 + k_d)}{k_d} = \left(1 - \frac{K_M}{K_P}\right) \cdot \left(\frac{G - G_0}{1,1}\right) - K_M \cdot \left(1 + \frac{S_0}{K_P}\right) \cdot \ln \left[\frac{1,1 \cdot S_0 - (G - G_0)}{1,1 \cdot S_0} \right] \quad (2.4.5)$$

obowiązujące tylko dla użytego enzymu w warunkach reakcji. Marc, Engasser, Rollinga, Thompson rozwijali opis kinetyki hydrolizy skrobi z udziałem α -amylazy w oparciu o profil produktów reakcji. Rollings i Thompson⁹⁷ podzielili produkty na cztery przedziały o różnych masach cząsteczkowych. Podobnie czynili Henriksnas i Lovgren⁹⁸. Colonna i współprac.⁹⁹ zaobserwowali, że hydrolizę skrobi α -amylazą (z *Bacillus subtilis*) można podzielić na dwie fazy: szybszą i wolniejszą. Zaproponowali więc nowe równanie, analogiczne w założeniach i „treści” do równania Michaelis-Menten. Równanie to opisuje dobrze tylko pierwszą fazę reakcji. Model ten nie sprawdza się przy długich czasach reakcji. Komolprasert i Ofoli¹⁰⁰ prowadząc reakcję hydrolizy skrobi α -amylazą (z *Bacillus licheniformis*) stwierdzili, że reakcja może być reprezentowana przez klasyczny model Michaelis-Menten tylko w zakresie niskich stężeń skrobi. Potwierdził te spostrzeżenia Yankow i współprac. Z kolei Rollings i Park¹⁰¹ dokonali podziału substratu na trzy podklasy: liniową amylozę (S_L), liniowe łańcuchy amylopektyny na zewnątrz klastra (S_B) i liniowe łańcuchy wewnątrz cząsteczki amylopektyny (S_C). Rozpatrywali model kinetyki dwufazowej, bazującej na jednoczesnej hydrolizie liniowych i rozgałęzionych frakcji substratu. Wyprowadzili równanie szybkości reakcji z siedmioma stałymi :

⁹³ E.Kilimiuk, B.Lossow, op.cit.

⁹⁴ E.Kilimiuk, B.Lossow, M.Bulińska, op.cit.

⁹⁵ J.Segel, op.cit.

⁹⁶ C.Law, L.Webb, R.Williams, *Kinetic studies on glucoamylase with maltodextrin as substrate*, Chemical Eng. Research & Design, 71, 1993

⁹⁷ J.E.Rollings, R.W.Thompson, *Kinetics of enzymatic starch liquefaction: Simulation of the high-molecular-weight product distribution*, Biotech. Bioeng., 26, 1984

⁹⁸ V. Komolprasert, R.Y. Ofoli, J. Chem. Tech. Biotech., 51, 1991, op. cit.

⁹⁹ A.Colonna, A.Buleon, F.Lemarie, *Action of B.subtilis α -amylase on native wheat starch*, Biotech. Bioeng., 31, 1988

¹⁰⁰ V. Komolprasert, R.Y. Ofoli, J. Chem. Tech. Biotech., 51, 1991, op.cit.

¹⁰¹ J.Park, J.Rollings¹, Biotech. Bioeng., 44, 1994, op.cit.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\frac{r_{\max,L}}{K_{M,L}} \cdot S_L + \frac{r_{\max,B}}{K_{M,B}} \cdot S_B}{1 + \frac{S_L}{K_{M,L}} + \frac{S_B}{K_{M,B}} + \frac{S_C}{K_{M,C}} + \frac{P_L}{K_{I,L}} + \frac{P_B}{K_{I,B}}} \quad (2.4.6)$$

Jeszcze bardziej skomplikowane równania (wymagające wyznaczenia kilkunastu parametrów) zaproponowali Zanin i Moraes¹⁰². Zaadoptowali oni do opisu kinetyki scukrzania manioki przez glukoamylazę model Marca, „wzbogacając” go o dodatkowe założenia: wiązania α -1,6-glikozydowe nie są hydrolizowane, istnieje reakcja rewersji maltoza $\rightarrow$ maltotrioza. Marc stworzył multisubstratowy model uwzględniający m.in. produkty pośrednie (dekstryny), odwracalność niektórych reakcji (glukoza $\rightarrow$ izomaltoza), inhibicję produktami i substratami, współzawodniczenie o centrum aktywne enzymu oraz podział oligosacharydów na dwie frakcje:

- (a) cukry bardziej wrażliwe na hydrolizę (frakcja obejmuje $\sim 77\%$ cząsteczek zawierających wiązania α -1,4-glikozydowe)
- (b) cukry odporne na hydrolizę (frakcja obejmuje pozostałe $\sim 23\%$ cząsteczek zawierających łańcuchy rozgałęzione).

Zaproponowane przez niego równanie szybkości hydrolizy frakcji (a) ma postać:

$$r_a = \frac{r_{\max,a} \cdot G_a \cdot E}{K_{M,a} \cdot \left(1 + \frac{G}{K_I}\right) + G_a + G_2 \cdot \frac{K_{M,a}}{K_{M,2}} + G_3 \cdot \frac{K_{M,a}}{K_{M,3}} + G_b \cdot \frac{K_{M,a}}{K_{M,b}} + \frac{1}{K_S}} \quad (2.4.7)$$

Analogicznie dla frakcji (b).

Proces hydrolizy skrobi zachodzi na kilku niezależnych i równoległych drogach (wówczas szybkość ogólna procesu jest sumą szybkości cząstkowych), ale wymaga także kilku następujących po sobie przemian (wówczas szybkość ogólna jest determinowana przez etap najwolniejszy). Sprawia ta, że rozpatrywany układ reakcyjny skrobia-enzym amylolityczny jest trudny do analizy i opisu, i przysparza badaczom wiele kłopotów.

2.5. Warunki procesowe

Reakcje katalizowane przez enzymy przebiegają dużo szybciej niż te same reakcje katalizowane chemicznie, dlatego preparaty enzymatyczne mogą być konkurencyjne dla innych, nieenzymatycznych katalizatorów. Enzymy przejawiają także nieosiągalne w niektórych klasycznych procesach chemicznych wydajności i selektywności.

¹⁰² G.M. Zanin, F.F. De Moraes, *Modeling cassava starch saccharification with amyloglucosidase*, Appl. Biochem. Biotech., 57/58, 1996

Enzymatyczna hydroliza skrobi daje m.in. wysokiej jakości półprodukty stosowane w produkcji żywności dla niemowląt i diabetyków; produkcja izomaltooligosacharydów nie jest możliwa metodami chemicznymi, a enzymatyczna hydroliza penicyliny acylazą immobilizowaną jest wysoce wydajna, daje czystsze produkty i ułatwia ich rozdział. Reakcje z enzymami immobilizowanymi są prowadzone w łagodnych warunkach, przez co są energooszczędne. Preparaty takie pozwalają na prowadzenie ciągłego procesu, wielokrotne użycie biokatalizatorów, zwiększenie termo- i pH-stabilności enzymu, uzyskanie niezanieczyszczonych produktów. Immobilizując enzym można „usztynić” centrum aktywne (zmniejsza się możliwość rozkładowania struktury centrum), przez co przedłuża się jego trwałość. Immobilizując enzym należy zwrócić uwagę przede wszystkim na ilość wiązanego białka, jego aktywność po immobilizacji oraz trwałość. Ta ostatnia wielkość jest bardzo istotna, gdyż wiąże się z podstawowym parametrem technologicznym, jakim jest stabilność operacyjna enzymu, określana jako czas pracy, po którym enzym traci połowę swej początkowej aktywności.

Unieruchomienie enzymu na nierozpuszczalnym w wodzie nośniku pozwala na zmniejszenie objętości mieszaniny reakcyjnej, a zastosowanie drobnoziarnistego nośnika na uzyskanie dużej powierzchni kontaktu międzyfazowego, a tym samym wyższego stężenia enzymu^{103,104}. Użycie w procesach enzymu immobilizowanego pozwala na obciążenie reaktora większym ładunkiem surowca bez pogarszania efektów jego pracy.

Ulokowanie miejsca reakcji na powierzchni nośnika w preparatach enzymatycznych sprawia, że ogólna szybkość procesu zależy nie tylko od parametrów wpływających na szybkość reakcji (temperatury, stężenia), ale i od zjawisk transportu składników w przestrzeni reakcyjnej. W obszarze kinetycznym, gdzie szybkość reakcji limituje proces, ogólna szybkość procesu rośnie z temperaturą według zależności Arrheniusa, natomiast w obszarze dyfuzyjnym (zewnętrzne zjawiska transportu) szybkość ta zależy od intensywności mieszania i burzliwości przepływu strumieni. W przypadku reakcji kontaktowych bardzo często przyjmuje się model, zgodnie z którym reagującą mieszaninę i katalizator traktuje się jako układ jednorodny – model pseudohomogeniczny. Układ ten opisuje się równaniem kinetycznym, bez uwzględniania zjawisk fizycznych.

¹⁰³ D.Freire, G.Sant'Anna Jr., *Hydrolysis of starch with immobilized glucoamylase. A comparison between two types of expanded-bed reactors*, Appl. Biochem. Biotech., 26, 1990

¹⁰⁴ M.D.Trevar, *Immobilized enzymes. An introduction and applications in biotechnology*, J. Wiley&Sons, Chichester-New York-Toronto, 1980

Opory dyfuzyjne - ograniczenia na drodze transportu substratu do powierzchni nośnika lub do jego wnętrza i produktu od tych powierzchni - mogą być istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg procesów z unieruchomionym enzymem. Jeżeli aktywność preparatu enzymatycznego jest wysoka, to o ogólnej szybkości procesu decydować będą opory dyfuzyjne. Dla substratów wielkocząsteczkowych opory transportu masy oraz ograniczenia natury przestrzennej, utrudniające przemiany enzymatyczne, mogą być szczególnie widoczne.

O wyborze odpowiedniego reaktora dla procesów biotechnologicznych decydować będzie nie tylko typ reakcji, wielkość produkcji czy efekt cieplny, ale przede wszystkim postać enzymu (natywny, immobilizowany), stosowana metoda unieruchamiania biokatalizatora, własności nośnika (kształt, rozmiar, gęstość)¹⁰⁵. Przy tak dużej liczbie współdziałających czynników nie można oczekiwać prostych i ogólnych reguł wyboru reaktora. Często nie ma żadnych ustalonych dróg postępowania a jedynie cel, jakim jest optymalizacja pracy danego bioreaktora lub procesu.

W procesach enzymatycznej hydrolizy skrobi stosuje się reaktory okresowe (z enzymem natywnym i immobilizowanym) oraz różnego typu reaktory przepływowe. Podstawowymi zaletami reaktorów okresowych są: duża objętość, możliwość stosowania substratów o wysokiej lepkości i dowolnych stężeń enzymów, wadą są: reakcje uboczne i niska standaryzacja produkcji¹⁰⁶. Enzymy immobilizowane są wykorzystywane głównie w procesach ciągłych, ponieważ można wtedy w pełni wykorzystać zalety jakie daje związanie enzymu z nośnikiem. W procesach takich najczęściej stosowane są reaktory ze złożem stacjonarnym i przepływem tłokowym, reaktory z całkowitym przemieszaniem, rzadziej reaktory ze złożem cyrkulującym.

W przepływowych reaktorach zbiornikowych z mieszaniem osiąga się stałość temperatury, stężenia, ciśnienia, co jest to dużą zaletą tych reaktorów, a krótki czas przebywania surowca w reaktorze pozwala na stosowanie wyższych stężeń substratu oraz niższych temperatur. Niestety w aparatach tych na skutek mieszania zostaje często uszkodzona struktura nośnika – prowadzi to do spadku aktywności preparatu enzymatycznego. Stres mechaniczny zaznacza się w reaktorach na wiele sposobów, a stopień uszkodzenia cząstek biopreparatu zależy od właściwości nośnika. Najczęściej spotykaną deformacją jest pęknięcie ziarna nośnika. Przyjmuje się, że pękanie ziarna następuje wtedy, gdy zewnętrzne siły działające na materiał są wyższe od sił adhezji

¹⁰⁵ K.Szewczyk¹, op.cit.

¹⁰⁶ J.Szarawara, J.Skrzypek, A.Gawdzik, *Podstawy inżynierii reaktorów chemicznych*, WNT, Warszawa 1991

i kohezji występujących między elementami strukturalnymi nośnika¹⁰⁷. Efekt spadku aktywności enzymu można zminimalizować stosując reaktor ze złożem fluidalnym.

Reaktor rurowy stosuje się głównie do prowadzenia reakcji homogenicznych i kontaktowych. Zastosowanie złoża upakowanego zapewnia prowadzenie reakcji z najwyższą, z możliwych, aktywnością enzymu immobilizowanego. Jednak obserwowane w tym przypadku opory przepływu roztworów o dużych lepkościach i ograniczone wykorzystanie preparatu biokatalitycznego (martwe strefy) zmniejszają możliwości jego zastosowania. Omija się te problemy stosując reaktory pulsacyjne (reaktor ze złożem nieruchomym i zmiennym przepływem tłokowym). Takie rozwiązanie jest polecane w procesach z inhibicją produktem lub w układach z dużymi ograniczeniami dyfuzyjnymi¹⁰⁸. Zamiast kłopotliwego reaktora ze złożem nieruchomym można stosować reaktory dwufazowe ze złożem ekspandującym¹⁰⁹.

Reaktory ze złożem cyrkulującym są rzadko stosowane w biotechnologii, ponieważ wymagają precyzyjnej kontroli natężenia przepływu płynu przez reaktor oraz wykazują ograniczone możliwości sterowania procesem¹¹⁰. Zastosowanie drobnoziarnistego materiału o szerokim zakresie uziarnienia sprawia, że podczas eksploatacji reaktora ze złożem ekspandującym należy liczyć się z wystąpieniem zjawiska sedymentacji lub aglomeracji cząstek¹¹¹. Zjawiska te mogą prowadzić do szeregu zakłóceń pracy aparatu, ale liczne zalety tego reaktora rekompensują te niedogodności. Współczesne technologie, które wymagają kontaktowania fazy ciekłej i stałej, preferują procesy ciągłe z intensywnym kontaktem międzyfazowym¹¹². Warunki takie zapewnia właśnie reaktor ze złożem fluidalnym.

Odrębną grupę pośród reaktorów z unieruchomionym enzymem stanowią reaktory membranowe. W reaktorach tego typu możliwe jest jednoczesne oddzielenie produktów reakcji¹¹³.

¹⁰⁷ V.A.P.Martins dos Santos, E.J.T.M.Lecnen i in., *Relevance of reological properties of gel beads for their mechanical stability in bioreactors*, Biotech. Bioeng., 56, 1997

¹⁰⁸ A.Sanroman, R.Chamy i in., *Enzymatic hydrolysis of starch in a fixed-bed pulsed-flow reactor*, App. Biochem. Biotech., 28-9, 1991

¹⁰⁹ D.M.G.Freire, G.L.Sant'Anna Jr., App. Biochem. Biotech., 26, 1990, op.cit.

¹¹⁰ B.R.Pieters, G.Berdeletti i in., App. Biochem. Biotech., 32, 1992, op.cit.

¹¹¹ A.Sobolewski, J.Bandrowski, *Badania fluidyzacji cieczowej z wymuszoną cyrkulacją złoża*, materiały konferencyjne XVI Ogólnopolskiej Konferencji Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Kraków-Muszyna 1998

¹¹² A.Sobolewski, J.Bandrowski, op.cit.

¹¹³ K.W.Szewczyk¹, op.cit.

3. Cel pracy

Głównym celem pracy było stworzenie, na podstawie wyników eksperymentalnych i w oparciu o analizę teoretyczną, modelu matematycznego reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z udziałem enzymów amylolitycznych.

W tym celu należało:

- rozpoznać charakter działania α -, β - i glukoamylazy,
- określić mechanizm hydrolizy cząsteczek skrobi ziemniaczanej z udziałem α -, β - i glukoamylazy natywnej i immobilizowanej,

a następnie:

- ✓ dobrać odpowiednie równania opisujące szybkości rozpatrywanych procesów,
- ✓ zweryfikować przyjęte równania w warunkach procesu ciągłego.

Dodatkowo postanowiono:

- zbadać wpływ intensywności mieszania na strukturę ziarna nośnika oraz trwałość mechaniczną preparatu enzymatycznego,
- zaproponować rozwiązania konstrukcyjne bioreaktorów, by zminimalizować wpływ stresów mechanicznych.

4. Materiały i metody

4.1. MATERIAŁY

Preparaty enzymatyczne :

- ♦ α -amylaza z *Bacillus* species z firmy SIGMA
- ♦ glukoamylaza z *Aspergillus niger* z firmy SIGMA
- ♦ β -amylaza z jęczmienia z firmy SIGMA

Odczynniki :

- ♦ glukoza z firmy MERCK
- ♦ kwas 3,5-dinitrosalicylowy z firmy ALDRICH CHEMICAL Co.LTD
- ♦ skrobia rozpuszczalna z firmy ALDRICH CHEMICAL Co.LTD
- ♦ aldehyd glutarowy z firmy SIGMA
- ♦ trizma base z firmy SIGMA

- ♦ nośnik z Zakładów Farmaceutycznych Polfa-Tarchomin Warszawa
- ♦ pozostałe odczynniki z firmy POCH-GLIWICE

4.2. METODY

4.2.1. Przygotowanie substratu

Odpowiednią naważkę skrobi rozpuszczano w niewielkiej ilości zimnej wody destylowanej, a następnie zalewano wrzącą wodą i wstawiano do łaźni wodnej o temperaturze 100°C na 15 minut, ciągle mieszając. Następnie przygotowany roztwór schładzano, dopełniano wodą destylowaną do odpowiedniej objętości.

4.2.2. Oznaczanie stężenia surowca

Stężenie skrobi oznaczano wagowo. Określano masy suchej próbki roztworów skrobi pobranych w odpowiednich objętościach przed reakcją lub po zakończeniu procesu hydrolizy skrobi.

Do suchego naczynka wagowego o znanej masie dodawano 20-25 ml wyjściowego roztworu skrobi, następnie całość ważono i suszono (w suszarce w temperaturze 70°C) przez 24 godziny, do stałej masy, po czym ponownie całość ważono. Po odjęciu masy naczynka od masy całości przed suszeniem i po suszeniu obliczano procentową zawartość skrobi.

4.2.3. Oznaczanie stężenia enzymu

Stężenie białek oznaczano spektrofotometrycznie. Metoda ta polega na bezpośrednim odczycie spektrofotometrycznym przy $\lambda=280$ nm kolejnych rozcieńczeń roztworów stosowanych enzymów. Stężenie białka aktywnego szacowano na podstawie krzywej aktywnościowej.

4.2.4. Oznaczanie aktywności enzymu

Aktywność amylaz określano na podstawie ilości powstałych cukrów redukujących, które oznaczano kolorymetrycznie. Metoda ta, zwana dalej metodą z DNS, oparta jest na redukcji w środowisku kwaśnym kwasu 3,5-dinitrosalicylowy przez grupy aldehydowe cukru do kwasu 3-amino-5-nitrosalicylowego. W obecności fenolu powstaje barwny kompleks, który stabilizowany jest pirosiarczynem sodowym i winianem sodowo-potasowym.

Do 0,5 ml roztworu enzymu dodawano 0,5 ml 1% roztworu skrobi i pozostawiano w łaźni wodnej o temperaturze 20°C przez 3 minut. Reakcję przerywano przez dodanie 3 ml odpowiednio przygotowanego odczynnika DNS. Próbę umieszczano w łaźni wodnej w temperaturze 100°C, po 5 minutach próbkę schładzano, dopełniano wodą destylowaną do objętości 20 ml. Po 30 minutach od momentu włożenia próbki do wrzącej łaźni odczytywano ekstynkcję na spektrofotometrze przy $\lambda=550$ nm wobec próby kontrolnej, w której użyto 0,5 ml buforu służącego do przygotowania roztworu enzymu, zamiast roztworu enzymu. Stężenie uwolnionych cukrów redukujących było odczytywane względem sporządzonej wcześniej krzywej standardowej dla glukozy w odpowiednim buforze.

Za 1 jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach testu (20°C, czas reakcji 3 minuty, odpowiednie pH) powoduje powstanie zabarwienia odpowiadającego zabarwieniu jakie daje 1 mg glukozy.

4.2.5. Przygotowanie krzywej aktywnościowej

Sporządzono wzorcowy roztwór białka i zrobiono z niego rozcieńczenia w szerokim zakresie stężeń (do 400 $\mu\text{g/ml}$). Do oznaczeń pobierano po 0,5 ml roztworu białka z każdego rozcieńczenia, dodawano 0,5 ml 1% roztworu skrobi i pozostawiano w łaźni wodnej o temperaturze 20°C przez 3 minut. Reakcję przerywano przez dodanie 3 ml odpowiednio przygotowanego odczynnika DNS. Dalej postępowano jak wyżej.

4.2.6. Przygotowanie krzywej wzorcowej dla glukozy

Sporządzono wzorcowy roztwór glukozy i zrobiono z niego rozcieńczenia w zakresie 0,1-2 g/l. Do oznaczeń pobierano po 1 ml roztworu glukozy z każdego rozcieńczenia i dodawano po 3 ml odczynnika DNS. Próby gotowano we wrzącej łaźni wodnej dokładnie 5 minut. Po ostudzeniu uzupełniano 16 ml wody destylowanej. Absorbancję odczytywano przy długości fali 550 nm po 25 minutach od wyjęcia z łaźni. W próbie kontrolnej zamiast roztworu glukozy dano wodę.

4.2.7. Przygotowanie odczynnika DNS

Odczynnik DNS używany w teście aktywnościowym do oznaczania ilości powstałych w reakcji enzymatycznej cukrów redukujących przygotowano z następujących składników: 1416 ml wody destylowanej, 10,6 g kwasu 3,5-dwunitrosalicylowego, 19,8 g NaOH, 306 g winianu sodowo-potasowego, 7,6 g fenolu stopionego w temperaturze 50°C i 8,3 g pirosiarczyny sodowej. Wszystkie składniki dokładnie rozpuszczono, a otrzymany roztwór sączono, następnie miareczkowano wobec fenoloftaleiny 0,1 M HCl. Wartość pH odczynnika korygowano poprzez dodanie NaOH.

4.2.8. Immobilizacja białek na nośniku akrylowym

Odpowiednią objętość nośnika (np. 5 ml) przemywano kilkakrotnie wodą, a następnie 0,1 M buforem fosforanowym o pH=7,0. Po odsączeniu zawieszono go w trzykrotnie większej objętości 2,5% roztworu aldehydu glutarowego (15 ml) na 40 minut mieszając od czasu do czasu. Po tym czasie nadmiar odczynnika aktywującego odmywano wodą destylowaną i 0,1 M buforem fosforanowym. Po odsączeniu nośnik zalewano trzykrotnie większą objętością roztworu białka (15 ml) i przez pierwszą godzinę mieszano sporadycznie. Następnie roztwór pozostawiono do dnia następnego w temperaturze 4°C. Po tym czasie nośnik wprowadzono do kolumny i odmywano nadmiar białka następującymi buforami: 0,1 M buforem fosforanowym o pH=7,0, 0,1 M buforem fosforanowym o pH=7,0 zawierającym 0,5 M NaCl, 0,1 M buforem cytrynianowym lub 0,05 M buforem octanowym.

Eluaty zbierano do zlewek i oznaczano ilość zawartego w nich białka. Ilość enzymu związanego z nośnikiem obliczono z różnicy między ilością białka danego do immobilizacji i odmytego. W celu zablokowania grup aldehydowych, które nie weszły w reakcję z enzymem, nośnik zawieszono w 0,5 M buforze tris-HCl o pH=8,14 i pozostawiono w temperaturze 4°C do dnia następnego.

4.2.9. Oznaczanie aktywności preparatu enzym-nośnik

Nośnik z immobilizowanym enzymem zawieszony w buforze tris-HCl przemywano wodą, a następnie odpowiednim buforem (cytrynianowym lub octanowym). 1 ml nośnika wprowadzono do reaktora okresowego uzupełniając do 10 ml odpowiednim buforem. Po kilku minutach preinkubacji w temperaturze pokojowej dodawano 10 ml substratu i prowadzono reakcję przez 3 minuty. Po tym czasie pobierano 1 ml roztworu z nad nośnika i przenoszono do probówki zawierającej 3 ml odczynnika DNS, przerywając tym samym reakcję. Oznaczano ilość końców redukujących metodą z DNS.

4.2.10. Hydroliza skrobi z udziałem enzymów natywnych w reaktorach okresowych

Do termostатованого reaktora o pojemności 140 ml wprowadzano od 20 do 40 ml roztworu substratu a następnie, przy ciągłym mieszaniu, taką samą objętość roztworu enzymu w odpowiednim buforze. Objętość pobieranych próbek była dostosowana do spodziewanego stężenia cukrów redukujących, które oznaczono metodą z DNS. Stężenie skrobi oznaczono metodą wagową. Mimo że optimum temperaturowe jest dla każdego enzymu inne, wybrano jako temperaturę reakcji 20°C.

W przypadku reakcji z α -amylazą stosowano stężenie substratu od 1,05 do 20,6 g/l oraz stężenie enzymu od 0,0123 do 0,046 g/l, pH stosowanego 0,1 M buforu cytrynianowego wynosi 4,5.

W przypadku reakcji z β -amylazą zakres stosowanych stężeń wynosił: dla substratu 0,32 – 23,0 g/l, a dla enzymu 0,05 – 0,40 g/l, pH stosowanego 0,1 M buforu cytrynianowego wynosi 4,1.

Hydrolizę z udziałem glukoamylazy prowadzono dla stężeń substratu 1,2 - 48,8 g/l oraz stężeń enzymu od 0,03 do 2,83 g/l, pH stosowanego 0,05 M buforu octanowego wynosi 5,0.

4.2.11. Hydroliza skrobi z udziałem enzymów immobilizowanych w reaktorach okresowych

Badania przeprowadzono analogicznie jak w przypadku stosowania enzymów natywnych, wprowadzając zamiast roztworu enzymu zawiesinę preparatu.

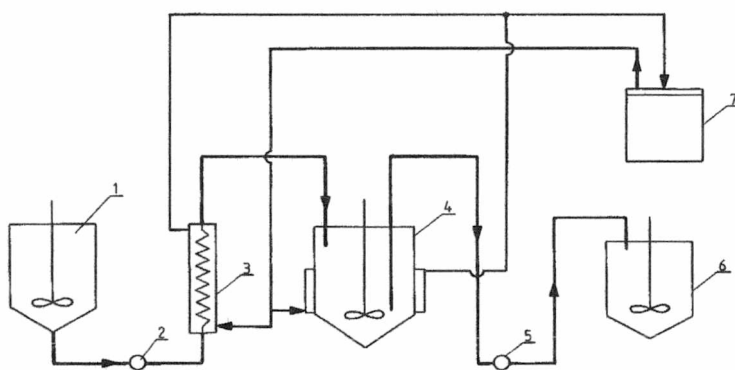
Dla hydrolizy z udziałem α -amylazy stężenie substratu zmieniano od 0,3 do 26,7 g/l, a stężenie enzymu od 0,008 do 0,046 g/l. Hydrolizę z udziałem β -amylazy immobilizowanej prowadzono dla stężenia substratu w zakresie 2,3-22,9 g/l i enzymu 0,03 do 0,305 g/l.

4.2.12. Hydroliza skrobi z udziałem enzymów immobilizowanych w reaktorach o działaniu ciągłym

Zaprojektowano i zbudowano w skali laboratoryjnej podstawowe typy reaktorów chemicznych, w których zweryfikowano w warunkach procesu ciągłego reakcji hydrolizy skrobi z udziałem enzymów immobilizowanych. Instalacje wykonano ze stali kwasoodpornej. Warunki procesowe takie same jak w reaktorach okresowych.

