



POLITECHNIKA WROCLAWSKA
INSTYTUT INŻYNIERII CHEMICZNEJ I URZĄDZEŃ CIEPLNYCH

praca doktorska

**Modelowanie matematyczne procesów
degradacji biopolimerów na przykładzie
enzymatycznej hydrolizy skrobi**

Autor: mgr inż. Piotr Wojciechowski
Promotor: prof. dr hab. inż. Antoni Koziol

Wrocław 1999



Promotorowi prof. Antoniemu Koziołowi składam podziękowania za cenne uwagi, które wpłynęły na kształt niniejszej pracy.

Panu prof. Andrzejowi Noworycie pragnę podziękować za niezliczone dyskusje, a także za czas poświęcony w trakcie pisania pracy.

Pani dr Jolancie Bryjak dziękuję za cenne wskazówki oraz za udostępnienie danych kinetycznych wykorzystanych w niniejszej pracy.

Pani Annie Karaban oraz koleżankom i kolegom z Zespołu pragnę podziękować za serdeczność i wspaniałą atmosferę, nie tylko w czasie pracy.

Rodzicom dziękuję za „pomoc duchową” przy pisaniu pracy.

Pracę tę dedykuję mojemu przyjacielowi - Iwonie Grad.

Spis treści

Wykaz przyjętych w pracy oznaczeń i symboli	3
1. Wstęp	7
1.1. Zastosowanie procesu enzymatycznej degradacji biopolimerów	7
1.2. Kinetyka reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów	10
1.3. Wykorzystanie metod <i>Monte Carlo</i> przy opisie reakcji degradacji biopolimerów	16
1.4. Podsumowanie przeglądu literaturowego	19
2. Cele pracy	20
3. Model iteracyjny enzymatycznej hydrolizy biopolimerów	21
3.1. Ogólne założenia modelu	21
3.2. Parametry modelu	22
3.3. Opis cząsteczek substratów	23
3.3.1. Polimery liniowe	23
3.3.2. Polimery rozgałęzione	25
3.4. Preferencje substratowe enzymów	30
3.5. Algorytm symulacji	31
3.6. Rozszerzenia modelu	35
3.6.1. Inhibicja akompetycyjna i niekompetycyjna	37
3.6.2. Atak wielokrotny	38
4. Modelowanie procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi	39
4.1. Opis danych doświadczalnych	39
4.2. Symulacja procesu hydrolizy skrobi	41
4.2.1. Opis programu	41
4.2.2. Określenie parametrów modelu dla procesu hydrolizy skrobi	42
4.2.3. Waga parametrów modelu	44
4.3. Translacja układu modelowego do układu rzeczywistego	46
4.4. Porównanie danych doświadczalnych z symulacją komputerową	51
4.5. Dyskusja błędów	56
4.5.1. Określenie zgodności danych eksperymentalnych z wynikami symulacji komputerowej	56
4.5.2. Współczynnik determinacji	58
4.6. Czas wykonywania obliczeń	61
4.7. Dodatkowa weryfikacja modelu	61
4.8. Wyniki modelowania procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi	62

5. Przykładowe zastosowania modelu iteracyjnego	65
5.1. Modelowanie procesów laboratoryjnych i przemysłowych	65
5.2. Wyznaczanie parametrów innych modeli w oparciu o model iteracyjny	67
5.2.1. Określenie ilości substratu	67
5.2.2. Określenie udziałów poszczególnych frakcji polisacharydów w skrobi	69
5.2.3. Wyznaczenie stałych kinetycznych z zastosowaniem symulacji komputerowej	70
5.2.4. Wyznaczenie parametrów startowych dla innych programów symulacyjnych	71
5.3. Modelowanie typu oddziaływań pomiędzy enzymami (synergizm, konkurencja)	72
5.4. Efektywność wykorzystania enzymu	74
5.5. Analiza oddziaływań inhibicyjnych oraz mechanizmu ataku enzymów	75
5.6. Opis enzymatycznej biodegradacji biopolimerów	77
6. Podsumowanie	79
6.1. Opis modelu	79
6.2. Uzyskane wyniki	80
6.3. Zalety modelu	81
6.4. Możliwości zastosowania modelu	82
Dodatek I	84
Dodatek II	94
Dodatek III	98
Dodatek IV	129
Załącznik - płyta CD	135
Piśmiennictwo cytowane	138

Wykaz przyjętych w pracy oznaczeń i symboli

SYMBOL:	OPIS: {Objaśnienia podane w nawiasach odnoszą się do procesu hydrolizy skrobi}
A	Funkcja charakterystyczna w modelu iteracyjnym, $A \in (0,1)$
B	Funkcja połączeń w modelu iteracyjnym, $B \in (N \cap \{0\})$
$C(X,Y)$	Kowariancja między cechami X i Y
c_E	Stężenie enzymu, [mg/ml]
c_{gl}	Stężenie monomerów {glukozy} mogącej powstać w wyniku całkowitej hydrolizy biopolimeru {skrobi}, [mg/ml]
c_P	Stężenie produktu, [mg/ml]
$c_{P_{sym}}$	Stężenie produktu oznaczone na podstawie symulacji komputerowej, [mg/ml]
c_S	Stężenie substratu, [mg/ml]
c_{S+P}	Sumaryczne stężenie substratu i produktu, [mg/ml]
c_{S0}	Stężenie początkowe substratu, [mg/ml]
$c_{x,0}$	Stężenie substancji x na początku reakcji, [mg/ml]
$c_{x,k}$	Stężenie substancji x na końcu reakcji, [mg/ml]
DP	Stopień polimeryzacji, $DP \in N$, [-]
$Int(x)$	Wartość całkowita liczby x
k_1, k_2	Stałe kinetyczne równania empirycznego, [ml/mg·min]
k_3	Stała kinetyczna równa odwrotności liczby obrotów enzymu, [min^{-1}]
k_i	Stała inhibicji, [mg/ml]
k_{iP}	Stała inhibicji produktem reakcji, [mg/ml]
k_{iS}	Stała inhibicji substratem reakcji, [mg/ml]
k_M	Stała Michaelisa-Menten, [mg/ml·min]
k_{st}	Stała przeskalowania stężenia dla modelu iteracyjnego, [mg/ml·n]
k_t	Stała przeskalowania czasu dla modelu iteracyjnego, [min/n]
lg	Liczba podjednostek monomerów {glukozy} w układzie, [-]
lg_{am}	Liczba podjednostek monomerów {glukozy} w cząsteczce biopolimeru liniowego {amylozy}, [-]
lg_{ap}	Liczba podjednostek monomerów {glukozy} w cząsteczce biopolimeru rozgałęzionego {amylopektyny}, [-]
lg_{calc}	Całkowita liczba podjednostek monomerów {podjednostek glukozy} w rozpatrywanym układzie, [-]

M_w	Masa molowa, [kg/mol]
N	Liczba naturalna
NRE	Oznaczenie końca biopolimeru podatnego na atak <i>egzo</i> -hydrolaz {oznaczenie końców nieredukujących w cząsteczkach amylozy i amylopektyny}
n	Numer podjednostki monomeru {glukozy}, $n \in N$, [-]
n	Numer iteracji, $n \in N$, [-]
ne	Liczba cząsteczek enzymów, $ne \in N$, [-]
n_k	Numer iteracji dla końca symulacji, [-]
$n_{k,P}$	Liczba cząsteczek produktów dla końcowej symulacji, [-]
p	Zmienna określana każdorazowo w sposób losowy, będąca liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od 0 do 1.
p_{iak}	Prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej; $p_{iak} \in [0, 1]$
p_{ink}	Prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej; $p_{ink} \in [0, 1]$
p_{wak}	Prawdopodobieństwo ataku wielokrotnego; $p_{wak} \in [0, 1]$
$p(x,y)$	Punkt o wartości odciętej x i rzędnej y
R^+	Dodatnia liczba rzeczywista
RE	Oznaczenie końca (końców) biopolimeru niepodatnych na atak <i>egzo</i> -hydrolaz {oznaczenie końców redukujących w cząsteczkach amylozy i amylopektyny}
r_{xy}	Współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r_{xy} \in [-1, 1]$
r_{xy}^2	Współczynnik determinacji $r_{xy}^2 \in [0, 1]$
s_x	Średnie odchylenie cechy x
s_y	Średnie odchylenie cechy y
t	Czas reakcji, [min]
t'	Jednostka dyskretnego czasu reakcji (przyjęto, że $1t' = t_{ak}$)
t_{ak}	Średni czas zderzenia aktywnego, [s]
t_e	Dyskretny czas przebywania cząsteczki enzymu w układzie, [s]
t_{iak}	Średni czas zderzenia aktywnego z inhibicją akompetycyjną, [s]
t_{ik}	Średni czas trwania kompleksu inhibitor kompetycyjny-substrat, [s]
t_{ink}	Średni czas zderzenia aktywnego z inhibicją niekompetycyjną, [s]
t_{nak}	Średni czas zderzenia nieaktywnego, [s]
$t_{P_{sym}}$	Czas reakcji opisujący powstawanie produktu P wyznaczony w symulacji komputerowej, [s]
t_R	Dyskretny czas reakcji, [min]

t_{wak}	Średni czas pojedynczego cyklu podczas ataku wielokrotnego, [s]
V_{max}	Maksymalna szybkość reakcji, [mg/ml·s]
V_R	Szybkość reakcji, [mg/ml·s]
wa_{am}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylozy, które potencjalnie są podatne na atak α -amylazy, [-]
wa_{ap}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylopektyny, które potencjalnie są podatne na atak α -amylazy, [-]
w_{am}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylozy, [-]
w_{ap}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylopektyny, [-]
wb_{am}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylozy potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy, [-]
wb_{ap}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy, [-]
weg_{ap}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania <i>egzo</i> - α -D-glukanazy, [-]
wgl_{am}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylozy potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania glukoamylazy, [-]
wgl_{ap}	Liczba wiązań α -1→4-glikozydowych w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania glukoamylazy, [-]
wh_{am}	Numer wiązania α -1→4-glikozydowego w cząsteczce amylozy, licząc od końca redukującego, hydrolizowanego w wyniku ataku enzymu amylolitycznego, [-]
wh_{ap}	Numer wiązania α -1→4-glikozydowego w cząsteczce amylopektyny, licząc od końca redukującego, hydrolizowanego w wyniku ataku enzymu amylolitycznego, [-]
wp_{ap}	Liczba wiązań α -1→6-glikozydowych w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania pullulanazy, [-]
X	Zmienna niezależna
$\bar{x}$	Średnia arytmetyczna x
x	Moduł liczby x
$x \xleftarrow{y}$	Monomer {podjednostka glukozy} o numerze porządkowym y, „grot strzały” wskazuje koniec RE w danej podjednostce; x jest wartością binarną funkcji charakterystycznej A określonej dla danego monomeru y
$x \downarrow^y$	Monomer {podjednostka glukozy} o numerze porządkowym y, „grot strzały” wskazuje miejsce przyłączenia łańcuchu podrzędnego zawierającego dany monomer do łańcucha nadrzędnego; x jest wartością binarną funkcji charakterystycznej A określonej dla danego monomeru y
$x \rightarrow y$	Nadanie zmiennej x wartości zmiennej y

Y	Zmienna zależna
$\bar{y}$	Średnia arytmetyczna y
ι	Jednostka liczności cząsteczek. Przejęto, że 1ι odpowiada obecności jednej cząsteczki w układzie modelowym.
ξ	Numer porządkowy przyporządkowywany cząsteczkom enzymów w układzie modelowym, $\xi \in N, [-]$



- ⊕ W przypadku równań multienzymatycznych dodatkowe indeksy dolne α , β , γ oznaczają iż dany parametr odnosi się odpowiednio do α -, β - lub glukoamylazy.
- ⊕ W Tabeli 1.3. przyjęto oznaczenia za autorami poszczególnych cytowań.
- ⊕ Podane w nawiasach kwadratowych wymiary poszczególnych oznaczeń są zgodne z wykorzystanymi w pracy publikacjami, z których zaczerpnięto część danych doświadczalnych [14, 15, 16, 18, 54, 61, 67, 80, 85, 99, 100, 151, 153].

1. Wstęp

1.1. Zastosowanie procesu enzymatycznej degradacji biopolimerów

Biopolimery naturalne są jednym z podstawowych substancji tworzących środowisko życia człowieka. Są one obecne między innymi w naszym pożywieniu, ubraniach, materiałach konstrukcyjnych, a także są one w nas samych. Stanowią olbrzymią bazę surowcową wykorzystywaną przez człowieka, a ich popularności należy się doszukiwać przede wszystkim w szybkiej odnawialności, przystępnej cenie, stosunkowo łatwym metodom pozyskiwania, a także w tym, że są przyjazne dla środowiska naturalnego. Podział polimerów naturalnych przedstawiono w tabeli 1.1.

Tab. 1.1. Podział biopolimerów naturalnych [125].

polimery naturalne	przykład biopolimeru
polinukleotydy	polimery kwasów rybonukleinowych (polimer kwasu dezoksyrybonukleinowego - DNA, polimer kwasu rybonukleinowego - RNA)
poliwęglowodany	polisacharydy (celuloza, skrobia, chityna, guma arabska)
poliamidy	polipeptydy (białka)
poliwęglowodory	kauczuk naturalny (<i>cis</i> -poli(izopren))

Procesy enzymatycznej degradacji biopolimerów towarzyszą nam w wielu dziedzinach życia codziennego. Przykładowo szereg z nich przebiega w organizmach ssaków: przy wysiłku fizycznym hydrolizowany jest w wątrobie glikogen, podczas przyjmowania pożywienia obecne w ślinie i soku żołądkowym hydrolazy degradują występujące w pożywieniu polimery naturalne. Na skalę przemysłową procesy hydrolizy biopolimerów wykorzystywane są między innymi przy produkcji żywności, w przemyśle papierniczym, tekstylnym, włókienniczym, poligraficznym, chemicznym, motoryzacyjnym, meblarskim, budowlanym, pralniczym, skórzanym oraz w kosmetyce i lecznictwie [58, 154, 177, 178]. W tabeli 1.2. przedstawiono przykładowe zastosowania preparatów enzymatycznych w różnych gałęziach przemysłu. Procesy enzymatycznej modyfikacji skrobi, w szczególności procesy enzymatycznej hydrolizy skrobi, wzmiankowane w tytule pracy przedstawiono w tabeli 1.3.

Tab. 1.2. Zastosowanie preparatów enzymatycznych w procesach degradacji biopolimerów [58, 120, 168, 177].

typ enzymów	przykładowe zastosowanie
enzymy amylolityczne	przemysł farmaceutyczny i cukierniczy (produkcja glukozy)
enzymy proteolityczne	przemysł mięsny i rybny (zmięczanie mięsa, produkcja hydrolizatów i żelatyn) przemysł piwowarski (zapobieganie zmętnieniu piwa) przemysł serowarski (koagulacja białek mleka, dojrzewanie serów)
enzymy pektolityczne	przemysł owocowo-warzywny (zwiększanie wydajności przy tłoczeniu owoców, klarowanie)
β -galaktozydaza i β -fruktozydaza	przemysł mleczarski (zapobieganie krystalizacji laktozy) przemysł cukierniczy (produkcja sztucznego miodu)
DNA'zy i RNA'zy	biologia molekularna (fragmentacja i modyfikacja materiału genetycznego)

Tab. 1.3. Przykłady zastosowania enzymów amylolitycznych w przemyśle spożywczym i medycynie [17, 165, 166, 167, 180].

Substancje pochodne skrobi natywnej	Enzymy używane w procesach technologicznych	Przykładowe zastosowania w przemyśle
skrobia modyfikowana	α -amylazy	Przemysł cukierniczy i piekarniczy (poprawienie zdolności wyrastania ciasta); zagęstnik (np. produkcja ketchupów); wypełniacz / substancja stabilizująca / czynnik zapobiegający zbrylaniu się produktów (zupy błyskawiczne), przechowalność produktów spożywczych - czynnik ograniczający powstawanie ziaren lodu oraz regulujący wilgotność Przemysł browarniczy i gorzelniczy (przekształcenie skrobi w sacharydy fermentujące) Produkcja tworzyw i opakowań biodegradowalnych Medycyna: antyutleniacze, enkapsulowanie leków, wypełniacze, dezintegranty. Podłoże fluidyzacyjne, czynnik utrzymujący wilgotność, czynnik zapobiegający zbrylaniu się substancji
syropy maltozowe	β -amylazy (α -amylazy – wstępne upłynnianie skrobi)	Przemysł cukierniczy (zapobieganie krystalizacji sacharozy, zwiększanie konsystencji, polepszenie walorów smakowych, wydłużenie trwałości produktów)
syropy glukozowo-maltozowe	glukoamylazy, β -amylazy (α -amylazy – wstępne upłynnianie skrobi)	Produkcja lodów, konfitur i dżemów, syropów owocowych, soków, ciastek, mrożonej żywności
syropy glukozowe	glukoamylazy (α -amylazy – wstępne upłynnianie skrobi)	Przemysł cukierniczy i pszczelarski
syropy o wysokim wskaźniku cukrów fermentacyjnych	α -amylazy	Przemysł piwowarski i piekarniczy
syropy fruktozowe	izomerazy fruktozowe (izomeryzacja glukozy do fruktozy)	Produkcja napojów (Coca Cola, Pepsi Cola), produkcja żywności dla dietetyków (fruktoza metabolizowana jest bez udziału insuliny)
syropy wysokofruktozowe	izomerazy fruktozowe	Przetwórstwo owoców, produkcja konfitur i syropów owocowych
syropy maltodekstrynowe	α -amylazy	Przemysł spożywczy (regulatory wilgotności, wypełniacze); przemysł cukierniczy (produkcja lodów, mrożonek, cukierków), przemysł farmakologiczny (enkapsulacja leków - ochrona przed utlenianiem)
maltoza krystaliczna	β -amylazy	Wlewy dożylnie u dietetyków

Z zastosowań enzymów w przemysłowych procesach modyfikacji i przetwarzania biopolimerów wypływa szereg korzyści. Podstawowe z nich to:

- preparaty enzymatyczne cechuje określona specyficzność, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie określonych produktów reakcji [59],
- obniżenie kosztów prowadzenia procesów [177],
- umożliwienie prowadzenia reakcji w łagodnych warunkach [13],
- enzymy obniżają energię aktywacji [59, 144],
- enzymy katalizują reakcję w małych ilościach w porównaniu ze stężeniem substratu ($c_E \ll c_S$), a ich działanie może być łatwo kontrolowane i jednocześnie łatwo przerwane [22],
- w przypadku enzymów stosowanych w produkcji żywności ważne jest, że nie są one toksyczne i nie wpływają negatywnie na pogorszenie walorów organoleptycznych produktów (np. przy produkcji serów z wykorzystaniem podpuszki lub przy produkcji syropów maltozowych [120, 177]),
- stosowane powszechnie w przemyśle enzymy są względnie tanie i łatwo pozyskiwane [22, 120] - ich produkcja nie wymaga deficytowych surowców, a jedynie odpowiedniej (bio)technologii,
- procesy enzymatyczne są one ogół bardziej przyjazne dla środowiska naturalnego, niż analogiczne procesy „konwencjonalne” [165].