Przepływowy reaktor mieszalnikowy

Schemat instalacji badawczej przedstawiono na rys. 4.2.12.1. Surowiec, ze zbiornika (1) był podawany pompą perystaltyczną (2) poprzez wymiennik ciepła (3) do reaktora (4). Mieszanina reakcyjna kierowana była do zbiornika produktu (6). Temperatura w reaktorze (4) i wymienniku ciepła (3) utrzymywana była za pomocą termostatu (7). Króciec wylotowy usytuowany był w pobliżu mieszadła i otoczonym siatką o bardzo drobnym splocie, uniemożliwiającym ziarnom biokatalizatora opuszczenie środowiska reakcji. Objętość reaktora 300 ml. Reaktor otoczony był płaszczem grzejnym.

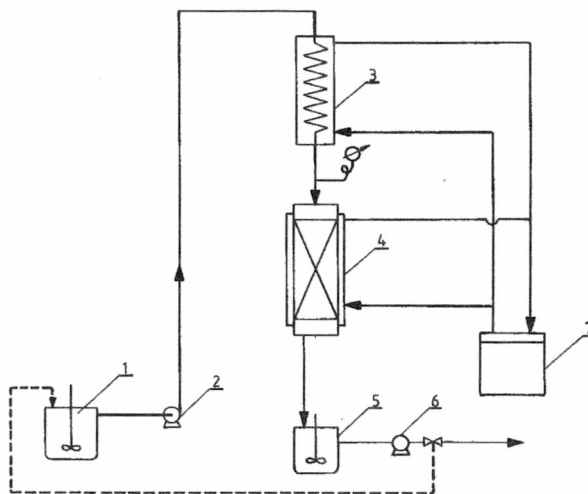


Rys. 4.2.12.1. Schemat instalacji reaktora mieszalnikowego.

Reaktor ze złożem nieruchomym

Schemat instalacji przedstawiono na rys. 4.1.12.2. Surowiec, ze zbiornika (1) był podawany pompą perystaltyczną (2) poprzez wymiennik ciepła (3) do reaktora (4). Mieszanina reakcyjna kierowana była do zbiornika (5), skąd wyprowadzana była na zewnątrz lub zawracana do zbiornika surowca pompą (6). Na króćcu wlotowym do reaktora umieszczony był manometr. Temperaturę w układzie utrzymywano za pomocą termostatu (7). Odpowiednio dobrane nakrętki na wejściu i wyjściu reaktora zapewniały

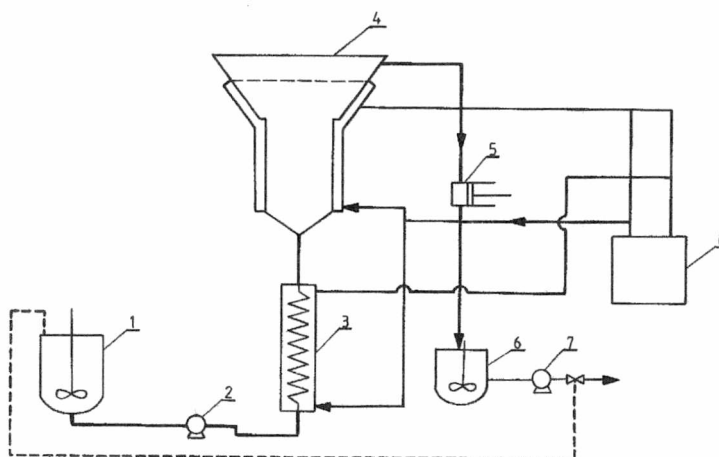
łatwy dostęp do wnętrza aparatu. W dolnej części reaktora zainstalowano siatkę, zatrzymującą biokatalizator. Reaktor rurowy miał objętość 30 ml, otoczony był płaszczem grzejnym.



Rys. 4.2.12.2. Schemat instalacji reaktora rurowego.

Reaktor ze złożem fluidalno-fontannowym

Schemat reaktora przedstawiono na rys. 4.2.12.3. Surowiec ze zbiornika (1) podawany był pompą perystaltyczną (2) poprzez wymiennik ciepła (3) do reaktora (4). Reaktor zamknięty był od góry siatką o drobnym splocie, zapobiegającą wydostaniu się ziaren nośnika poza reaktor. Mieszanina poreakcyjna kierowana była do zbiornika (6). Temperaturę utrzymywano za pomocą termostatu (8). Pompą (7) można było odprowadzić produkty na zewnątrz instalacji lub zawrócić do zbiornika surowca.



Rys. 4.2.12.3. Schemat instalacji reaktora fluidalnego.

5. Charakterystyka stosowanych enzymów amylolitycznych i preparatów enzymatycznych

Prace nad enzymami amylolitycznymi, doбором nośników korzystnych dla immobilizacji oraz charakterystyką enzymów natywnych i immobilizowanych, trwają w Zakładzie Inżynierii Bioprosesowej od kilku lat. Dokładną charakterystykę aktywnościową enzymów natywnych i preparatów immobilizowanych, obejmującą wpływ pH i temperatury na aktywność i stabilność stosowanych enzymów oraz dobór najkorzystniejszej metody immobilizacji i warunków procesowych, wykonała i opisała w licznych publikacjach Bryjak. Autor niniejszej pracy pominął zatem etap prac wstępnych związanych z charakterystyką stosowanych enzymów i przyjął zalecane przez Bryjak warunki pracy enzymów jako właściwe dla rozpatrywanych reakcji. Zamieszczono jednak informacje o istotnych właściwościach enzymów, ponieważ stanowią ważny element opisu procesu hydrolizy skrobi z ich udziałem.

Podstawowe parametry charakteryzujące enzymy natywne zamieszczono w tabeli 5.1*.

Tabela 5.1. Charakterystyka enzymów natywnych.

	α -amylaza	β -amylaza	glukoamylaza
źródło enzymu	<i>Bacillus species</i>	jęczmień	<i>Aspergillus niger</i>
pH optymalne	6,0	4,7	4,0
pH-stabilność	3,7-7,2	3,5-7,2	2,3-7,3
temperatura najefektywniejszej pracy enzymu	50°C	50°C	60°C
termostabilność	do 37°C	do 30°C	do 20°C

Literatura przedmiotu donosi, że omawiane enzymy amylolityczne były stabilizowane poprzez związanie białka z zastosowaniem większości znanych technik immobilizacji (adsorpcja, wiązanie kowalencyjne, kopolimeryzacja, sieciowanie) na nośnikach syntetycznych, naturalnych, nieorganicznych^{114,115,116,117}. Związanie białek

*dane udostępniła dr J.Bryjak z Instytutu Inżynierii Chemicznej i Urządzeń Ciepłych Politechniki Wrocławskiej

z nośnikami nierozpuszczalnymi w wodzie okazało się być bardzo skuteczne^{118,119}. Spośród kilku przetestowanych w zespole badawczym nośników syntetycznych wybrano do immobilizacji nośnik akrylowy, posiadający na swej powierzchni grupy aminowe zdolne do wiązania enzymów. Nośnik ten otrzymuje się przez polimeryzację suspensyjną monomerów akrylanu butylu i dimetakrylanu glikolu etylenowego (BA/EGDMA) w obecności inertnych rozpuszczalników. Jest on usieciowany w 40%, gęstość rzeczywista wynosi 1,28 [g/cm³], 1 gram nośnika chłonie około 1,36 grama wody. Po modyfikacji etylenodiaminą nośnik posiada na swej powierzchni grupy aminowe w ilości 0,67 mmol na gram nośnika. Nośnik jest odporny chemicznie. Nie odnotowano zmian strukturalnych w szerokim zakresie pH i temperatury¹²⁰. Współczynnik sprężystości wynosi 1,8 bar/cząstkę (ziarno)¹²¹. Ziarenka nośnika są okrągłe o porowatości 39%. Średnica porów w ziarnie wynosi średnio 8,8 nm¹²².

Dobrano odpowiednią metodę immobilizacji i optymalne warunki prowadzenia procesów^{123,124,125}. Enzym wiązany był z nośnikiem kowalencyjnie poprzez czynnik sprzęgający (aldehyd glutarowy)^{126,127}. Otrzymane preparaty charakteryzowały się wysoką aktywnością i stabilnością. Wyniki zamieszczono w tabeli 5.2*.

¹¹⁴ T. Yamamoto, *Handbook of amylases and related enzymes*, ed. The Amylase Research Society of Japan, Oxford-Sydney-Tokyo-Toronto, 1988

¹¹⁵ Y. Ohtsuka, H. Kawaguchi, T. Yamamoto, *Immobilization of α -amylase on polymeric carriers having different structures*, J. Appl. Polym. Sci., 29, 1984

¹¹⁶ Y. Yang, H.A. Chase, *Immobilization of α -amylase on poly(vinyl alcohol) coated perfluoropolymer support for use in enzyme reactors*, App. Biotech., Biochem., 28, 1998

¹¹⁷ J. Reilly, *Potential and use native and immobilized carbohydrates*, Europ. J. Biochem., 164, 1987

¹¹⁸ L. Jim-Tsy i in., *Investigation on the immobilization of isoamylase onto polysaccharide matrices*, Bioprocess Eng., 18, 1998

¹¹⁹ J. Bryjak, A. Trochimczuk, A. Noworyta, *Effect of polymer matrix on penicillin acylase immobilization on copolymers of butyl acrylate*, J. Chem. Technol. Biotechnol., 57, 1993

¹²⁰ B. Kolarz, A. Trochimczuk i in., *A search for optimal acrylic carriers for immobilization of penicillin acylase*, Angew. Makromol. Chem., 179, 1990

¹²¹ J. Bryjak, A. Trochimczuk, A. Noworyta, J. Chem. Technol. Biotechnol., 57, 1993, op.cit.

¹²² M. Bryjak, *Evaluation of poly(butyl acrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) sorbents for chromatographic separation of biomolecules*, Angew. Macromol. Chem., 215, 1994

¹²³ J. Bryjak, B. Kolacz, A. Noworyta, *Immobilizacja α -amylazy na syntetycznych nośnikach akrylowych*, XV Ogólnopolska Konferencja Naukowa Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Gdańsk, 1995

¹²⁴ J. Bryjak, B. Kolacz, A. Szczeszek, M. Majkowska, *Immobilizacja β -amylazy na syntetycznych nośnikach akrylowych*, VI Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa, Postępy Inżynierii Bioreaktorowej, Łódź, 1996

¹²⁵ J. Bryjak, A. Iskra, *Hydroliza skrobi z udziałem glukoamylazy natywnej i immobilizowanej*, materiały VII Ogólnokrajową Konferencję Naukową, Postępy Inżynierii Bioreaktorowej

¹²⁶ J. Bryjak, *Immobilization of amylase on acrylic carriers*, 7th European Congress on Biotechnology, Nicea, 1995

¹²⁷ W. Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren. Eine Einführung*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 1986

Tabela 5.2. Charakterystyka enzymów immobilizowanych.

	α -amylaza	β -amylaza	glukoamylaza
źródło enzymu	<i>Bacillus species</i>	jęczmień	<i>Aspergillus niger</i>
pH optymalne	4,5	3,7	3,5
pH-stabilność	3,5-8,3	2,5-8,5	1,5-8,5
temperatura najefektywniejszej pracy enzymu	54°C	45°C	60°C
termostabilność	do 44°C	do 40°C	do 35°C
warunki reakcji	pH= 4,5 t=20°C 0,1 M bufor cytrynianowy	pH= 4,1 t=20°C 0,1 M bufor cytrynianowy	pH= 5,0 t=20°C 0,05 M bufor octanowy

Po immobilizacji rozszerzył się dla wszystkich enzymów zakresy pH- i termostabilności oraz zmieniła wartość temperatury optymalnej.

Modyfikacja chemiczna enzymu podczas immobilizacji może powodować inaktywację enzymów. Można temu częściowo zapobiec dodając substrat podczas immobilizacji. Chroni on wówczas centrum aktywne enzymu. Dodanie skrobi do roztworów α -amylazy i glukoamylazy podczas procesu wiązania z nośnikiem powodowało wzrost aktywności preparatu enzymatycznego, ale towarzyszył temu spadek stabilności. W przypadku β -amylazy otrzymywało się bardziej trwałe, za to mniej aktywny preparat enzymatyczny. Stosowanie skrobi w procesie immobilizacji omawianych enzymów amylolitycznych nie jest wskazane.

Aktywność enzymów można scharakteryzować m.in. ilością wiązań rozerwanych w łańcuchach w jednostce czasu. Spośród metod analitycznych określających ilość grup redukujących bardzo dobrą okazała się metoda z DNS, dlatego wykorzystano ją w analizach. Bernfeld [1955] pierwszy użył jej do określenia charakterystyki aktywności α - i β -amylazy¹²⁸. Jest ona powszechnie używana do śledzenia szybkości reakcji, ponieważ jest prosta i dostarcza dogodnych do interpretacji wyników¹²⁹. Inne metody jak barwienie jodem czy określanie lepkości nie mogą być użyte do oceny ilości zhydrolizowanych wiązań.

¹²⁸ V.Hagenimana, L-P Vezina, R.E.Simard, *Sweet potato α -i β -amylases: characterization & kinetic studies with endogenous inhibitors*, Journal of Food Science, 59, 1994

Większość enzymów natywnych jest niestabilna w roztworach, a α -amylazy należy uznać za enzymy o szczególnie niskiej stabilności¹³⁰. Jest to niekorzystne ze względów technologicznych, ale wadę tę częściowo niweluje immobilizacja enzymów. α -Amylaza immobilizowana po 1 miesiącu przechowywania w temperaturze 4°C zachowywała około 80% aktywności wyjściowej, glukoamylaza około 90%, a β -amylaza ~75%.

Celem określenia oporów dyfuzyjnych zbadano wpływ temperatury na szybkość reakcji. Otrzymano liniową zależność $\ln(r/r_{\text{stand.}})$ od $1/T$. Można przyjąć, że reakcja przebiega w obszarze kinetycznym, a opory dyfuzyjne dla układów z enzymami immobilizowanymi w reaktorach z mieszaniem są do pominięcia.

¹²⁹ V. Komolprasert, R.Y. Ofoli, J. Chem. Tech. Biotechnol., 59, 1995, op.cit.

¹³⁰ J.Bryjak¹, Biotechnologia, 1 (44), 1999, op.cit.

6. Wyniki i ich dyskusja

6.1. Sformułowanie modelu kinetyki

Znane równania kinetyczne, umożliwiające modelowanie i kontrolę przebiegu procesu hydrolizy skrobi ziemniaczanej przez enzymy amylolityczne, z racji mnogości parametrów wpływających na reakcję, nie dają satysfakcjonujących wyników. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w przypadku badań nad reakcjami enzymatycznymi trudno jest wykorzystać odnotowane w literaturze osiągnięcia innych naukowców. Mimo stosowania pewnych standardów, każdy badany układ jest inny, a otrzymywane wyniki tak różne, że trudno je usystematyzować.

Przez długi czas m.in. brak znajomości drugo- i trzeciorzędowej struktury składników skrobi, jak i samego jej ziarna, utrudniał poznanie mechanizmu procesu. Pojawiające się reakcje rewersji, możliwość blokowania enzymu przez substraty i produkty reakcji, utrata zdolności katalitycznych enzymu pod wpływem warunków środowiska nie pozwalały przedstawić w miarę wiernego mechanizmu reakcji oraz sformułować adekwatnego modelu matematycznego procesu hydrolizy skrobi. Nawet współcześnie, dysponując bogatym zapleczem aparaturowym i obliczeniowym, nie dokonał się istotny przełom w dziedzinie badań kinetyki reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi.

Wielu naukowców omawia wpływ różnych parametrów na proces enzymatycznej hydrolizy skrobi, lecz bez próby stworzenia matematycznego ich opisu. Przyczyn należy szukać głównie w tym, że:

- surowiec wyjściowy nie jest jednolitą substancją węglowodanową. Skrobia składa się z łańcuchów liniowych i rozgałęzionych; występują dwa typy wiązań glikozydowych α -1,4 i α -1,6; cząsteczki amylozy i amylopektyny nie są jednorodne ani pod względem wielkości, ani ilości rozgałęzień,
- surowiec – łańcuchy biopolimeru - zmienia się w wyniku każdego ataku enzymu. Pojedyncze cięcie endoenzymów w środku łańcucha powoduje powstanie dwóch krótszych łańcuchów, które są hydrolizowane w kolejnych etapach reakcji. Podwaja się zatem ilość cząstek, czyli wzrasta stężenie molowe substratu (w początkowym okresie reakcji),

- o szybkości reakcji decyduje m.in. powinowactwo podcentrów wiążących do reszt glukozowych w łańcuchach skrobi, powinowactwo miejsc katalitycznych do wiązań glikozydowych, prawdopodobieństwo utworzenia aktywnego kompleksu enzym-substrat,
- nie jest znany udział i profil rozkładu produktów pośrednich, uzyskanych z poszczególnych składników surowca
- i co najważniejsze, istnieje kilka (równie prawdopodobnych) hipotez na temat mechanizmu hydrolizy skrobi przez enzymy amylolityczne.

Zróznicowane właściwości skrobi utrudniają analizę i zapis procesów zachodzących z jej udziałem i skłaniają do innego spojrzenia na substrat reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi ziemniaczanej. Chcąc ominąć wspomniane problemy przyjęto, że

**substratem w reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi (biopolimeru) jest
wiązanie glikozydowe w łańcuchu polocukru.**

W szczególności substratami mogą być :

- (a) wszystkie wiązania glikozydowe w cząsteczkach polocukru,
- (b) wiązania łatwo dostępne, mające korzystne położenie przestrzenne, zawarte w odpowiednio skonfigurowanych przestrzennie łańcuchach,
- (c) wiązania z wysokim powinowactwem chemicznym do enzymu.

Przedstawione powyżej propozycje określenia substratu są pewnym uproszczeniem rzeczywistości. Z powodu skomplikowanej budowy cząsteczek amylozy i amylopektyny część wiązań, mających wysokie powinowactwo do enzymu, nie będzie mogła być zhydrolizowana (wiązania znajdujące się wewnątrz cząsteczki) i odwrotnie, część wiązań, choć łatwo dostępnych, nie ulegnie hydrolizie z uwagi na niskie powinowactwo do enzymu. Można przyjąć, że hydrolizowane z mierzalną szybkością będą tylko te wiązania, które są łatwo dostępne przestrzennie i zarazem mają wysokie powinowactwo do enzymu ((b)∩(c)). O stopniu podatności substratu (podatność= dostępność przestrzenna ∧ powinowactwo chemiczne) będzie mówić współczynnik podatności wiązania (ξ). Jest to wielkość znormowana w przedziale $\langle 0,1 \rangle$, określająca zdolność danego wiązania do wejścia w reakcję z enzymem, wiążąca dostępność przestrzenną i powinowactwo chemiczne.

Z analizy sposobu rozcinania łańcuchów polocukru wynika, że współczynnik ten dla amylozy będzie niemalejącą funkcją stopnia przereagowania (α). Z postępem reakcji zmniejsza się co prawda długość łańcuchów amylozy (jest to istotne dla α -amylazy, która preferuje dłuższe łańcuchy), ale zdecydowanie wzrasta ich dostępność. Dlatego w nowoutworzonych łańcuchach (produktach pośrednich) współczynnik podatności nie powinien maleć. Natomiast dla amylopektyny współczynnik podatności jeszcze niehydrolizowanych wiązań będzie miał tendencję do zmniejszania się wraz z postępem reakcji. Wynika to z rozgałęzionej struktury amylopektyny. Ze wzrostem stopnia przereagowania maleje dostępność wiązań glikozydowych dla enzymu.

Dla każdego z rozpatrywanych enzymów substratami mogą być inne wiązania lub wiązania ulokowane w różnych miejscach łańcuchów biopolimerów.

Precyzując:

- Dla α -amylazy substratem będzie określona liczba wiązań α -1,4-glikozydowych. W obu polimerach pierwsze będą hydrolizowane te wiązania, których rozcięcie spowoduje powstanie krótszych polocukrów (wynika to ze specyficzności działania α -amylazy, endoenzymu). Wiązania α -1,4-glikozydowe w powstałych oligocukrach mogą być hydrolizowane przez enzym równolegle z wiązaniami w dłuższych łańcuchach. α -Amylaza preferuje przypadkowy atak.
- Dla β -amylazy substratem będzie co drugie wiązanie α -1,4-glikozydowe począwszy od nieredukującego końca łańcucha. Enzym hydrolizuje kilka wiązań i zatrzymuje się w pewnym oddaleniu od punktu rozgałęzienia, którego to punktu nie jest w stanie ominąć.
- Dla glukoamylazy substratem będą wiązania α -1,4-glikozydowe hydrolizowane od nieredukującego końca łańcucha oraz niektóre wiązania α -1,6-glikozydowe, odpowiednio skonfigurowane względem końców nieredukujących. Glukoamylaza przejawia typ ataku wielokrotnego (podobnie jak β -amylaza).

Wynika stąd, że w przypadku β -amylazy i glukoamylazy długość łańcucha surowca nie jest istotna.

Teoretyczne określenie ilości ulegających hydrolizie wiązań glikozydowych nie jest możliwe. Istnieje bowiem określony, charakterystyczny tylko dla danego enzymu i surowca, procent wiązań rozcinanych przez enzym (podatnych), pozostałe wiązania można traktować jak „inerty”. Ich bierność wynikać będzie bądź ze specyficzności ataku

enzymu (na przykład dla α -amylazy inertami będą wiązania α -1,6-glikozydowe i wiązania α -1,4-glikozydowe ulokowane bardzo blisko punktu rozgałęzienia), bądź z braku dostępności. Nie jest możliwe przyporządkowanie a priori wszystkich istniejących wiązań do frakcji hydrolizowanej lub inertej.

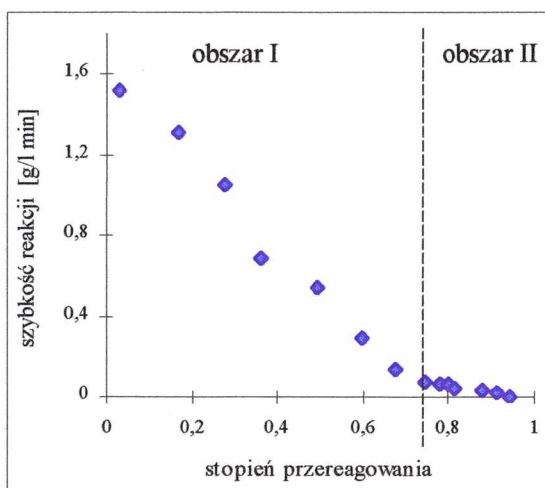
W wyniku ataku enzymu na cząsteczkę skrobi przybywa zawsze jeden nowy koniec redukujący (cukier redukujący). Oznaczany analitycznie przyrost końców redukujących jest równy ilości rozciętych wiązań glikozydowych. Ilość końców redukujących przelicza się na stężenie glukozy, cukru prostego będącego monomerem skrobi. Szybkość reakcji zdefiniować można jako przyrost stężenia glukozy powstałej w wyniku hydrolizy łańcuchów biopolimeru w jednostce czasu.

Wartość stężenia początkowego substratu można określić tylko doświadczalnie, prowadząc daną reakcję do wyczerpania substratu

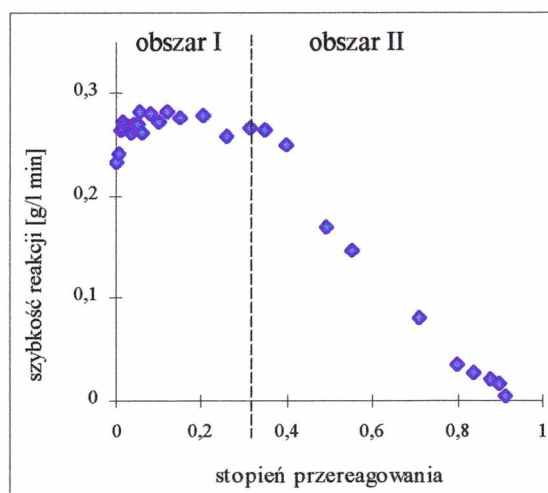
$$c_{S0} = \lim_{t \rightarrow \infty} c_P(t) \quad (6.1.1)$$

W procesie hydrolizy skrobi z udziałem α -amylazy i glukoamylazy można wyodrębnić dwa obszary (rys. 6.1.1.a-c). W przypadku α -amylazy, w I obszarze enzym szybko rozcina wiązania glikozydowe, potem następuje etap wolnej hydrolizy substratu (prawdopodobnie rozcinane są wiązania w dekstrynach) - obszar II. W drugim przypadku, glukoamylaza w początkowym okresie reakcji rozcina wiązania ze stałą szybkością (obszar I), po czym obserwuje się spadek szybkości hydrolizy (obszar II).

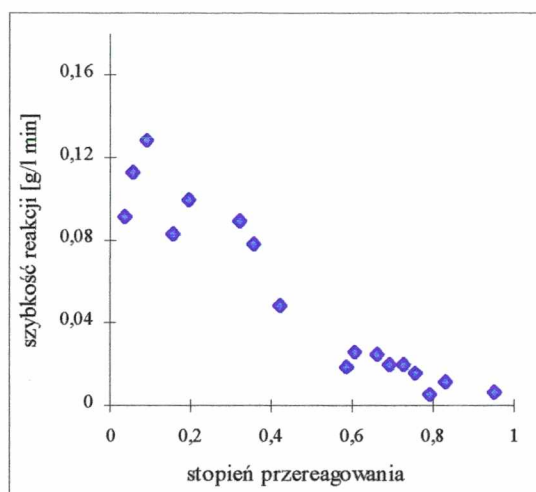
a)



b)



c)



Rys. 6.1.1. Kinetyka hydrolizy skrobi z udziałem α -amylazy (a), glukooamylazy (b) i β -amylazy (c).

Dla β -amylazy, być może ze względu na specyfikę działania i blokowanie się enzymu przy rozgałęzieniach łańcuchów, dwa obszary nie zaznaczyły się tak wyraźnie jak w przypadku α -amylazy czy glukooamylazy.

Opisane powyżej zachowanie się układów enzym-skrobia może wynikać:

- (1) ze zmiany typu ataku enzymu podczas reakcji,
- (2) z różnej podatności wiązań w łańcuchach surowca na atak enzymu.

W części literaturowej wykazano, że opinie dotyczące typu ataku enzymów są sprzeczne, a żadna z hipotez nie została poparta odpowiednimi dowodami. Przyjęto zatem, że nie występuje zmiana typu ataku, i że zastosowane enzymy hydrolizują skrobię zgodnie z preferowanym przez siebie typem ataku.

Ponieważ każda cząsteczka amylozy, amylopektyny różni się od pozostałych bądź to długością łańcucha, bądź ilością rozgałęzień, podjęto próbę podzielenia cząsteczek biopolimeru na frakcje o uśrednionych, mało zmiennych właściwościach. Ze względów merytorycznych i technicznych ilość frakcji nie powinna być zbyt duża. Przyjęto, że kryterium podziału będzie podatność wiązań na działanie enzymu.

Surowiec składa się zatem z:

- ❖ **frakcji A: do której należą wiązania podatne na atak enzymu, zawarte zarówno w amylozie jak i amylopektynie,**
- ❖ **frakcji B: do której należą wiązania mniej podatne na atak enzymu, zawarte zarówno w amylozie jak i amylopektynie.**

Wiązania podatne to (z definicji) wiązania łatwo dostępne przestrzennie i posiadające wysokie powinowactwo do enzymu. W przypadku wiązań mniej podatnych założono, że nie jest spełniony warunek o dostępności przestrzennej wiązania.

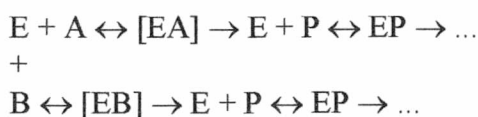
Charakter rozgałęzień i konformacji cząsteczek skrobi jest ważnym wskaźnikiem podatności substratu na działanie enzymu i kinetykę enzymatycznej hydrolizy skrobi. W czasie reakcji następuje ciągła zmiana otoczenia substratu, łańcuchy biopolimeru są coraz krótsze i zmienia się ich konfiguracja (szczegół ten jest istotny w przypadku amylopektyny). Dlatego produkty (substraty) pośrednie mogą wykazywać inne właściwości fizykochemiczne.