Aktualnie obserwuje się stały wzrost zainteresowania przemysłu procesami enzymatycznej degradacji biopolimerów. Prognozuje się, iż wiek XXI będzie okresem gwałtownego rozwoju biologii molekularnej i biotechnologii. Na bazie naturalnych biopolimerów opracowanych zostanie i wdrożonych do masowej produkcji szereg tworzyw biodegradowalnych o szerokiej gamie zastosowań. Opracowane zostaną nowe preparaty enzymatyczne, a koszt ich produkcji ulegnie radykalnemu obniżeniu. Przy pozyskiwaniu żywności w większym stopniu zostaną wykorzystane substancje produkowane przez rośliny wodne. Mutacje genetyczne pozwolą obniżyć koszty i zwiększyć produkcję najbardziej powszechnego polimeru roślinnego - skrobi. Także przemysł paliwowy i motoryzacyjny w większym stopniu będzie wykorzystywał substancje pochodne polimerów naturalnych, przykładowo obecnie w wielu krajach świata trwają badania nad możliwością wykorzystania produktów uzyskiwanych ze skrobi i celulozy (np. alkoholu etylowego) jako taniego, proekologicznego paliwa [154].

1.2. Kinetyka reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów

Opis matematyczny procesów enzymatycznej degradacji biopolimerów jest niezwykle złożony. Wynika to przede wszystkim ze struktury cząsteczek biopolimeru oraz z obecności w układzie reakcyjnym szeregu substratów (polimerów o różnej masie cząsteczkowej), produktów pośrednich oraz produktów końcowych. Problemem jest także zapis samej reakcji degradacji biopolimeru oraz jednoznaczne określenie stężenia polimeru [150]. Przykładowo podczas reakcji degradacji liniowego polimeru przez *endo*-hydrolazy substrat „rozcinany” jest na dwie mniejsze cząsteczki, które mogą być wykorzystane ponownie jako substraty w następnych etapach reakcji. Analizując przebieg omawianej reakcji, możemy stwierdzić, iż w pierwszym jej etapie stężenie masowe substratu* jest praktycznie stałe, natomiast stężenie molowe substratu paradoksalnie rośnie! Dodatkowo trzeba zaznaczyć, że mechanizm reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów może zależeć zarówno od pochodzenia użytego w reakcji preparatu enzymatycznego, struktury substratu [121], jak i jego źródła i sposobu przechowywania [68]. Może się on także zmieniać podczas przebiegu reakcji†.

Spotykane w literaturze sposoby opisu kinetyki procesów degradacji enzymatycznej biopolimerów przedstawiono w tabeli 1.4. Generalnie można je podzielić na:

1) modele ciągłe:

- a) opierające się na równaniach kinetycznych bazujących na modelu Henriego [27], który zakłada powstanie odwracalnego kompleksu enzym-substrat, podlegającego dalszej nieodwracalnej przemianie do produktu (produktów) i wolnej cząsteczki enzymu według schematu:



- b) inne modele deterministyczne (np. eksponentalne równanie empiryczne [61, 122]),

2) modele nieciągłe opisujące układ w sposób dyskretny (np. analiza klasterowa [65]).

* Jako cząsteczki substratu rozumie się tu wszystkie cząsteczki potencjalnie podatne na działanie danego enzymu (*egzo*-hydrolazy).

† Dotyczy to zwłaszcza przypadku, gdy w pierwszym etapie reakcji enzym hydrolizuje lepiej dostępny i bardziej podatny substrat, prowadząc do pozostania w układzie cząsteczek mniej podatnych na działanie enzymu. W praktyce często uwidacznia się to zmianą kinetyki na pierwszorzędową pod koniec reakcji.

Tab. 1.4. Przykładowe modele kinetyczne stosowane do opisu reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów (w tabeli przyjęto oznaczenia za autorami poszczególnych artykułów).

Enzym (enzymy)	Warunki eksperymentu [literatura]	Proponowany opis kinetyki reakcji
α -amylaza z <i>Schwanniomyces castelli</i>	1% skrobia; 32°C; pH 5,0 [111]	równanie Michaelisa-Menten z inhibicją produktem reakcji: $v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_M (1 + \frac{[P]}{K_i})}$
α -amylaza z <i>Saccharomycopsis fibuliger</i>	0,1% ÷ 0,9% skrobia; 32°C; pH 4,8 [130]	równanie Michaelisa-Menten z inhibicją produktem reakcji
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> (Thermamyl 120L)	1% ÷ 8% skrobia kukurydziana; 100°C; pH 6,0 [68]	równanie Michaelisa-Menten
α -amylaza ze słodu	ekstrakt słodowy; 40 ÷ 70°C [83]	reakcje pierwszego rzędu dla każdego produktu; reakcja pierwszego rzędu opisująca dezaktywację enzymu
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> (Termamyl 60L)	35% ÷ 55% skrobia pszeniczna; 80°C [116]	model nieliniowy: $v = f(c_s, c_w, c_E)$
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> (Termamyl 60L)	30% ÷ 50% skrobia pszeniczna; 90 ÷ 120°C [43]	nieodwracalna reakcja pierwszego rzędu
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> (Termamyl)	1% skrobia kukurydziana; 60 ÷ 65°C; pH = 6,0 [117]	$\frac{dm}{dt} = f(k, [E], \alpha, m)$
α -amylaza z <i>Bacillus subtilis</i>	1% skrobia pszeniczna [47]	następcze reakcje pierwszorzędowe
α -amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i>	6,6% ÷ 40% skrobia; 100°C; pH 7,0 [160]	równanie Michaelisa-Menten
α -amylaza z <i>Bacillus stearothermophilus</i>	24% ÷ 36% skrobia kukurydziana; 93 ÷ 115°C; pH 5,3 ÷ 6,7; 0 ÷ 200 ppm wapnia [45]	pierwszorzędowa dezaktywacja enzymu i kinetyki upłynniania skrobi
α -amylaza (Thermamyl Novo Laboratories)	skrobia kukurydziana; 60°C ÷ 80°C; pH 6,0 [117]	model upłynniania bazujący na zmianie masy ziaren skrobi; uwzględniono pierwszorzędową reakcję dezaktywacji enzymu: $E(t) = E_0 \cdot e^{-k_E \cdot t}$
α -amylaza z <i>Bacillus sp.</i> typ IIA (Sigma)	skrobia ziemniaczana (Aldrich); 20°C; pH 4,5 [100]	metoda całkowa połączona z symulacją komputerową: $t = \frac{1}{k \cdot c_E} \cdot (c_{s0} - c_s + K_m \cdot \ln \frac{c_{s0}}{c_s})$
α -amylaza z trzustyki wieprzowej (EC 3.2.1.1)	amylaza; 40°C; pH 6,9 [97]	symulacja Monte Carlo z atakiem wielokrotnym
glukoamylaza z <i>Rhizopus niveus</i>	maltozooligosacharydy; 25°C; pH 4,5 ÷ 5,2 [134]	atak losowy
glukoamylaza	35% maltodekstryna; pH 4,5 [69]	kinetyka Michaelisa-Menten z inhibicją kompetycyjną produktem
α -amylaza z <i>Bacillus sp.</i> typ IIA (Sigma)	skrobia ziemniaczana (Aldrich); 20°C; pH 4,5 [155]	model zakładający rozróżnienie „typów” podjednostek glukozy w układzie; opis kinetyki poprzez układ 6 równań

Tab. 1.4. Ciąg dalszy.

Enzym (enzymy)	Warunki eksperymentu [literatura]	Proponowany opis kinetyki reakcji
glukoamylaza z <i>Rhizopus delmar</i>	maltoza, skrobia Wako, skrobia Katayama; 50°C; pH 4,5 [71]	zmodyfikowane równanie Michaelisa-Menten z inhibicją produktami (parametry kinetyczne K_M i V_m zmieniają się liniowo w zależności od masy substratu)
endo-(1→3),(1→4)-β-D-glukanaza	β-glukan (masa 216 kDa oraz 413 kDa) [20]	symulacja <i>Monte Carlo</i> (pojedynczy atak losowy), określone stężenie „wykrywalnych” substratów: $W_d = W_o(1 + \alpha t)e^{-\alpha t}$
α-amylaza z <i>Bacillus licheniformis</i> ; izoamylaza z <i>Pseudomonas amyloclavata</i>	amylaza i amylopektyna; 50°C; pH 6,0 [106,107]	model Michaelisa-Menten rozpatrujący cztery typy reakcji przebiegających w roztworze i zakładający inhibicję niskocząsteczkowymi produktami reakcji
α-amylaza z <i>Bacillus subtilis</i> (Koch-Light 0394t); β-amylaza ze słodkich ziemniaków (Boehringer 15471)	dwie frakcje skrobi (1%); α-amylaza: 30°C; pH 5,5; β-amylaza: 30°C; pH 4,8 [47]	dwie pierwszorzędowe reakcje następcze: $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$ (atak pojedynczy, atak wielokrotny, atak na kilka łańcuchów)
α- i β-amylaza	slód; 35 ÷ 75°C [83]	układ reakcji równoległo-następczych dla nierozpuszczalnych i rozpuszczalnych składników
α-amylaza z <i>Bacillus subtilis</i> ; glukoamylaza	skrobia ziemniaczana; 30°C; pH 5,25 [37]	przyrost rozpuszczalnych cukrów: $\frac{d[G]}{dt} = \frac{V_m ([S_0] + [S])}{K_m (1 + \frac{[G]}{K_i}) + ([S_0] + [S])}$
β-amylaza (zakupiona w BDH Ltd.) pullulanasa z <i>Aerobacter aerogenes</i>	skrobia ziemniaczana wstępnie zhydrolizowana α-amylazą [87]	wielomian piątego stopnia: $f(x) = x^5 + ax^4 + bx^3 + cx^2 + dx + e$
α-amylaza (Miles-Taka-Therm L-170) z <i>Bacillus licheniformis</i> ; glukoamylaza (Diazyme L-200)	mąka z manioku; 85 ÷ 100°C; pH 5,2 ÷ 7,0 [145]	rozszerzenie modelu kinetycznego Smith'a (1970): $\frac{dC_r}{dt} = -K \cdot (C_r)^n$
endo-β-1,4-glukanaza* exo-β-1,4-glukanaza† β-glukozydaza‡	celuloza [102]	model bazujący na kinetyce Michaelisa-Menten, uwzględniający atak losowy, inhibicję produktami końcowymi reakcji oraz występowanie trzech typów enzymów w układzie
endo-β-1,4-glukanaza z <i>Thichoderma reesei</i> exo-β-1,4-glukanaza z <i>Thichoderma reesei</i>	mikrokryształy celulozy; 40°C; pH 4,8 [92]	model zakładający prawdopodobieństwo zajścia ataku fałszywego P_f : $\frac{G}{G_2} = \frac{2 \cdot P_f + 1}{DP - P_f - 0,5}$

* endo-β-1,4-glukan 4-glukanohydrolaza (EC 3.2.1.4)

† 1,4-β-D-glukan cellobiohydrolaza, cellobiohydrolaza, exoglukanaza (EC 3.2.1.91)

‡ β-D-glukozydowa glukohydrolaza (EC 3.2.1.21)

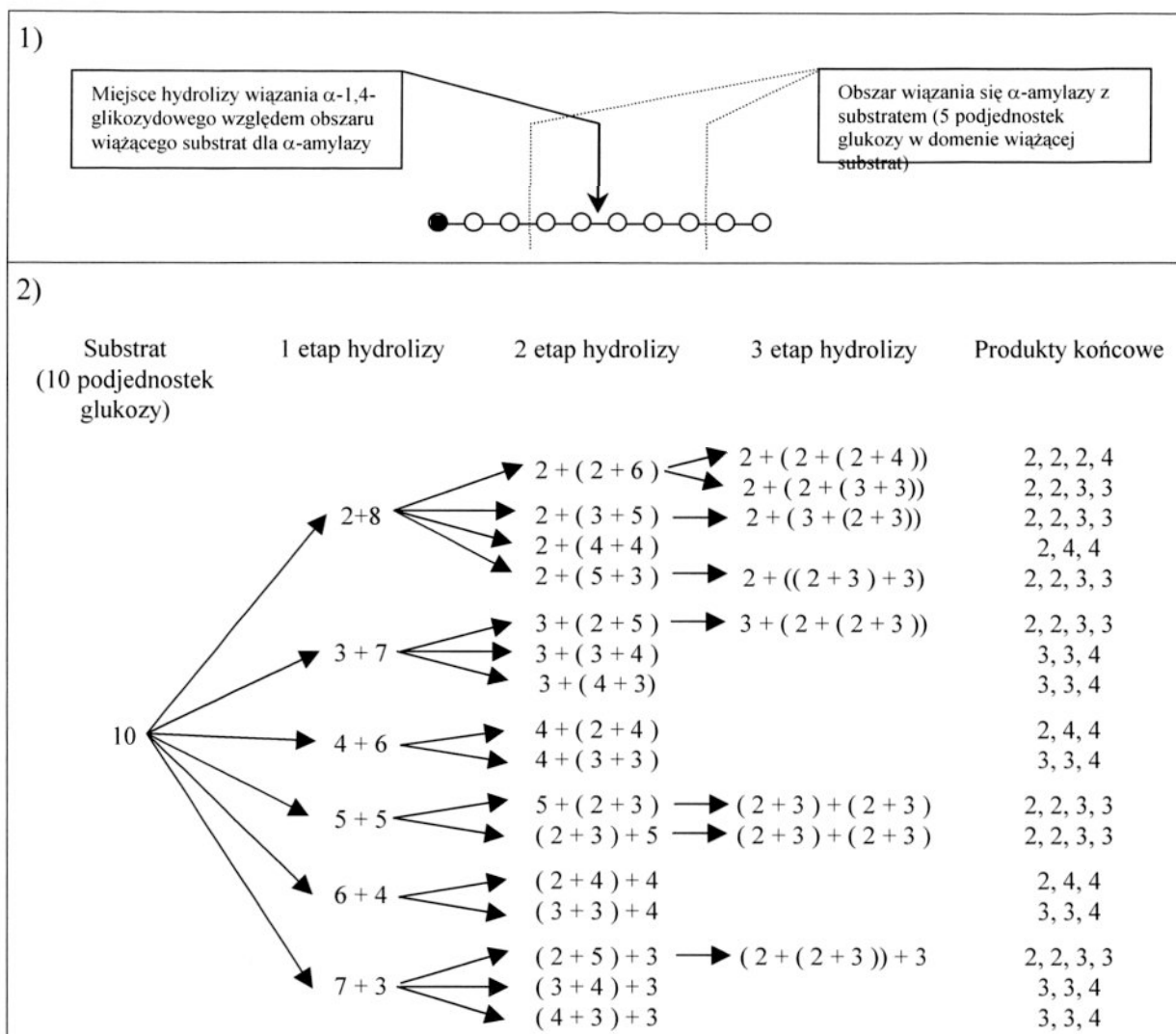
Większość przedstawionych w tabeli 1.4. opisów reakcji zakłada jednorodność substratu* oraz powstawanie jednego produktu. Tym samym nie są rozróżniane różne frakcje substratów oraz produktów pośrednich powstających w reakcji, a w przypadku wystąpienia kilku „klas” produktów, nie umożliwiają one wyznaczenia ich udziałów w mieszaninie reakcyjnej. Także opisy reakcji multienzymatycznych nie określają zakresu współpracy między enzymami oraz nie podają wpływu zmiany proporcji stężeń enzymów w układzie na skład produktu końcowego. Opracowane równania kinetyczne niejednokrotnie związane są ze ściśle określonym układem preparat enzymatyczny - substrat oraz stosowaną metodyką pomiarów† [20, 109, 114, 139, 124].

Generalnie spotykane w literaturze modele kinetyczne przyjmują uproszczony zapis procesu enzymatycznej kinetyki reakcji degradacji biopolimerów zakładając ich jednoetapowość [130, 160] lub opisując ich przebieg poprzez szereg reakcji następnych [83]. W rzeczywistości enzymatyczna degradacja biopolimerów jest procesem współbieżnym, w którym zachodzi szereg reakcji równoległo-następczych [150]. Nawet jeśli rozpatrzmy reakcję hydrolizy liniowego polisacharydu (maltodekanozy) złożonego z dziesięciu podjednostek glukozy pod wpływem α -amylazy przebiegającej wg schematu na rys. 1.1. widzimy, że reakcja może potoczyć się wieloma drogami z utworzeniem różnych produktów pośrednich i końcowych.

Drugim uproszczeniem jest wzmiankowane przyjęcie jednorodności substratu. W praktyce biopolimery naturalne są na ogół zbiorem cząsteczek o różnej masie cząsteczkowej i o różnym stopniu usieciowania w przypadku cząsteczek rozgałęzionych. Tym samym proces powinien być rozpatrywany jako reakcja multisubstratowa, w którym następuje określony rozkład wielkości (masy) cząsteczek substratu.

* W przypadku skrobi niektórzy autorzy zakładają występowanie dwóch frakcji substratu [61, 162].

† Przykładowo, praca [100] opisuje *de facto* kinetykę uwalniania wolnych końców redukujących w cząsteczkach skrobi oznaczanych w reakcji z DNS [85], podczas gdy w [20] opisano kinetykę degradacji cząsteczek skrobi wiążących się z Callofluorem.



Rys. 1.1. Schemat hydrolizy cząsteczki amylozy (maltodekanozy) przy udziale α -amylazy.

1). Przykładowy schemat wiązania się α -amylazy do substratu. Na rysunku przyjęto, że domena wiążąca α -amylazy asocjuje z pięcioma kolejnymi podjednostkami glukozy, a hydroliza wiązania α -1,4-glikozydowego następuje w domenę wiążącą, między drugą, a trzecią podjednostką glukozy licząc od końca redukującego w łańcuchu polocukru.

2). Możliwe warianty reakcji hydrolizy łańcucha amylopektyny zawierającego 10 podjednostek glukozy przy udziale α -amylazy o preferencjach substratowych zdefiniowanych na rys. 1.1. Przyjęto, że hydroliza wiązania następuje jedynie, gdy cała domena wiążąca α -amylazy związana jest z substratem. Na rysunku zaznaczono liczbę podjednostek glukozy w polocukrach (2 - maltoza, 3 - maltotrioza, 4 - maltotetroza, itd.)

Przykładowe sposoby opisu układów multisubstratowych przedstawiono w tabeli 1.5. Najczęściej wykorzystywanymi do opisu kinetyki reakcji są: równanie empiryczne, równanie multisubstratowe Michaelisa-Menten oraz modele wykorzystujące metodę *Monte Carlo* opisującą prawdopodobieństwo zajścia poszczególnych reakcji [21, 140].

Tab. 1.5. Sposoby opisu reakcji multisubstratowych.

Proponowany opis kinetyki reakcji	Uwagi
równanie multisubstratowe Michaelisa-Menten, model ogólny rozróżniający wszystkie typy substratów, które występują w układzie [25, 155] $r_i = \frac{\left(\frac{V_{\max,i}}{K_{m,i}}\right) \cdot C_{S_i}}{1 + \sum_{j=1}^N \frac{C_{S_j}}{K_{m,j}}}, i = 1, 2, \dots, N$	rozróżniane są wszystkie „typy” cząsteczek substratów; kinetykę hydrolizy każdego „typu” substratu opisują niezależne stałe kinetyczne
równanie empiryczne zakładające istnienie określonej liczby frakcji substratu [122] $c_S = c_{S0} \cdot x_1 \cdot e^{-k_1 \cdot c_E \cdot t} + c_{S0} \cdot x_2 \cdot e^{-k_2 \cdot c_E \cdot t} + \dots + c_{S0} \cdot x_i \cdot e^{-k_i \cdot c_E \cdot t}$ $\sum_{j=1}^i x_j = 1$	zakłada się istnienie określonej liczby frakcji substratów, dla których wyznacza się stałe kinetyczne opisujące prędkość degradacji danej frakcji (analogicznie do opisu rozpadu promieniotwórczego mieszaniny izotopów)
sztuczna sieć neuronowa (algorytmy PLS2 oraz PCR), opis układu wieloskładnikowego [9]	metody numeryczne polegające na tworzeniu „powiązań” pomiędzy zadanymi wektorami zmiennych (punktami doświadczalnymi)
analiza kłasterowa [65]	
model kinetyczny „fuzzy logic”, opis układu enzymatycznego poprzez szereg warunków („if” ... „then” ...) [73]	układ opisuje się poprzez nałożenie szeregu warunków opisujących „lokalnie” zachodzące reakcje
metody <i>Monte Carlo</i> [76]	określane jest prawdopodobieństwo zajścia poszczególnych reakcji cząstkowych

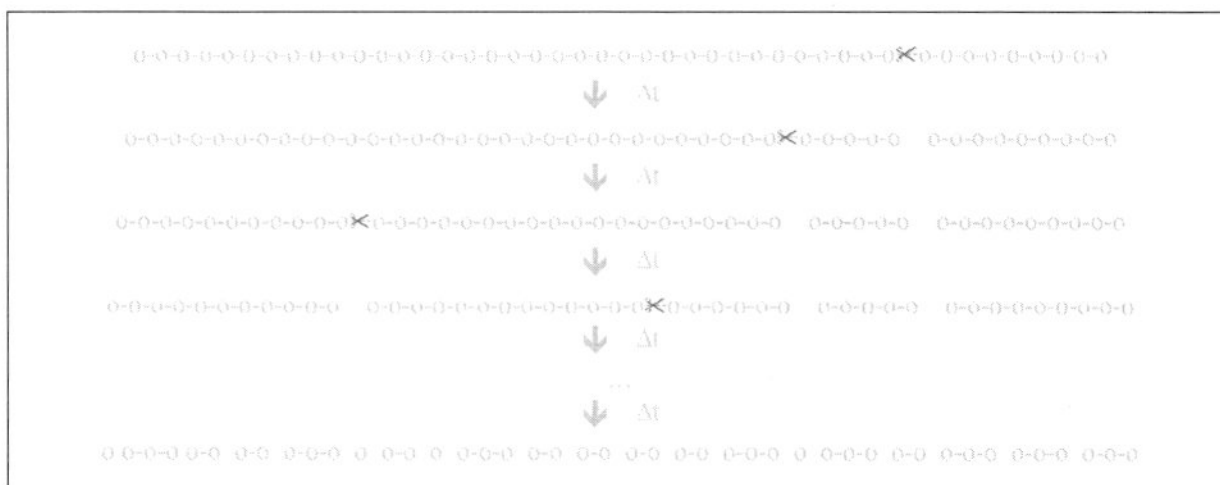
W przypadku opisu procesów degradacji biopolimerów multisubstratowe równanie empiryczne najczęściej stosuje się do opisu procesu hydrolizy enzymatycznej skrobi, gdzie dla uproszczenia rozróżnia się tylko dwie jej frakcje. Stosowanie równań multisubstratowych rozróżniających więcej frakcji lub opisujących stężenia wszystkich składników układu przy opisie procesów hydrolizy biopolimerów jest wysoce kłopotliwe nawet w przypadku biopolimerów niskocząsteczkowych. Przykładowo opis hydrolizy cząsteczki maltodekanozy przedstawionej schematycznie na rys. 1.1. pociąga za sobą konieczność rozwiązania układu kilkunastu równań kinetycznych opisujących możliwe etapy reakcji. Dla większych cząsteczek biopolimerów liczba pojedynczych równań kinetycznych może sięgać kilkuset tysięcy, dlatego poszukuje się alternatywnych metod opisanie układów multisubstratowych operujących mniejszą liczbą zmiennych. Jedną z takich metod jest stochastyczna metoda *Monte Carlo* omówiona w następnym podrozdziale.

1.3 Wykorzystanie metod *Monte Carlo* przy opisie reakcji degradacji biopolimerów

W przeciwieństwie do metod deterministycznych, opisujących układy przez np. podanie szeregu równań deterministycznych, metody *Monte Carlo* opisują układ w sposób stochastyczny poprzez określenie prawdopodobieństw zajścia pojedynczych reakcji cząstkowych [70, 104]. W przypadku opisu procesu enzymatycznej degradacji biopolimerów, można wyróżnić dwie zasadnicze grupy modeli wykorzystujących metody *Monte Carlo*:

- 1) modele *Monte Carlo*, w których w sposób losowy określa się cząsteczkę biopolimeru i miejsce w cząsteczce, względem którego zachodzi reakcja enzymatyczna [20]*,
- 2) modele *Monte Carlo*, w których w sposób losowy określa się prawdopodobieństwo zajścia reakcji (hydrolizy wiązania w cząsteczce biopolimeru) [113].

Przykład przedstawiający hydrolizę liniowego polimeru złożonego z 44 monomerów powiązanych 43 wiązaniami przedstawiono na rysunku 1.2. W najprostszym przypadku przyjmuje się, iż każde wiązanie między monomerami może być rozerwane w wyniku pojedynczego aktu hydrolizy zachodzącego w cyklicznych odstępach czasu Δt . Określenie hydrolizowanego wiązania w danym cyklu, możliwe jest w oparciu o metodę *Monte Carlo*, która w tym przypadku sprowadza się do losowego wyznaczenia „rozcinanego” wiązania (zaznaczonego na rys. 1.2. symbolem $\otimes$).



Rys. 1.2. Schemat hydrolizy liniowego biopolimeru - symbolem $\otimes$ (kolor czerwony) zaznaczono miejsce „cięcia” polimeru w danym etapie reakcji.

* Przykładową animację komputerową przedstawiającą „losową” hydrolizę wiązań w cząsteczce liniowego polimeru (hydroliza amylozy przy udziale α -amylazy) przedstawiono w załączniku.

Teoretyczne podstawy zastosowania stochastycznego opisu reakcji chemicznych zostały opublikowane w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych [104, 110], jednakże dopiero w latach siedemdziesiątych Gillespie [39] zaproponował zastąpienie stałych kinetycznych, prawdopodobieństwem zajścia reakcji na jednostkę czasu (w modelu w sposób losowy typowano reakcję przebiegającą w danym momencie; do opisu czasu reakcji użyto eksponentyjnego rozkładu gęstości). Mimo, iż zagadnienie stochastycznego opisu reakcji było podejmowane w wielu opracowaniach, do końca lat osiemdziesiątych większość prac miała charakter teoretyczny [70, 76, 89, 90, 110, 119, 123, 138] i rzadko była weryfikowana przez autorów w oparciu o większą pulę danych doświadczalnych. Wykorzystując metodę *Monte Carlo*, na początku lat dziewięćdziesiątych podjęto próby numerycznej symulacji procesu degradacji większych cząsteczek, w tym także procesu hydrolizy liniowych polisacharydów* [99, 113, 137]. Przykładowe zastosowania metody *Monte Carlo* przy opisie procesów enzymatycznej degradacji biopolimerów przedstawiono w tabeli 1.6.

Tab. 1.6. Przykładowe zastosowania metody *Monte Carlo* przy opisie procesów hydrolizy biopolimerów.

substrat	czynnik depolimeryzujący	opis stosowanej metody <i>Monte Carlo</i>
liniowe homopolimery o wzorze ogólnym $(C_6H_{10}O_5)_n$ (celuloza lub amyloza)	H_2SO_4 (hydroliza kwaśna w zakresie temperatur $90 \div 135^\circ C$)	liniowy substrat zapisywany jest jako <i>Markowian</i> [76], rozpatrywane są wszystkie wiązania w homopolimerze, w oparciu o generowany <i>quasilosowy</i> numer określa się czy dane wiązanie uległo rozerwaniu [113]
liniowy homopolimer (1→3),(1→4)-β-D-glukan z jęczmienia (Sigma No. Kat. 81H0472 $M_w = 216$ kDa oraz otrzymany laboratoryjnie $M_w = 413$ kDa)	<i>endo</i> -(1→3),(1→4)-β-D-glukanaza (EC 3.2.1.73)	cząsteczki substratu są w sposób losowy „cięte” na nowe cząsteczki substratu o mniejszej M_w (<i>random attack</i>); symulacja jest przerywana w momencie osiągnięcia zadanej liczby iteracji, osiągnięcia minimalnego stężenia „wykrywalnych” substratów, etc. [20]
skrobia ziemniaczana	<i>endo</i> -α-amylaza z trzustki wieprzowej (EC 3.2.1.1)	uwzględniano tylko cząsteczki amylozy i łańcuchy A w cząsteczkach amylopektyny (pominięto strukturę rozgałęzioną amylopektyny - „linearyzacja substratu”); założono atak wielokrotny przyjmując, że enzym „ślizga” się po substracie uwalniając kolejne cząsteczki produktów; określono prawdopodobieństwo dysocjacji produktywnego kompleksu enzym-substrat [97]

* W obydwu pracach symulacji dokonywano wykorzystując program napisany w *Fortranie*. Przyjęto, iż cząsteczka liniowego polimeru reprezentowana jest przez *łańcuch Markowa* [76, 157], względem którego losowo „przesuwa się” (*random walk*) czynnik depolimeryzujący, powodując hydrolizę wiązań [123].

Zastosowanie metod *Monte Carlo* do opisu procesu enzymatycznej degradacji biopolimerów umożliwia między innymi modelowanie reakcji multisubstratowych i współbieżnych, uwzględnienie wszystkich składników występujących w układzie oraz określenie chwilowych stężeń wszystkich reagentów [113, 124]. W oparciu o modele *Monte Carlo* opisywane są różnorodne układy monoenzymatyczne zawierające liniowe (lub „zlinearyzowane” [97]) cząsteczki substratów. Dyskusyjną sprawą jest pomijanie przez autorów wszystkich cytowanych prac poświęconych modelowaniu reakcji degradacji biopolimerów z wykorzystaniem metody *Monte Carlo* [20, 89, 97, 99, 110, 113, 119, 123, 138] oddziaływań inhibicyjnych mogących potencjalnie występować w układach [61, 99, 100, 101, 102, 121].

Aktualnie obserwuje się gwałtowny wzrost zainteresowania metodami *Monte Carlo*, czego przyczyn można upatrywać w gwałtownym rozwoju mikroelektroniki, gdyż nawet średniej klasy komputer osobisty obecnie umożliwia zapisanie w pamięci RAM układu zawierającego nawet kilka milionów monomerów oraz modelowanie przebieg skomplikowanych procesów stochastycznych [152]. Jednocześnie radykalnemu obniżeniu uległ czas wykonania obliczeń oraz koszty maszyn liczących. Dzięki swoim zaletom metody *Monte Carlo* są coraz częściej wykorzystywane do opisu i modelowania omawianych procesów oraz do uzyskania dodatkowych informacji o badanych układach [154, 156].

1.4. Podsumowanie przeglądu literaturowego

Przeważająca część spotykanych w literaturze modeli kinetycznych opisujących procesy enzymatycznej hydrolizy biopolimerów wprowadza uproszczenie zakładające jednorodność substratu oraz powstawanie w reakcji jednego produktu końcowego*. Przedstawione w tabeli 1.4. równania kinetyczne opisują jedynie procesy szczegółowe, natomiast nie został zdefiniowany model ogólny. W przypadku degradacji biopolimerów przy udziale *egzo*- i *endo*-hydrolaz przedstawione w rozdziale 1.2. równania deterministyczne nie pozwalają na określenie zmiany rozkładu koncentracji masowej poszczególnych polimerów, a jedynie opisują sumaryczne stężenie wszystkich polimerów w układzie. Brak jest modelu matematycznego odzwierciedlającego specyfikę procesu degradacji enzymatycznej biopolimerów, który umożliwiłby jednoczesne uwzględnienie:

- 📖 struktury substratu (struktura liniowa lub/oraz rozgałęziona [118, 175]),
- 📖 multisubstratowości reakcji oraz powstawania szeregu produktów końcowych i pośrednich [47, 61, 151],
- 📖 reakcji multienzymatycznych (proces hydrolizy skrobi przy udziale mieszaniny enzymów amylolitycznych [17]; proces degradacji celulozy przy udziale mieszaniny hydrolaz [24]),
- 📖 oddziaływań inhibicyjnych zachodzących w układzie (np. inhibicja *egzo*- β -glukanazy celobiozą uwalnianą w wyniku reakcji hydrolizy celulozy [92]).

* Założenie to uniemożliwia zastosowanie powyższych modeli do opisu wielu procesów technologicznych, takich jak proces upłynniania i scukrzania skrobi, gdzie uzyskiwany skład końcowy mieszaniny reakcyjnej decyduje o wykorzystaniu produktu reakcji [17, 120, 154].

2. Cele pracy

Celem pracy było opracowanie uniwersalnego modelu pozwalającego na opis i analizę procesów enzymatycznej degradacji biopolimerów za pomocą symulacji komputerowej. Ze względu na specyfikę procesu, szczególny nacisk w pracy postanowiono położyć na uwzględnienie struktury substratu (liniowa lub/oraz rozgałęziona) oraz możliwość rozpatrywania układów multisubstratowych, w których dopuszcza się zajście szeregu reakcji współbieżnych. Przyjęto, iż model powinien pozwalać na analizę zmian wszystkich stężeń chwilowych substratów, produktów pośrednich oraz produktów końcowych powstających w reakcji depolimeryzacji. Model ten powinien umożliwiać analizę układów multienzymatycznych powszechnie wykorzystywanych w procesach przemysłowych. Ponadto powinien cechować się dużą elastycznością i posiadać możliwość łatwej modyfikacji pozwalającej na uwzględnienie dodatkowych zjawisk towarzyszących poszczególnym procesom, takich jak np. dezaktywacja enzymu, inhibicja substratowa lub inhibicja produktami reakcji.

Przyjęto, iż opracowany model zostanie wykorzystany do opisu procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych. Za wyborem układu modelowego przemawiało:

- ↻ szerokie wykorzystywanie w przemyśle procesu enzymatycznej degradacji skrobi [17]),
- ↻ złożoność substratu (mieszanina polimerów o strukturze liniowej i rozgałęzionej [82]),
- ↻ charakter produktu (mieszanina oligosacharydów i dekstryn granicznych [47]),
- ↻ występowanie w procesie inhibicji kompetycyjnej [100] oraz interakcji pomiędzy enzymami (synergizm / konkurencja) [37, 127],
- ↻ multienzymatyczność (np. proces scukrzania i upłynniania skrobi przeprowadzane przy udziale mieszaniny *endo*- i *egzo*-amylaz [177]),
- ↻ brak modeli matematycznych uwzględniających złożoność procesu,
- ↻ dostępność danych kinetycznych opisujących omawiany proces z udziałem różnych preparatów enzymatycznych.