Do rozstrzygnięcia pozostaje problem podatności substratu na działanie enzymu w zależności od miejsca ulokowania danego wiązania w cząsteczce surowca oraz zmienność tego parametru w czasie reakcji. W przypadku amylozy, liniowych łańcuchów skrobi, można założyć, że wszystkie wiązania α -1,4-glikozydowe są tak samo dostępne, więc są równie podatne na atak enzymu. W amylopektynie najszybciej ulegać będą hydrolizie wiązania zewnętrznych łańcuchów i one będą najbardziej podatne. Wiązania te zakwalifikowano do frakcji A. Do frakcji substratów mniej podatnych na atak enzymu należeć będą wiązania znajdujące się w dekstrynach i oligocukrach. Generalnie można przyjąć, że dla danego wiązania współczynnik ξ nie zmienia się w trakcie reakcji.

Powstające produkty pośrednie mogą pozostawać w swej frakcji lub przejść do frakcji o innej podatności wiązania na atak enzymu. W niniejszej pracy przyjęto, że:

produkt pośredni pozostaje w swej frakcji.

Mając na uwadze przedstawione informacje przyjęto traktować proces enzymatycznej hydrolizy skrobi ziemniaczanej jak układ dwóch równoległych reakcji następczych:



Wykazano (kryterium temperaturowe), że zewnętrzny transport masy w przypadku enzymów immobilizowanych jest do zaniedbania. Skleikowana skrobia tworzy wokół nośnika z enzymem „otoczkę” żelową (bogatą w substrat), która przemieszcza się podczas mieszania wraz z ziarnem nośnika. Z uwagi na to, że nośnik jest nieporowaty i enzymy wiązane są na powierzchni ziarna, nie występuje także wewnętrzny transport masy. Proces hydrolizy skrobi będzie zatem w obszarze kinetycznym, który opisuje się jedynie równaniem kinetycznym, pomijając zjawiska fizyczne. W niniejszej pracy nie

uwzględniono zatem wpływu właściwości fizykochemicznych surowca na kinetykę enzymatycznej hydrolizy skrobi (tzn. zmian lepkości mieszaniny reakcyjnej).

REASUMUJĄC:

Przedstawiono propozycję opracowania modelu kinetycznego reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi, modelu na tyle uniwersalnego, by można go było stosować do innych biopolimerów.

Model kinetyczny oparto na następujących założeniach:

- (1) substratem w reakcji enzymatycznej degradacji skrobi ziemniaczanej z udziałem α -, β - i glukoamylazy jest wiązanie glikozydowe ulegające hydrolizie,
- (2) substrat występuje w dwóch frakcjach różniących się podatnością na atak enzymów,
- (3) produkt pośredni pozostaje w danej (wyjściowej) frakcji,
- (4) w układzie reakcyjnym nie występują opory dyfuzyjne transportu masy.

6.2. Kinetyka reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej[#]

Przedstawione w rozdziale 6.1 założenia są wnioskami wysnutymi z wcześniej przeprowadzonych obliczeń. W niniejszym rozdziale pokazano najważniejsze etapy poszukiwań równań, które możliwie najlepiej opiszą mechanizm procesu hydrolizy skrobi ziemniaczanej z udziałem enzymów amylolitycznych i które posilkują się niewielką liczbą parametrów. Celowo dążono do zminimalizowania liczby stałych kinetycznych. Unika się wtedy licznych trudności podczas modelowania, co wobec złożoności samego procesu jest istotne.

Dla reakcji o złożonym mechanizmie, do których niewątpliwie należy enzymatyczna hydroliza skrobi, określenie równania kinetycznego przeprowadza się poprzez dobór odpowiedniej funkcji aproksymującej, która w maksymalny sposób odzwierciedli mechanizm zachodzącego procesu i z zadowalającą dokładnością opisie dane doświadczalne. Wiąże się to z zaproponowaniem odpowiedniego równania oraz określeniem wartości jego współczynników.

Do wyznaczenia kinetyki reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi wykorzystano reaktory zbiornikowe z mieszałem o napędzie magnetycznym, pracujące okresowo. Dane doświadczalne przedstawiono w formie funkcji $c_s=f(t)$. Do obliczeń kinetyki reakcji wykorzystano metodę całkową¹³¹ analizy danych, gdyż korzysta ona bezpośrednio z danych doświadczalnych i jest mało „czuła” na niedokładności pomiarów ($c_{s,i} < c_{s,i+1}$), tzn. zachowuje informacje o funkcji wynikającej z pomiarów, a zacierza zakłócenia¹³². Uzyskane dane obliczeniowe, $c_{s,obl}$ lub t_{obl} , porównywano z danymi eksperymentalnymi i wyznaczano współczynniki równania metodą wyrównawczą najmniejszych kwadratów (norma euklidesowa $Q = \sum (y_i - f(x_i))^2$). Metoda ta łączy w sobie błąd pomiaru, błąd przybliżenia modelu i błąd oceny parametrów, a przy tym jest najmniej pracochłonna i najmniej wrażliwa na przenoszenie błędów np. błędów zaokrągleń¹³³. Obliczenia prowadzono w programie *Microsoft® Excel*, wykorzystano także moduł *Solver*.

Dane doświadczalne uzyskane we wszystkich seriach pomiarowych, dla poszczególnych enzymów (osobno dla α -, β -, glukoamylazy natywnej, osobno dla

[#] dane doświadczalne zamieszczone są w raporcie z realizacji grantu KBN 3P40501107, „Bioreaktory enzymatyczne do równoległo-następczej reakcji hydrolizy skrobi”, kierownik projektu A. Noworyta, Instytut Inżynierii chemicznej i Urządzeń Ciepłych, Politechnika Wrocławska, 1997 oraz Załączniku 1

¹³¹ A. Burghardt, *Postępy inżynierii reaktorów chemicznych*, skrypt Politechniki Śląskiej, Gliwice, 1977

¹³² J. Demichowicz-Pigoniowa, *Obliczenia fizykochemiczne*, PWN, Warszawa, 1980

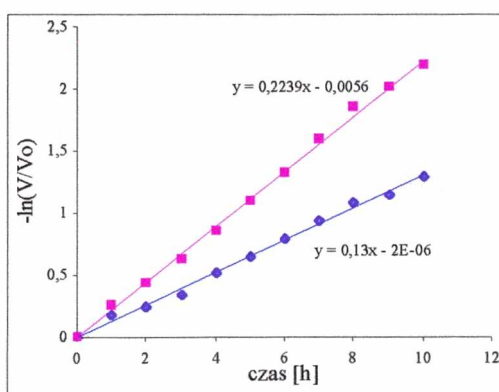
¹³³ S. Brandt, *Analiza danych. Metody statystyczne i obliczeniowe*, PWN, Warszawa, 1998

enzymów immobilizowanych), potraktowano jako elementy jednego zbioru danych. Na podstawie tych zbiorów przeprowadzono estymacje.

6.2.1. Hydroliza skrobi z udziałem α -amylazy

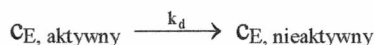
Stabilność aktywności enzymu

W czasie reakcji wskutek blokowania enzymu przez inhibitor, naturalnej inaktywacji lub uszkodzenia preparatu enzymatycznego enzym może tracić swoje zdolności katalityczne. Zbadano wpływ czasu na spadek aktywności α -amylazy. Preparat enzymatyczny i roztwór enzymu natywnego przechowywano przez 10 godzin w temperaturze reakcji (20°C). Co określony czas pobierano próbkę preparatu immobilizowanego i roztworu enzymu natywnego, i oznaczano aktywność katalityczną enzymu (test aktywnościowy). Wyniki przedstawiono na rys. 6.2.1.1. Z upływem czasu ta sama ilość enzymu tworzyła coraz mniej produktów. Dodatkowo, w przypadku enzymu immobilizowanego przeprowadzano reakcje hydrolizy skrobi w reaktorze rurowym ($\tau=5$ [min], stałe natężenie przepływu surowca). Funkcje $c_p=f(t)$ uzyskane z testów aktywnościowych i reaktora rurowego miały bardzo zbliżony przebieg, a stałe inaktywacji enzymu różniły się minimalnie. Obserwowany spadek aktywności był tak wyraźny, iż uznano za konieczne uwzględnienie tego efektu przy określaniu kinetyki reakcji.



Rys. 6.2.1.1. Wyniki testów aktywnościowych dla α -amylazy natywnej (■) i immobilizowanej (◆). V – aktywność chwilowa, V_0 – aktywność początkowa.

Przyjęto, że inaktywacja enzymu zachodzi według schematu:



Rozwiązując równanie różniczkowe dla reakcji I-rzędu:

$$-\frac{dc_{E, \text{aktyw.}}}{dt} = k_d \cdot c_{E, \text{aktyw.}} \quad (6.2.1.1)$$

otrzymano:

$$c_E = c_{E0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (6.2.1.2)$$

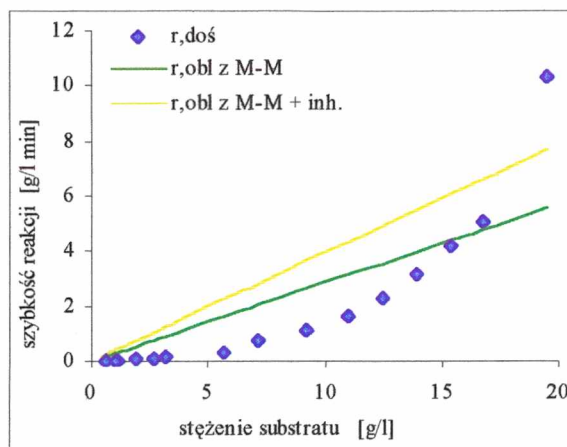
Równanie to zastosowano do wyznaczenia wartości stałej inaktywacji (k_d) α -amylazy natywnej i immobilizowanej. Stała k_d dla α -amylazy natywnej wynosi $6,231 \cdot 10^{-5}$ [1/s], natomiast dla α -amylazy immobilizowanej $3,611 \cdot 10^{-5}$ [1/s].

Równanie kinetyczne

Dokonując przeglądu literatury dotyczącej kinetyki reakcji enzymatycznych, zauważa się, że dużą popularnością cieszy się model Michaelis-Menten. Wynika to z prostoty i uniwersalności tego równania oraz możliwości łatwej fizycznej interpretacji jego współczynników. Dlatego poszukiwania równania matematycznego, które najlepiej opisze proces hydrolizy skrobi ziemniaczanej przez α -amylazę rozpoczęto od równania Michaelis-Menten:

$$r = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (6.2.1.3)$$

Do aproksymacji zastosowano zbiór 270 elementów (wszystkie dane doświadczalne dla układów reakcyjnych z α -amylazą natywną). Współczynniki równania (6.2.1.3) wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów. Otrzymano wartości: $k_3 = 2,696 \cdot 10^5$ [1/s] i $K_M = 2,311 \cdot 10^5$ [g/l]. Nie uzyskano dobrej zbieżności danych doświadczalnych z danymi obliczonymi z równania (6.2.1.3). Przykładowe wyniki przedstawiono na rys. 6.2.1.2.



Rys. 6.2.1.2. Przebieg zmiany szybkości hydrolizy w zależności od stężenia substratu dla przykładowego układu doświadczalnego i rozpatrywanych modeli.

Następnie kinetykę procesu hydrolizy skrobi opisano równaniem Michaelis-Menten z inhibicją kompetycyjną substratem:

$$r = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_I}\right) + c_S} \quad (6.2.1.4)$$

Podobnie jak w przypadku równania Michaelis-Menten nie uzyskano dobrej korelacji danych doświadczalnych z obliczeniowymi (rys. 6.2.1.2). Otrzymane w estymacji wartości stałych ($k_3=1,10 \cdot 10^6$ [1/s], $K_M=2,88 \cdot 10^5$ [g/l]) są zbliżone do stałych wyznaczonych z równania (6.2.1.3), a wprowadzony do równania Michaelis-Menten dodatkowy parametr (stała inhibicji $K_P=2,11 \cdot 10^4$ [g/l]) nie wpłynął istotnie na wynik aproksymacji.

Analiza danych eksperymentalnych (przykład na rys. 6.2.1.2) zasugerowała możliwość wystąpienia dwóch frakcji substratu. W pierwszej próbie odwołano się do budowy skrobi i podzielono substrat na wiązania znajdujące się w cząsteczkach amylozy (frakcja A) i w cząsteczkach amylopektyny (frakcja B). Podziału tego nie potwierdziły analizy danych doświadczalnych i wyników obliczeń. Wiazań przypisanych do frakcji A jest więcej od wiązań znajdujących się w łańcuchach amylozy.

Przyjęto, że główną „cechą” pozwalającą przyporządkować dane wiązanie do jednej z frakcji nie jest jego lokalizacja w cząsteczkach czy to amylozy, czy amylopektyny, lecz podatność (rozdział 6.1).

Następnie przyjęto, że obie frakcje hydrolizowane są jednocześnie:



Założenie to wynika z mechanizmu, typu działania α -amylazy. Enzym rozcina jedno, losowo wybrane wiązanie. α -Amylaza preferuje atak w środek łańcucha, gdzie znajdują się wiązania z frakcji A, ale może zaatakować i zhydrolizować również wiązania w desktrynach i oligocukrach (frakcja B).

W układach reakcyjnych z dwoma lub więcej substratami (multisubstratowych), poszczególne reagenty mogą współzawodniczyć (każdy z każdym) o miejsce aktywne stosowanego enzymu. Jeden z nich (będący w nadmiarze) może „zaanektować” miejsce wiążące przypadające w danej chwili drugiemu reagentowi^{134,135}. Wiązania frakcji A, z racji tego że są bardziej dostępne dla enzymu, mogą spełniać rolę pseudo-inhibitora enzymu, hamując szybkość hydrolizy wiązań frakcji B. Jeżeli produkty otrzymywane w każdej z reakcji byłyby różne, układ można by traktować jak dwie niezależne reakcje z inhibicją kompetycyjną. Sytuacja komplikuje się, gdy produkt w obu reakcjach jest taki sam. Mierzona szybkość tworzenia produktu jest wtedy sumą szybkości dwóch reakcji:

$$r = k_{3,A} \cdot [AE] + k_{3,B} \cdot [BE] \quad (6.2.1.5)$$

Przekształcając równanie (6.2.1.5) według schematu Michaelis-Menten z uwzględnieniem inhibicji otrzymuje się równanie:

$$r = \frac{k_{3,A} \cdot c_E \cdot \frac{c_A}{K_{M,A}}}{1 + \frac{c_A}{K_{M,A}} + \frac{c_B}{K_{M,B}}} + \frac{k_{3,B} \cdot c_E \cdot \frac{c_B}{K_{M,B}}}{1 + \frac{c_A}{K_{M,A}} + \frac{c_B}{K_{M,B}}} \quad (6.2.1.6)$$

Równanie powyższe jest szczególnym przypadkiem równania multisubstratowego^{136,137}:

$$r = \sum_i \frac{c_{S,i} \cdot \frac{r_{\max,i}}{K_{M,i}}}{1 + \sum_j \frac{c_{S,j}}{K_{M,j}}} \quad (6.2.1.7)$$

gdzie: $r_{\max,i} = k_{3,i} \cdot c_E$, $i, j = A, B$.

Opis kinetyki reakcji hydrolizy skrobi w oparciu o równanie (6.2.1.6) jest trudny ze względu na dużą ilość występujących w nim stałych kinetycznych. Liczba stałych, które

¹³⁴ T.Keleti, *Basic enzyme kinetics*, Akademiai Kiado, Budapest, 1986

¹³⁵ J.E.Bailey, D.F.Ollis, *Biochemical engineering fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, Chemical Eng. Series, 1989

¹³⁶ E.Dawes, *Quantitative problems in biochemistry*, Longman, London-New York, 1980

¹³⁷ L.Marchal, J.Jonkers i in., *The effect of process conditions on the alpha-amylolytic hydrolysis of amylopectin potato starch: An experimental design approach*, Biotech. Bioeng., 3, 1999,

należałoby wyznaczyć z jednego równania wynosi 5, co osłabia fizyczny sens równania i stwarza ryzyko dużych błędów przy jego wykorzystywaniu.

Oszacowano* stałe kinetyczne z równania (6.2.1.6). Otrzymano duże wartości $K_{M,A}$ i $K_{M,B}$, rzędu 10^6 [g/l], co sugerowało możliwość uproszczenia rozpatrywanego równania do reakcji pierwszego rzędu względem każdego reagenta. Wówczas reakcje hydrolizy skrobi z udziałem α -amylazy można opisać zależnością:

$$r = k_A \cdot c_E \cdot c_A + k_B \cdot c_E \cdot c_B \quad (6.2.1.8)$$

gdzie: $k_A = k_{3,A}/K_{M,A}$, $k_B = k_{3,B}/K_{M,B}$.

$$r_A = -dc_A/dt = k_A \cdot c_E \cdot c_A \quad (6.2.1.9)$$

$$r_B = -dc_B/dt = k_B \cdot c_E \cdot c_B \quad (6.2.1.10)$$

Uwzględniając spadek aktywności enzymu (równanie 6.2.1.2), scałkowano w odpowiednich granicach równanie (6.2.1.9) oraz (6.2.1.10) i otrzymano:

$$c_A = c_{A0} \cdot e^{\left(-\frac{k_A \cdot c_{E0}}{k_d} \cdot (1 - e^{-k_d \cdot t}) \right)} \quad (6.2.1.11)$$

$$c_B = c_{B0} \cdot e^{\left(-\frac{k_B \cdot c_{E0}}{k_d} \cdot (1 - e^{-k_d \cdot t}) \right)} \quad (6.2.1.12)$$

Oznaczając początkowe stężenia poszczególnych frakcji:

$$c_{0A} = c_0 \cdot Y \quad (6.2.1.13)$$

$$c_{0B} = c_0 \cdot (1 - Y) \quad (6.2.1.14)$$

otrzymuje się ostateczne równanie na całkowite stężenie substratu w trakcie reakcji:

$$c = c_A + c_B = c_0 \cdot Y \cdot e^{\left(-\frac{k_A \cdot c_{E0}}{k_d} \cdot (1 - e^{-k_d \cdot t}) \right)} + c_0 \cdot (1 - Y) \cdot e^{\left(-\frac{k_B \cdot c_{E0}}{k_d} \cdot (1 - e^{-k_d \cdot t}) \right)} \quad (6.2.1.15)$$

Powyższe równanie wykorzystano do aproksymacji. Stałe kinetyczne wyznaczono na podstawie 270 elementów, stosując metodę najmniejszych kwadratów. Otrzymano następujące wartości współczynników równania dla α -amylazy natywnej:

$$Y = 0,782$$

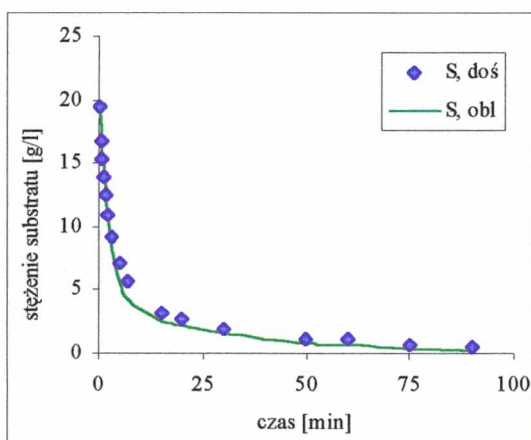
$$k_A = 0,1498 \text{ [l/g}\cdot\text{s]}$$

$$k_B = 0,0123 \text{ [l/g}\cdot\text{s]}$$

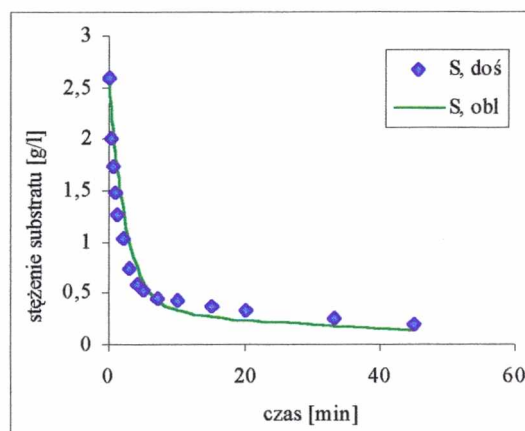
Na podstawie wykresów zmiany stężenia substratu od czasu reakcji (przykłady zaprezentowano na rys. 6.2.1.3) oraz analizy błędów (błąd względny 20,6% - szczegóły w dalszej części podrozdziału) uzyskaną estymację uznano za zadowalającą.

Z 16 przeprowadzonych reakcji okresowych dla α -amylazy natywnej pokazano na rys. 6.2.1.3 układy o największym i najmniejszym stężeniu skrobi dla trzech różnych stężeń enzymu.

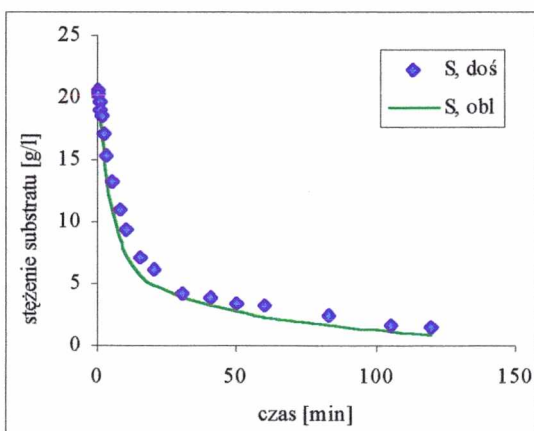
a) $c_{S0}=19,501$ [g/l], $c_{E0}=0,045$ [g/l]



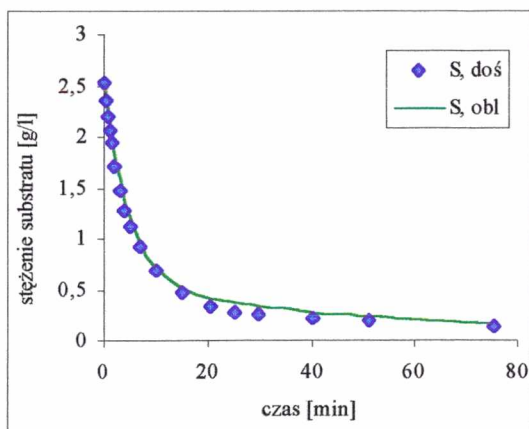
b) $c_{S0}=2,582$ [g/l], $c_{E0}=0,045$ [g/l]



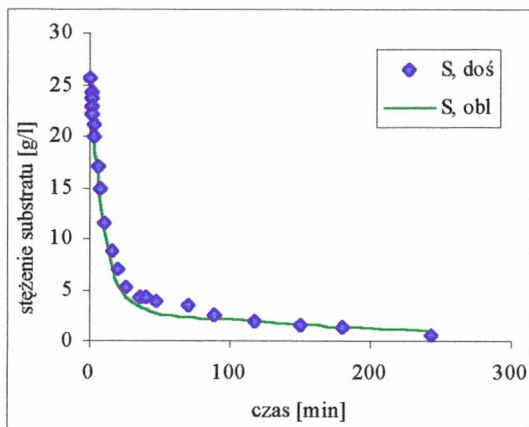
c) $c_{S0}=20,612$ [g/l], $c_{E0}=0,023$ [g/l]



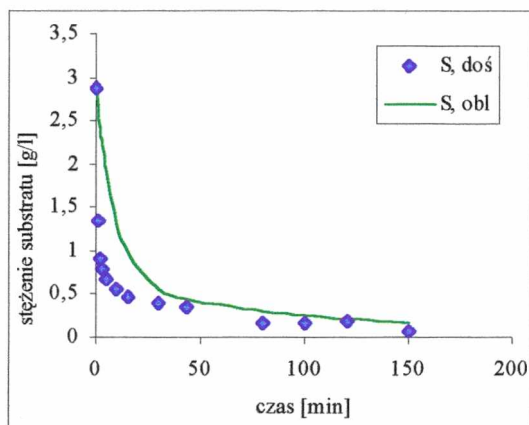
d) $c_{S0}=2,527$ [g/l], $c_{E0}=0,023$ [g/l]



e) $c_{S0}=25,676$ [g/l], $c_{E0}=0,0126$ [g/l]



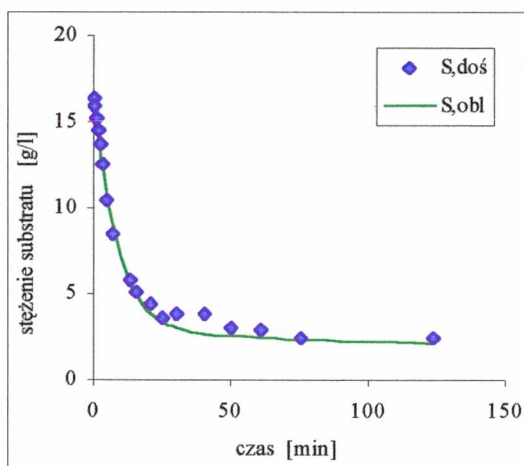
f) $c_{S0}=2,874$ [g/l], $c_{E0}=0,0123$ [g/l]



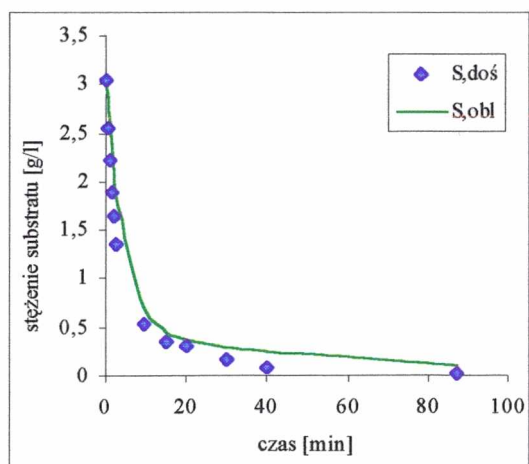
Rys. 6.2.1.3. Przebieg zmian stężenia substratu w czasie reakcji dla układu z α -amylazą natywną.

Analogiczne obliczenia przeprowadzono dla reakcji z udziałem α -amylazy immobilizowanej (220 danych). Skorzystano z tego samego równania, bo fakt związania enzymu z nośnikiem nie powinien z zasady zmieniać mechanizmu reakcji, a tym samym postaci równania kinetycznego, jedynie jego parametry. Przeprowadzono 14 reakcji z enzymem immobilizowanym. Przykłady zamieszczono na rys. 6.2.1.4.

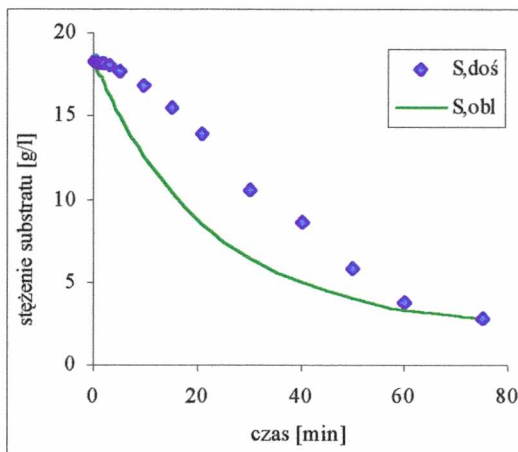
a) $c_{S0}=16,374$ [g/l], $c_{E0}=0,046$ [g/l]



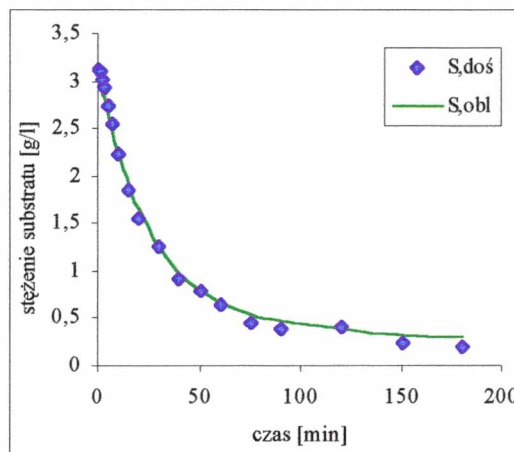
b) $c_{S0}=3,055$ [g/l], $c_{E0}=0,046$ [g/l]



c) $c_{S0} = 18,305 \text{ [g/l]}$, $c_{E0} = 0,009 \text{ [g/l]}$



d) $c_{S0} = 3,121 \text{ [g/l]}$, $c_{E0} = 0,008 \text{ [g/l]}$



Rys. 6.2.1.4. Przebieg zmian stężenia substratu w czasie reakcji dla układu z α -amylazą immobilizowaną.