3. Model iteracyjny enzymatycznej hydrolizy biopolimerów

3.1. Ogólne założenia modelu

1. Przyjmuje się, że substratem w reakcji enzymatycznej hydrolizy biopolimerów są monomery tworzące wiązania chemiczne, potencjalnie podatne na atak enzymatyczny.
2. Reprezentatywna próbka substratu składa się z zadeklarowanej liczby cząsteczek o przyjętej strukturze, z których każda posiada określoną liczbę wiązań pomiędzy monomerami biopolimeru. Model nie nakłada ograniczeń na liczbę rozpatrywanych w układzie cząsteczek merów oraz enzymów. Dopuszcza się rozpatrywanie układów zawierających cząsteczki enzymów o różnych preferencjach substratowych i o różnym mechanizmie działania.
3. Czas trwania reakcji jest dyskretny i składa się z następujących po sobie okresowo zderzeń enzymu z cząsteczkami merów występującymi w układzie. Rozróżniane są zderzenia aktywne (produktywne) prowadzące do hydrolizy wiązania pomiędzy sąsiednimi monomerami w cząsteczce biopolimeru oraz zderzenia nieaktywne (nieproduktywne) nie prowadzące do degradacji biopolimeru. Szczególnym przypadkiem zderzenia nieaktywnego rozpatrywanym w modelu jest zderzenie enzymu z cząsteczką inhibitora kompetycyjnego. W ogólnym przypadku czasy poszczególnych zderzeń mogą być różne.
4. W poszczególnych okresach reakcji zachodzi kontakt między enzymem a przypadkowym wiązaniem pomiędzy monomerami biopolimeru. Cząsteczka biopolimeru i hydrolizowane wiązanie określane jest w sposób losowy (metoda *Monte Carlo*). Zakłada się jednostajny rozkład prawdopodobieństwa zderzenia enzymu z danym biopolimerem względem liczby merów w nim zawartych (względem masy biopolimeru).
5. Prawdopodobieństwo rozerwania wiązań między monomerami tworzącymi biopolimer zależy od preferencji enzymu względem atakowanego wiązania. W szczególnym przypadku, gdy rozpatrywany jest kontakt enzymu z wiązaniem już rozerwanym, wartość prawdopodobieństwa wynosi zero (reakcja nie zachodzi).
6. Postęp reakcji określany jest sumą rozerwanych wiązań w cząsteczkach biopolimerów.
7. W przypadku układów wieloenzymatycznych dopuszcza się rozpatrywanie w danej chwili wielu procesów jednostkowych, w których uczestniczą poszczególne cząsteczki enzymów.

3.2. Parametry modelu

W modelu zdefiniowano parametry opisujące cząsteczki substratów (biopolimerów) oraz charakteryzujące enzymy. Zostały one przedstawione w tabelach 3.1 i 3.2. Przez pojęcie „odległość” rozumie się w modelu liczbę monomerów w danym fragmencie łańcucha. Numer iteracji n , związany jest z zapisem rekurencyjnym procesu depolimeryzacji.

Tab.3.1. Parametry modelu opisujące substrat (patrz rozdział 3.3.).

substrat	przykładowy biopolimer	parametry modelu opisujące substrat	przyjęte oznaczenia przy opisie modelu
liniowy	amylaza	średnia liczba monomerów w cząsteczce polimeru	$l_{g_{am}}$ ($l_{g_{am}} \in N$)
rozgałęziony (struktura drzewa [118])	amyllopektyna	średnia liczba monomerów w cząsteczce polimeru	$l_{g_{ap}}$ ($l_{g_{ap}} \in N$)
		stopień polimeryzacji [96]	DP ($DP \in N$; $DP < l_{g_{ap}}$)
mieszanina polimerów o strukturze liniowej i rozgałęzionej	skrobia	stosunek liczba cząsteczek polimeru o strukturze liniowej i rozgałęzionej	stosunek ten określają wprowadzone w modelu funkcja charakterystyczna A oraz funkcja rozgałęzień B
liczba i struktura cząsteczek biopolimeru określona jest poprzez zdefiniowaną modelu funkcję charakterystyczną i funkcję opisującą rozgałęzienia.			

Tab. 3.2. Parametry modelu opisujące cząsteczki enzymów (patrz rozdział 3.4.).

parametry modelu charakteryzujące enzym	
parametry opisujące kinetykę procesu	czas zderzenia aktywnego: t_{ak} ($t_{ak} \in R^+$) czas zderzenia nieaktywnego: t_{nak} ($t_{nak} \in R^+$) czas zderzenia z inhibicją kompetycyjną: t_{ik} (szczególny przypadek zderzenia nieaktywnego prowadzący do utworzenia odwracalnego kompleksu enzym - inhibitor kompetycyjny), ($t_{ik} \in R^+$)
parametry modelu opisujące preferencje substratowe enzymu	odległość podatnych na atak enzymatyczny wiązań od końców biopolimeru (polimer liniowy i rozgałęziony) odległość podatnych na atak enzymatyczny wiązań od punktów rozgałęzienia biopolimeru (polimer rozgałęziony)
czas przebywania cząsteczki enzymu w układzie: t_e ($t_e \in R^+$)	
liczba cząsteczek enzymów w układzie modelowym: ne ($ne \in N$)	
numer porządkowy cząsteczki enzymu (umożliwia rozróżnienie cząsteczek enzymów w układzie modelowym): ξ ($\xi \in [1..ne]$)	

Przyjmuje się, że w rozpatrywanym układzie istnieje skończona liczba monomerów $lg_{całk}$ oraz cząsteczek enzymów ne . Parametrem odpowiadającym czasowi reakcji jest w modelu *dyskretny czas reakcji* t_R , który określany jest w sposób iteracyjny na podstawie zależności:

$$t_{R_n} = \frac{1}{ne} \sum_{\xi=1}^{ne} (t_{e_n})_{\xi} ; (t_{R_n} \in R^+),$$

gdzie t_e jest czasem przebywania cząsteczki enzymu o numerze porządkowym ξ w układzie. W modelu przewidziano możliwość wprowadzenia dodatkowych parametrów pozwalających na uwzględnienie m. in. typu ataku enzymatycznego oraz występujących w układzie innych oddziaływań inhibicyjnych.

3.3 Opis cząsteczek substratów

3.3.1. Polimery liniowe

W pracy przyjęto, że podjednostki monomerów w cząsteczkach biopolimerów będą przedstawiane symbolicznie jako strzałki. W celu odróżnienia od znaków powszechnie przyjętych w notacji chemicznej, przyjęto że dla wyróżnienia podjednostki monomerów będą oznaczane jako *strzałki z podwójnym beltem*: „ $\Rightarrow$ ”. Wybrano arbitralnie, że zwrot strzałek będzie zgodny z kierunkiem degradacji biopolimeru pod wpływem *egzo*-hydrolaz. Koniec biopolimeru podatny na atak *egzo*-hydrolaz oznaczono literami NRE, koniec biopolimeru nie ulegający hydrolizie pod wpływem działania *egzo*-hydrolaz oznaczono symbolem RE*. Przy numerowaniu podjednostek monomerów w cząsteczce polimeru, przyjęto numerację od końca RE w kierunku końca NRE, zaznaczając numer porządkowy nad strzałką symbolizującą podjednostkę monomeru. Numerowane są wszystkie podjednostki monomerów w układzie, poprzez przypisanie im kolejnych liczb naturalnych począwszy od liczby jeden. Przyjęto także, iż pojedyncza cząsteczka monomeru posiada także końce NE i NRE, które mogą być „wolne” lub zaangażowane w tworzenie wiązań pomiędzy poszczególnymi monomerami.

* Proponowany zapis jest zgodny ze zwyczajową konwencją stosowaną przy opisie amylopektyny, gdzie symbolem NRE oznacza się koniec nieredukujący (*nonreducing end*), a symbolem RE koniec redukujący (*reducing end*).

Orientacja końców RE i NRE w wolnym monomerze, jest analogiczna do orientacji końców w monomerach zawartych w polimerze liniowym. W przypadku syntezy biopolimeru wiązanie chemiczne tworzy się pomiędzy końcami RE i NRE „scalanych” monomerów.

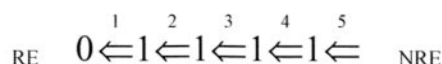
W celu opisanie wiązań między cząsteczkami monomerów, w oparciu o pojęcie *łańcucha Markowa* [91], wprowadzono binarną *funkcję charakterystyczną* A zdefiniowaną następująco:

1. Każdemu monomerowi n , zostaje przypisana binarna wartość zero lub jeden, określająca czy tworzy on wiązanie z innym monomerem poprzez koniec RE: $A \in (0,1)$.
2. Wartość zero przyjmuje funkcja dla danego monomeru n , jeśli posiada on niezwiązany koniec RE: $A_n = 0$.
3. Wartość równą jedności przyjmuje funkcja dla danego monomeru n , jeśli jest on połączony wiązaniem chemicznym poprzez koniec RE z innym monomerem: $A_n = 1$.
4. Monomerowi o numerze porządkowym $n = 1$, zostaje przypisana wartość funkcji równa zero: $A_1 = 0$.

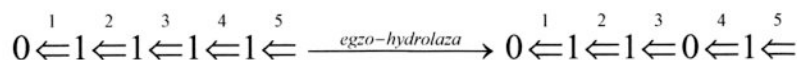
Zdefiniowana funkcja charakterystyczna umożliwia między innymi:

- * określenie liczby cząsteczek merów w układzie - odpowiada ona liczbie monomerów w układzie, dla których wartość funkcji charakterystycznej A przyjmuje wartość zero,
- * określenie liczby wiązań pomiędzy wszystkimi cząsteczkami merów występującymi w układzie - odpowiada ona liczbie monomerów w układzie, dla których wartość funkcji charakterystycznej A przyjmuje wartość jeden,
- * określenie ilości merów występujących w danej cząsteczce biopolimeru.

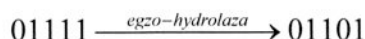
W dalszej części pracy przyjęto, że w schematycznym opisie cząsteczki polimeru, wartość opisanej powyżej funkcji charakterystycznej będzie zapisywana dla danego monomeru w miejscu wskazanym przez grot strzałki symbolizującej podjednostkę glukozy. Zgodnie z zaproponowanymi zasadami, cząsteczkę polimeru złożoną z pięciu podjednostek można przedstawić symbolicznie jako:



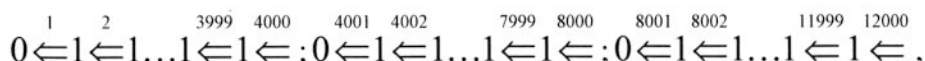
Przedstawiona konwencja notacji umożliwia także zapis reakcji depolimeryzacji. Przykładowo, hydrolizę powyższej cząsteczki przy udziale *egzo-hydrolazy* z uwolnieniem dimeru można zapisać następująco:



W przypadku polimeru liniowego, w oparciu o zaproponowaną funkcję charakterystyczną, można sprowadzić zapis reakcji do zapisu binarnego. Omawianą powyżej reakcję można zapisać jako:



Proponowana konwencja umożliwia także zapis układu zawierającego mieszaninę cząsteczek biopolimerów. Przykładowo, trzy cząsteczki biopolimerów liniowych zbudowanych z 4000 monomerów każda, można przedstawić symbolicznie jako:



co odpowiada, przy przyjętej notacji binarnej, zapisowi:



Sumaryczna liczba monomerów w układzie podawana jest poprzez liczbę $lg_{\text{całk}}$, natomiast liczba cząsteczek liniowych i ich wielkość określana jest przez funkcję charakterystyczną A . Parametr lg_{am} określa średnią liczbę monomerów w biopolimerze.

3.3.2. Polimery rozgałęzione

Polimery rozgałęzione zdefiniowano w pracy opierając się na modelu zakładającym analogię strukturalną cząsteczki biopolimeru rozgałęzionego do struktury drzewa [151]. W cząsteczce biopolimeru rozgałęzionego rozróżniono trzy typy łańcuchów*:

- *łańcuch C* - składa się z powiązanych w sposób liniowy monomerów, wyróżniane są dwa końce RE i NRE. Obrazowo można przedstawić łańcuch C jako pień drzewa.

* Przyjęte nazwy łańcuchów zgodne są ze zwyczajowymi oznaczeniami stosowanymi przy opisie cząsteczek amylopektyny [17, 18, 118]. W załączniku przedstawiono w formie graficznej wybrane modele struktury amylopektyny wyróżniające poszczególne typy łańcuchów.

- *łańcuchy B* - składają się z powiązanych w sposób liniowy monomerów. Końce RE łańcuchów B są związane z łańcuchem C lub innymi łańcuchami B, tworząc *punkty rozgałęzienia*. Końce NRE są wolne. W strukturze drzewa odpowiadają one konarom.
- *łańcuchy A* - składają się z powiązanych w sposób liniowy monomerów. Analogicznie jak w przypadku łańcuchów B, końce RE łańcuchów A są związane z łańcuchem C lub łańcuchami B poprzez punkty rozgałęzienia. W przeciwieństwie jednak do łańcuchów B, do łańcuchów A nie są przyłączone kolejne łańcuchy. W stosowanej analogii do drzewa, łańcuchy A odpowiadają gałęziom.

W pracy dodatkowo przyjęto rozróżnienie na łańcuchów na podrzędne i nadrzędne, przyjmując następującą definicję: „łańcuch *X* jest podrzędny względem łańcucha *Y*, jeżeli jest on przyłączony w punkcie rozgałęzienia do liniowego łańcucha *Y*; tym samym łańcuch *Y* jest nadrzędny wobec łańcucha *X*”. Liczba monomerów w poszczególnych łańcuchach jest nieograniczona. Przyłączenie łańcucha podrzędnego do łańcucha nadrzędnego, odbywa się poprzez utworzenie wiązania chemicznego pomiędzy końcem RE monomeru zawartego w łańcuchu podrzędnym a specyficznym miejscem w monomerze w łańcuchu nadrzędnym (jest ono różne od końca RE i NRE). Odległości pomiędzy punktami rozgałęzienia określone są przez liczbę DP. Z przyjętego opisu wynika, iż polimer rozgałęziony posiada jeden koniec RE oraz końce NRE, których liczba odpowiada sumie łańcuchów ilości A, B i C.

W celu zachowania zgodności z zaproponowanym wcześniej sposobem oznaczania schematycznego cząsteczek polimerów, przyjęto że podjednostki monomerów przyłączone bezpośrednio do łańcucha nadrzędnego, będą przedstawiane jako *strzałki z podwójnym beltem skierowane w dół*: „ $\Downarrow$ ”. Grot strzałki wskazuje na monomer w łańcuchu nadrzędnym, do którego w punkcie rozgałęzienia przyłączony jest łańcuch podrzędny. Przy numerowaniu podjednostek monomerów, przyjęto iż będą im przypisywane numery począwszy od końca RE w kierunku końców NRE, zaznaczając numer jej nad strzałką symbolizującą podjednostkę glukozy. Numerowane są kolejno podjednostki glukozy w łańcuchu „głównym” C, następnie numerowane są podjednostki w łańcuchu B, który jest najbliżej końca RE łańcucha C. W następnym etapie numerowane są kolejno podjednostki glukozy w łańcuchach podrzędnych względem łańcucha B, poczynając od miejsca ich przyłączenia do łańcucha nadrzędnego.

Procedura ta jest powtarzana dla kolejnych łańcuchów A i B w kierunku końca NRE łańcucha C.

Przykładowo cząsteczkę biopolimeru rozgałęzionego zbudowaną z 54 podjednostek monomerów (zawierającą dwudziestopodjednostkowy łańcuch C z przyłączonymi dwoma łańcuchami B, z których każdy posiada po jednym przyczepionym łańcuchu A) można przedstawić w formie zaprezentowanego poniżej schematu:



Nazwijmy łańcuch zawierający podjednostki monomerów o numerach porządkowych 1÷20 łańcuchem C, łańcuch zawierający podjednostki monomerów 21÷33 łańcuchem B₁, łańcuch zawierający podjednostki monomerów 34÷40 łańcuchem A₁, łańcuch zawierający podjednostki 41÷49 łańcuchem B₂ oraz łańcuch zawierający podjednostki 50÷55 łańcuchem A₂.

Jak łatwo zauważyć z powyższego schematu, zaprezentowana przykładowo cząsteczka biopolimeru, posiada jeden koniec RE (przy pierwszej podjednostce glukozy), pięć końców NRE (przy podjednostkach glukozy 20, 33, 40, 49 i 54) oraz cztery punkty rozgałęzienia (zlokalizowane przy podjednostkach 8, 12, 27 i 45). Wiązania chemiczne odpowiedzialne za tworzenie punktów rozgałęzienia występują między monomerami: 21-8, 34-27, 41-12 oraz 50-45.

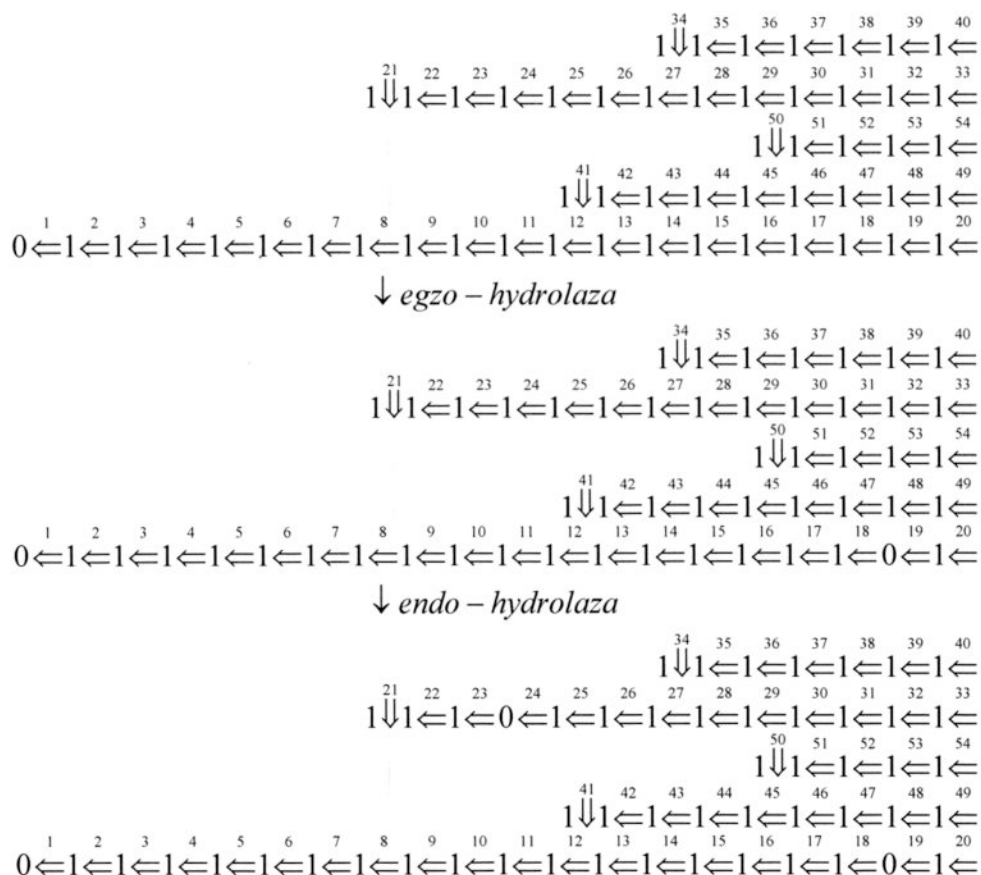
W celu opisanie struktury biopolimeru rozgałęzionego wprowadzono w pracy dodatkową funkcję B zdefiniowaną następująco:

1. Wartości funkcji opisującej rozgałęzienia B zawierają się w zbiorze liczb naturalnych z włączeniem wartości zero: $B \in (N \cup \{0\})$.
2. Funkcja przyjmuje wartość zero dla n -tego monomeru, jeśli posiada wolny koniec RE lub przynależny jej koniec RE uczestniczy w tworzeniu struktury liniowej poprzez utworzenie wiązania chemicznego z końcem NRE w poprzedzającym go monomerze: $B_n = 0$.

3. Funkcja przyjmuje wartość dodatnią* dla danego monomeru, jeżeli jest przyłączony bezpośrednio do niej łańcuch podrzędny w stosunku do liniowego łańcucha, w którym znajduje się dany monomer. Wartości funkcji przypisywany jest numer przyporządkowany monomerowi zawartemu w bezpośrednio przyłączonym łańcuchu podrzędnym: $B_n = n$.

W dalszej części pracy funkcję B nazwano *funkcją opisującą rozgałęzienia*. W przypadku opisu cząsteczek rozgałęzionych, opis funkcji charakterystycznej A nie ulega zmianie w porównaniu z definicją zawartą z rozdziale 3.3.1.

Założmy, że wspomniana w poprzednim przykładzie cząsteczka biopolimeru rozgałęzionego, ulega najpierw atakowi *egzo*-hydrolazy na wiązanie między monomerami 18 i 19 w łańcuchu C, a następnie pojedynczemu atakowi *endo*-hydrolazy na wiązanie pomiędzy monomerami 23 i 24 w łańcuchu B₁. Schematycznie możemy ten proces przedstawić następująco:



* W pracy nie uwzględniono opisu cząsteczek cyklicznych, jednakże istnieje możliwość rozszerzenia modelu uwzględniającego występowanie cyklopolimerów, poprzez rozszerzenie wartości funkcji B na zbiór liczb całkowitych i przyjęcie, że jej wartość ujemna oznacza iż dany monomer tworzy wiązanie z monomerem o niższym numerze n .

Jak widać, w wyniku tych dwóch reakcji cząsteczka została rozszczepiona na trzy mniejsze cząsteczki, z utworzeniem dwóch dodatkowych końców redukujących (podjednostki 19 i 24).

W pracy przyjęto ze każdemu monomerowi w układzie zostaje przypisana para liczb: pierwsza z nich odpowiada wartości funkcji charakterystycznej A , druga funkcji połączeń B określonej dla danego polimeru. Zgodnie z powyższym, omawiany przykład można zapisać jako:

$$\begin{aligned} &\{0,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,41\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,34\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,50\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\} \end{aligned}$$

$\downarrow$ *egzo – hydrolaza*

$$\begin{aligned} &\{0,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,41\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{0,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,34\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,50\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\} \end{aligned}$$

$\downarrow$ *endo – hydrolaza*

$$\begin{aligned} &\{0,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,41\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{0,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,0\};\{0,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,34\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\}; \\ &\{1,50\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\};\{1,0\} \end{aligned}$$

W opracowanym modelu miarą postępu reakcji jest zdefiniowana w pracy binarna funkcja charakterystyczna A . Zmiana jej wartości z jeden na zero odpowiada pojedynczemu procesowi hydrolizy wiązań między monomerami tworzącymi biopolimer. Sumaryczna liczba monomerów w układzie podawana jest poprzez liczbę lg_{calc} , ilość cząsteczek określa funkcja charakterystyczna A , natomiast strukturę cząsteczek funkcja opisująca rozgałęzienia B . Parametrem lg_{ap} określa się średnią liczbę monomerów w biopolimerze rozgałęzionym, natomiast o ilości punktów rozgałęzienia decyduje parametr DP.

3.4. Preferencje substratowe enzymów

Oddziaływanie enzymu z substratem zdefiniowane jest w modelu poprzez określenie parametrów czasowych opisujących czasy poszczególnych zderzeń oraz poprzez zadeklarowanie preferencji substratowych enzymu. W dalszej części pracy dopuszczono możliwość wprowadzenia także innych parametrów opisujących prawdopodobieństwo hydrolizy wiązania w przypadku ataku enzymu na „podatne” wiązanie między monomerami, narzucające dodatkowe warunki na zadeklarowane preferencje substratowe enzymu oraz parametrów związanych z modelowaniem mechanizmu ataku enzymatycznego.

W modelu wprowadzono pojęcie *czas zderzenia aktywnego* t_{ak}^* , przez które w pracy rozumie się długość cyklu, w wyniku którego dochodzi do właściwego procesu hydrolizy enzymatycznej, składającego się z szeregu etapów fizycznych i chemicznych (wiązanie substratu z enzymem, szereg reakcji enzymatycznych prowadzących do hydrolizy wiązań między monomerami, uwalnianie produktu z centrum aktywnego enzymu, dysocjacja enzymu i produktów [59]). Podobnie, przez *czas zderzenia nieaktywnego* t_{nak} rozumie się długość cyklu, w którym dochodzi do kontaktu enzymu z substratem oraz jego ponownego oddysocjowania bez zajścia reakcji hydrolizy wiązania między monomerami. W szczególności rozpatrywana jest możliwość kontaktu enzymu z określonym merem (inhibitorem kompetycyjnym) prowadząca do utworzenia odwracalnego kompleksu enzym-inhibitor kompetycyjny[†]. W tym przypadku nie zachodzi reakcja enzymatyczna, a *czas zderzenia z inhibicją kompetycyjną* t_{ik} jest dłuższy od *czasu zderzenia nieaktywnego* t_{nak} .

Preferencje substratowe dla każdego typu enzymu określane są poprzez zdefiniowanie wiązania podatnego na atak enzymatyczny oraz jego położenia w cząsteczce. Podatność wiązania na hydrolizę przy udziale danego enzymu określana jest poprzez podanie jego odległości od końców RE i NRE oraz punktów rozgałęzienia (przykład deklaracji parametrów modelu określających preferencje substratowe enzymów amylolitycznych przedstawiono w rozdziale 4, tabela 3.3.). Dla uproszczenia przyjmuje się, że w przypadku ataku enzymu na podatne wiązanie między monomerami prawdopodobieństwo hydrolizy wynosi 1. Dopuszcza

* Czas zderzenia aktywnego koresponduje z pojęciem liczby obrotów enzymu (ang. *turnover number*), będącym odwrotnością stałej k_3 w modelu Michaelisa-Menten [144].

† Animację komputerową przedstawiającą wpływ stężenia enzymu oraz inhibitora kompetycyjnego na szybkość reakcji enzymatycznej przedstawiono w załączniku.

się istnienie określonego meru, którego zaatakowanie przez enzym prowadzi do inhibicji kompetycyjnej.

W celu rozróżnienia cząsteczek enzymów, wszystkim cząsteczkom enzymów w układzie przyporządkowuje się numery porządkowe ξ , będące kolejnymi liczbami naturalnymi poczynając od liczby 1. Dodatkowo dla każdej cząsteczki enzymu w rozpatrywanym układzie obliczany jest w sposób dyskretny *czas przebywania enzymu w układzie* t_e , będący sumą czasów zderzeń aktywnych, czasów zderzeń nieaktywnych i czasów zderzeń z inhibicją kompetycyjną, w których uczestniczyła dana cząsteczka enzymu.

3.5. Algorytm symulacji

Ogólny schemat blokowy modelu enzymatycznej hydrolizy biopolimeru przedstawiono na rysunku 3.1. Wyróżniono na schemacie następujące bloki:

- 1) Nadanie wartości początkowych parametrom modelu:
 - a) Określenie substratu. Zadeklarowanie sumarycznej ilości wszystkich merów Ig_{calc} w rozpatrywanym układzie. Określenie ilości cząsteczek biopolimerów oraz ich struktury, poprzez przypisanie poszczególnym monomerom odpowiednich wartości funkcji charakterystycznej A oraz funkcji rozgałęzień B .
 - b) Określenie enzymu. Zadeklarowanie ilości cząsteczek enzymów w układzie ne oraz wartości czasów poszczególnych zderzeń oraz określenie preferencji substratowych enzymu. W przypadku rozpatrywania inhibicji kompetycyjnej, zadeklarowanie typu (typów) monomerów, z którymi zderzenie enzymu prowadzi do inhibicji. Parametrem określającym czas przebywania poszczególnych enzymów w układzie zostaje przypisana wartość zero.
 - c) Zerowanie numeru iteracji i wartości dyskretnego czasu reakcji: $n = 0$; $t_R = 0$.
- 2) Wyznaczanie czasu dyskretnego reakcji. W modelu przyjęto, że dyskretny czas reakcji t_R wyznaczany jest w oparciu o średnią arytmetyczną czasów przebywania wszystkich cząsteczek enzymów w układzie:

$$t_R = \frac{1}{ne} \sum_{\xi=1}^{ne} (t_e)_{\xi} .$$

W szczególności w przypadku rozpatrywania w układzie jednej cząsteczki enzymu ($ne = 1$), dyskretny czas reakcji odpowiada czasowi przebywania danego enzymu:

$$t_R = (t_e)_1 .$$

- 3) Określenie czy w układzie znajdują się cząsteczki (wiązania między monomerami) potencjalnie podatne na atak enzymatyczny. W sposób rekurencyjny począwszy od monomeru 2 do monomery lg_{catk} , w oparciu o preferencje substratowe dla rozpatrywanych w układzie enzymów, określana jest podatność substratu na atak enzymatyczny. Dla układów multienzymatycznych rozpatrywane są wszystkie rodzaje enzymów. W przypadku wykrycia przynajmniej jednego wiązania potencjalnie podatnego na atak enzymatyczny, zwiększany jest o jedność numer iteracji i proces symulacji jest kontynuowany. Brak podatnych wiązań na atak enzymatycznych utożsamiany jest z pełnym przereagowaniem substratu (koniec reakcji ⑩).
- 4) Określenie numeru porządkowego enzymu ξ , dla którego będzie rozpatrywany atak w danej iteracji. Przyjmuje się, że w danej iteracji rozpatruje się cząsteczkę enzymu, dla której wartość parametru t_e jest najniższa. W przypadku, gdy parametr t_e osiąga tę samą wartość dla kilku cząsteczek enzymów rozpatrywany jest enzym o przyporządkowanym najniższemu numerze porządkowym ξ . (Przykład wyznaczania dyskretnego czasu reakcji ② i określania kolejności rozpatrywania enzymów ④ przedstawiono dla układu zawierającego pięć cząsteczek enzymów przedstawiono w dodatku II).
- 5) Losowe określenie cząsteczki i wiązania w cząsteczce, które atakuje enzym. W sposób (pseudo)losowy (metoda *Monte Carlo* [89]) generowana jest liczba n o rozkładzie jednostajnym z przedziału od 1 do lg_{catk} ($n \in N$, $1 \leq n \leq lg_{catk}$). Liczba ta określa monomer, jego położenie w cząsteczce (funkcje A i B) oraz obecność wiązania zlokalizowanego przy końcu NR danego monomeru (wartość funkcji A_n).
- 6) Czy enzym hydrolizuje atakowane wiązanie? Określa się czy atakowane wiązanie odpowiada zadeklarowanym dla danego enzymu preferencjom susbtratowym. Przyjęto,

iż prawdopodobieństwo hydrolizy atakowanego wiązania w przypadku gdy odpowiada on preferencjom substratowym enzymu wynosi jeden.

- 7) Zderzenie aktywne. Odpowiada ono procesowi hydrolizy pojedynczego wiązania w cząsteczce biopolimeru, co w modelu wyrażane jest poprzez zmianę wartości funkcji charakterystycznej A dla danego monomeru:

$$(A_n)_{n-1} = 1 \rightarrow (A_n)_n = 0.$$

W przypadku ataku produktywnego na punkt rozgałęzienia zmianie ulega także funkcją opisująca rozgałęzienia B . Czas przebywania danego enzymu w układzie zwiększany jest o długość cyklu odpowiadającemu czasowi zderzenia aktywnego dla danego enzymu:

$$(t_e)_\xi \rightarrow (t_e)_\xi + (t_{ak})_\xi$$

- 8) Zderzenie nieaktywne. W modelu rozpatruje się, czy enzym nie zaatakował cząsteczki inhibitora kompetycyjnego. Jeśli tak, dochodzi do zderzenia nieproduktywnego z inhibicją kompetycyjną. Czas przebywania enzymu w układzie, zwiększany jest o długość cyklu odpowiadającego czasowi zderzenia z inhibicją kompetycyjną:

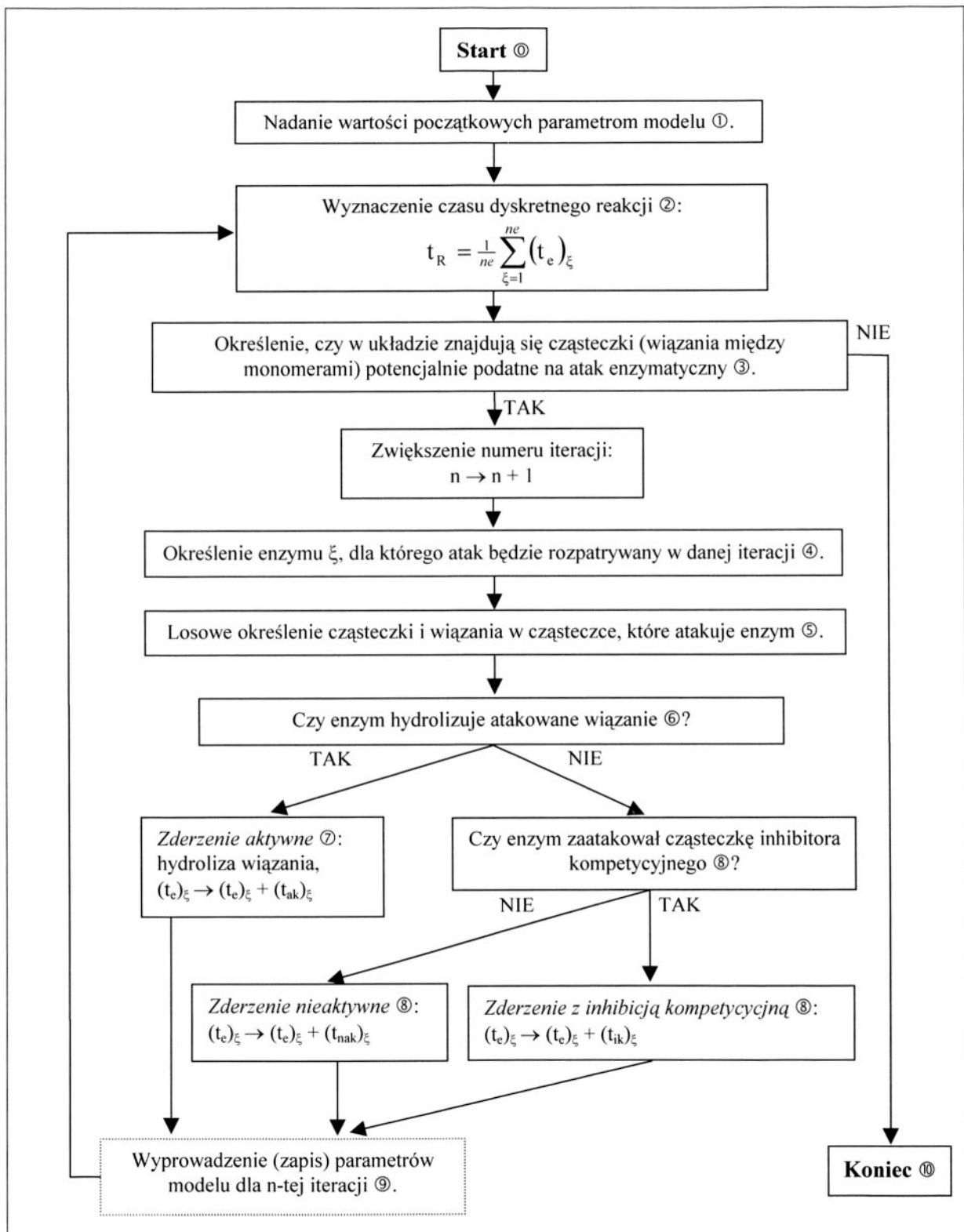
$$(t_e)_\xi \rightarrow (t_e)_\xi + (t_{ik})_\xi.$$

W przeciwnym razie zachodzi zderzenie nieaktywne, wyrażone zwiększeniem czasu przebywania enzymu w układzie o wartość t_{nak} :

$$(t_e)_\xi \rightarrow (t_e)_\xi + (t_{nak})_\xi$$

Przyjmuje się, że w obu przypadkach zderzeń nieaktywnych, nie zachodzi reakcja enzymatycznej hydrolizy, a wartości funkcji charakterystycznej A i funkcji opisującej połączenia B nie ulegają zmianie.