Dla α -amylazy immobilizowanej uzyskano wartości stałych kinetycznych:

$$Y = 0,825$$

$$k_A = 4,28 \cdot 10^{-2} \text{ [l/g} \cdot \text{s]}$$

$$k_B = 8,216 \cdot 10^{-4} \text{ [l/g} \cdot \text{s]}$$

Nie modyfikowano przyjętego modelu dwóch równoległych reakcji równaniami wyższego rzędu, gdyż prowadzi to do zbyt dużej liczby parametrów, których nie można wyznaczyć niezależnie.

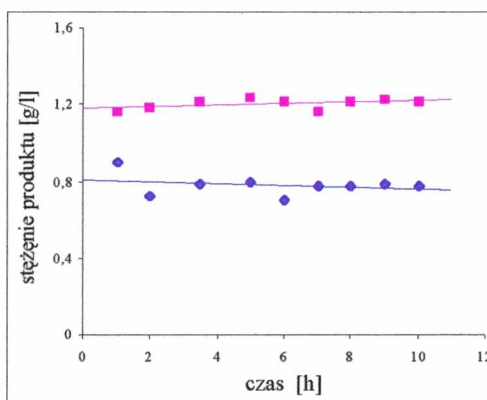
Zastosowana do wyznaczenia nieznanych parametrów procedura numeryczna dała średni absolutny błąd względny między wartościami obliczonymi i eksperymentalnymi dla α -amylazy natywnej 20,6%, dla immobilizowanej 23,6%. Na wielkość błędu wpłynął niewątpliwie fakt „dopasowywania” funkcji modelowej do wyników doświadczalnych obarczonych błędami o różnych wartościach (momentami dość dużych). Jako miarę dopasowania modelu matematycznego do danych eksperymentalnych wybrano współczynnik korelacji. Współczynnik ten wynosi 0,9942 dla enzymu natywnego i 0,9920 dla enzymu związanego z nośnikiem. Wartości bliskie jedności świadczą o dobrym dopasowaniu krzywych do danych empirycznych i implikują pośrednio dobrą zgodność modelu kinetycznego z rozważanym przypadkiem doświadczalnym¹³⁹.

¹³⁹ J.B.Czermiński, A.Iwasiewicz i in., *Metody statystyczne dla chemików*, PWN, Warszawa 1992

6.2.2. Hydroliza skrobi z udziałem β -amylazy

Stabilność aktywności enzymu

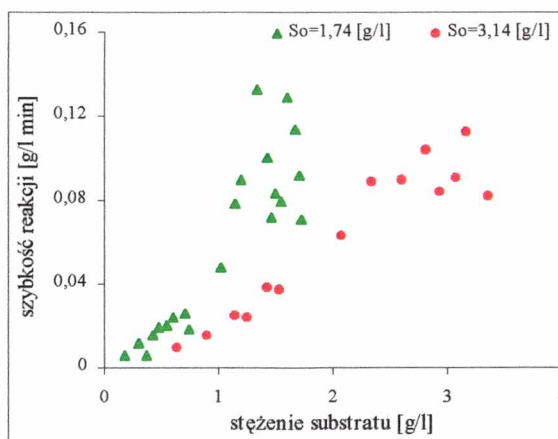
Spadek aktywności β -amylazy określano na podobnej zasadzie jak dla α -amylazy. Wyniki zaprezentowano na rys. 6.2.2.1. Nie zaobserwowano utraty zdolności katalitycznych enzymu w czasie współmiernym z czasem reakcji. Nie uwzględniono zatem wpływu spadku aktywności enzymu na kinetykę hydrolizy skrobi przez β -amylazę.



Rys. 6.2.2.1. Wynik testów aktywnościowych dla β -amylazy natywnej (■) i immobilizowanej (◆).

Równanie kinetyczne

Z analizy uzyskanych przebiegów doświadczalnych (rys. 6.2.2.2) i wstępnych obliczeń na podstawie równania Michaelis-Menten wynika, że odchylenie wartości obliczonych (z równania Michaelis-Menten) od doświadczalnych zwiększa się z postępem reakcji tym wyraźniejszy im wyższe jest stężenie reagentów. Jest to zachowanie charakterystyczne dla reakcji, w której produkty hamują (ograniczają) działanie enzymu.



Rys. 6.2.2.2. Przebieg zmian szybkości reakcji w funkcji stężenia substratu dla różnych stężeń początkowych substratu.

Warunkiem koniecznym by zaszła reakcja hydrolizy biopolimeru z udziałem egzoenzymów jest „kontakt” cząsteczek enzymu z końcami nieredukującymi. Enzymy te, niezależnie od ilości wiązań znajdujących się w zaatakowanych łańcuchach, zhydrolizują tylko kilka z nich, po czym odłączają się i poszukują nowego miejsca ataku. Dla β -amylazy i glukoamylazy długość łańcuchów nie jest istotna. Enzymy te „widzą” tylko koniec nieredukujący i bardzo krótki fragment łańcucha, tzn. te cząsteczki monomerów (maltozę, glukozę), które znajdują się najbliżej centrum katalitycznego. Końce nieredukujące są zatem najważniejszymi dla enzymu elementami w łańcuchach surowca.

W układzie reakcyjnym ze wzrostem stopnia przereagowania pojawia się coraz więcej dekstryn. Są to cząsteczki o mocno rozgałęzionej strukturze. Rozgałęzieniami są krótkie liniowe łańcuchy o charakterze amyloz. Wiązania α -1,4-glikozydowe znajdujące się w tych łańcuchach są wciąż podatne na działanie β -amylaz. Enzym jest w stanie zhydrolizować te wiązania, choć z nieco mniejszą szybkością. Zaznaczyć należy, że w pobliżu punktów rozgałęzień działanie β -amylazy jest blokowane. Dlatego w przypadku β -amylazy nie obserwuje się wyraźnego przejścia z obszaru, gdzie hydrolizowane są wiązania z frakcji A do obszaru hydrolizy frakcji B. Można stwierdzić, że dla β -amylazy ilość i dostępność końców nieredukujących a nie wiązań jest wielkością determinującą proces. W związku z tym przyjęto, że w rozpatrywanym układzie reakcyjnym występuje jedna frakcja.

Szybkość reakcji opisano jedną zależnością, tzn. równaniem Michaelis-Menten z inhibicją kompetycyjną produktem:

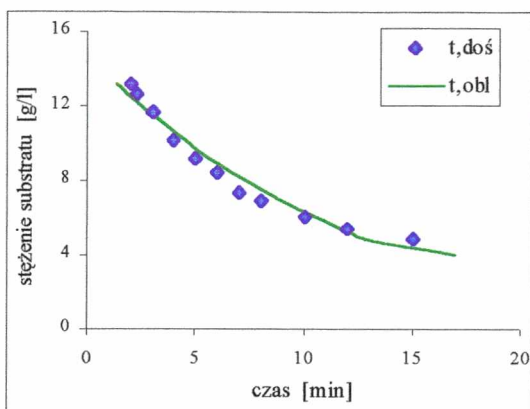
$$r = -\frac{dc_S}{dt} = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{K_M + c_S + \frac{K_M}{K_P} \cdot (c_{S0} - c_S)} \quad (6.2.2.1)$$

Po scałkowaniu równania (6.2.2.1) w odpowiednich granicach otrzymuje się:

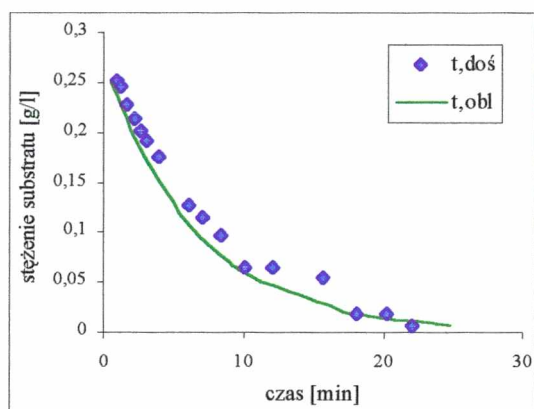
$$t = \left(\frac{K_M}{k_3 \cdot c_E} + \frac{K_M \cdot c_{S0}}{k_3 \cdot c_E \cdot K_P} \right) \cdot \ln \left(\frac{c_{S0}}{c_S} \right) + \left(\frac{1}{k_3 \cdot c_E} - \frac{K_M}{k_3 \cdot c_E \cdot K_P} \right) \cdot (c_{S0} - c_S) \quad (6.2.2.2)$$

W estymacji porównywano czasy reakcji, ponieważ z równania (6.2.2.1) nie można wyznaczyć w sposób analityczny stężenia substratu. Parametry równania (6.2.2.2) wyznaczono w oparciu o zbiór danych składający się z 400 elementów dla enzymu natywnego i 150 dla enzymu immobilizowanego. Zastosowano metodę najmniejszych kwadratów. Wyniki aproksymacji przedstawiono na rys. 6.2.2.3 i rys.6.2.2.4.

a) $c_{S0} = 14,76 \text{ [g/l]}$, $c_E = 0,4 \text{ [g/l]}$



b) $c_{S0} = 0,269 \text{ [g/l]}$, $c_E = 0,1 \text{ [g/l]}$



Rys. 6.2.2.3. Przebieg zmian stężenia substratu w trakcie reakcji okresowych dla układu z β -amylazą w postaci natywnej.

Uzyskano następujące wartości stałych :

- dla β -amylazy natywnej

$$k_3 = 0,056 \text{ [1/s]}$$

$$K_M = 1,97 \text{ [g/l]}$$

$$K_P = 2,42 \text{ [g/l]}$$

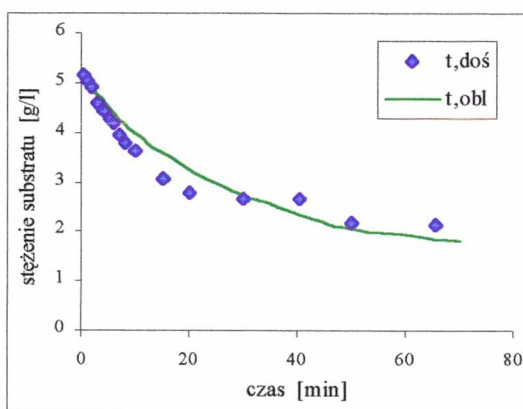
- dla β -amylazy immobilizowanej

$$k_3 = 0,0197 \text{ [1/s]}$$

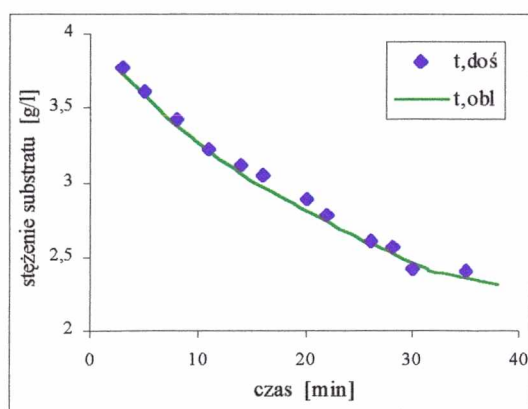
$$K_M = 1,30 \text{ [g/l]}$$

$$K_P = 0,30 \text{ [g/l]}$$

a) $c_{S0} = 5,22 \text{ [g/l]}$, $c_E = 0,205 \text{ [g/l]}$



b) $c_{S0} = 3,98 \text{ [g/l]}$, $c_E = 0,105 \text{ [g/l]}$



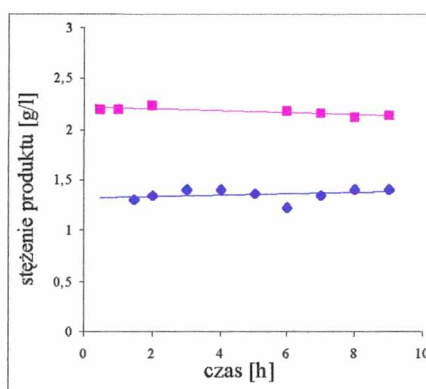
Rys. 6.2.2.4. Przebieg zmian stężenia substratu od czasu reakcji dla układu reakcyjnego z β -amylazą immobilizowaną.

Średni absolutny błąd względny dla β -amylazy natywnej wynosi 24,5%, dla enzymu immobilizowanego 27,2%. Współczynnik korelacji wynosi odpowiednio - 0,9790 i 0,9714. Otrzymane wyniki uznano za zadowalające. Uzyskano dużą zbieżność danych eksperymentalnych i obliczeniowych, co sugeruje poprawność doboru modelu.

6.2.3. Hydroliza skrobi z udziałem glukoamylazy

Stabilność aktywności enzymu

Podobnie jak w przypadku α - i β -amylazy, preparat enzymatyczny i roztwór glukoamylazy natywnej przechowywano przez kilka godzin w temperaturze 20°C, przeprowadzając co określony czas reakcję i oznaczając ilość cukrów redukujących (test aktywnościowy). Nie zaobserwowano w tym czasie utraty zdolności katalitycznych enzymu (rys. 6.2.3.1).

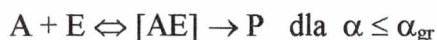


Rys. 6.2.3.1. Wynik testów aktywnościowych dla glukoamylazy natywnej (■) i immobilizowanej (◆).

Równanie kinetyczne

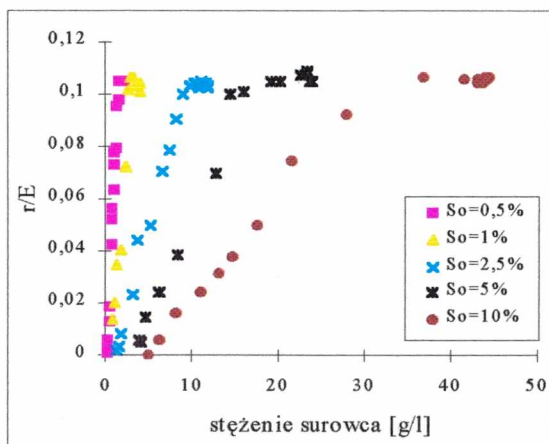
Wstępne próby opisu procesu hydrolizy skrobi z udziałem glukoamylazy jednym równaniem z zachowaniem fizycznego sensu współczynników równania nie powiodły się. Analizując wyniki doświadczalne zauważono, że szybkość reakcji hydrolizy skrobi glukoamylazą jest w początkowej fazie stała. Po osiągnięciu pewnego stopnia przereagowania następuje gwałtowna zmiana szybkości reakcji. Zależność tę przedstawiono na rys. 6.2.3.2.

Obserwowane przebiegi zmian szybkości reakcji wyjaśnić można wykorzystując założenie, że proces hydrolizy skrobi jest układem dwóch równoległych reakcji następnych. W przypadku reakcji z glukoamylazą układ ten można uprościć do dwóch reakcji następnych:

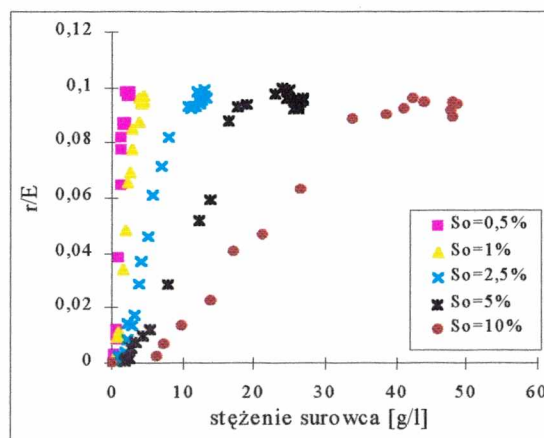


Enzym reaguje z substratem z frakcji A tak długo, aż zostaną zhydrolizowane wszystkie wiązania podatne na jego działanie. Następnie glukoamylaza atakuje wiązania mniej podatne.

a)



b)



Rys. 6.2.3.2. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu dla dwóch różnych stężeń enzymu; (a) $-1,77 \text{ g/l}$, (b) $-2,83 \text{ g/l}$.

Wyznaczono graficznie, na podstawie wykresów $r=f(\alpha)$ (dla każdego układu reakcyjnego) wartość stopnia przereagowania, przy którym następuje zmiana charakteru przebiegu szybkości reakcji. Wartości te miały niewielki rozrzut ($0,31 \div 0,35$), średnia arytmetyczna z tych wartości wynosi $\alpha_{gr} = 0,33$. Stwierdzono, że wartość α_{gr} nie zależy od stężenia surowca. Dla $\alpha \in (0; 0,33)$ szybkość reakcji determinowana jest tylko przez koncentrację enzymu:

$$r = k \cdot c_E \quad (6.2.3.1)$$

Na podstawie danych doświadczalnych przedstawionych na rys. 6.2.3.2, wyznaczono wartość stałej szybkości reakcji. Przekształcono równanie (6.2.3.1) do postaci $k = r/c_E$, gdzie r jest szybkością reakcji liczoną jako chwilowy przyrost produktów (Δc_p) w różnicowym przedziale czasu (Δt). Wartość stałej k wyznaczono dla stopni przereagowania mniejszych niż $0,33$. Uzyskano $k = 1,67 \cdot 10^{-3} \text{ [1/s]}$.

Kinetykę tej złożonej reakcji przyjęto opisywać równaniem:

$$r = \begin{cases} k \cdot c_E & \text{dla } \alpha \leq 0,33 \\ f(c_j, c_E) & \text{dla } \alpha > 0,33 \end{cases} \quad (6.2.3.2)$$

gdzie: $j = S$ (substrat), P (produkt), I (inhibitor).

Stała szybkości k z równania (6.2.2.1) jest stałą szybkości reakcji hydrolizy frakcji A (k_A). Równanie szybkości hydrolizy wiązań z frakcji A ma postać:

$$-\frac{dc_A}{dt} = k_A \cdot c_E \quad (6.2.3.3)$$

Poszukiwania funkcji $f(c_B)$ rozpoczęto od równania Michaelis-Menten:

$$f(c_S) = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (6.2.3.4)$$

Wyznaczono wartości stałych, metodą najmniejszych kwadratów porównując czas doświadczalny i obliczeniowy, uzyskując $k_3 = 9,1 \cdot 10^{-3}$ [1/s] i $K_M = 1,25 \cdot 10^2$ [g/l]. Zbiór danych liczył 170 elementów. W rozpatrywanym przypadku nieadekwatność opisu występowała szczególnie wyraźnie w końcowym etapie reakcji, kiedy stężenie produktu było duże. Rzeczywisty czas reakcji, potrzebny do otrzymania żadanego stopnia przereagowania, był dłuższy niż czas obliczony na podstawie równania (6.2.3.4).

Przyjęto zatem, że produkt jest inhibitorem reakcji (inhibicja kompetycyjna), co odpowiada funkcji:

$$f(c_S) = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_B}{K_M + c_B + \frac{K_M}{K_P} \cdot (c_0 - c_B)} \quad (6.2.3.5)$$

Równanie powyższe obowiązuje dla drugiego okresu reakcji (rys. 6.1.1.c – obszar II), kiedy wszystkie wiązania frakcji A zostały zhydrolizowane. Po scałkowaniu równania (6.2.2.5), w odpowiednich granicach, uzyskuje się wyrażenie:

$$t_B = \frac{1}{k_3 \cdot c_E} \cdot \left[\left(K_M + \frac{K_M \cdot c_0}{K_P} \right) \cdot \ln \left(\frac{c_{0B}}{c_B} \right) + \left(1 - \frac{K_M}{K_P} \right) \cdot (c_{0B} - c_B) \right] \quad (6.2.3.6)$$

W estymacji porównywano czasy reakcji (t). Dla stopnia przereagowania $\alpha \leq 0,33$ $t = t_A$, dla $\alpha > 0,33$ $t = t_A + t_B$. Wartości t_A obliczono rozwiązując równanie (6.2.3.3).

Dla glukoamylazy stężenia początkowe frakcji opisują zależności:

$$c_{0A} = c_0 \cdot \alpha_{gr.} \quad (6.2.3.7)$$

$$c_{0B} = c_0 \cdot (1 - \alpha_{gr.}) \quad (6.2.3.8)$$

Wyznaczono wartości parametrów tego równania dla enzymu natywnego, opierając się na 170 danych doświadczalnych. Wynoszą one:

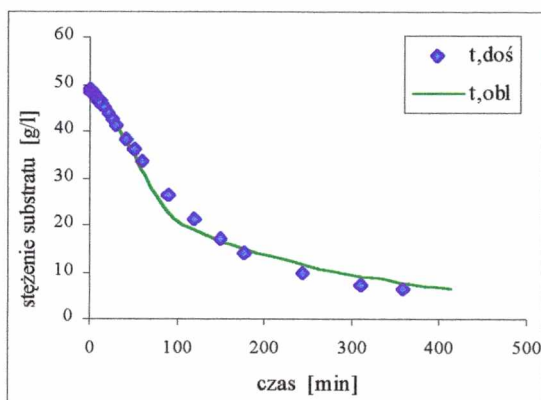
$$k_3=46 \text{ [1/s]}$$

$$K_M=4,01 \cdot 10^4 \text{ [g/l]}$$

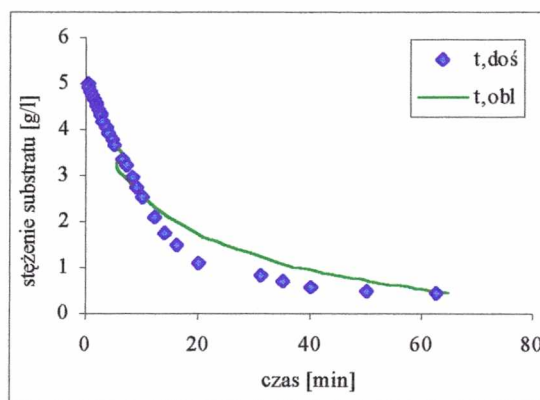
$$K_P=0,734 \text{ [g/l]}.$$

Przykładowe przebiegi reakcji, spośród 17 serii pomiarowych, przedstawiono na rys. 6.2.3.3. Średni absolutny błąd względny dla glukoamylazy natywnej wynosi 21,7%, współczynnik korelacji 0,9741. Na podstawie tego estymację uznano za zadowalającą.

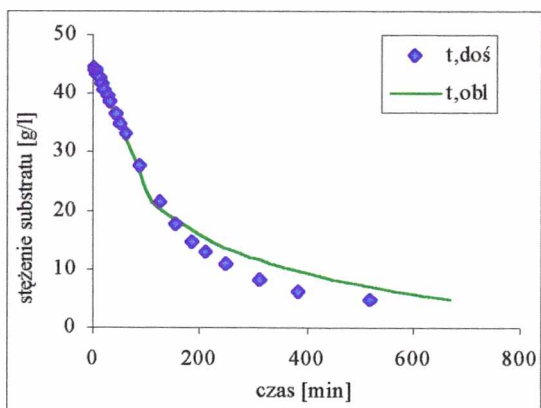
a) $c_{S0}=48,79 \text{ [g/l]}$, $c_E=0,187 \text{ [g/l]}$



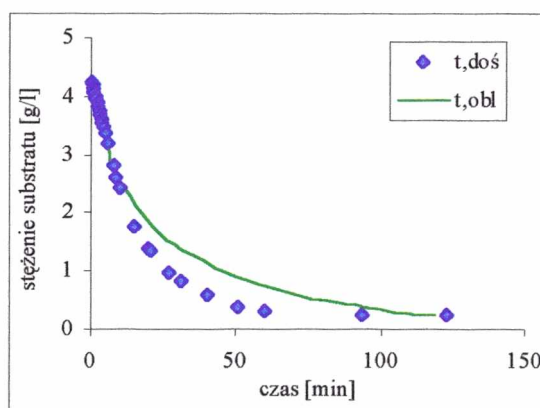
b) $c_{S0}=5,032 \text{ [g/l]}$, $c_E=0,187 \text{ [g/l]}$



c) $c_{S0}=44,49 \text{ [g/l]}$, $c_E=0,137 \text{ [g/l]}$



d) $c_{S0}=4,3 \text{ [g/l]}$, $c_E=0,137 \text{ [g/l]}$



Rys. 6.2.3.3. Przebieg zmian stężenia substratu w trakcie reakcji okresowych dla układu reakcyjnego z glukoamylazą natywną.

Podobne obliczenia wykonano dla enzymu immobilizowanego (zbiór danych liczył 30 elementów). Wyznaczono wartości parametrów równania (6.2.3.3) i (6.2.3.6), które wynoszą:

$$k_A = 1,33 \cdot 10^{-3} \text{ [1/s]}$$

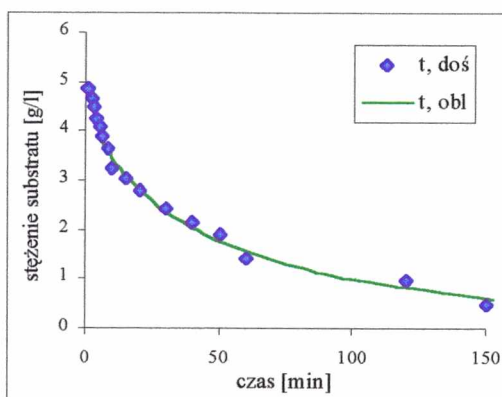
$$k_3 = 12,55 \text{ [1/s]}$$

$$K_M = 3489 \text{ [g/l]}$$

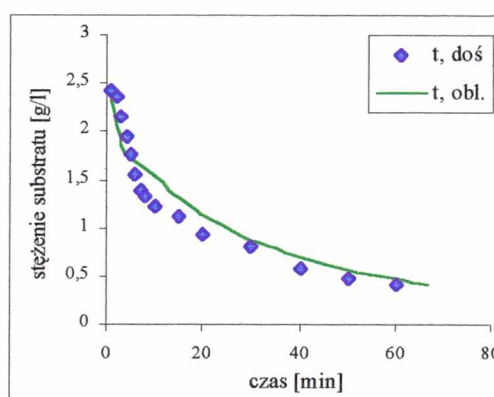
$$K_P = 0,458 \text{ [g/l]}.$$

Średni absolutny błąd względny dla glukoamylazy immobilizowanej wynosi 28,77%, współczynniki korelacji przyjął wartość 0,9781. Przykładowe wyniki przedstawiono na rys. 6.2.3.4.

a) $c_{S0} = 5,014 \text{ [g/l]}$, $c_E = 0,055 \text{ [g/l]}$

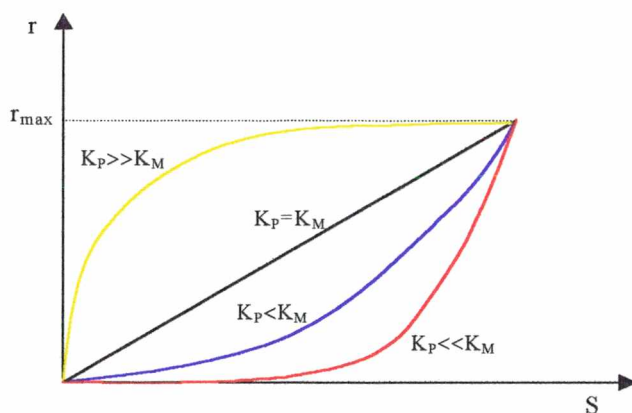


b) $c_{S0} = 2,489 \text{ [g/l]}$, $c_E = 0,055 \text{ [g/l]}$



Rys. 6.2.3.4. Przebieg zmian stężenia substratu w trakcie reakcji okresowych dla układu z glukoamylazą immobilizowaną.

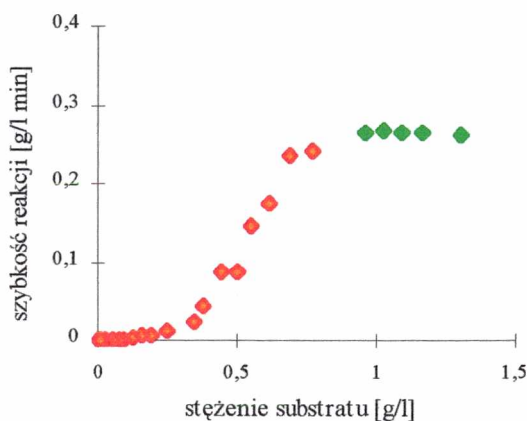
Charakterystyka krzywych $r=f(c_S)$ zależy od względnego powinowactwa enzymu do substratu i produktu, innymi słowy od wartości stałych K_M i K_P . W zależności od relacji między tymi stałymi uzyskuje się różne przebiegi funkcji. Zobrazowane to zostało na rys. 6.2.3.5. Wykres sporządzono na podstawie równania (6.2.3.5).



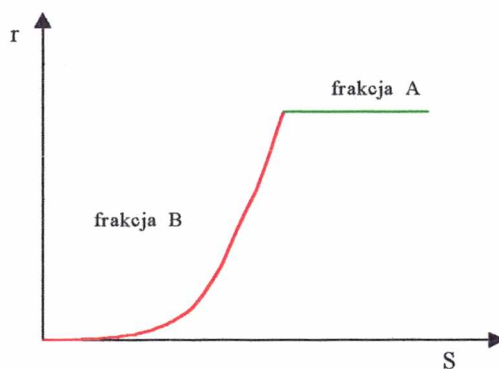
Rys. 6.2.3.5. Wykres zależności szybkości reakcji od stężenia enzymu dla różnych wartości stałych kinetycznych K_M i K_P .

Rozkład punktów doświadczalnych dla frakcji B (rys. 6.2.3.6) przedstawia przypadek, kiedy stała inhibicji produktem jest dużo mniejsza od stałej Michaelis (czerwona linia). Uzyskane wartości stałych ($K_M=4,01 \cdot 10^4$ [g/l], $K_P=0,734$ [g/l] dla glukoamylazy natywnej oraz $K_M=3489$ [g/l], $K_P=0,458$ [g/l] dla enzymu immobilizowanego) to potwierdzają.

a)



b)



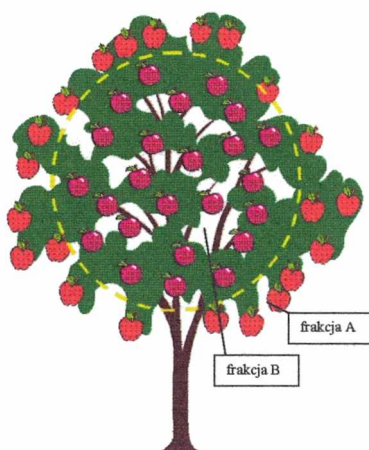
Rys. 6.2.3.6. Przebieg zmian szybkości reakcji hydrolizy skrobi z udziałem glukoamylazy w funkcji stężenia substratu. a) dane doświadczalne, b) schemat ogólny.

Wnioskować stąd można, że model kinetyczny został poprawnie sformułowany (a stałe kinetyczne poprawnie wyznaczone).

6.2.4. Dyskusja modelu &

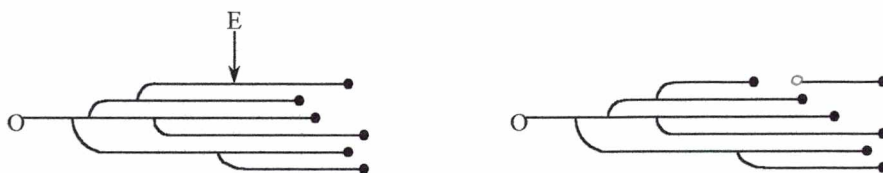
Opierając się na danych eksperymentalnych oraz wykorzystując wiedzę na temat budowy skrobi i działania enzymów amylolitycznych zaproponowano model kinetyczny, który odzwierciedla mechanizm hydrolizy skrobi przez α -, β - i glukoamylazę.

Celem lepszego zobrazowania prezentowanej w niniejszy rozdziale dyskusji przyjętego modelu kinetycznego przedstawiono cząsteczkę surowca w postaci drzewa owocowego (rys. 6.2.4.1).



Rys. 6.2.4.1. Model drzewa owocowego.

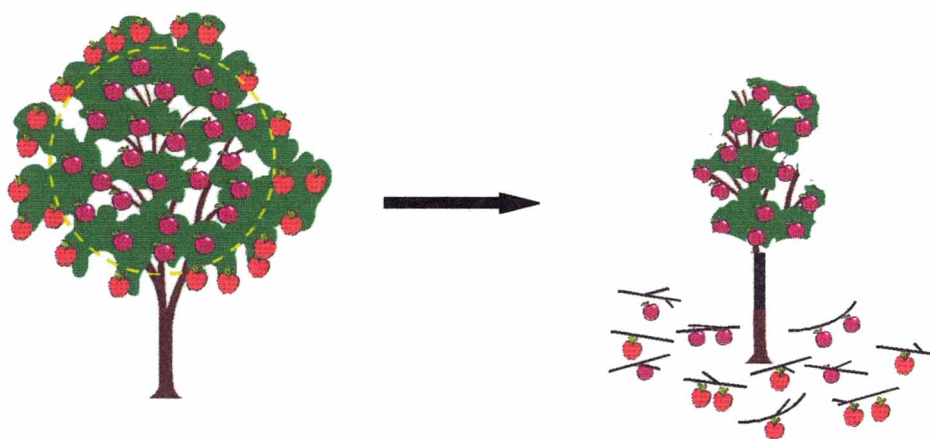
α -Amylaza atakuje łańcuchy biopolimeru w środku, tworząc po jednym nowym końcu nieredukującym i redukującym (rys. 6.2.4.2). W wyniku cięcia w środku łańcucha α -amylaza stwarza sobie nowe możliwości ataku (nowe miejsca ataku, odsłaniając kolejne łańcuchy w cząsteczkach amylopektyny).



Rys. 6.2.4.2. Mechanizm ataku endoenzymów. Koniec nieredukujący (●), koniec redukujący (○).

& W rozdziale tym celowo nie podano wartości omawianych stałych kinetycznych, by uczynić tekst przejrzystym. Wartości współczynników równań oraz inne istotne informacje zamieszczono na końcu rozdziału w tabeli 6.2.4.1.

W ten sposób w krótkim czasie dość długie łańcuchy amylozy hydrolizowane są do policukrów, a „krzaczaste” cząsteczki amylopektyny do poziomych kłastrów. Cząsteczki policukrów i klastry amylopektyny hydrolizowane są do maltooligosacharydów i dekstryn granicznych (rys. 6.2.4.3). Spada wówczas lepkość roztworu skrobi, ułatwiając prowadzenie procesu. Na tym etapie reakcji enzym hydrolizuje znaczną część wiązań (~80%). Bardzo podobne wartości udziału frakcji A dla enzymu natywnego i immobilizowanego oznaczają, że przyjęty podział substratu na frakcje o dużej i małej podatności na atak enzymu wydaje się być poprawny. Wiązania w frakcjach są tak samo dostępne dla enzymu, niezależnie od jego formy.



Rys. 6.2.4.3. Mechanizm ataku α -amylazy na cząsteczkę skrobi.

W początkowym okresie reakcji enzym preferuje wiązania frakcji A, ale ponieważ jego atak jest przypadkowy, może również rozciąć wiązania mniej podatne na jego działanie. O tym, że α -amylaza „niechętnie” hydrolizuje wiązania frakcji B świadczy stała szybkości k_B , około 10 razy mniejsza od stałej szybkości reakcji dla frakcji A. Substraty z frakcji B to wiązania położone blisko punktów rozgałęzień i wiązania w maltooligocukrach. Ilość wiązań frakcji B jest zależna od stopnia zhydrolizowania frakcji A i dopiero pod koniec reakcji ich stężenie determinuje ogólną szybkość procesu.

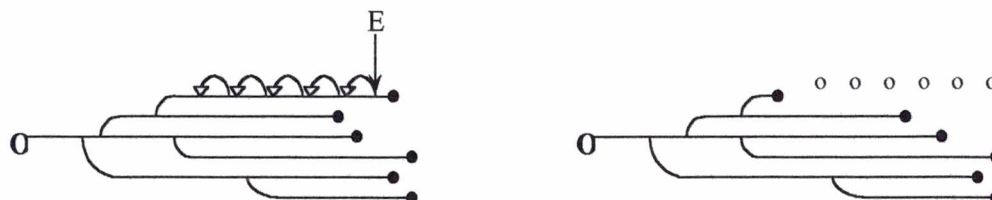
Fakt unieruchomienia enzymu na nośniku nie zmienia mechanizmu działania enzymu, zmniejsza natomiast, co jest logiczne, szybkość z jaką enzym rozcina wiązania w cząsteczkach skrobi. Wyznaczone stałe szybkości reakcji dla układu reakcyjnego z enzymem immobilizowanym są mniejsze w porównaniu z ich wartościami dla enzymu natywnego. Może oznaczać to, że:

- ✓ podczas procesu immobilizacji zostało zniszczone centrum aktywne enzymu,

- ✓ enzym na ograniczony dostęp do łańcuchów biopolimeru z racji unieruchomienia na nośniku (obiekt dużo większy od cząsteczki enzymu).

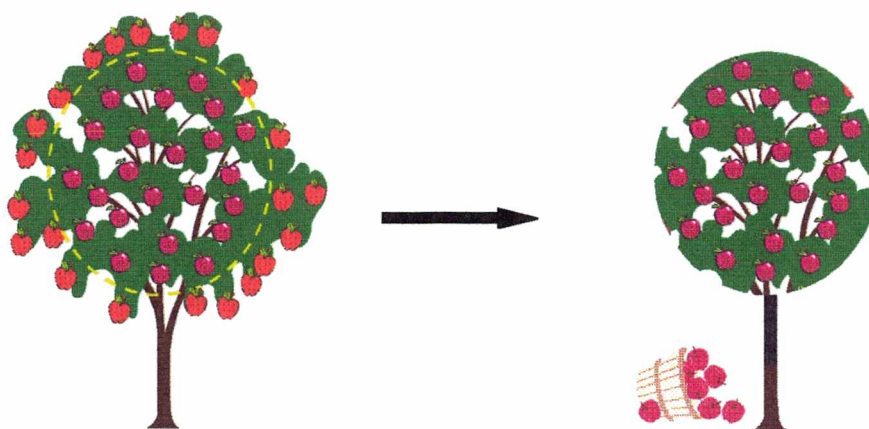
Prawdopodobnie najistotniejszy udział w spadku szybkości reakcji dla enzymów immobilizowanych mają właśnie ograniczenia steryczne enzymu oraz wielkość cząstek enzym-nośnik. Zostało to potwierdzone przez umiarkowane zmniejszenie się stałej szybkości reakcji dla frakcji A (około 4 razy) w stosunku do reakcji z enzymem natywnym. W frakcji tej wiązania znajdują się jeszcze w dość luźnej, korzystnej strukturze przestrzennej i nawet duże cząstki enzym-nośnik są w stanie odpowiednio się ułożyć i przeprowadzić reakcję. Dla frakcji B, w której znajdują się praktycznie tylko dekstryny, czyli cząsteczki z krótkimi łańcuchami i mocno rozgałęzione, szybkość reakcji zmniejszyła się kilkanaście razy (~15) w porównaniu z enzymem natywnym.

β -Amylaza i glukoamylaza to egzoenzymy o podobny typie ataku. Glukoamylaza odcina cząsteczkę glukozy od nieredukującego końca łańcucha biopolimeru, natomiast β -amylaza odcina maltozę. W obu przypadkach atak enzymu tworzy jeden nowy koniec redukujący i żadnych końców nieredukujących (rys. 6.2.4.4.)



Rys. 6.2.4.4. Mechanizm ataku egzoenzymów. Koniec nieredukujący (●), koniec redukujący (○).

Zgodnie ze swoimi preferencjami egzoenzymy przyłączają się do końców nieredukujących i hydrolizują kilka wiązań w łańcuchu. W pierwszym okresie reakcji dostępne są dla β -amylazy i glukoamylazy końce nieredukujące znajdujące się w cząsteczkach amylozy i zewnętrznych łańcuchach amylopektyny. Zhydrolizowana wówczas zostaje do cukrów prostych cała amyloza i część najbardziej wyeksponowanych na zewnątrz łańcuchów w amylopektynie. Następnie hydrolizowane są wiązania w odsłoniętych przez pierwszy atak łańcuchach amylopektyny. Z postępem reakcji dostępność odsłanianych końców nieredukujących maleje, tym samym zmniejsza się ilość miejsc potencjalnego ataku dla β -amylazy. Taki charakter działania powoduje, że β -amylaza (jak również glukoamylaza) „obiera” cząsteczkę skrobi (rys. 6.2.4.5).



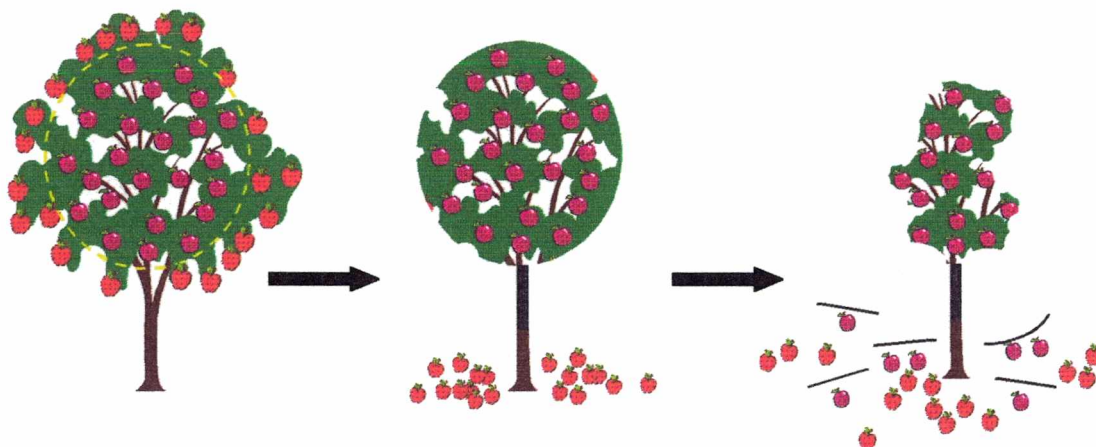
Rys. 6.2.4.5. Mechanizm ataku β -amylazy na cząsteczkę skrobi.

Glukoamylaza, w odróżnieniu od β -amylazy, ma dodatkowo możliwość rozcięcia wiązań α -1,6-glikozydowych. Hydrolizując te wiązania enzym stwarza sobie bardzo dogodne warunki do działania. Przez jedno cięcie w punkcie rozgałęzienia odsłaniane są obszary z nowymi końcami nieredukującymi, czyli dodatkowe miejsca ataku (rys. 6.2.4.6). Wiązań, które glukoamylaza jest w stanie rozciąć jest tak dużo, że reakcja w początkowym okresie (do stopnia przereagowania $\sim 33\%$) biegnie ze stałą szybkością (nadmiar substratu).

Po zhydrolizowaniu wiązań frakcji A enzym dociera w bliskie sąsiedztwo punktów rozgałęzień łańcuchów zewnętrznych i atakuje wiązania głębiej ulokowanych łańcuchów, pod warunkiem że jest dostępny koniec nieredukujący. Pojawiają się już trudności w dotarciu do miejsca ataku. Pomimo dużej wartości stałej k_3 , czyli liczby obrotów enzymu, następuje bardzo gwałtowny spadek szybkości reakcji hydrolizy skrobi przez glukoamylazę. Na tym etapie reakcji, zarówno dla β -amylazy jak i glukoamylazy, w mieszaninie reakcyjnej występują już duże ilości produktów, które blokują centra aktywne enzymu ograniczając ich udział w katalizie. Wyznaczone stałe inhibicji to potwierdzają. Zmniejszenie się stałej inhibicji dla enzymu immobilizowanego może oznaczać, że centra katalityczne enzymu nie są dostępne, ponieważ nastąpiła sorpcja produktu na powierzchni preparatu enzymatycznego. Im mniejsza wartość stałej K_P , tym silniejszy jej wpływ produktu na proces blokowania enzymu.

Unieruchamiając enzym ogranicza się jego mobilność. Stała szybkości reakcji k_3 powinna zatem zmniejszyć się. Uzyskane wartości stałej k_3 dla β -amylazy i glukoamylazy immobilizowanej, mniejsze 3-4 razy od wartości stałych szybkości reakcji z enzymami

natywnymi, to potwierdzają.



Rys. 6.2.4.6. Mechanizm ataku glukoamylazy na cząsteczkę skrobi.

W układach reakcyjnych z enzymami immobilizowanymi reakcja biegnie na granicy faz, co jest dodatkowym utrudnieniem w procesie. Mogą wtedy mieć miejsca odstępstwa od założeń modelu Michaelis-Menten (choćby że $S \gg E_0$) i mogą wystąpić duże różnice między wartościami doświadczalnymi i obliczeniowymi. Dlatego dla obu enzymów średni błąd przybliżeń wyniósł $\sim 27 \div 28\%$ dla β -amylazy i glukoamylazy immobilizowanej, podczas gdy dla enzymów natywnych był niższy $\sim 21 \div 24\%$.

Uzyskane w estymacjach stałe kinetyczne oraz przeprowadzona analiza modelu pokazuje, że zaproponowany w niniejszej pracy mechanizm hydrolizy skrobi ziemniaczanej przez enzymy amylolityczne poprawnie odzwierciedla obserwowany doświadczalnie przebieg hydrolizy rozpatrywanego biopolimeru.

Tabela 6.2.4.1. Podstawowe informacje o modelach matematycznych.

enzym	α -amylaza	
	natywny	immobilizowany
model	układ reakcji równoległych	
	$r = r_A + r_B$ $r_A = -dc_A/dt = k_A \cdot c_E \cdot c_A$ $r_B = -dc_B/dt = k_B \cdot c_E \cdot c_B$	
równania użyte w estymacji	$c = c_A + c_B = c_0 \cdot Y \cdot e^{\left(\frac{k_A \cdot c_{E0}}{k_d} (1 - e^{-k_d \cdot t})\right)} + c_0 \cdot (1 - Y) \cdot e^{\left(\frac{k_B \cdot c_{E0}}{k_d} (1 - e^{-k_d \cdot t})\right)}$	
wartości stałych kinetycznych	$Y = 0,782$ $k_A = 0,1498 \text{ [l/g} \cdot \text{s]}$ $k_B = 0,0123 \text{ [l/g} \cdot \text{s]}$ $k_d = 6,23 \cdot 10^{-5} \text{ [1/s]}$	$Y = 0,825$ $k_A = 4,28 \cdot 10^{-2} \text{ [l/g} \cdot \text{s]}$ $k_B = 8,216 \cdot 10^{-4} \text{ [l/g} \cdot \text{s]}$ $k_d = 3,61 \cdot 10^{-5} \text{ [1/s]}$
błąd względny	20,6 %	23,6 %
współczynnik korelacji	0,9942 zbiór 270 elementów	0,9920 zbiór 220 elementów
zakres stosowalności modelu	$c_E \in (0,0127, 0,046) \text{ g/l}$ $c_S \in (0,24, 26) \text{ g/l}$	$c_E \in (0,008, 0,046) \text{ g/l}$ $c_S \in (0,3, 27) \text{ g/l}$

Tabela cd.

enzym	β -amylaza	
	natywny	immobilizowany
	$r = -\frac{dc_s}{dt} = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{K_M + c_S + \frac{K_M}{K_P} \cdot (c_{S0} - c_S)}$	
równania użyte w estymacji	$t = \left(\frac{K_M}{k_3 \cdot c_E} + \frac{K_M \cdot c_{S0}}{k_3 \cdot c_E \cdot K_P} \right) \cdot \ln \left(\frac{c_{S0}}{c_S} \right) + \left(\frac{1}{k_3 \cdot c_E} - \frac{K_M}{k_3 \cdot c_E \cdot K_P} \right) \cdot (c_{S0} - c_S)$	
wartości stałych kinetycznych	$k_3 = 0,056 \text{ [1/s]}$ $K_M = 1,97 \text{ [g/l]}$ $K_P = 2,42 \text{ [g/l]}$	$k_3 = 0,0197 \text{ [1/s]}$ $K_M = 1,30 \text{ [g/l]}$ $K_P = 0,30 \text{ [g/l]}$
błąd względny	24,5 %	27,2 %
współczynnik korelacji	0,9790 zbiór 400 elementów	0,9714 zbiór 150 elementów
zakres stosowalności modelu	$c_E \in (0,05, 0,4) \text{ g/l}$ $c_S \in (0,27, 22) \text{ g/l}$	$c_E \in (0,03, 0,3) \text{ g/l}$ $c_S \in (2, 23) \text{ g/l}$

Tabela cd.

enzym	glukoamylaza	
	natywny	immobilizowany
model	układ reakcji następujących $r = \begin{cases} r_A & \text{dla } \alpha \leq 0,33 \\ r_B & \text{dla } \alpha > 0,33 \end{cases}$	
	$r_A = -\frac{dc_A}{dt} = k_A \cdot c_E$ $r_B = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_B}{K_M + c_B + \frac{K_M}{K_P} \cdot (c_0 - c_B)}$	
równania użyte w estymacji	$t = t_A \text{ dla } \alpha \leq 0,33$ $t = t_A + t_B \text{ dla } \alpha > 0,33$	
wartości stałych kinetycznych	$k_A = 1,67 \cdot 10^{-3} \text{ [1/s]}$ $k_3 = 46 \text{ [1/s]}$ $K_M = 4,01 \cdot 10^4 \text{ [g/l]}$ $K_P = 0,734 \text{ [g/l]}$	$k_A = 1,33 \cdot 10^{-3} \text{ [1/s]}$ $k_3 = 12,55 \text{ [1/s]}$ $K_M = 3489 \text{ [g/l]}$ $K_P = 0,458 \text{ [g/l]}$
błąd względny	21,7 %	28,7 %
współczynnik korelacji	0,9741 zbiór 180 elementów	0,9781 zbiór 30 elementów
zakres stosowalności modelu	$c_E \in (0,03, 3) \text{ g/l}$ $c_S \in (1, 45) \text{ g/l}$	$c_E \in (0,01, 0,5) \text{ g/l}$ $c_S \in (1, 5) \text{ g/l}$

6.3. Weryfikacja modelu matematycznego

W niniejszej pracy modele matematyczne stworzono na bazie danych otrzymanych z reaktorów okresowych. Do weryfikacji zastosowano reaktory pracujące w sposób ciągły. W tym celu zaprojektowano i zbudowano w skali laboratoryjnej podstawowe typy reaktorów: przepływowy reaktor mieszalnikowy, przepływowy reaktor rurowy (kolumnowy) ze złożem stacjonarnym i przepływowy reaktor fontannowy. Reaktory te pracują w odmiennych warunkach hydrodynamicznych od tych, w których wyznaczono parametry modelu.

Przeprowadzenie weryfikacji w układach reakcyjnych z enzymem natywnym było kosztowne, dlatego zastosowano do badań w reaktorach przepływowych enzym unieruchomiony na ziarnistym nośniku akrylowym. Wykorzystanie preparatów enzymatycznych daje niezaprzeczalne korzyści, m.in.:

- mniejsze zużycie enzymów,
- wydłużenie czasu operacyjnego,
- niezanieczyszczone enzymem produkty reakcji.

Prowadzi to do zmniejszenia nakładów finansowych w reaktorach przepływowych z enzymami immobilizowanymi w porównaniu z kosztami procesu w reaktorach przepływowych z enzymami natywnymi.

Wykazano (rozdziały 6.2.1–6.2.3), że niezależnie od postaci enzymu (natywny, immobilizowany) mechanizm działania enzymów jest taki sam, a zatem taki sam jest również model matematyczny. Sprawdzone zatem modele tylko w reakcjach ciągłych z enzymami immobilizowanymi.

Odporność nośnika na wszelkie uszkodzenia mechaniczne powstałe podczas mieszania jest jedną z najważniejszych właściwości cechujących dobry nośnik. Powinna być ona jednym z kluczowych kryteriów doboru reaktora dla procesów enzymatycznych w skali technicznej. Przed przystąpieniem do zasadniczych reakcji hydrolizy skrobi enzymami amylolitycznymi w warunkach procesu ciągłego, dokonano charakterystyki stosowanego nośnika. Zbadano wpływ czasu i sposobu mieszania na trwałość i aktywność preparatów enzymatycznych użytych w reaktorach przepływowych. Badania przeprowadzono w reaktorach zbiornikowym, rurowym i fontannowym. Głównym celem budowy reaktora fontannowego (od strony procesowej analogicznego z mieszalnikowym) było sprawdzenie wpływu oddziaływań mechanicznych spowodowanych mieszadłem na trwałość i aktywność preparatu enzymatycznego.

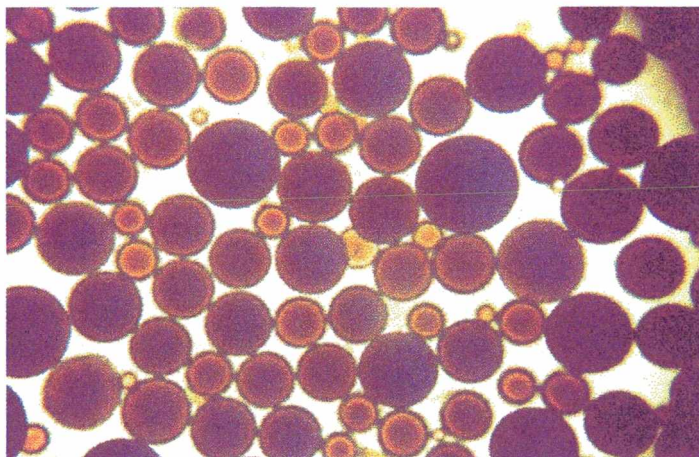
6.3.1. Charakterystyka nośnika

Wykonano pomiary uziarnienia nośnika BA/EGDMA (analizą sitową na sucho oraz laserowym analizatorem uziarnienia). Wyniki zamieszczono w tabeli 6.3.1.1.

Tabela 6.3.1.1. Wyniki analizy granulometrycznej nośnika.

nr sita	wielkość oczka d_p	odsiew Δm_i	względny odsiew $\Delta m_i / m$	suma względnych odsiewów	gęstość klasy ziarnowej q_3
	mm	g	g/g	g/g	1/mm
1	0,77	0,0858	0,0052	0,0052	
2	0,49	0,9658	0,0585	0,0637	0,2088
3	0,30	4,1519	0,2513	0,3150	1,3227
4	0,20	6,3179	0,3824	0,6974	3,8241
5	0,15	2,9609	0,1792	0,8766	3,5844
6	0,088	1,5558	0,0942	0,9708	1,5189
7	0,06	0,4480	0,0271	0,9979	0,9685
8	0	0,0352	0,0021	1,0000	0,0355
suma		16,5212	1,0000		

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że ziarna nośnika mieszczą się w zakresie średnic 10-800 μm . Najliczniejsze frakcje stanowią ziarna o średnicy 200-300 μm (~38%) i 300-490 μm (~25%). Gęstość rozkładu cząstek badanego nośnika ma charakter zbliżony do rozkładu normalnego. Przebadaną próbkę nośnika potraktowano jako punkt odniesienia (wzorzec), z którym porównywano analizy uziarnienia kolejnych pomiarów. Na rys. 6.3.1.1 zamieszczono zdjęcie wzorca uzyskane pod mikroskopem optycznym.