- 9) Zapis symulacji. W przypadku symulacji komputerowej wyprowadzane (zapisywane) są parametry modelu opisujące stan układu modelowego dla n -tej iteracji. Proces modelowania enzymatycznej hydrolizy biopolimeru kontynuowany jest od punktu ③.



Rys. 3.1. Ogólny schemat blokowy modelu enzymatycznej hydrolizy biopolimeru z uwzględnieniem inhibicji kompetycyjnej.

3.6. Rozszerzenia modelu

W pracy przewidziano możliwość modyfikacji modelu pozwalającej na uwzględnienie szeregu zjawisk i procesów, zarówno natury chemicznej jak i fizycznej. W tym celu wprowadza się dodatkowe parametry oraz nakłada się dodatkowe warunki na przedstawiony model ogólny. Możliwe jest koniunkcja prezentowanych w niniejszym rozdziale opcji, co umożliwia dostosowanie modelu iteracyjnego do opisu badanego zagadnienia. W tabeli 3.3. przedstawiono przykładowe możliwości adaptacji i rozbudowy modelu iteracyjnego przedstawionego w rozdziale 3.2. Uwzględniono najczęściej raportowane w literaturze [17, 61, 72, 100, 115, 118, 144, 154] zjawiska towarzyszące procesom enzymatycznej degradacji biopolimerów, a w tym w szczególności zjawiska towarzyszące procesom enzymatycznej hydrolizy skrobi.

Tab. 3.3. Przykładowe możliwości rozszerzenia modelu. Numery „w kółkach” odnoszą się do bloków schematu przedstawionego na rys. 3.1.

uwzględniane w modelu zjawisko (opis / komentarz)	rozszerzenie modelu
Zderzenie „dead end” - inhibicja nieodwracalna (W wyniku zderzenia cząsteczki enzymu z określonym inhibitorem dochodzi do jej „zatrucia” poprzez utworzenie nieodwracalnego kompleksu enzym-inhibitor. Stężenie cząsteczek enzymu zdolnych katalizować reakcje hydrolizy ulega zmniejszeniu. [131])	1. Przyjmuje się możliwość istnienia w układzie cząstek, z którymi kontakt enzymu prowadzi do nieodwracalnej dezaktywacji danej cząsteczki enzymu ①. 2. Rozpatrywana jest dodatkowo możliwość zderzenia enzymu z inhibitorem nieodwracalnym ⑤. W przypadku zderzenia z nim, następuje usunięcie cząsteczki enzymu z układu. Liczba cząsteczek enzymu w układzie maleje o jeden: $n_e \rightarrow n_e - 1$. 3. Dodatkowo rozpatruje się, czy w układzie są aktywne cząsteczki enzymu ③. Ich brak równoznaczny jest z końcem reakcji ⑥.
Dezaktywacja enzymu (W rzeczywistych układach fizycznych obserwuje się naturalny spadek ilości cząsteczek enzymów zdolnych przeprowadzać reakcję enzymatyczną [27]. W przeciwieństwie do zderzenia „dead end” jest to proces samorzutny, zachodzący nawet w przypadku gdy enzym nie uczestniczy w reakcji. Zależy on od wielu czynników fizycznych i chemicznych, takich jak np.: temperatura, pH roztworu, obecność białek stabilizujących, sposób immobilizacji enzymu. [5, 14, 15, 41, 45, 135, 160])	1. Zakłada się, że liczba cząsteczek enzymów w układzie ulega zmniejszeniu w miarę postępu reakcji. 2. Przyjmuje się funkcję określającą szybkość dezaktywacji enzymu (np. na podstawie ilości zderzeń aktywnych, w których uczestniczył dany enzym lub na podstawie czasu przebywania danego enzymu w układzie - <i>średni czas życia enzymu</i>). 3. Dodatkowo rozpatruje się, czy w układzie są aktywne cząsteczki enzymu ③. Ich brak równoznaczny jest z końcem reakcji ⑥.
Zmniejszenie liczby obrotów enzymu w trakcie reakcji (W trakcie reakcji enzymatycznej może dochodzić do naturalnego procesu „starzenia” się enzymu, objawiające się spadkiem maksymalnej szybkości reakcji. [122])	1. Dopuszcza się zwiększanie wartości czasu zderzenia aktywnego dla danego enzymu w miarę postępu reakcji ⑦. $\left((t_c)_z \right)_n \leq \left((t_c)_z \right)_{n+1}$
Uwzględnienie podatności poszczególnych wiązań na atak enzymatyczny (W standardowym modelu przyjęto dla uproszczenia, że w przypadku ataku enzymu na wiązanie odpowiadające preferencjom substratowym tego enzymu prawdopodobieństwo jego hydrolizy wynosi 1. W rzeczywistości można spodziewać się różnego rozkładu prawdopodobieństwa określającego podatność wiązań w substracie na atak enzymatyczny.)	1. Do modelu wprowadza się dodatkową funkcję określającą czy w przypadku ataku enzymu na wiązanie chemiczne odpowiadające jego preferencjom substratowym ⑤ zachodzi produktywnie ⑦, czy nieproduktywnie ⑧.

Tab. 3.3. Ciąg dalszy.

uwzględniane w modelu zjawisko (opis / komentarz)	rozszerzenie modelu
Uwzględnienie dostępności (steryczności) substratu, zróżnicowanie powinowactwa enzymu do substratu (W modelu założono liniowy rozkład prawdopodobieństwa ataku na poszczególne wiązania, jednakże można wyobrazić sobie inny rozkład prawdopodobieństwa, np. zakładający iż elementy skrajne będą częściej atakowane niż elementy leżące wewnątrz cząsteczki substratu. [173])	1. Przyjmuje się różny rozkład prawdopodobieństwa ataku enzymów na poszczególne wiązania w cząsteczkach biopolimerów (np. w funkcji odległości od końców cząsteczki) ③.
Reakcje nieenzymatyczne (Równolegle z procesem enzymatycznej depolimeryzacji w układzie może zachodzić szereg reakcji nieenzymatycznych wpływających na przebieg procesu. Spowodowane to może być np. wpływem czynników fizycznych lub zabrudzeniem preparatów stosowanych w reakcji.)	1. W modelu dopuszcza się istnienie reakcji przebiegających równolegle z reakcjami enzymatycznymi 2. Przyjmuje się, że co określoną iterację lub w określonych odstępach czasu t_R modeluje się dodatkową reakcję nieenzymatyczną. 3. Po każdym cyklu określa się, czy w układzie pozostały cząsteczki enzymów oraz wiązania podatne na atak danych enzymów ③.
Reakcje kondensacji (Enzymatycznemu rozkładowi biopolimerów mogą także towarzyszyć reakcje kondensacji (<i>reverse reactions</i>). Obserwowane są one szczególnie w ostatnim etapie procesu, gdzie występuje wysokie stężenie produktów reakcji, przy bardzo niskim stężeniu substratów. [98])	1. Zakłada się, że w układzie równolegle z procesem depolimeryzacji może zachodzić proces polimeryzacji. 2. W celu uwzględnienia możliwości kondensacji monomerów rozszerza się model, przyjmując iż w przypadku ataku enzymu na pojedynczy monomer ⑤ rozpatrywane jest prawdopodobieństwo jego kondensacji z innymi merami w układzie.
Zmiana ilości cząsteczek w układzie (W modelu uwzględniono możliwość symulacji procesów, w których następuje dodanie lub usunięcie określonego składnika z układu, takich jak np.: * wstępne upłynnianie skrobi przy udziale <i>egzo</i>-amylaz z późniejszym dodaniem enzymów scukrzających [177], * usuwanie produktów reakcji w celu osiągnięcia korzystniejszych warunków procesu.)	1. Przyjmuje się, że zarówno liczba merów w układzie $I_{g_{calc}}$ jak i liczba cząsteczek enzymów n_e w układzie może ulec zmianie. 2. Nakłada się w bloku ③ dodatkową możliwość usunięcia lub wprowadzenia do układu określonych cząsteczek. W przypadku wprowadzenia zmian, aktualizowane są odpowiednie parametry modelu. 3. Dodatkowo rozpatruje się, czy w układzie są aktywne cząsteczki enzymu ③. Ich brak równoznaczny jest z końcem reakcji ⑩.
Uwzględnienie wpływu czynników fizycznych na szybkość reakcji (Zgodnie z ogólną teorią zderzeń, przyjmuje się że czasy poszczególnych zderzeń cząsteczek są lub mogą być uzależnione od szeregu czynników fizycznych, takich jak np. temperatura, gęstość, bądź lepkość mieszaniny reakcyjnej.[27, 31, 77, 81, 94, 139, 141,149, 159])	1. Przyjmuje się, iż wartości czasów zderzeń t_{ak}, t_{nak}, t_{ik} mogą ulec zmianie w trakcie trwania procesu i są określoną funkcją dodatkowo rozpatrywanych parametrów modelu.
Określenie końca reakcji (W modelu przyjęto za koniec reakcji iterację, dla której w reprezentatywnej próbce substratu zostają wyczerpane wiązania podatne na atak enzymów. W niektórych procesach koniec reakcji utożsamia się z momentem, w którym ustala się równowaga między cząsteczkami substratów, a cząsteczkami produktów, lub z momentem w którym szybkość reakcji spada poniżej określonego poziomu.)	1. Odpowiedniej modyfikacji ulega blok ③, definiujący koniec reakcji. (Przykładowo koniec reakcji można rozpatrywać jako ustalenie się określonej proporcji między liczbą cząsteczek substratów i produktów reakcji lub można uzależnić przerwanie procesu symulacji od liczby kolejnych zderzeń nieaktywnych.)
Uwzględnienie zderzeń enzym-enzym (Generalnie w pracy przyjęto, że zderzenia enzym-enzym nie będą rozpatrywane, co wynika z faktu iż dla większości reakcji enzymatycznych $c_S \gg c_E$, jednakże w razie konieczności przewidziano możliwość uwzględnienia także tego rodzaju zderzeń w układzie. [74])	1. Przyjmuje się w bloku ⑤, iż określany w sposób pseudo(losowy) parametr n wyznaczany jest z przedziału od 1 do $I_{g_{calc}}+n_e-1$. Jeżeli wyznaczona wartość jest liczbą z przedziału od jeden do $I_{g_{calc}}$, to tak jak poprzednio odpowiada to zderzeniu enzymu z podjednostką glukozy, natomiast jeśli jest z przedziału od $I_{g_{calc}}+1$ do $I_{g_{calc}}+n_e-1$ to oznacza to zderzenie enzym-enzym. Zderzenie enzym-enzym traktowane jest jako zderzenie nieaktywne.

3.6.1. Inhibicja akompetycyjna i niekompetycyjna

W tabeli 3.4. przedstawiono modyfikacje modelu pozwalające na uwzględnienie inhibicji akompetycyjnej i niekompetycyjnej*. Rozpatrywanymi cząsteczkami inhibitorów mogą być zarówno cząsteczki substratów (inhibicja substratowa), jak i produktów pośrednich oraz produktów końcowych (inhibicja produktami reakcji).

Tab. 3.4. Rozszerzenie modelu - uwzględnienie inhibicji niekompetycyjnej i akompetycyjnej.

typ inhibicji (opis)	wprowadzane parametry modelu	rozszerzenie modelu
inhibicja akompetycyjna (inhibitor wiąże się wyłącznie z kompleksem enzym-substrat powodując spadek szybkości reakcji)	* t_{iak} - czas zderzenia z inhibicją akompetycyjną ($t_{iak} \geq t_{nak}$), * p_{iak} - prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej ($p_{iak} \in [0..1]$)	Modyfikowany jest blok ⑦ schematu przedstawionego na rys. 3.1. W przypadku ataku enzymu na wiązanie odpowiadające jego preferencjom substratowym: 1. w sposób (pseudo)losowy wyznaczana jest wartość parametru pomocniczego p ($p \in [0..1]$; $p \neq p_{iak}$), określającego czy do utworzeniu kompleksu aktywnego enzym-substrat przylączy się dodatkowo inhibitor. 2. jeżeli $p_{iak} < p$ to zderzenie jest traktowane jako <i>zderzenie aktywne</i> (enzym nie jest związany z inhibitorem), dochodzi do hydrolizy substratu w danym miejscu, zwiększany jest czas reakcji dla danego enzymu: $(t_c)_\xi \rightarrow (t_c)_\xi + (t_{ak})_\xi$, 3. jeżeli $p_{iak} > p$ to zderzenie jest traktowane jako <i>zderzenie aktywne z inhibicją akompetycyjną</i>, dochodzi do hydrolizy substratu w danym miejscu, zwiększany jest czas reakcji dla danego enzymu o czas trwania zderzenia aktywnego z inhibicją akompetycyjną: $(t_c)_\xi \rightarrow (t_c)_\xi + (t_{iak})_\xi$, Szczegółowy przykład modelu uwzględniającego inhibicję akompetycyjną przedstawiono w dodatku III.J.
inhibicja niekompetycyjna (inhibitor wiąże się z enzymem lub kompleksem enzym-substrat powodując spadek szybkości reakcji)	* t_{ink} - czas zderzenia z inhibicją niekompetycyjną ($t_{ink} \geq t_{nak}$)[†], * p_{ink} - prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej ($p_{ink} \in [0..1]$)	Modyfikowany jest blok ⑦ schematu przedstawionego na rys. 3.1. W przypadku ataku enzymu na wiązanie odpowiadające jego preferencjom substratowym: 1. w sposób (pseudo)losowy wyznaczana jest wartość parametru pomocniczego p ($p \in [0..1]$; $p \neq p_{nak}$), określającego czy inhibitor niekompetycyjny związany jest z enzymem lub kompleksem enzym-substrat, 2. jeżeli $p_{ink} < p$ to zderzenie jest traktowane jako <i>zderzenie aktywne</i> (enzym nie jest związany z inhibitorem), dochodzi do hydrolizy substratu w danym miejscu, zwiększany jest czas reakcji dla danego enzymu: $(t_c)_\xi \rightarrow (t_c)_\xi + (t_{ak})_\xi$, 3. jeżeli $p_{ink} > p$ to zderzenie jest traktowane jako <i>zderzenie aktywne z inhibicją niekompetycyjną</i>, dochodzi do hydrolizy substratu w danym miejscu, zwiększany jest czas reakcji dla danego enzymu o czas trwania zderzenia aktywnego z inhibicją niekompetycyjną: $(t_c)_\xi \rightarrow (t_c)_\xi + (t_{ink})_\xi$, 4. w szczególności w przypadku związania enzymu z inhibitorem niekompetycyjnym wydłużeniu może ulec także czas zderzenia nieaktywnego, Szczegółowy przykład modelu uwzględniającego inhibicję akompetycyjną przedstawiono w załączniku III.K.

* Wykresy obrazujące wpływ stężenia inhibitora i substratu na prędkość reakcji dla poszczególnych typów inhibicji przedstawiono w załączniku.

[†] Przypadek, gdy ($t_{ink} \geq t_{nak}$) można rozpatrywać jako wprowadzenie aktywatora.

3.6.2. Atak wielokrotny

W modelu przyjęto, iż po każdym akcie ataku enzymu na cząsteczkę substratu lub produktu dochodzi do jego oddysocjowania i ponownego ataku na inną cząsteczkę. Istnieje także inna możliwość, która zakłada że enzym ślizga się (ang. *sliding*) po cząsteczce [17, 97]. Sytuacja ta może zachodzić np. w przypadku *endo*-hydrolazy, które ślizgają się począwszy od jednego z końców cząsteczki uwalniając krótkie oligomery.

Aby opisać atak wielokrotny wprowadzono dodatkowy parametr: *prawdopodobieństwo ataku wielokrotnego*: p_{wak} , który opisuje zachowanie się enzymu, tj. czy enzym oddysocjowuje od substratu, czy atakuje kolejne wiązanie w danej cząsteczce. Teoretycznie czas jednego cyklu przy pojedynczym „cięciu” w przypadku ataku wielokrotnego powinien być krótszy niż w przypadku ataku pojedynczego, gdyż nie występuje zjawisko oddysocjowania enzymu od substratu i ponownej asocjacji enzym-substrat. Dlatego do opisu można wprowadzić także dodatkowy parametr czasu, który opisuje czas pojedynczego cyklu przy ataku wielokrotnym: t_{wak} . W tabeli 3.5 przedstawiono modyfikacje modelu pozwalające uwzględnić występowanie ataku wielokrotnego. Przykładowy schemat blokowy ataku wielokrotnego przedstawiono w dodatku III.L.