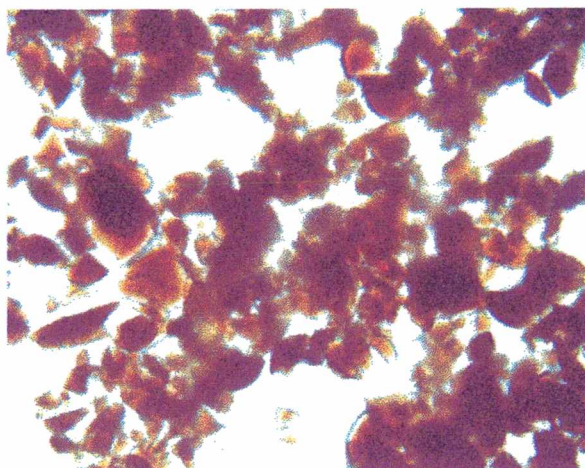


Rys. 6.3.1.1. Obraz wzorca uzyskany pod mikroskopem optycznym.

Następnie badano wpływ stresów mechanicznych i hydromechanicznych na właściwości nośnika i preparatów enzymatycznych zastosowanych w procesie enzymatycznej hydrolizy skrobi. Sprawdzone jak typ reaktora i mieszadła wpływa na strukturę nośnika. Nośnik zawieszony w wodzie mieszano przez 6 godzin w następujących reaktorach:

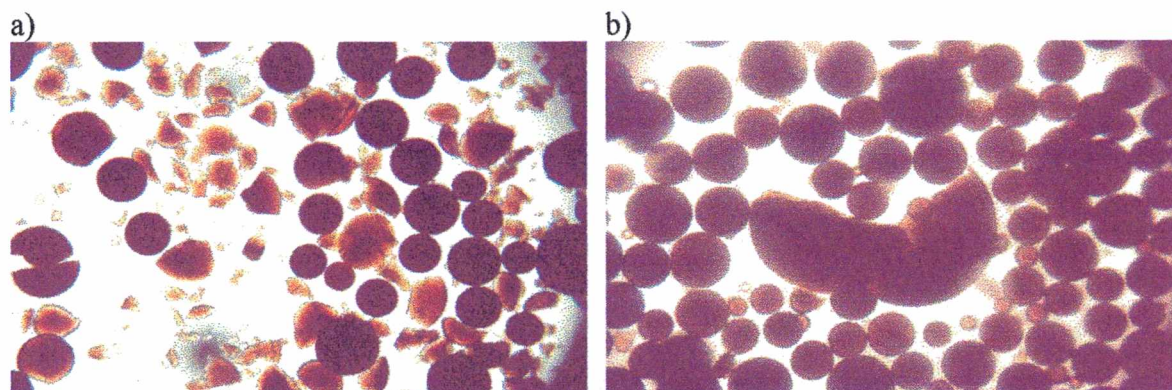
- zbiornikowym z mieszadłem o napędzie magnetycznym,
- zbiornikowym z mieszadłem łopatkowym o napędzie mechanicznym
- fontannowym.

Zaobserwowano duże uszkodzenie nośnika mieszanego w reaktorze z mieszadłem o napędzie magnetycznym (rys. 6.3.1.2). W reaktorze tym mieszadło obracało się tuż przy dnie zbiornika i ziarna nośnika, które dostały się w obszar pomiędzy mieszadłem a dnem zbiornika zostały bardzo mocno „rozbite”, starte.



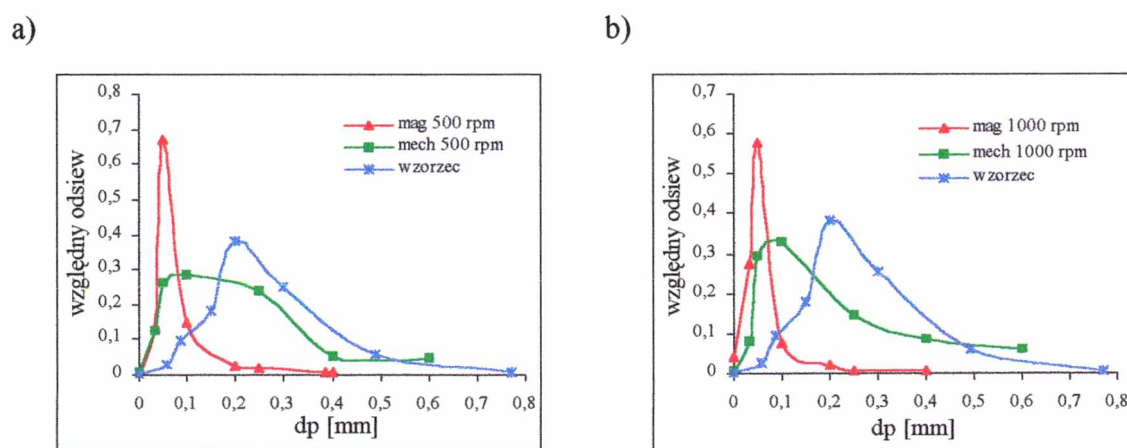
Rys. 6.3.1.2. Zdjęcie nośnika wykonane po 6 godzinach mieszania w reaktorze z mieszadłem o napędzie magnetycznym przy 1000 rpm.

Dużo mniejsze uszkodzenia stwierdzono dla nośnika znajdującego się w reaktorze z mieszadłem o napędzie mechanicznym (łopatki mieszadła usytuowane były pod zwierciadłem cieczy), a prawie śladowe uszkodzenia ziarna zanotowano w reaktorze fontannowym. W obu przypadkach duża ilość ziaren pozostawała nienaruszona. Były to przede wszystkim ziarna o małych i średnich rozmiarach. Zobrazowano to na rys. 6.3.1.3.



Rys. 6.3.1.3. Zdjęcie nośnika wykonane po 6 godzinach mieszania w reaktorze z mieszadłem o napędzie mechanicznym przy 1000 rpm (a), w reaktorze fontannowym (b).

Wyniki analizy granulometrycznej preparatu przedstawiono na rys. 6.3.1.4. Rozkład uziarnienia nośnika z reaktora fontannowego wyglądał praktycznie identycznie jak dla wzorca.

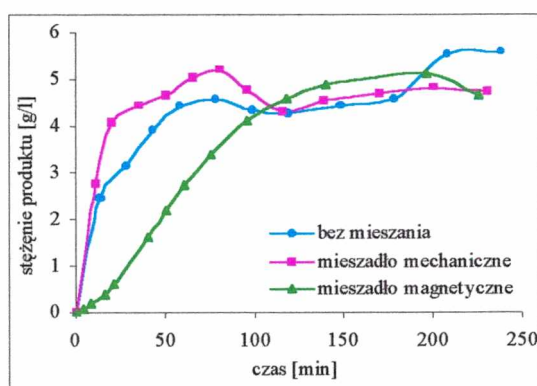


Rys. 6.3.1.4. Zależność względnych odsiewów od d_p dla reaktora z mieszadłem o napędzie magnetycznym i mechanicznym przy 500 rpm (a) i 1000 rpm (b).

Na podstawie przeprowadzonej analizy sitowej nośnika zauważa się różny charakter zmian względnych odsiewów od średnic ziaren nośnika, zależnie od stosowanego typu mieszadła i szybkości jego obrotów (rys. 6.3.1.4). Rozkład względnych odsiewów potwierdza, że mieszadło o napędzie magnetycznym w największym stopniu niszczy

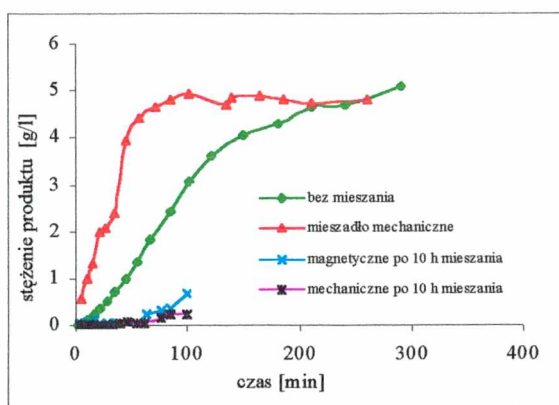
nośnik. Badania przeprowadzono dla dwóch różnych stężeń roztworu skrobi (1% i 5%). Rozkłady klas ziarnowych preparatu enzymatycznego w obu testach wyglądały prawie identycznie. Na podstawie tego stwierdzono, że lepkość roztworu surowca nie wpływa istotnie na efekt niszczenia nośnika podczas mieszania.

Wykazano, że charakter mieszania i szybkość obrotów mieszadła wpływa na niszczenie ziaren nośnika. W wyniku uszkodzenia struktury ziarna zostaje zniszczona warstwa wiążąca enzym z tym nośnikiem. Może się to odbić niekorzystnie na aktywności preparatu enzymatycznego, a tym samym na efektywności całego procesu. Dla potwierdzenia przeprowadzono reakcje hydrolizy 1% roztworu skrobi α -amylazą immobilizowaną na nośniku w reaktorach z mieszadłem o napędzie mechanicznym i magnetycznym, przy 500 i 1000 rpm oraz w reaktorze zbiornikowym bez mieszania (punkt odniesienia). Mieszadło o napędzie magnetyczne uznano za najbardziej „stresogenne” dla preparatu enzym-nośnik (rys. 6.3.1.5).



Rys. 6.3.1.5. Wpływ typu stosowanego mieszadła (500 rpm) na proces hydrolizy skrobi.

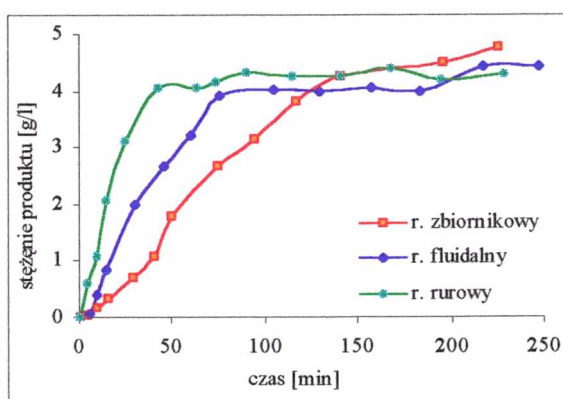
Spadek aktywności enzymu może nastąpić wskutek zmiany pH, temperatury lub zniszczenia preparatu enzymatycznego. Przeprowadzono reakcje hydrolizy skrobi, przy czym w pierwszej reakcji użyto preparat enzymatyczny przechowywany przez 10 godzin w temperaturze pokojowej, w którym stwierdzono duży spadek aktywności (test aktywnościowy), w drugiej reakcji użyto preparat, który wcześniej mieszano przez kilka godzin w reaktorach z mieszadłem mechanicznym i magnetycznym. Wybrano najmniejsze z możliwych obroty mieszadeł. Dane doświadczalne przedstawiono na rys. 6.3.1.6.



Rys. 6.3.1.6. Wpływ czasu mieszania preparatu enzym-nośnik na stabilność aktywności enzymu (i przebieg procesu).

Aktywności enzymów mieszanego przez kilka godzin była bliska zeru. Nieznaczny wzrost stężenia glukozy spowodowany był prawdopodobnie zanieczyszczeniem drobinkami rozbitego nośnika próbek pobieranych do analizy spektrofotometrycznej. Pokazano, że długotrwałe mieszanie preparatu enzymatycznego jest niewskazane.

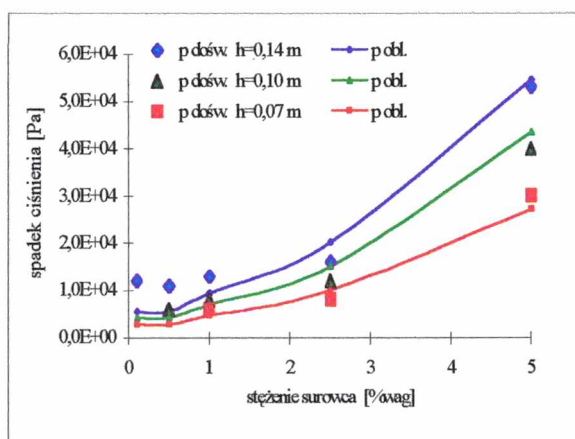
Ponieważ nie tylko mechaniczna stabilność preparatu enzymatycznego, ale także dynamika przepływu decyduje o efektywności procesów, przeprowadzono reakcję rozkładu skrobi enzymem amylolitycznym w reaktorze z klasycznym mieszaniem, w reaktorach: fontannowym i kolumnowym ze złożem nieruchomym. Ze względów ekonomicznych prowadzono reakcje okresowe, z recyrkulacją produktu. Wyniki doświadczeń przedstawiono na rys.6.3.1.7.



Rys. 6.3.1.7. Przebieg reakcji hydrolizy skrobi w różnych typach reaktorów.

W reaktorze fontannowym oraz w reaktorze kolumnowym nośnik nie podlega procesowi niszczenia. Straty aktywności preparatów enzymatycznych w tych reaktorach mogą nastąpić jedynie na drodze naturalnej inaktywacji enzymu. Zgodnie z oczekiwaniami

najlepsze rezultaty otrzymano dla reaktora rurowego. W reaktorze tego typu siła napędowa jest duża, co w konsekwencji daje wysoki stopień przereagowania substratu. Zaletą reaktora rurowego jest to, że prowadzi się w nim reakcje z udziałem enzymu immobilizowanego o stężeniu najwyższym z możliwych. Niestety złożone nieruchome powoduje powstanie dużych oporów przepływu, zwłaszcza bardziej stężonych roztworów skrobi.



Rys. 6.3.1.8. Wykres zmian spadku ciśnienia na złożu w zależności od stężeń roztworu skrobi dla największej prędkości przepływu (0,0035 m/s).

Zbadano zależność spadku ciśnienia na złożu od prędkości przepływu dla trzech wysokości wypełnienia 0,14, 0,10 i 0,07 [m] i różnych stężeń roztworu wyjściowego (rys. 6.3.1.8). Dane doświadczalne zweryfikowano równaniem Darcy-Weisbacha dla spadku ciśnienia płynu podczas przepływu przez złożę. Przepływ miał charakter laminarny.

W reaktorze o całkowitym wymieszaniu stężenie substratu jest takie samo jak w wypływie z reaktora. Zatem siła napędowa jest bardzo mała, a proces powolny. Dodatkowo w przypadku reaktorów zbiornikowych z mieszadłem mechanicznym może nastąpić utrata zdolności katalitycznych enzymu na skutek uszkodzenia preparatu podczas mieszania.

W tej sytuacji wydaje się, że reaktor fontannowy jest idealnym rozwiązaniem, wymaga tylko precyzyjnej kontroli szybkości przepływu cieczy przez aparat. Reaktor ten jest szczególnym przypadkiem reaktora przepływowego z idealnym przemieszaniem. Gdy medium wywołującym fluidyzację jest ciecz, ziarna rozkładają się równomiernie, tworząc jednorodną mieszaninę ciała stałego i cieczy. Odpowiada to warunkom panującym

w przepływowym reaktorze zbiornikowym. Stwierdzono, że gdy dolną część aparatu fluidalnego zbuduje się w postaci stożka, to wytworzy się złożo fontannowe¹⁴⁰.

Aparaty z rurą wznoszącą są modyfikacją klasycznych aparatów fontannowych. Centralna rura wznosząca zwiększa stabilność procesu, jest on łatwiejszy do przeprowadzenia i regulacji¹⁴¹. Układ fontannowy cechuje się odmiennymi właściwościami hydrodynamicznymi niż złożo fluidalne, bo poszczególne parametry nie zależą jedynie od własności płynu i ciała stałego, ale także od konstrukcji aparatu oraz wysokości i szerokości złoża¹⁴². Inne będą zatem warunki pracy w aparacie stożkowym, inne w stożkowo-cylindrycznym; inne dla małej i dużej ilości złoża.

W przeprowadzonych badaniach czynnikiem powodującym ekspansję złoża był roztwór skrobi. Nie stosowano gazu, z uwagi na możliwość flotacji nośnika, ani innych cieczy, ze względu na trudny rozdział takiej mieszaniny oraz możliwość zmiany warunków panujących w reaktorze. Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w reaktorze przepływowym ze złożem fluidalno-fontannowym zaobserwowano, że przy objętości katalizatora większej niż 15% objętości mieszaniny reakcyjnej i stężeniach skrobi wyższych niż 2,5% wag. nie występuje klasyczne fontannowanie złoża. Zauważono również, że w większości przypadków cyrkulacja złoża następuje przy objętościowym natężeniu przepływu około 0,033 [m³/h] (liniowa prędkość przepływu cieczy liczona na przekrój poprzeczny aparatu wynosi około 6,5 [m/h]). Obliczona wartość minimalnej prędkości cyrkulacji wynosi 4,75 [m/h] i jest zbliżona do doświadczalnej. W obliczeniach użyto zaczerpniętych z literatury wartości gęstości i lepkości roztworu skrobi.

6.3.2. Hydroliza skrobi z udziałem α -, β - i glukoamylazy w reaktorach ciągłych

Zbudowanie reaktora z idealnym przepływem tłokowym, bez mieszania wzdłużnego, jest praktycznie niemożliwe. Niemożliwe więc wydaje się eksperymentalne weryfikowanie modelu matematycznego takiego reaktora. Istnieją jedynie pewne jego przybliżenia. W przypadku reaktorów zbiornikowych całkowite, idealne wymieszanie jest warunkiem

¹⁴⁰ K.B.Mathur, P.E.Gishler, *A technique for contacting gases with coarse solid particle*, AIChE Journal, 2, 1955

¹⁴¹ R.Muir, F.Berruti, L.A.Behie, *Solids circulation in spouted and spout-fluid beds with draft tubes*, Chem. Eng. Comm., 88, 1990

¹⁴² W.Ludwig, *Model matematyczny przepływu dwufazowego gaz-ciało stałe w aparacie z rurą wznoszącą*, praca doktorska, Politechnika Wrocławska, Wrocław, 1997

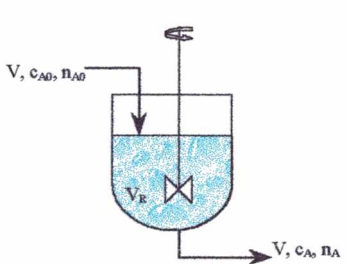
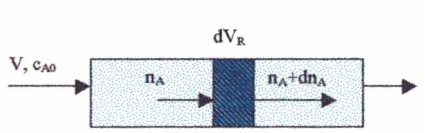
koniecznym by móc interpretować wyniki doświadczeń w oparciu o model matematyczny reaktora z idealnym wymieszaniem.

Wyprowadzając równania bilansowe reaktorów przepływowych założono, że:

- (a) w reaktorze rurowym ze złożem nieruchomym nie występuje przemieszanie wzdłużne, ilość preparatu enzymatycznego nie ulega zmianie w czasie (tzn. preparat nie jest ani dostarczany, ani odbierany w trakcie procesu),
- (b) w reaktorze zbiornikowym jest doskonałe przemieszanie, ilość preparatu jest niezmienna w czasie.

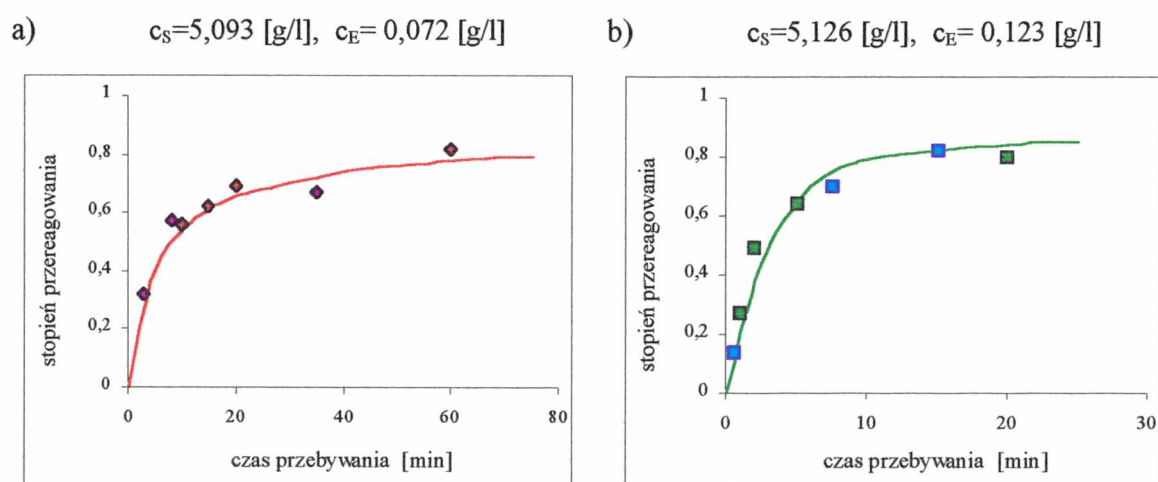
Założenie pseudohomogeniczności złoża pozwala na wykorzystanie modeli matematycznych (bilansów masy) reaktorów homogenicznych. Dodatkowo przyjęto, że układ reakcyjny jest jednorodny i biegnie w obszarze kinetycznym.

Równania bilansowe reaktorów

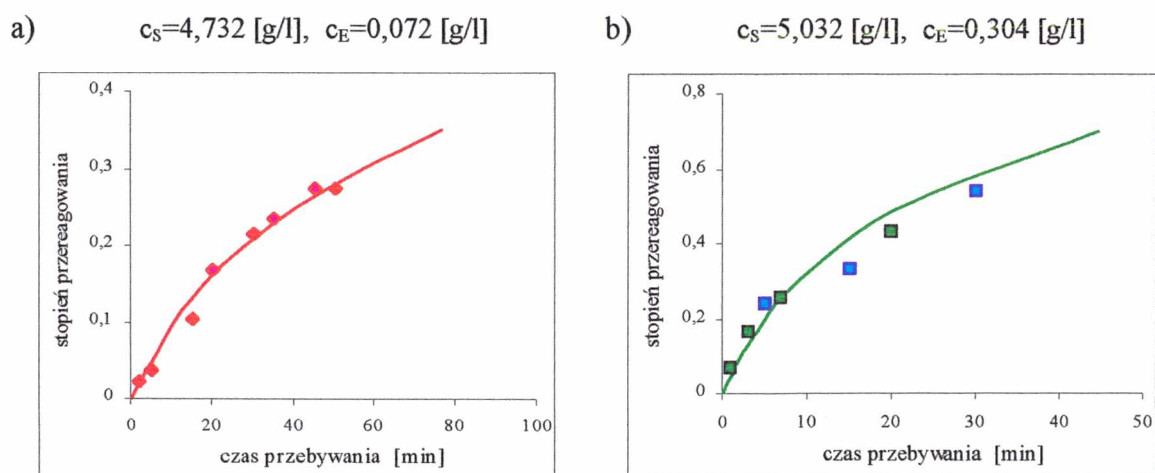
reaktor zbiornikowy	reaktor rurowy
 $\dot{n}_{A0} = \dot{n}_A + (-r_A) \cdot V_R$ ostatecznie uzyskuje się równanie: $\frac{V_R}{\dot{V}} = \frac{c_{A0} - c_A}{(-r_A)} \cong \tau$	 $\dot{n}_A = \dot{n}_A + d\dot{n}_A + (-r_A) \cdot dV_R$ ostatecznie uzyskuje się równanie: $\frac{V_R}{\dot{V}} = -\int \frac{dc_A}{(-r_A)} \cong \tau$

Przeprowadzono hydrolizę skrobi ziemniaczanej z udziałem α -, β - i glukoamylazy unieruchomionych na nośniku w procesie ciągłym. Reakcje prowadzono w przepływowym reaktorze zbiornikowym z mieszadłem łopatkowym i reaktorze kolumnowym.

Przebiegi zmian uzyskanych doświadczalnie stopni przereagowania od czasu przebywania, w porównaniu z wartościami modelowymi, przedstawiono na rys. 6.3.2.1, 6.3.2.2 i 6.3.2.3. Na wykresach oznaczonych literą a) pokazano wyniki otrzymane w przepływowych reaktorach zbiornikowych, na wykresach b) wyniki z reaktorów rurowych ze złożem stacjonarnym. Prezentowane wykresy są graficzną weryfikacją równań kinetycznych (tabela 6.2.4.1) opisujących proces hydrolizy skrobi ziemniaczanej z udziałem α -, β - i glukoamylazy.

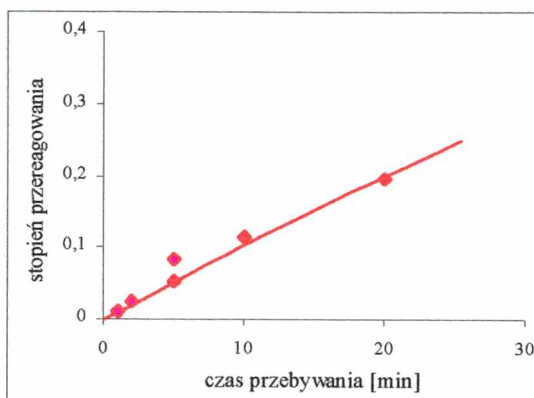


Rys. 6.3.2.1. Wykres zależności stopnia przereagowania od czasu przebywania dla układu z α -amylazą. Porównanie stopni przereagowania doświadczalnych (♦/■) z modelowymi (—/—).

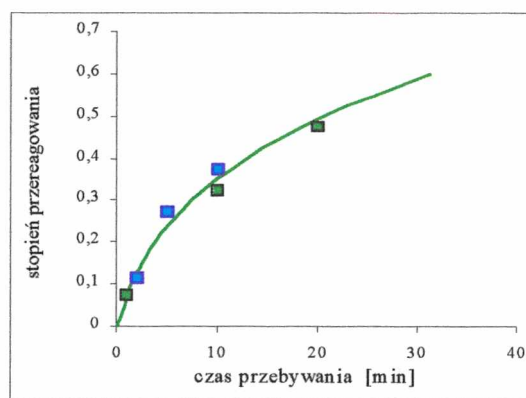


Rys. 6.3.2.2. Wykres zależności stopnia przereagowania od czasu przebywania dla układu z β -amylazą. Porównanie stopni przereagowania doświadczalnych (♦/■) z modelowymi (—/—).

a) $c_S=4,725$ [g/l], $c_E=0,126$ [g/l]



b) $c_S=5,081$ [g/l], $c_E=0,522$ [g/l]



Rys. 6.3.2.3. Wykres zależności stopnia przereagowania od czasu przebywania dla układu z glukoamylazą. Porównanie stopni przereagowania doświadczalnych (♦/■) z modelowymi (—/—).

Przeprowadzono również hydrolizę skrobi α -amylazą w reaktorze fontannowym. Wybrano takie natężenie przepływu cieczy przez aparat, by nastąpiło fontannowanie złoża. Niestety wówczas otrzymuje się krótkie czasy przebywania i niewielkie stopnie przereagowania. Uzyskane dane przedstawiono w tabeli 6.3.2.1.

Tabela 6.3.2.1. Hydroliza skrobi w reaktorze fontannowym.

	próba 1	próba 2
c_{S0} [g/l]	2,5	2,5
c_E [g/l]	0,047	0,047
τ [min]	5	2
$\alpha_{\text{dośw.}}$	0,048	0,015
$\alpha_{\text{obl.}}$	0,051	0,014
błąd względny [%]	6,25	7,14

Zaniechano dalszych prób ze względów ekonomicznych. Reaktor należałoby obciążać odpowiednią ilością fazy stałej (biokatalizatora), a to z uwagi na wysoką cenę enzymów nie było możliwe.

Uzyskano dobrą zgodność przebiegu eksperymentu z modelem. Błąd względny (załącznik 2), pomiędzy stopniem przereagowania doświadczalnym i obliczeniowym, mieści się dla α -amylazy w przedziale 2÷9%. Dla β -amylazy również uzyskano

zadowalającą zgodność wyników z modelem. Błąd względny wynosi $2\div 13\%$. Dla glukoamylazy względny błąd wynosi $3\div 14\%$.