Tab. 3.5. Rozszerzenia modelu - atak wielokrotny.

typ ataku (opis)	wprowadzane parametry modelu	rozszerzenie modelu
pojedynczy atak łańcuchowy - <i>single chain attack</i> (Enzym „ślizga” się po cząsteczce, hydrolizując kolejne wiązania pomiędzy monomerami, aż do całkowitej degradacji biopolimeru liniowego lub napotkania punktu rozgałęzienia w przypadku polimerów rozgałęzionych.)	* p_{iak} - prawdopodobieństwo ataku wielokrotnego ($p_{wak} = 1$) * t_{wak} - czas ataku na pojedyncze wiązanie podczas ataku wielokrotnym ($t_{wak} \leq t_{ak}$),	W przypadku wystąpienia ataku produktywnego ⑦ w oparciu o wprowadzony parametr p_{wak} określona jest możliwość zajścia ataku wielokrotnego: 1. w sposób (pseudo)losowy wyznaczana jest wartość parametru pomocniczego p ($p \in [0..1]$; $p \neq p_{wak}$), 2. jeżeli $p_{wak} < p$ to przyjmuje się, iż zachodzi atak wielokrotny, atakowane jest kolejne wiązanie w danej cząsteczce. W przypadku gdy odpowiada ono preferencjom substratowym enzymu dochodzi do hydrolizy substratu w danym miejscu, zwiększany jest czas reakcji dla danego enzymu: $(t_e)_\xi \rightarrow (t_e)_\xi + (t_{wak})_\xi$, 3. przypadek gdy $p_{wak} > p$ utożsamiany jest z oddysocjowaniem enzymu od substratu.
wielokrotny atak łańcuchowy - <i>multiple chain attack</i> (Enzym „ślizgając” się po substracie uwalnia kolejne cząsteczki produktów. Istnieje możliwość oddysocjowania enzymu od hydrolizowanego łańcucha przed jego całkowitą degradacją).	* p_{iak} - prawdopodobieństwo ataku wielokrotnego ($p_{wak} \in [0..1]$) * t_{wak} - czas ataku na pojedyncze wiązanie podczas ataku wielokrotnym ($t_{wak} \leq t_{ak}$),	

4. Modelowanie procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi

Przedstawiony w rozdziale trzecim model ogólny enzymatycznej degradacji biopolimerów uściślono do opisu procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych. Skupiono się na analizie układów enzymatycznych, dla których dysponowano danymi doświadczalnymi.

4.1. Opis danych doświadczalnych

W pracy wykorzystano dane kinetyczne udostępnione przez panią dr Jolantę Bryjak z Zakładu Inżynierii Bioprocessowej Instytutu Inżynierii Chemicznej i Urządzeń Ciepłych Politechniki Wrocławskiej, określające przebieg enzymatycznej hydrolizy skrobi pod wpływem różnych enzymów amylolitycznych [14, 15, 16, 18, 54, 61, 67, 80, 85, 99, 100, 151, 153]. Zakres stężeń enzymów oraz skrobi, wraz z informacją o ilości serii pomiarowych dla każdego badanego układu enzymatycznego przedstawiono w tabeli 4.1. Aktywność amylaz^{*} mierzono określając kolorymetrycznie przyrost ilości cukrów zawierających koniec redukujący. Metodyka pomiaru opiera się na redukcji w środowisku kwaśnym kwasu 3,5-dinitrosalicylowego przez grupy aldehydowe lub ketonowe cukrów do kwasu 3-amino-5-nitrosalicylowego (reakcja z DNS [42, 85]). W obecności fenolu powstaje żółtawo-brunatny kompleks, który stabilizuje się roztworem pirosiarczanu sodowego i winianu sodowo-potasowego. Stężenie cukrów redukujących oznaczane było spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=550$ nm w oparciu o próbę kontrolną i przeliczane względem krzywej standardowej sporządzonej wcześniej dla roztworu glukozy. Szerszy opis analityki przedstawiono w załączniku.

Stosowaną nomenklaturę nazewnictwa cukrów i enzymów amylolitycznych oraz sposób wyrażania stężeń poszczególnych składników roztworu przyjęto zgodnie z cytowanymi pracami zawierającymi wykorzystane dane eksperymentalne.

^{*} Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach testu ($T=20^{\circ}\text{C}$, czas reakcji 3 min, optymalne pH) powoduje powstanie zabarwienia adekwatnego zabarwieniu uzyskanemu dla 1 mg glukozy.

Tab. 4.1. Zakres stężeń i liczba serii danych kinetycznych użytych do weryfikacji modelu enzymatycznej hydrolizy skrobi.

enzym		zakres stężeń enzymu	zakres stężeń substratu	liczba serii danych
α -amylaza immobilizowana na nośniku akrylowym		2,55 ÷ 47,5 [μ g/ml]	0,19 ÷ 24,28 [mg/ml]	18
natywna β -amylaza z jęczmienia		50 ÷ 400 [μ g/ml]	0,28 ÷ 29,55 [mg/ml]	24
β -amylaza z jęczmienia immobilizowana na nośniku akrylowym		30,0 ÷ 305,0 [μ g/ml]	2,33 ÷ 22,91 [mg/ml]	13
glukoamylaza z <i>Apergillus niger</i>		0,31 ÷ 2,83 [μ g/ml]	1,21 ÷ 48,56 [mg/ml]	16
synergizm	α -amylaza	0,15 ÷ 4,50 [μ g/ml]	4,55 ÷ 5,20 [mg/ml]	18
	glukoamylaza	45 ÷ 360 [μ g/ml]		

Przykładową serię danych doświadczalnych dla jednego stężenia enzymu i początkowego stężenia substratu przedstawiono w tabeli 4.2. Stężenie produktów c_P wyraża sumaryczne stężenie wszystkich cukrów powstałych w reakcji bez rozróżnienia masy (wielkości) uwalnianych produktów pośrednich i końcowych*. Ze względu na limitowaną objętość pracy, szczegółowej prezentacji wszystkich danych doświadczalnych dokonano w załączniku.

* W stosowanej w analizie reakcji z DNS [72, 85] oznacza się jedynie ilość końców redukujących (końców RE) obecnych w cząsteczkach cukrów. Ponieważ zarówno cząsteczki amylozy, amylopektyny, jak i wolnej glukozy posiadają po jednym końcu redukującym, liczba oznaczanych wolnych końców redukujących odpowiada, więc liczbie cząsteczek cukrów w układzie [100, 151].

Tab. 4.2. Przykładowe dane eksperymentalne opisujące degradację skrobi przy udziale α -amylazy z *Bacillus sp.* immobilizowanej na nośniku akrylowym ($c_{S0} = 19,00$ mg/ml; $c_E = 33,5$ μ g/ml).

czas [min:s]	cP [mg/ml]
0:00	0,00
0:14	0,34
0:32	0,88
0:53	1,59
1:12	2,13
1:57	3,47
3:06	5,29
5:00	7,42
7:09	9,50
7:43	9,58
10:04	11,33
14:55	13,47
19:57	14,51
30:00	16,43
40:05	16,69
50:00	17,19
59:37	17,43
83:00	18,43
130:00	18,83
140:00	18,99

4.2. Symulacja procesu hydrolizy skrobi

4.2.1. Opis programu

W oparciu o przedstawiony w rozdziale 3.5. algorytm opracowano program pozwalający na komputerową symulację omawianych zagadnień. Przy tworzeniu programu założono możliwość określenia podstawowych parametrów modelu, takich jak np. ilość cząsteczek substratów i enzymów w układzie modelowym, definiowanie substratu, wybór rodzajów enzymów, określenie czasu poszczególnych zderzeń oraz wyboru opcji symulacji

związanych np. z określeniem typu inhibicji. Przyjęto, że program będzie pracował w trybie tekstowym, generując plik z wynikami symulacji. Rozwiązanie takie umożliwiło importowanie wyników symulacji bezpośrednio do arkuszy kalkulacyjnych *Microsoft® Excel* i *KyPlot* [169], co pozwala na szybkie dokonanie niezbędnych przeliczeń (wyznaczanie stałych przeskalowania) i wizualizację danych.

Konstrukcja programu została przedstawiona w dodatku IV. Dodatkowo w załączniku zawarto omawiany program wraz z kodami źródłowymi (wersja w *TurboPascalu* 7.0 firmy *Borland* oraz *KickPascalu* 3.5 firmy *Maxon Computer GmbH*). Załączone kody źródłowe do programu zawierają niezbędne komentarze pozwalające na modyfikacje nie uwzględnionych w pierwotnej wersji programu.

W programie predefiniowano następujące enzymy: α -amylazę upłynniającą, α -amylazę scukrzającą, β -amylazę, glukoamylazę, pullulanazę i enzym usuwający rozgałęzienia. Wartości zadeklarowanych w programie parametrów modelu przedstawiono w rozdziale 4.2.2.

4.2.2. Określenie parametrów modelu dla procesu hydrolizy skrobi

W oparciu o dostępne źródła literaturowe [8, 20, 97, 108, 124, 158, 180] wyznaczono parametry modelu opisujące proces hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych - zostały one przedstawione w tabeli 4.3. Przyjęto, że merami są podjednostki glukozy powiązane wiązaniami α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowymi oraz α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowymi (punkty rozgałęzienia) [52, 100, 150, 175]. W układzie rozpatruje się mieszaninę dwóch polimerów wchodzących w skład skrobi: polimeru liniowego (amylozy) oraz polimeru rozgałęzionego (amylopektyny^{*}). Opis skrobi przedstawiono w dodatku I.A. Podział enzymów amylolitycznych oraz schemat ich działania przedstawiono w dodatku I.B. Animację komputerową przedstawiającą atak losowy oraz atak wielokrotny zawarto w załączniku. W przypadku deklaracji czasów poszczególnych zderzeń wymienione poprzednio źródła literaturowe podają jedynie stosunki czasów poszczególnych zderzeń. Dlatego w pracy do opisu dyskretnego czasu reakcji wprowadzono jednostkę [t'] przyjmując definicję, iż 1 t' odpowiada średniemu czasowi pojedynczego zderzenia aktywnego.

Tab. 4.3. Określenie parametrów modelu dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi ziemniaczanej przy użyciu enzymów amylolitycznych.

substrat	przyjęte parametry modelu
niskocząsteczkowa skrobia ziemniaczana firmy Sigma-Aldrich®	średnia ilość podjednostek glukozy w cząsteczce amylozy: $lg_{am} = 4000$ średnia ilość podjednostek glukozy w cząsteczce amylopektyny: $lg_{ap} = 7450$ stopień polimeryzacji dla amylopektyny: DP = 25 stosunek amylozy do amylopektyny: 30 : 70 %
enzymy amylolityczne	przyjęte założenia w modelu
α -amylaza	podatne na atak są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe leżące wewnątrz cząsteczek skrobi; przyjęto że α -amylaza nie ulega inhibicji kompetycyjnej; $t_{ak} \approx t_{nak}$
β -amylaza	podatne na atak są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe między drugą a trzecią podjednostką glukozy od końców NRE w cząsteczce skrobi; reakcja zostaje „zatrzymana na punktach rozgałęzienia”; inhibitorem kompetycyjnym jest dimer glukozy (maltoza) uwalniany jako produkt reakcji; $t_{ak} \approx t_{nak} \approx \frac{1}{2} \cdot t_{ik} \approx 2 \cdot t_{wak}$
glukoamylaza (hydrolizująca wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe)	podatne na atak są kolejne wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe począwszy od końców NRE w cząsteczce skrobi; reakcja zostaje „zatrzymana na punktach rozgałęzienia”; przyjęto że glukoamylaza nie ulega inhibicji kompetycyjnej; $t_{ak} \approx t_{nak}$
glukoamylaza (hydrolizująca wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe oraz α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe)	podatne na atak są kolejne wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe począwszy od końców NRE w cząsteczce skrobi; hydrolizowane są także wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe stanowiące końce NRE w cząsteczkach amylopektyny [66]; przyjęto że glukoamylaza nie ulega inhibicji kompetycyjnej; $t_{ak(1\rightarrow4)} \approx t_{nak} \approx 1/20 \cdot t_{ak(1\rightarrow6)}$
pullulanaza (enzym usuwający rozgałęzienia)	hydrolizowane są wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe wewnątrz cząsteczek amylopektyny; przyjęto że pullulanaza nie ulega inhibicji kompetycyjnej; $t_{ak} \approx 20 \cdot t_{nak}$

Za koniec reakcji w symulacji komputerowej uznawano iterację dla której wystąpiło tysiąc kolejnych zderzeń nieaktywnych lub osiągnięto pełne przereagowanie substratu. Odpowiada to przyjętemu w pracach eksperymentalnych sposobowi prowadzenia doświadczeń, w których przyjęto, że jeżeli w kolejnych pomiarach stężenie produktu zmienia się o mniej niż 3% (zakładany błąd pomiarowy) to przerywane są cykliczne pomiary stężenia „końców redukujących” [85, 151][†].

* Rysunki przedstawiające strukturę amylopektyny przedstawiono w załączniku.

[†] Założenie to podyktowane było także rozrzutem punktów doświadczalnych pod koniec reakcji oraz możliwością występowania reakcji kondensacji (*reverse reaction*) [98]. Należy tu nadmienić, iż ze względów ekonomicznych zdecydowaną większość procesów przemysłowych hydrolizy skrobi, prowadzi się z szybkością nie mniejszą niż 15% szybkości maksymalnej dla danych warunków. Dodatkowo w przypadku długich czasów reakcji zwiększa się prawdopodobieństwo zakażenia układu i rozkładu mikrobiologicznego produktów [120].

4.2.3. Waga parametrów modelu

Przeprowadzając szereg symulacji komputerowych przeanalizowano jak zmiana wybranych parametrów modelu wpływa na uzyskiwane w symulacji wyniki. Ze względu na objętość pracy przedstawiono jedynie wpływ zdefiniowania substratu na skład końcowy produktu w przypadku hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy. W tabelach 4.4 ÷ 4.7. przedstawiono jaki wpływ na skład końcowy produktu wywiera zmiana określonego parametru opisującego substrat.

Tab. 4.4. Wpływ stosunku amylozy do amylopektyny na skład produktu końcowego w procesie hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy. Przyjęto, że stopień polimeryzacji dla amylopektyny wynosi 25. Za koniec reakcji w symulacji uznano iterację dla której wystąpiło 1000 kolejnych zderzeń nieaktywnych.

stosunek amylozy do amylopektyny w skrobi	Produkty końcowe						
	glukoza	maltoza	maltotrioza	maltotetraza	maltopentaoza	maltoheksaoza	dekstryny graniczne
100% : 0%	0,00%	25,71%	13,31%	9,25%	31,73%	19,05%	0,00%
50% : 50%		28,46%	12,65%	8,53%	29,72%	15,42%	4,39%
30% : 70%		26,11%	14,57%	8,72%	27,76%	15,78%	6,46%
0% : 100%		27,37%	15,05%	8,80%	24,39%	13,96%	9,71%

Tab. 4.5. Wpływ stopnia polimeryzacji amylopektyny na skład produktu końcowego w procesie hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy. Przyjęto że stosunek amylozy do amylopektyny wynosi 30% ÷ 70%. Za koniec reakcji w symulacji uznano iterację dla której wystąpiło 1000 kolejnych zderzeń nieaktywnych.

DP amylopektyny	Produkty końcowe						
	glukoza	maltoza	maltotrioza	maltotetraza	maltopentaoza	maltoheksaoza	dekstryny graniczne
15	0,00%	27,20%	13,45%	9,83%	23,65%	13,23%	11,83%
20		28,91%	12,61%	8,46%	25,48%	15,52%	8,30%
25		26,28%	14,70%	8,10%	26,96%	16,32%	6,48%
30		27,16%	13,22%	9,34%	29,68%	14,37%	5,22%

Tab. 4.6. Wpływ wielkości cząsteczki amylozy na skład produktu końcowego w procesie hydrolizy przy udziale α -amylazy. Za koniec reakcji w symulacji uznano iterację dla której wystąpiło 1000 kolejnych zderzeń nieaktywnych.

ilość podjednostek glukozy w cząsteczce amylozy	Produkty końcowe				
	maltoza	maltotrioza	maltotetraza	maltopentaoza	maltoheksaoza
100	26,18%	14,05%	9,83%	31,30%	18,64%
1000	26,51%	14,20%	8,96%	32,36%	17,96%
10000	25,17%	14,70%	7,82%	33,44%	18,87%
100000	25,14%	14,74%	7,77%	33,45%	18,90%

Tab. 4.7. Wpływ liczby monomerów w rozpatrywanym układzie na skład produktu końcowego w procesie hydrolizy przy udziale α -amylazy. Za koniec reakcji w symulacji uznano iterację dla której wystąpiło 1000 kolejnych zderzeń nieaktywnych.

lg_{catk}	Produkty końcowe				
	maltoza	maltotrioza	maltotetraza	maltopentaoza	maltoheksaoza
11450	24,78%	14,35%	8,98%	31,50%	18,30%
114500	25,75%	14,26%	9,21%	31,90%	18,27%
1145000	25,54%	13,49%	9,65%	31,44%	18,77%

Analizując uzyskane wyniki symulacji stwierdzono, iż stosunkowo duży wpływ (do 10%) na obecność w substracie dekstryn granicznych ma przyjęty stosunek amylozy do amylopektyny w skrobi oraz stopień polimeryzacji amylopektyny. Wiąże się to z liczbą punktów rozgałęzienia obecnych we wszystkich cząsteczkach znajdujących się w rozpatrywanym układzie. Natomiast stosunkowo mały wpływ (poniżej 1%) na skład końcowy ma wielkość rozpatrywanych cząsteczek oraz ich liczba w rozpatrywanym układzie. Jest to o tyle korzystne, iż różne źródła literaturowe [38, 52, 56, 78, 84, 96, 117, 127] podają zbliżone wartości składu procentowego skrobi ziemniaczanej (25 ÷ 30 % amylozy, 70 ÷ 75 % amylopektyny) oraz stopnia polimeryzacji dla amylopektyny ($22 \leq DP \leq 27$), natomiast znaczne różnice występują przy określaniu masy cząsteczek. Przyczyn tego zjawiska można upatrywać w różnym sposobie pozyskiwania skrobi ziemniaczanej oraz możliwości jej częściowej degradacji zachodzącej w procesie oczyszczania i przygotowania roztworów.