Wartości stopnia przereagowania uzyskane w eksperymentach odpowiadają wartościom obliczonym na podstawie modelu. Pozwala to stwierdzić zgodność modeli matematycznych i procesów opisanych tymi równaniami. Występujące rozbieżności mogą być przypadkowe lub spowodowane chwilowymi zakłóceniami występującymi w czasie pracy reaktorów.

7. Podsumowanie

Skrobia jest surowcem powszechnie wykorzystywanym w wielu gałęziach przemysłu. Jest polimerem naturalnym pochodzenia roślinnego, a więc surowcem odnawialnym i łatwym do pozyskania.

W prezentowanej pracy rozpatrywano kinetykę enzymatycznej hydrolizy biopolimerów. Jako układ doświadczalny wybrano reakcję hydrolizy skrobi ziemniaczanej z udziałem trzech enzymów amylolitycznych: α -, β - i glukoamylazy. Stosowano enzymy w postaci natywnej i immobilizowane na nośniku akrylowym.

Głównym celem pracy było opracowanie modelu kinetycznego oraz matematycznego rozpatrywanych reakcji, identyfikacja parametrów równań i końcowa weryfikacja.

W oparciu o dane eksperymentalne oraz wiedzę z zakresu budowy skrobi ziemniaczanej i właściwości α -, β - i glukoamylazy, opracowano mechanizm procesu enzymatycznej hydrolizy biopolimeru, wyróżniający się „niekonwencjonalnym” rozpatrywaniem substratu. Zaproponowano, że substratami w analizowanych reakcjach będą wiązania glikozydowe ulegające hydrolizie.

Analizując dane doświadczalne otrzymane z reaktorów okresowych, zaobserwowano dwa obszary przebiegu procesu hydrolizy skrobi przez α - i glukoamylazę. Na podstawie tego przyjęto, że występują dwie frakcje substratu: substraty o wysokim powinowactwie chemicznym i korzystnej lokalizacji przestrzennej w łańcuchach biopolimerów (frakcja A) oraz substraty o niskiej podatności na atak enzymu, czyli niekorzystnej konfiguracji (frakcja B). Następnie przyporządkowano odpowiednie wiązania do frakcji A i B dla wszystkich rozpatrywanych układów reakcyjnych.

Dodatkowo przyjęto, że α -amylaza hydrolizuje obie frakcje jednocześnie, a glukoamylaza, najpierw wiązania frakcji A, następnie frakcji B. Założenia te wynikają z charakteru działania stosowanych enzymów. W przypadku β -amylazy zacierają się różnice między frakcjami. Przyjęto zatem, że występuje tylko jedna frakcja substratu.

Stwierdzono, że dyfuzyjne opory transportu masy podczas reakcji z enzymami immobilizowanymi są do pominięcia. Reakcje będą w obszarze kinetycznym, układ może być traktowany jako pseudohomogeniczny.

Na podstawie wyników z reaktorów okresowych i założeń modelu kinetycznego, dobrano równania, które dobrze odzwierciedliły mechanizm zachodzącego procesu.

Hydrolizę skrobi z udziałem α -amylazy opisano równaniami I rzędu względem każdego substratu, z udziałem β -amylazy równaniem Michaelis-Menten z inhibicją produktem, z udziałem glukoamylazy równaniem zerowego rzędu względem substratu dla stopnia przereagowania $< 0,33$ i równaniem Michaelis-Menten z inhibicją produktem dla stopnia przereagowania $> 0,33$. Wyznaczono wartości parametrów stosowanych równań.

Przyjęto, że forma enzymu (natywny, immobilizowany) nie wpływa na mechanizm reakcji. Uzyskane wartości parametrów dla enzymu natywnego i immobilizowanego potwierdzają to założenie. Bardziej złożony po immobilizacji układ przestrzenny enzymu zmniejszył szybkość reakcji frakcji A, a szczególnie mocno szybkość hydrolizy frakcji B. W wyniku związania kowalencyjnego enzymu z nośnikiem utrudniony jest dostęp do centrum aktywnego. Obrazujące to stałe szybkości reakcji powinny zatem ulec zmniejszeniu, co ma miejsce. Uzyskane wartości stałych K_P (dla β - i glukoamylazy) wskazują na silny wpływ inhibicji produktem reakcji. Trudno wyjaśnić zmniejszenie się stałej Michaelis dla enzymów immobilizowanych. Uzyskane wartości stałej K_M mieszczą się w granicach błędu i są do przyjęcia.

Uzyskano wysokie wartości współczynników korelacji. Świadczą one o prawie pełnej korelacji danych obliczonych z danymi eksperymentalnymi.

Stwierdzono, że najbardziej „stresogenne” dla preparatu enzymatycznego warunki panują w reaktorach zbiornikowych z mieszadłem. Należy zaliczyć to do wad reaktorów mieszalnikowych. Zaobserwowano dużą stabilność preparatu w reaktorze rurowym ze złożem nieruchomym. Jednak z uwagi na opory przepływu ma on ograniczone zastosowanie w przemyśle skrobiowym. Jako alternatywny zaproponowano reaktor fontannowy. Zapewnia on pełne przemieszanie, co decyduje nie tylko o wielkości powierzchni kontaktu reagentów, ale również o likwidowaniu gradientów stężeń hamujących proces (jak w przypadku β - i glukoamylazy). Jest to niezmiernie ważne i czyni ten reaktor szczególnie korzystnym (interesującym) w aplikacjach.

Przeprowadzono proces hydrolizy skrobi przez α -, β - i glukoamylazę w przepływowych reaktorach: zbiornikowym, fontannowym i rurowym. Zastosowano w nich enzym immobilizowany. Pozwoliło to zweryfikować modele matematyczne. Uzyskano bardzo dobrą zgodność danych doświadczalnych z procesów ciągłych z modelem. Błąd pomiędzy stopniem przereagowania doświadczalnym a modelowym był w granicach kilkunastu procent.

Z przeprowadzonych badań i analiz stałych kinetycznych wynika, że przyjęty model kinetyczny reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej przez enzymy amylolityczne (α -, β - i glukoamylazę) jest poprawny, a przedstawione równania dobrze dobrane.

Przedstawione w niniejszej pracy rozważania pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Ø budowanie modelu kinetycznego w oparciu o substrat rozumiany jako cząsteczki skrobi jest dyskusyjne,
- Ø przyjęcie, że substratem jest wiązanie glikozydowe zawarte w cząsteczkach amylozy i amylopektyny jest trafne,
- Ø układ multisubstratowy (jakim jest skrobia) można z dobrym przybliżeniem opisać skończoną, niewielką ilością frakcji,
- Ø dobrym kryterium podziału substratu na frakcje może być cecha charakteryzująca wiązania w biopolimerze – podatność,
- Ø immobilizacja badanych enzymów nie zmienia mechanizmu ich działania,
- Ø opracowany model kinetyczny sprawdził się dla trzech różnych układów reakcyjnych, może zatem być wskazówką podczas dyskusji procesów enzymatycznej hydrolizy innych biopolimerów.

8. Literatura

Literaturę przedstawiono w formie przypisów dolnych. Liczy ona 93 pozycje.

9. Spis oznaczeń

Część literaturowa

A – typ łańcucha, frakcja

B – typ łańcucha, frakcja

DE – ekwiwalent dekstrozowy

E_0 , E – stężenie enzymu, początkowe i chwilowe

ES – stężenie kompleksu aktywnego

G_0 , G – stężenie produktu, początkowe i chwilowe

G_1 , G_2 , G_i – stężenie produktu (cukry złożone z 1, 2, i cząsteczek glukozy)

G_a , G_b – stężenie produktu powstałego z frakcji a i b

k_d – stała inaktywacji enzymu

k_1 – stała szybkości reakcji tworzenia kompleksu ES

k_2 – stała szybkości reakcji rozpadu kompleksu ES na E i S

k_3 – stała szybkości reakcji rozpadu kompleksu ES na E i P

K_I – stała inhibicji

$K_{I,B}$ – stała inhibicji łańcuchami rozgałęzionymi

$K_{I,L}$ – stała inhibicji łańcuchami liniowymi

K_M – stała Michaelis

$K_{M,a}$ – stała Michaelis dla frakcji a

$K_{M,b}$ – stała Michaelis dla frakcji b

$K_{M,B}$ – stała Michaelis dla łańcuchów rozgałęzionych

$K_{M,C}$ – stała Michaelis dla klastrów

$K_{M,L}$ – stała Michaelis dla łańcuchów liniowych

K_P – stała inhibicji produktem

K_S – stała inhibicji substratem

P – stężenie produktu

r- szybkość reakcji

r_{max} – maksymalna szybkość reakcji

S_0, S – stężenie substratu, początkowe i chwilowe
 S_B – stężenie łańcuchów rozgałęzionych
 S_C – stężenie klastrów
 S_L – stężenie łańcuchów liniowych
 t - czas reakcji

Cześć eksperymentalna

c_A – stężenie frakcji A, g/l
 c_{A0} – stężenie początkowe frakcji A, g/l
 c_B – stężenie frakcji B, g/l
 c_{B0} – stężenie początkowe frakcji B, g/l
 c_E – stężenie enzymu, g/l
 c_{E0} – stężenie początkowe enzymu, g/l
 $c_{E,aktyw}$ – stężenie enzymu aktywnego, g/l
 $c_{E,nieaktyw}$ – stężenie enzymu nieaktywnego, g/l
 c_I – stężenie inhibitora, g/l
 c_S – stężenie substratu, g/l
 c_{S0}, c_0 – stężenie początkowe substratu, g/l
 $c_{S,obl}$ – stężenie substratu obliczone, g/l
 d_p – średnica oczek sita, mm
 k – stała szybkości reakcji, 1/s
 k_A – stała szybkości reakcji dla frakcji A, 1/g·s
 k_B – stała szybkości reakcji dla frakcji B, 1/g·s
 k_d – stała inaktywacji enzymu, 1/s
 $k_{3,A}$ – stała szybkości reakcji tworzenia kompleksu AE
 $k_{3,B}$ – stała szybkości reakcji tworzenia kompleksu BE
 k_3 – stała szybkości reakcji, 1/s
 K_I – stała inhibicji, g/l
 K_M – stała Michaelis, g/l
 $K_{M,A}$ – stała Michaelis dla frakcji A, g/l
 $K_{M,B}$ – stała Michaelis dla frakcji B, g/l
 K_P – stała inhibicji produktem, g/l
 m_i – masa próbki nośnika, g
 r – szybkość reakcji, g/l min lub g/l s
 r_A – szybkość reakcji hydrolizy frakcji A, g/l·s
 r_B – szybkość reakcji hydrolizy frakcji B, g/l·s

t – czas reakcji, s lub min

Y – udziały frakcji

α - stopień przereagowania

ξ - współczynnik podatności

τ - czas przebywania, min

Definicja

DE – ekwiwalent dekstrozowy; oznacza stopień hydrolizy skrobi; wyrażany jest przez ilości cukrów redukujących (zwykle równoważników glukozy), przypadających na jednostkę suchej masy produktów. Przyjmuje się, że dla skrobi wartość $DE \cong 0$, a po pełnej hydrolizie do glukozy $DE \cong 100$.

Wzory

$$\varepsilon = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{y_{\text{exp},i} - y_{\text{obl},i}}{y_{\text{exp},i}} \right|$$

średni absolutny błąd
względny

$$\Delta p = \lambda \cdot \frac{H}{d_s} \cdot \frac{w^2}{2} \cdot \rho$$

równanie
Darcy-Weisbacha

$$\lambda = \frac{150}{\text{Re}}$$

współczynnik oporu

$$\text{Re} = \frac{w \cdot d \cdot \rho}{\eta}$$

liczba Reynoldsa

$$\text{Re}_{\text{cyr}} = 0,0137 \cdot \left(\varphi \cdot \frac{V_R}{V_0} \right)^{0,411} \cdot \text{Ar}^{0,714} \cdot \left(\frac{D_b}{d_0} \right)^{-0,554} \cdot \left(\frac{h_r}{D_c} \right)^{0,174} \cdot \theta^{0,8}$$

minimalna prędkość
cyrkulacji[©]

$$\text{Ar} = \frac{d_{\text{cs}}^3 \cdot (\rho_{\text{cs}} - \rho_p) \cdot g \cdot \rho_p}{\eta^2}$$

liczba Archimedesesa

[©] oznaczenia jak w: W.Ludwig, praca doktorska, op.cit.

gdzie:

Δp – spadek ciśnienia na złożu, Pa

H – wysokość złoża, m

d_s – średnica Sautera, m

w – liniowa prędkość przepływu płynu, m/s lub m/h

ρ, ρ_p - gęstość płynu, kg/m^3

d – średnica aparatu, m

η - lepkość płynu, Pa·s

d_{cs} – średnica ziarna, m

g – przyspieszenie ziemskie, m/s^2

10. Załączniki

10.1. Załącznik 1

W rozdziale tym zamieszczono (w formie tabel) wyniki reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z udziałem:

- ☉ α -amylazy natywnej - Tab. AN, α -amylazy immobilizowanej - Tab. AI
- ☉ β -amylazy natywnej - Tab. BN, β -amylazy immobilizowanej - Tab. BI
- ☉ glukoamylazy natywnej - Tab. GN, glukoamylazy immobilizowanej - Tab. GI

przeprowadzonych w reaktorach okresowych.



Wyniki pomiarów kinetyki reakcji hydrolizy skrobi przeprowadzonej z udziałem α -amylazy natywnej

Tab. AN 1

E= 0,023 [mg/ml] So= 20,612 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,23	0,338
0,53	0,879
0,88	1,588
1,20	2,133
1,95	3,470
3,10	5,290
5,00	7,421
7,71	9,578
10,06	11,328
14,91	13,468
19,95	14,508
30,00	16,428
40,08	16,688
50,00	17,188
59,61	17,428
83,00	18,226
105,00	19,072
120,00	19,212
161,00	19,232

Tab. AN 2

E= 0,023 [mg/ml] So= 10,713 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,32	0,342
0,68	0,888
0,93	1,299
1,25	1,814
2,11	2,945
2,98	3,859
5,05	5,286
7,11	6,406
9,98	7,236
15,25	7,973
20,08	8,329
39,83	8,532
60,00	8,688
75,33	9,388
90,00	9,788
105,50	10,056
135,00	10,168
165,00	10,308

Tab. AN 3

E= 0,023 [mg/ml] So= 5,893 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,35	0,144
0,48	0,314
0,98	0,634
1,33	0,974
2,15	1,574
3,06	2,154
5,26	2,944
7,25	3,464
10,08	3,854
14,91	4,124
20,25	4,584
30,08	4,654
40,25	4,884
50,83	5,004
77,50	5,354
90,16	5,454
150,00	5,694

Tab. AN 4

E= 0,023 [mg/ml] So= 2,527 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,31	0,175
0,68	0,329
1,06	0,477
1,36	0,591
2,00	0,817
3,00	1,061
4,00	1,245
5,00	1,400
7,00	1,603
10,00	1,837
15,21	2,051
20,31	2,191
25,00	2,245
29,83	2,275
40,00	2,320
51,00	2,335
75,33	2,381
90,00	2,431

Tab. AN 5

E= 0,023 [mg/ml] So= 1,249 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,23	0,141
0,63	0,264
1,01	0,366
1,40	0,449
2,00	0,545
3,00	0,605
3,91	0,712
5,00	0,770
7,00	0,851
9,00	0,941
15,00	1,045
20,00	1,081
30,00	1,121
40,00	1,157

Tab. AN 6

E= 0,0455 [mg/ml] So= 19,501 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,27	2,794
0,53	4,116
0,88	5,584
1,35	7,074
2,00	8,554
3,08	10,284
5,00	12,374
7,00	13,824
15,00	16,294
20,00	16,864
30,00	17,619
50,00	18,394
60,00	18,464
75,00	18,884
90,00	19,096

Tab. AN 7

E= 0,0455 [mg/ml] So= 11,976 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,35	1,454
0,67	2,624
0,97	3,449
1,23	4,144
2,13	5,924
3,02	7,074
5,00	8,514
7,00	9,214
10,17	9,464
15,25	9,714
20,08	9,954
25,00	10,234
33,17	10,524
65,17	11,514
81,00	11,594
95,67	11,604

Tab. AN 8

E= 0,0455 [mg/ml] So= 5,126 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,110
0,55	0,684
0,82	1,054
1,22	1,534
2,00	2,254
3,00	2,834
4,00	3,314
5,00	3,574
7,00	4,044
10,00	4,154
15,00	4,434
20,00	4,634
25,00	4,764
50,00	5,014

Tab. AN 9

E= 0,046 [mg/ml] So= 2,582 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,33	0,581
0,61	0,855
0,92	1,100
1,22	1,307
2,00	1,547
3,00	1,835
4,00	1,991
5,00	2,051
7,08	2,127
10,00	2,147
15,00	2,203
20,17	2,243
33,00	2,331
45,00	2,395

Tab. AN 10

E= 0,046 [mg/ml] So= 1,130 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,189
0,58	0,334
0,90	0,444
1,21	0,519
2,00	0,655
3,00	0,753
4,00	0,836
5,00	0,885
7,00	0,930
10,00	0,976
13,00	1,011
15,83	1,041
20,00	1,062

Tab. AN 11

E= 0,046 [mg/ml] So= 0,240 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,27	0,052
0,55	0,078
0,83	0,093
1,13	0,106
2,00	0,139
3,17	0,148
4,00	0,172
5,00	0,181
6,50	0,193
8,00	0,197
10,00	0,203
15,00	0,226

Tab. AN 12

E= 0,0026 [mg/ml] So= 1,054 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,17	0,033
3,00	0,124
8,08	0,329
12,00	0,440
20,00	0,584
30,75	0,654
47,50	0,759
65,00	0,847
91,50	0,888
120,00	0,929
153,67	0,973
243,00	0,974

Tab. AN 13

E= 0,0123 [mg/ml] So= 2,874 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,00	1,525
2,00	1,979
3,00	2,097
5,00	2,209
10,00	2,309
15,00	2,409
30,00	2,469
43,00	2,517
80,00	2,704
100,00	2,701
120,25	2,698
150,00	2,799

Tab. AN 14

E= 0,0127 [mg/ml] So= 25,676 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,80	1,344
1,25	1,964
1,57	2,774
1,97	3,444
2,62	4,484
3,12	5,694
5,02	8,554
7,03	10,864
10,00	14,104
15,02	16,794
20,00	18,530
25,00	20,284
35,00	21,394
40,00	21,420
47,83	21,754
70,25	22,214
88,00	23,124
116,50	23,644
150,00	24,114
180,00	24,274
243,00	24,996

Tab. AN 15

E= 0,0127 [mg/ml] So= 15,050 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,27	0,174
0,58	0,624
0,85	1,244
1,20	1,804
3,00	4,334
5,00	6,484
10,00	9,114
15,42	10,274
20,00	10,764
30,00	11,644
45,00	12,124
60,50	12,494
90,00	12,874
165,00	13,564
284,00	14,006
301,00	14,276

Tab. AN 16

E= 0,0127 [mg/ml] So= 7,226 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,35	0,144
0,62	0,504
0,95	0,924
1,23	1,294
3,00	2,964
5,00	4,094
10,00	5,044
17,00	5,524
20,08	5,704
32,25	6,194
44,75	6,434
60,17	6,526
90,00	6,566
120,00	6,606
145,50	6,856
332,00	7,226

Wyniki pomiarów kinetyki reakcji hydrolizy skrobi przeprowadzonej z udziałem α -amylazy immobilizowanej

Tab. AI 1

E= 0,046 [mg/ml] So= 26,687 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,83	1,274
1,75	2,264
2,58	3,584
3,25	3,784
5,08	7,984
7,25	10,174
10,50	15,514
15,00	17,004
20,00	19,394
25,10	20,134
40,00	20,924
51,20	21,574
60,00	22,444
70,16	21,574
86,00	23,174
105,00	22,574
125,00	23,764
180,00	23,624

Tab. AI 2

E= 0,046 [mg/ml] So= 16,374 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,33	0,454
0,91	1,114
1,50	1,884
2,00	2,634
3,00	3,784
4,58	5,879
6,50	7,864
13,25	10,584
15,16	11,254
20,50	11,994
25,16	12,734
30,16	12,514
40,00	12,484
50,00	13,354
61,00	13,414
75,00	13,954
124,00	13,914

Tab. AI 3

E= 0,046 [mg/ml] So= 7,534 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,41	0,579
1,16	0,944
1,61	1,314
2,13	1,844
3,00	2,604
4,08	3,374
5,11	3,914
7,41	4,934
10,08	5,604
15,08	6,424
20,00	6,724
30,00	6,874
43,00	6,954
70,00	6,834
95,00	7,444
123,00	7,294

Tab. AI 4

E= 0,046 [mg/ml] So= 3,055 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,33	0,511
0,83	0,829
1,33	1,169
1,92	1,415
2,58	1,697
9,33	2,521
15,00	2,701
20,00	2,741
30,00	2,883
40,00	2,971
87,00	3,025

Tab. AI 5

E= 0,046 [mg/ml] So= 1,658 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,33	0,371
0,83	0,535
1,33	0,663
2,16	0,851
3,00	0,978
5,00	1,161
7,50	1,258
10,16	1,325
16,08	1,424
20,00	1,451
30,00	1,485
45,00	1,525
60,00	1,548

Tab. AI 6

E= 0,046 [mg/ml] So= 0,337 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,25	0,090
0,83	0,123
1,41	0,139
2,08	0,160
3,08	0,189
4,16	0,205
5,00	0,214
7,45	0,230
15,05	0,271
20,00	0,257
30,40	0,247
40,06	0,272

Tab. AI 7

E= 0,019 [mg/ml] So= 3,071 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,25	0,001
0,83	0,111
1,50	0,237
2,33	0,437
3,00	0,684
5,00	1,147
8,00	1,675
20,00	2,174
30,00	2,578
40,00	2,691
60,00	2,813
82,00	2,823
100,00	2,955

Tab. AI 8

E= 0,025 [mg/ml] So= 1,785 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,049
0,80	0,132
1,50	0,260
2,21	0,382
3,00	0,485
5,00	0,730
11,30	1,059
15,00	1,158
22,00	1,268
30,35	1,366
40,00	1,407
60,08	1,472
80,00	1,527
99,00	1,488
157,00	1,559
180,00	1,541

Tab. AI 9

E= 0,026 [mg/ml] So= 0,302 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,26	0,006
0,78	0,021
1,38	0,034
2,13	0,049
3,50	0,074
5,00	0,098
7,58	0,126
10,00	0,147
16,50	0,170
25,00	0,202
35,50	0,209
55,00	0,223
90,00	0,261
129,00	0,269

Tab. AI 10

E= 0,008 [mg/ml] So= 3,121 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,00	0,032
2,00	0,100
3,00	0,188
5,00	0,376
7,00	0,574
10,00	0,890
15,00	1,270
20,00	1,572
30,00	1,873
40,00	2,199
50,00	2,337
60,08	2,493
75,00	2,667
90,00	2,733
120,00	2,715
150,00	2,888
180,00	2,934

Tab. AI 11

E= 0,010 [mg/ml] So= 2,955 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,00	0,020
2,08	0,066
3,00	0,067
5,00	0,144
7,50	0,267
10,00	0,435
15,00	0,703
20,00	0,977
30,00	1,382
40,16	1,730
50,00	1,957
70,00	2,072
75,00	2,204
90,00	2,424
105,00	2,486
120,00	2,532
150,00	2,623
180,00	2,657
240,00	2,731
300,00	2,756
360,00	2,730

Tab. AI 12

E= 0,010 [mg/ml] So= 5,710 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
3,16	0,019
5,01	0,126
8,41	0,348
11,00	0,638
15,00	1,163
23,25	2,368
30,50	3,274
41,50	4,355
50,00	4,829
60,00	5,115
75,00	5,662

Tab. AI 13

E= 0,009 [mg/ml] So= 18,305 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,33	0,062
0,95	0,076
1,41	0,095
1,96	0,181
3,00	0,278
5,00	0,642
9,58	1,439
15,00	2,829
21,00	4,343
30,00	7,728
40,00	9,684
50,00	12,494
60,00	14,594
75,16	15,574

Tab. AI 14

E= 0,009 [mg/ml] So= 11,441 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,98	0,008
2,55	8,774
3,36	0,140
5,00	0,150
8,00	0,336
11,75	0,760
15,00	1,390
23,00	2,121
30,00	3,933
40,00	7,880
50,16	9,214
63,00	10,273

Wyniki pomiarów kinetyki reakcji hydrolizy skrobi przeprowadzonej z udziałem β -amylazy natywnej

Tab. BN 1

E= 0,05 [mg/ml] So= 0,3213 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,13	0,002
1,58	0,016
2,17	0,017
2,62	0,025
3,07	0,033
3,62	0,038
4,18	0,054
4,72	0,062
5,32	0,07
5,97	0,081
7,05	0,097
7,77	0,137
9,92	0,165
11,32	0,171
13,22	0,201
15,05	0,217
25,00	0,262
35,00	0,27
52,50	0,311
65,00	0,313
112,50	0,321

Tab. BN 2

E= 0,05 [mg/ml] So= 1,759 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,53	0,0310
0,93	0,0590
1,35	0,0970
1,92	0,1610
2,38	0,2210
3,00	0,2700
3,48	0,3100
3,92	0,3410
4,85	0,4340
5,85	0,5660
6,52	0,6260
8,00	0,7420
10,17	0,8460
12,00	1,0250
14,12	1,0640
17,85	1,1610
20,00	1,2130
23,23	1,2770
26,00	1,3300
30,10	1,3940
41,33	1,4560
53,60	1,5920
70,50	1,7350
112,20	1,7590

Tab. BN 3

E= 0,05 [mg/ml] So= 3,416 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,48	0,0060
1,05	0,0150
1,50	0,0640
2,00	0,1050
2,43	0,1060
3,00	0,2610
3,53	0,3210
4,08	0,3520
5,60	0,4890
7,00	0,6060
9,08	0,8230
12,00	1,0830
15,00	1,3490
18,00	1,8900
21,00	2,0020
25,25	2,1630
30,00	2,2760
40,00	2,5270
56,33	2,7820
75,00	2,9530
122,00	3,0770
181,25	3,4150

Tab. BN 4

E= 0,05 [mg/ml] So= 6,739 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,75	0,0350
1,58	0,0700
2,05	0,1100
2,40	0,1420
3,00	0,2070
3,58	0,2660
4,22	0,3420
5,17	0,4720
6,00	0,5410
7,00	0,6770
8,00	0,7880
9,00	1,1720
10,00	1,2450
13,00	1,6270
16,25	2,0820
20,00	2,8930
25,33	3,7280
30,25	3,8880
40,00	4,3790
50,00	4,7020
66,00	5,1610
80,00	6,1050
111,00	6,4020
303,00	6,6550
359,00	6,7390

Tab. BN 5

E= 0,05 [mg/ml] So= 14,725 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,0070
2,00	0,0760
3,00	0,0840
4,00	0,1450
5,00	0,2830
7,00	0,5190
17,85	2,5390
24,00	3,3570
30,00	4,7980
42,50	6,7520
50,00	7,1550
68,00	8,3520
90,00	10,0190
120,00	11,0920
180,00	12,6230
300,00	13,0320

Tab. BN 6

E= 0,10 [mg/ml] So= 0,269 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,38	0,003
0,80	0,017
1,20	0,024
1,63	0,041
2,10	0,055
2,53	0,067
3,00	0,077
3,92	0,094
6,00	0,142
7,00	0,154
8,25	0,173
10,00	0,205
12,00	0,205
15,58	0,215
18,00	0,251
20,12	0,251
22,00	0,263
26,00	0,263
29,98	0,263
124,00	0,268

Tab. BN 7

E= 0,10 [mg/ml] So= 1,999 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,38	0,089
0,77	0,197
1,13	0,273
1,53	0,385
1,95	0,449
3,00	0,691
3,53	0,672
4,03	0,775
4,65	0,778
5,18	0,851
6,07	1,027
7,23	1,034
8,15	1,054
10,00	1,132
12,00	1,305
15,00	1,435
18,00	1,453
25,75	1,459
31,00	1,610
48,14	1,638
85,00	1,895
155,00	1,999

Tab. BN 8

E= 0,10 [mg/ml] So= 3,460 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,27	0,022
0,58	0,028
0,88	0,106
1,22	0,180
1,52	0,254
1,80	0,337
2,12	0,404
2,45	0,506
3,00	0,719
3,50	0,762
4,00	0,870
4,50	1,064
5,00	1,154
6,00	1,382
7,00	1,539
8,00	1,661
10,00	1,832
12,00	2,040
14,00	2,084
17,00	2,418
32,50	2,743
40,00	2,872
52,50	2,896
65,00	3,145
75,00	3,160
98,50	3,291
124,00	3,459

Tab. BN 9

E= 0,10 [mg/ml] So= 8,40 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,038
0,97	0,120
1,28	0,170
1,63	0,196
1,98	0,343
2,33	0,447
2,45	0,674
3,00	0,808
4,00	0,994
5,00	1,407
6,00	1,722
7,00	2,066
8,33	2,772
10,00	3,257
12,00	3,728
14,00	4,247
17,00	4,837
20,00	4,857
25,00	5,692
30,67	5,765
40,50	6,304
50,00	6,820
60,00	7,044
75,50	7,293
125,00	7,686
153,00	7,970
215,00	8,139
273,00	8,235
337,00	8,398

Tab. BN 10

E= 0,10 [mg/ml] So= 14,99 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,002
0,95	0,025
1,42	0,092
2,00	0,102
3,00	0,357
4,00	0,713
5,00	0,864
8,25	2,170
9,00	2,425
10,17	2,908
12,50	3,925
15,00	4,955
28,50	8,220
38,00	9,486
55,50	10,964
78,00	11,806
99,00	12,836
222,00	14,362
279,00	14,983

Tab. BN 11

E= 0,20 [mg/ml] So= 1,950 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,25	0,164
0,60	0,286
0,95	0,452
1,27	0,565
1,63	0,684
2,00	0,842
2,35	0,854
3,00	0,954
3,45	0,990
3,93	1,086
4,90	1,184
9,00	1,501
10,00	1,515
12,50	1,627
15,00	1,638
20,00	1,744
35,00	1,834
68,50	1,861
93,00	1,925
121,00	1,950

Tab. BN 12

E= 0,20 [mg/ml] So= 3,830 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,042
0,70	0,152
1,05	0,354
1,37	0,500
1,72	0,633
2,00	0,829
3,02	1,167
3,43	1,277
3,82	1,508
4,20	1,635
4,55	1,765
5,00	1,896
6,00	2,045
7,00	2,169
8,00	2,303
9,17	2,417
10,00	2,475
12,00	2,612
14,00	2,718
16,00	2,802
20,00	2,917
31,00	3,185
62,67	3,489
122,00	3,758
151,00	3,759
220,00	3,829

Tab. BN 13

E= 0,20 [mg/ml] So= 9,150 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,40	0,063
0,82	0,187
1,15	0,390
2,05	1,020
2,45	1,332
3,28	1,732
4,00	2,152
5,00	2,781
7,42	3,850
9,75	4,510
11,33	4,706
13,00	4,545
15,00	5,701
17,02	5,984
25,02	6,401
30,00	6,695
35,03	7,014
41,17	7,285
51,00	7,351
81,00	7,615
100,00	7,829
142,00	7,985
201,00	8,106
261,00	9,148

Tab. BN 14

E= 0,20 [mg/ml] So= 14,850 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,27	0,078
0,63	0,214
0,93	0,328
1,27	0,471
1,62	0,697
2,07	0,968
2,53	1,408
3,00	1,613
3,55	2,130
4,00	2,491
5,00	2,953
6,00	3,949
7,03	4,588
8,00	5,448
10,00	6,486
12,00	7,349
14,00	8,758
17,17	9,674
20,00	10,314
30,00	11,057
40,00	11,094
60,00	11,554
81,00	12,581
90,00	12,607
105,00	12,687
120,00	12,814
150,00	13,005
182,00	14,046
240,00	14,359
302,50	14,837

Tab. BN 15

E= 0,20 [mg/ml] So= 23,04 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,105
0,53	0,121
0,88	0,177
1,15	0,280
1,45	0,386
1,77	0,546
2,08	0,758
2,43	0,917
3,00	1,313
3,45	1,873
4,00	2,244
4,50	2,669
5,00	3,147
6,17	3,994
7,00	4,901
8,00	5,494
9,00	6,492
10,00	7,076
12,17	8,403
14,00	10,165
16,00	10,744
18,00	11,920
20,00	12,639
23,00	13,919
26,00	14,465
30,00	16,042
50,00	18,776
60,00	19,002
93,00	21,027
181,00	23,039

Tab. BN 16

E= 0,40 [mg/ml] So= 2,081 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,25	0,230
0,60	0,456
0,98	0,701
1,33	0,821
1,73	0,913
2,15	0,940
2,57	1,051
3,00	1,087
3,42	1,104
3,87	1,201
4,35	1,343
4,73	1,370
6,00	1,477
7,00	1,565
9,25	1,625
10,00	1,619
15,25	1,698
47,50	1,806
60,00	1,860
93,00	2,080

Tab. BN 17

E= 0,40 [mg/ml] So= 3,757 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,25	0,240
0,60	0,572
0,95	0,920
1,30	1,018
1,73	1,462
2,22	1,520
2,52	1,528
3,00	1,854
5,00	2,050
6,00	2,378
7,00	2,420
8,00	2,612
9,17	2,674
10,00	2,748
12,00	2,830
16,00	3,150
30,50	3,312
67,00	3,756

Tab. BN 18

E= 0,40 [mg/ml] So= 8,547 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,25	0,160
0,55	0,451
0,87	0,832
1,15	1,119
1,50	1,560
1,85	1,858
2,25	2,383
3,00	3,364
4,00	3,979
5,00	4,406
6,00	4,352
7,00	4,963
8,00	5,521
9,00	5,634
10,00	5,839
12,50	5,977
15,00	6,054
22,83	6,228
25,00	6,821
30,00	7,246
54,50	8,281
100,00	8,546

Tab. BN 19

E= 0,40 [mg/ml] So= 14,760 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,61	0,132
0,95	0,416
1,30	0,854
1,64	1,249
1,98	1,605
2,34	2,117
3,00	3,091
4,00	4,602
5,00	5,536
6,00	6,287
7,00	7,442
8,00	7,867
10,00	8,745
12,00	9,393
15,00	9,876
20,00	9,541
30,00	10,128
40,00	11,691
60,00	12,838
79,00	12,968
100,00	13,913
120,00	14,290
175,00	14,338
236,00	14,757

Tab. BN 20

E= 0,40 [mg/ml] So= 21,381 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,28	0,100
0,58	0,222
0,92	0,543
1,27	0,994
1,60	1,339
2,02	2,056
2,38	2,547
3,00	3,572
4,00	4,997
5,00	5,905
6,00	7,564
7,50	9,698
8,50	9,873
10,08	11,665
12,25	13,473
21,25	14,489
26,50	15,501
30,00	15,734
40,08	17,988
54,00	17,890
60,50	18,390
90,00	18,920
120,00	20,435
180,00	21,380

Wyniki pomiarów kinetyki reakcji hydrolizy skrobi przeprowadzonej z udziałem β -amylazy immobilizowanej

Tab. BI 1

E= 0,03 [mg/ml] So= 2,326 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,0	0,000
1,0	0,020
3,0	0,067
5,0	0,117
10,0	0,265
16,0	0,374
21,5	0,479
30,0	0,575
41,0	0,787
70,0	1,018
105,0	1,231
162,0	1,338
221,0	1,406

Tab. BI 2

E= 0,07 [mg/ml] So= 2,383 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,0	0,000
1,0	0,090
4,0	0,248
6,0	0,360
9,0	0,477
11,0	0,521
14,0	0,554
18,0	0,720
22,0	0,769
27,0	0,828
32,0	0,973
40,0	1,050
60,5	1,263
80,0	1,454
130,0	1,585
180,0	1,666

Tab. BI 3

E= 0,11 [mg/ml] So= 3,986 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,0	0,000
1,0	0,063
3,0	0,217
5,0	0,380
8,0	0,557
11,0	0,762
14,0	0,869
18,0	0,933
22,0	1,102
27,0	1,214
32,0	1,378
37,5	1,428
42,0	1,569
50,0	1,489
60,0	1,993
80,0	2,378
220,0	3,077

Tab. BI 4

E= 0,138 [mg/ml] So= 8,604 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,0	0,000
1,1	0,111
2,1	0,215
3,0	0,254
4,5	0,447
6,3	0,703
8,0	0,906
10,0	1,278
15,0	1,671
20,0	1,984
30,0	2,500
45,0	3,194
63,0	3,729
97,0	4,509
180,0	5,480
225,0	6,030
285,0	6,614
347,0	6,958

Tab. BI 5

E= 0,15 [mg/ml] So= 17,068 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,0	0,000
0,9	0,129
1,5	0,140
2,3	0,142
3,0	0,142
4,0	0,232
5,0	0,288
6,0	0,522
7,6	0,556
8,5	0,684
9,5	0,769
10,5	0,785
11,5	0,973
12,5	1,135
15,0	1,507
19,0	2,027
27,1	3,099
45,0	5,010
60,0	6,393
90,0	7,920
122,0	8,408
152,0	10,120
183,0	10,700
236,0	12,110
296,0	12,430
380,0	12,867
480,0	13,096
540,0	12,883
600,0	13,024

Tab. BI 6

E= 0,27 [mg/ml] So= 22,907 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,0	0,000
1,0	0,190
3,0	0,527
4,0	0,737
5,0	1,111
7,0	1,828
10,0	2,836
13,0	3,707
16,0	4,509
20,0	5,658
28,0	7,660
32,0	8,750
36,0	9,199
45,0	10,436
53,0	12,010
62,0	12,541
72,0	13,127
80,0	13,409
92,0	13,603
120,0	14,301
123,0	14,566
176,0	15,631
236,0	16,706
320,0	17,820
360,0	18,487
420,0	18,174
480,0	19,878

Tab. BI 7

E= 0,305 [mg/ml] So= 2,745 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,0	0,000
1,0	0,638
3,0	0,660
5,0	1,133
10,0	1,401
15,0	1,504
20,0	1,602
30,0	1,705
46,0	1,941
60,0	1,928
92,0	2,055
121,0	2,163
150,0	2,157

Tab. BI 8

E= 0,205 [mg/ml] So= 5,225 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,0	0,000
0,5	0,069
1,2	0,210
1,9	0,331
3,0	0,621
4,0	0,789
5,0	0,939
6,0	1,046
7,0	1,290
8,0	1,440
10,0	1,652
15,0	2,152
20,0	2,456
30,0	2,554
40,3	2,579
50,1	3,070
65,5	3,100
80,0	3,379
100,0	3,593
120,0	4,140
150,0	4,478
180,0	4,709

Wyniki pomiarów kinetyki reakcji hydrolizy skrobi przeprowadzonej z udziałem glukoamylazy natywnej

Tab. GN 1

E= 2,83 [mg/ml] So= 1,344 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,23	0,038
0,50	0,108
0,77	0,182
1,03	0,252
1,30	0,322
1,53	0,384
1,78	0,460
2,03	0,509
2,33	0,571
2,67	0,651
3,00	0,730
3,38	0,797
3,72	0,845
4,33	0,898
5,10	0,964
6,00	1,003
10,00	1,100
15,00	1,152
20,00	1,188
25,10	1,223
40,00	1,255
63,00	1,267
124,00	1,292
175,00	1,316
270,00	1,344

Tab. GN 2

E= 2,83 [mg/ml] So= 2,576 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,20	0,030
0,47	0,103
0,73	0,177
1,00	0,258
1,27	0,335
1,55	0,419
1,82	0,499
2,10	0,577
2,40	0,663
2,70	0,746
3,00	0,821
3,33	0,898
3,62	0,967
3,88	1,030
4,40	1,158
4,72	1,231
5,00	1,293
6,00	1,475
10,00	1,906
15,00	2,080
20,00	2,195
30,05	2,276
40,00	2,328
50,05	2,382
60,70	2,400
122,00	2,468
168,00	2,469
280,00	2,504

Tab. GN 3

E= 2,83 [mg/ml] So= 5,032 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,23	0,046
0,50	0,135
0,80	0,221
1,08	0,307
1,35	0,386
1,62	0,461
1,85	0,528
2,08	0,596
2,33	0,667
2,62	0,744
3,00	0,849
3,50	0,982
4,00	1,115
4,50	1,250
5,00	1,373
6,33	1,668
7,00	1,825
8,05	2,070
9,00	2,299
10,00	2,517
12,10	2,928
14,00	3,281
16,10	3,565
20,10	3,950
31,10	4,228
35,00	4,354
40,00	4,483
50,00	4,534
62,60	4,576
90,75	4,667
121,00	4,795
180,50	4,943
315,00	5,032

Tab. GN 4

E= 2,83 [mg/ml] So= 13,325 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,33	0,049
0,75	0,156
1,05	0,238
1,32	0,311
1,60	0,385
1,88	0,464
2,25	0,567
2,58	0,659
2,88	0,740
3,23	0,836
3,58	0,934
4,00	1,045
4,83	1,268
5,10	1,344
5,43	1,436
5,78	1,536
6,05	1,606
7,00	1,873
8,00	2,136
9,00	2,385
9,38	2,485
10,83	2,868
12,25	3,257
15,00	3,987
20,00	5,340
25,00	6,494
30,00	7,500
35,00	8,363
40,50	9,075
45,25	9,574
54,10	10,288
59,60	10,562
70,00	10,967
82,40	11,247
90,00	11,550
120,00	11,867
194,00	12,375
240,00	12,678
326,00	12,693

Tab. GN 5

E= 2,83 [mg/ml] So= 27,254 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,29	0,059
0,59	0,129
0,92	0,207
1,22	0,287
1,53	0,369
1,81	0,442
2,06	0,510
2,92	0,742
3,22	0,822
3,52	0,903
3,89	1,000
4,16	1,070
4,41	1,137
4,70	1,217
5,00	1,296
5,50	1,431
6,10	1,600
6,57	1,722
7,10	1,801
8,20	2,183
10,10	2,714
12,10	3,257
15,10	4,101
20,25	5,527
25,47	6,980
31,10	8,434
35,10	9,497
40,00	10,790
50,20	13,325
60,10	14,994
90,00	19,349
120,25	21,786
150,00	22,826
187,00	23,847
213,00	24,397
241,00	24,834
300,00	25,050
347,00	25,227

Tab. GN 6

E= 2,83 [mg/ml] So= 48,769 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,37	0,027
0,67	0,092
0,97	0,166
1,42	0,286
1,71	0,362
2,37	0,526
2,66	0,597
3,01	0,682
3,51	0,804
3,83	0,892
4,22	0,990
4,54	1,073
4,89	1,157
5,09	1,204
5,56	1,316
6,00	1,426
7,05	1,677
8,40	1,997
9,10	2,160
10,05	2,388
10,58	2,515
12,00	2,865
15,58	3,729
20,70	5,045
25,75	6,397
30,30	7,629
40,50	10,287
50,05	12,713
60,00	15,119
89,00	22,379
119,00	27,699
150,00	31,763
177,00	34,847
244,00	39,141
310,00	41,671
357,00	42,557

Tab. GN 7

E= 1,77 [mg/ml] So= 1,208 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,38	0,021
0,70	0,063
1,00	0,121
1,32	0,183
1,67	0,252
2,00	0,315
2,33	0,376
2,67	0,441
3,00	0,494
3,33	0,545
3,67	0,595
4,00	0,632
4,67	0,700
5,00	0,730
5,50	0,768
6,00	0,800
7,20	0,869
8,00	0,895
10,00	0,948
15,05	1,009
20,10	1,051
25,50	1,076
30,05	1,095
40,00	1,123
50,20	1,135
82,00	1,155
122,00	1,171
252,00	1,190
394,00	1,195

Tab. GN 8

E= 1,77 [mg/ml] So= 2,206 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,75	0,086
1,02	0,138
1,28	0,192
1,52	0,236
1,82	0,301
2,08	0,359
2,33	0,408
2,67	0,480
3,00	0,546
3,33	0,613
3,67	0,681
4,00	0,747
4,50	0,835
5,10	0,938
5,75	1,030
6,25	1,100
7,15	1,218
8,40	1,360
9,15	1,435
10,00	1,515
12,00	1,668
15,50	1,781
20,00	1,886
26,15	1,950
30,15	1,980
40,40	2,004
50,00	2,018
60,00	2,032
107,00	2,090
177,00	2,160
279,00	2,188
415,00	2,201

Tab. GN 9

E= 1,77 [mg/ml] So= 4,275 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,33	0,024
0,68	0,062
1,00	0,128
1,35	0,200
1,72	0,266
2,03	0,326
2,33	0,385
2,67	0,453
2,98	0,515
3,33	0,580
3,72	0,654
4,10	0,728
4,53	0,813
5,00	0,900
6,00	1,093
8,00	1,475
9,00	1,667
10,00	1,850
15,00	2,500
20,25	2,880
20,50	2,916
26,75	3,305
31,00	3,458
40,50	3,692
50,83	3,904
59,83	3,966
93,75	4,027
123,00	4,046
162,00	4,071
196,00	4,086
226,00	4,098
298,00	4,120
432,00	4,133

Tab. GN 10

E= 1,77 [mg/ml] So= 11,906 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,38	0,011
0,73	0,040
1,05	0,080
1,38	0,140
1,75	0,213
2,00	0,271
2,33	0,346
2,67	0,420
3,05	0,502
3,60	0,627
4,05	0,727
4,50	0,829
5,00	0,937
5,50	1,042
5,98	1,150
7,00	1,350
8,30	1,593
10,50	2,054
15,00	2,949
20,00	3,847
25,05	4,669
29,00	5,226
40,40	6,675
57,60	8,203
64,40	8,744
94,40	9,996
126,00	10,441
151,00	10,601
180,00	10,697
254,00	11,158
324,00	11,221
460,00	11,484
560,00	11,493
1470,00	11,520

Tab. GN 11

E= 1,77 [mg/ml] So= 24,167 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,33	0,013
0,67	0,049
1,00	0,095
1,33	0,160
1,67	0,224
2,00	0,287
2,33	0,360
2,67	0,432
2,98	0,501
3,53	0,605
4,00	0,704
4,60	0,822
5,15	0,929
5,60	1,030
6,00	1,118
7,60	1,431
8,60	1,624
10,00	1,904
15,00	2,870
20,00	3,852
20,40	3,938
25,15	4,958
29,75	5,979
40,05	8,112
49,00	9,740
57,60	11,286
94,00	15,853
123,75	17,921
156,00	19,328
180,00	19,947
220,00	20,303
283,00	20,895
353,00	21,367
490,00	22,055
588,00	22,232

Tab. GN 12

E= 1,77 [mg/ml] So= 44,497 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,24	0,030
0,64	0,057
1,00	0,097
1,34	0,161
1,69	0,229
2,00	0,289
2,32	0,352
2,67	0,417
3,02	0,484
3,50	0,576
4,04	0,678
4,50	0,767
5,00	0,861
5,52	0,961
6,01	1,058
7,20	1,290
8,15	1,467
10,10	1,838
15,00	2,799
20,00	3,750
20,53	3,855
25,50	4,809
30,00	5,685
40,60	7,781
49,20	9,421
59,20	11,341
86,40	16,729
123,00	22,791
153,00	26,819
185,00	29,669
210,00	31,357
249,00	33,525
312,00	36,271
382,00	38,249
518,00	39,577
618,00	39,675
1530,00	43,291

Tab. GN 13

E= 2,27 [mg/ml] So= 5,208 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,27	0,032
0,60	0,090
0,93	0,177
1,25	0,266
1,62	0,365
1,96	0,450
2,31	0,535
2,65	0,622
3,00	0,705
3,50	0,823
4,00	0,945
4,50	1,065
5,00	1,175
6,00	1,387
7,10	1,650
8,10	1,885
9,00	2,063
10,20	2,282
12,00	2,613
15,50	3,225
19,50	3,696
25,00	4,054
30,00	4,301
40,40	4,524
50,00	4,673
60,10	4,730
89,00	4,876
120,75	4,958
184,00	5,088
244,00	5,087

Tab. GN 14

E= 1,51 [mg/ml] So= 4,97 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,25	0,008
0,67	0,054
1,00	0,103
1,33	0,155
1,67	0,208
2,00	0,257
2,33	0,307
2,67	0,361
3,00	0,412
3,35	0,465
3,67	0,515
4,00	0,566
4,60	0,658
5,00	0,720
6,00	0,864
7,50	1,065
8,83	1,242
10,90	1,518
13,00	1,801
15,00	2,030
15,33	2,069
20,25	2,640
26,40	3,115
30,50	3,376
42,25	3,773
52,25	3,952
64,50	4,081
90,00	4,242
151,00	4,389
273,00	4,589

Tab. GN 15

E= 1,33 [mg/ml] So= 5,187 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,21	0,001
0,52	0,017
0,84	0,034
1,21	0,070
1,54	0,105
1,93	0,145
2,34	0,209
2,69	0,260
3,01	0,305
3,50	0,376
4,00	0,445
5,00	0,578
6,16	0,726
7,25	0,870
8,00	0,957
9,10	1,084
10,00	1,185
12,10	1,416
15,00	1,754
20,10	2,343
24,75	2,818
30,40	3,313
40,00	3,812
50,50	4,150
60,10	4,400
90,00	4,696
119,00	4,789
220,00	4,924
340,00	4,971

Tab. GN 16

E= 0,76 [mg/ml] So= 4,593 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
0,32	0,010
0,68	0,021
1,00	0,030
1,33	0,045
1,67	0,063
2,00	0,088
2,33	0,114
2,67	0,139
3,00	0,165
3,37	0,191
3,70	0,217
4,00	0,240
4,50	0,279
5,00	0,318
5,67	0,367
6,10	0,400
8,00	0,540
12,20	0,845
18,20	1,284
25,50	1,765
25,83	1,788
30,20	2,070
40,75	2,677
56,25	3,277
66,00	3,511
92,50	3,946
137,00	4,247
159,00	4,378
225,00	4,453
294,00	4,471
356,00	4,499

Tab. GN 17

E= 0,31 [mg/ml] So= 4,97 [mg/ml]	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,38	0,005
2,00	0,009
2,50	0,017
3,00	0,025
3,50	0,037
4,00	0,051
4,50	0,063
5,00	0,077
5,58	0,091
6,00	0,105
7,07	0,139
8,10	0,171
9,10	0,202
10,10	0,230
12,10	0,279
15,00	0,373
20,10	0,520
25,10	0,650
30,00	0,830
40,50	1,220
50,00	1,503
59,75	1,820
88,10	2,720
100,60	3,020
120,50	3,404
146,00	3,773
180,60	4,070
243,00	4,504
313,00	4,588
390,00	4,629

Wyniki pomiarów kinetyki reakcji hydrolizy skrobi przeprowadzonej z udziałem glukoamylazy immobilizowanej

Tab. GI 1

$E = 0,055 \text{ [mg/ml]}$ $S_0 = 2,208 \text{ [mg/ml]}$	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,00	8,000
2,00	0,150
3,00	0,346
4,00	0,547
5,00	0,738
6,00	0,957
7,00	1,110
8,00	1,170
10,00	1,280
15,00	1,380
20,00	1,560
30,00	1,690
40,00	1,914
50,00	2,031
60,00	2,090
120,00	2,161
180,00	2,121
240,00	2,149
300,00	2,113

Tab. GI 2

$E = 0,055 \text{ [mg/ml]}$ $S_0 = 4,708 \text{ [mg/ml]}$	
t	P
min	mg/ml
0,00	0,000
1,00	0,128
2,00	0,325
3,00	0,515
4,00	0,724
5,00	0,899
6,00	1,090
7,00	1,374
8,00	1,771
10,00	1,972
15,00	2,215
20,00	2,560
30,00	2,864
40,00	3,094
50,00	3,590
60,00	4,042
120,00	4,070
160,00	4,101
180,00	4,207
240,00	4,192
300,00	4,152
360,00	4,201



10.2. Załącznik 2

W rozdziale tym zamieszczono (w formie tabel) wyniki reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z udziałem: α -amylazy, β -amylazy, glukoamylazy immobilizowanej przeprowadzonych w reaktorach przepływowych w procesie ciągłym.

Tabela 10.2.1. Wyniki hydrolizy skrobi z udziałem α -amylazy immobilizowanej.

S_0	c_E	τ	$c_{k, \text{ prod}}$	$\alpha_{\text{dośw.}}$	$\alpha_{\text{obl.}}$	błąd względny
g/l	g/l	min	g/l			%
reaktor mieszalnikowy						
5,093	0,072	3	1,611	0,32	0,30	5,8
5,093	0,072	8	2,782	0,57	0,54	8,1
5,093	0,072	10	2,831	0,56	0,54	4,6
5,093	0,072	15	3,109	0,62	0,60	3,2
5,093	0,072	20	3,401	0,68	0,65	4,4
5,093	0,072	35	3,368	0,67	0,73	8,9
5,093	0,072	60	4,172	0,82	0,79	4,8
reaktor rurowy						
5,126	0,123	1	1,382	0,27	0,25	7,4
5,126	0,123	2	2,511	0,49	0,45	8,1
5,126	0,123	3,5	3,024	0,59	0,41	35,2
5,126	0,123	5	3,279	0,64	0,65	0,7
5,126	0,123	7,5	3,382	0,66	0,69	4,5
5,126	0,123	15	4,150	0,81	0,83	2,5
5,126	0,123	20	4,049	0,79	0,84	6,3

Tabela 10.2.2. Wyniki hydrolizy skrobi z udziałem β -amylazy immobilizowanej.

S_0	c_E	τ	$c_{k, \text{ prod}}$	$\alpha_{\text{dośw.}}$	$\alpha_{\text{obl.}}$	błąd względny
g/l	g/l	min	g/l			%
reaktor mieszalnikowy						
4,732	0,072	2	0,104	0,022	0,021	4,5
4,732	0,072	5	0,212	0,045	0,049	8,8
4,732	0,072	15	0,491	0,104	0,118	13,46
4,732	0,072	20	0,790	0,167	0,16	4,2

4,732	0,072	30	0,992	0,214	0,208	2,8
4,732	0,072	35	1,088	0,234	0,226	3,4
4,732	0,072	45	1,296	0,274	0,265	3,3
4,732	0,072	50	1,296	0,274	0,258	5,8
reaktor rurowy						
5,032	0,304	1	0,34	0,068	0,052	23,5
5,032	0,304	3	0,820	0,163	0,136	16,5
5,032	0,304	5	1,207	0,24	0,2	16,2
5,032	0,304	7	1,282	0,256	0,255	0,4
5,032	0,304	15	1,660	0,33	0,41	24,2
5,032	0,304	20	2,162	0,43	0,48	12,6
5,032	0,304	30	2,768	0,55	0,59	7,2

Tabela 10.2.3. Wyniki hydrolizy skrobi z udziałem glukoamylazy immobilizowanej.

S ₀	c _E	τ	C _{k, prod}	α _{dośw.}	α _{obl.}	błąd względny
g/l	g/l	min	g/l			%
reaktor mieszalnikowy						
4,725	0,126	1	0,0472	0,01	0,009	10,0
4,725	0,126	2	0,117	0,025	0,023	8,0
4,725	0,126	5	0,254	0,054	0,055	3,4
4,725	0,126	5	0,405	0,086	0,055	36
4,725	0,126	10	0,545	0,115	0,11	4,5
4,725	0,126	20	0,945	0,195	0,21	9,0
reaktor rurowy						
5,081	0,522	1	0,37	0,073	0,076	4,1
5,081	0,522	2	0,573	0,113	0,129	14,2
5,081	0,522	5	1,370	0,27	0,247	8,5
5,081	0,522	10	1,625	0,32	0,36	12,5
5,081	0,522	10	1,877	0,37	0,35	6,2
5,081	0,522	20	2,386	0,47	0,49	3,8