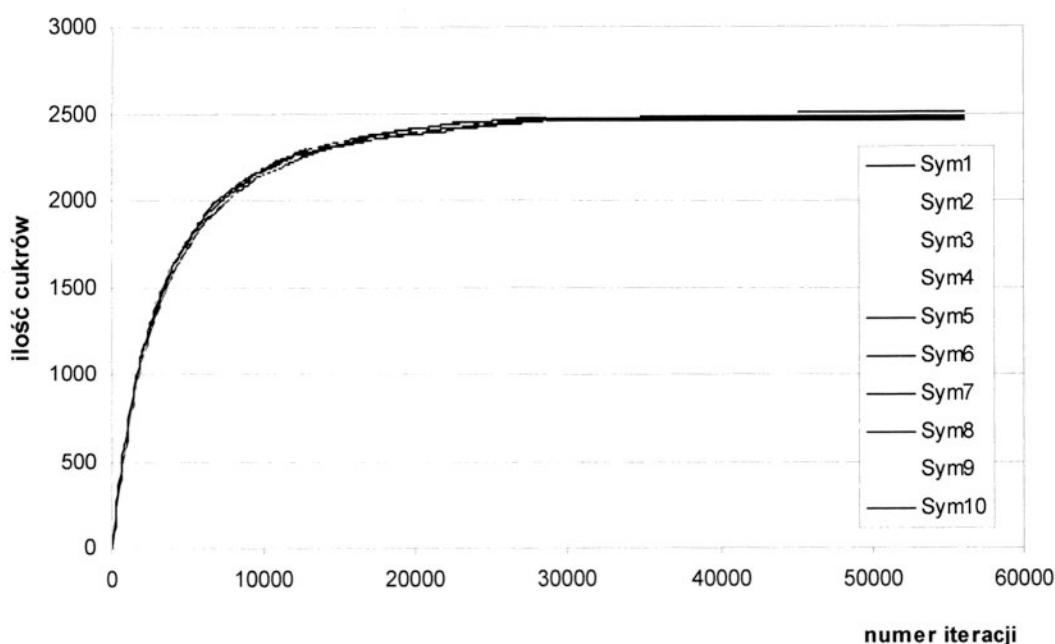
W pracy zweryfikowano także powtarzalność uzyskanych wyników symulacji. W tym celu wykonywano dziesięciokrotnie symulację komputerową przy identycznych zadeklarowanych wielkościach startowych modelu, a następnie określano odchylenie standardowe liczby cząsteczek określonych cukrów zliczanych w układzie modelowym [26]. Dla próby dziesięcioelementowej odchylenie standardowe s_{n_p} wyznaczane było z zależności:

$$s_{n_p} = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} |n_{p_i} - \bar{n}_p| ,$$

gdzie n_p jest liczbą cząsteczek danego cukru, a $\bar{n}_p$ jest wartością średnią dla wszystkich prób.

Generalnie można stwierdzić, że powtarzalność wyników symulacji rosła wraz ze wzrostem ilości uwzględnianych podjednostek glukozy zawartych w substracie w rozpatrywanym układzie modelowym. Przykładowo w przypadku rozpatrywania substratu

zawierającego 1000 podjednostek glukozy, wielkość odchylenia standardowego dla sumarycznej ilości substratu wyrażona w procentach wynosiła około 5%, natomiast gdy substrat zawierał 10 000 glukozy, standardowe odchylenie było mniejsze od jednego procenta (patrz załącznik). Na rysunku 4.1 przedstawiono zmianę ilości produktu reakcji wyznaczoną w dziesięciu kolejnych symulacjach komputerowych danego procesu.



Rys. 4.1. Powtarzalność wyników symulacji. Przedstawiono zmianę ilości produktu reakcji podczas enzymatycznej hydrolizy skrobi wyznaczoną w dziesięciu kolejnych symulacjach komputerowych. Symulacje przeprowadzono dla układu zawierającego 11450 podjednostek glukozy. Odchylenie standardowe ilości produktu wynosiło 0,59%.

4.3. Translacja układu modelowego do układu rzeczywistego

Przejście z układu modelowego do rzeczywistego odbywa się w dwóch niezależnych etapach: przeliczeniu ilości cząsteczek rozpatrywanych w modelowym układzie na stężenia molowe [mol/dm^3] oraz dyskretnego czasu reakcji t_R na jednostki czasu [s].

Przyjmijmy, że w pewnej objętości jednostkowej znajduje się określona liczba cząsteczek substratu i enzymu*. Stężenie początkowe w układzie modelowym (wyrażane

* Gdy znana jest masa molowa enzymu, możliwe jest określenie ilości cząsteczek polimeru przypadających na jedną cząsteczkę enzymu ze stosunku średniej masy jednego mola cząsteczek skrobi do masy molowej danego enzymu. W przypadku tym dla uproszczenia można przyjąć, że objętość jednostkowa odpowiada takiej objętości, w której znajduje się jedna cząsteczka enzymu (układy monoenzymatyczne) oraz określona liczbą cząsteczek polimeru.

poprzez funkcję charakterystyczną) odpowiada stężeniu początkowemu w układzie rzeczywistym wyrażonemu poprzez stężenie molowe ($c_{t=0}$ [mmol/ml]) lub stężenie masowe ($c_{t=0}$ [mg/ml]). Stężenie końcowe w układzie modelowym, odpowiada ilości powstałych cząsteczek w układzie, w którym wszystkie cząsteczki substratów i produktów pośrednich zostały przekształcone na produkty końcowe. W praktyce za stężenie końcowe produktów, przyjmuje się takie stężenie, które jest osiągane po pewnym czasie (t_k) i które nie ulega późniejszemu zmianą (przy zachowanych warunkach reakcji). W tabeli 4.8. zestawiono przykładowe wielkości wyznaczane przy badaniu kinetyki reakcji enzymatycznej degradacji skrobi z symulacją komputerową.

Tabela 4.8. Przykładowe zestawienie wielkości wyznaczanych przy badaniu kinetyki reakcji enzymatycznej degradacji skrobi z symulacją komputerową.

REAKCJA CHEMICZNA		MODEL (SYMULACJA KOMPUTEROWA)	
WIELKOŚĆ	OPIS	WIELKOŚĆ	OPIS
Stężenie początkowe substratu $c_{S,0}$ [mg/ml]	Stężenie substratu w chwili $t=0$, równe ilości końców redukujących oznaczonych w reakcji z DNS.	Liczba cząsteczek [-] dla iteracji $n=0$.	Liczba cząsteczek określona przez funkcję charakterystyczną A ("liczba zer") dla iteracji $n=0$ (początek reakcji).
Stężenie końcowe cukrów $c_{S+p,k}$ [mg/ml]	Stężenie końcowe cukrów w chwili $t=t_k$, równe ilości końców redukujących oznaczonych w reakcji z DNS.	Liczba cząsteczek [-] dla iteracji $n=n_k$.	Liczba cząsteczek określona przez funkcję charakterystyczną A ("liczba zer") dla iteracji $n=n_k$ (koniec reakcji)
Stężenie końcowe produktów $c_{S,k}$ [mg/ml]	Stężenie końcowe produktów. Ponieważ w reakcji z DNS nie rozróżnialne są cząsteczki substratów, produktów pośrednich i końcowych, równe jest ono różnicy oznaczonemu stężeniu mieszaniny w chwili t minus stężenie początkowe: $c_{P,k} = c_{S+p,k} - c_{S,0}$	Różnica liczby cząsteczek dla iteracji $n=n_k$ minus liczba cząsteczek dla iteracji $n=0$.	Liczba cząsteczek powstałych podczas symulacji.
Stężenie glukozy przy całkowitej hydrolizie skrobi do wolnej glukozy c_{gl} [mg/ml]	Stężenie glukozy w układzie przy całkowitej hydrolizie polocukrów do wolnej glukozy (np. pod wpływem gorącego kwasu solnego).	lg_{calk}	Całkowita liczba podjednostek glukozy w rozpatrywanym układzie, równa ilości parametrów funkcji charakterystycznej.

W przypadku metody graficznej, translacja parametrów modelu do wielkości opisujących układ rzeczywisty odbywa się w dwóch etapach, które omówione zostały poniżej. Za punkt stały przyjęto punkt opisujący początek reakcji hydrolizy ($t = 0, n = 0$).

1. Wyznaczenie stałej przeskalowania stężenia (rys. 4.2). Parametrom modelu opisującym licznosc cząsteczek w układzie modelowym, przypisane zostaje stężenie cukrów wyrażone w mg/ml.

- 1.a. Określane jest stężenie końcowe produktów $c_{k,P}$ [mg/ml] powstających pod koniec reakcji. Stężenie to może być określone na podstawie pojedynczego pomiaru po odpowiednio długim czasie reakcji lub poprzez wyznaczenie asymptoty do której zbliżają się wielkości opisujące punkty doświadczalne.

- 1.b. Określana jest ilość cząsteczek produktów $n_{k,P}$ [t], które powstały w układzie modelowym*. Następnie wyznaczana jest *stała przeskalowania stężenia* równa:

$$k_{st} = \frac{c_{k,P}}{n_{k,P}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml} \cdot \text{t}} \right].$$

- 1.c. Dokonywana jest translacja układu modelowego do układu rzeczywistego, poprzez pomnożenie wielkości odpowiadających licznosci cząsteczek w układzie modelowym przez wyznaczoną wartość *stałej przeskalowania stężenia* k_{st} .

2. Wyznaczenie stałej przeskalowania czasu k_t (rys. 4.3). Parametrowi modelu określającego dyskretny czas reakcji $[t']$ zostaje przypisany czas reakcji [min].

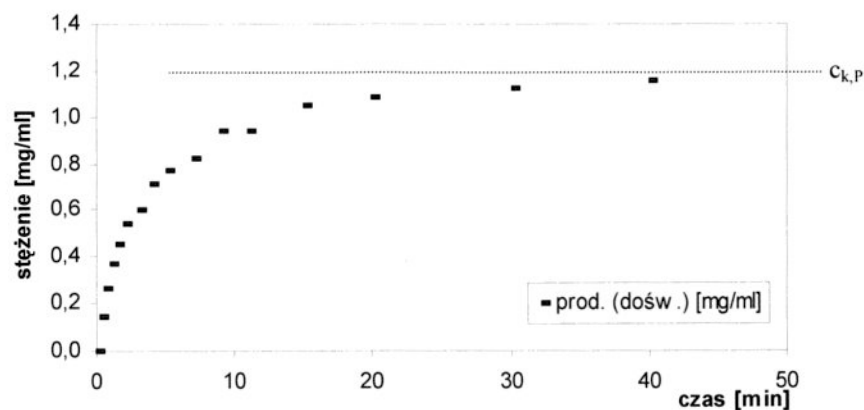
- 2.a. Dla początkowych punktów doświadczalnych, które odzwierciedlają przebieg reakcji z maksymalną prędkością, wyznaczane jest równanie prostej.

- 2.b. Analogicznie wyznaczane jest równanie prostej dla początkowych wielkości opisujących ilość cząsteczek produktu w układzie modelowym.

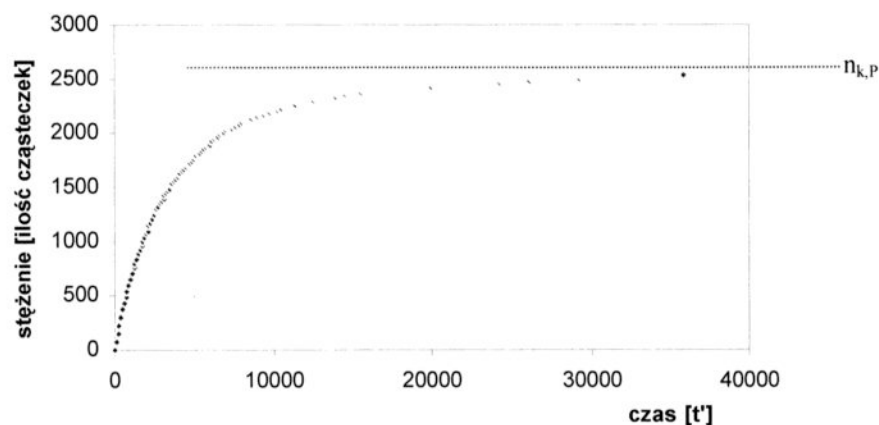
- 2.c. Wyznaczana jest *stała przeskalowania czasowego*, która jest równa co do wartości ilorazowi współczynnika nachyleni prostej wyznaczonej w punkcie 4.2.a. przez wartość współczynnika nachyleni prostej wyznaczonego w punkcie 4.2.b.

- 2.d. Dokonywana jest translacja układu modelowego do układu rzeczywistego, poprzez pomnożenie wielkości odpowiadających dyskretnemu czasowi reakcji w układzie modelowym przez wyznaczoną wartość *stałej przeskalowania czasu*.

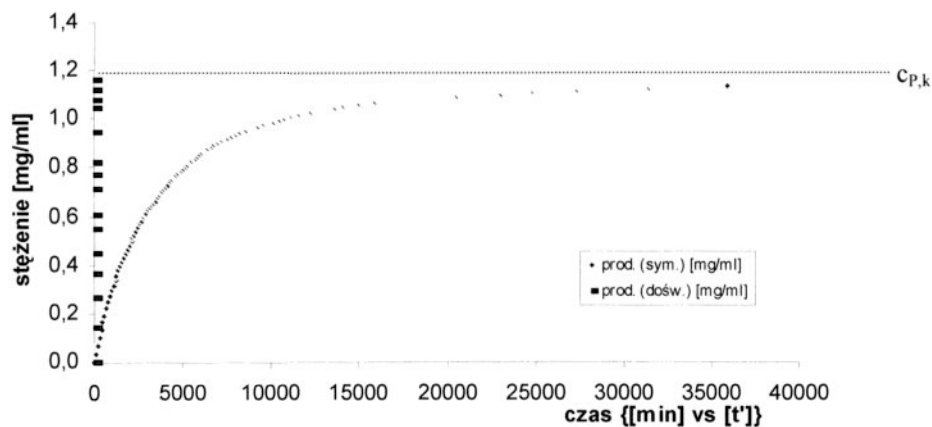
* W przypadku symulacji komputerowej wartość ta jest podawana przez program lub może zostać wyznaczona w oparciu o asymptotę w przypadku gdy nałożony jest warunek o przerwaniu symulacji dla zadanej liczby kolejnych zderzeń nieaktywnych.



a) Przykładowe dane eksperymentalne dla procesu hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy scukrzającej ($c_{S0}=1,16$ mg/ml; $c_E=5,30$ μ g/ml). Określenie stężenia końcowego produktu na podstawie asymptoty (linia przerywana), do której zbliżają się wartości określające stężenie produktu mierzone eksperymentalnie.

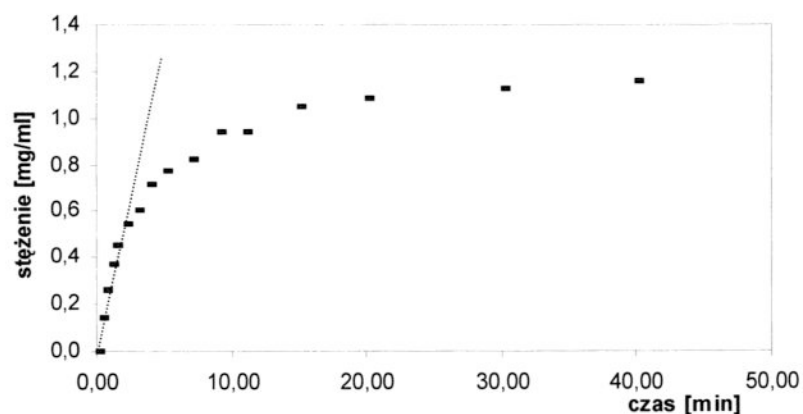


b) Dane z symulacji komputerowej. Określenie końcowej ilości cząsteczek w układzie modelowym. Wyznaczenia stałej przeskalowania stężenie $k_{st} = c_{k,P} / n_{k,P}$ [mg/ml·t].

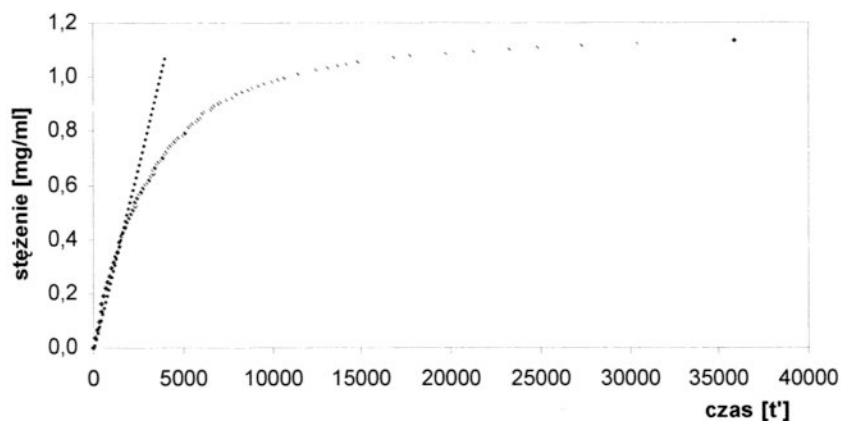


c) Przeskalowanie liczności cząsteczek z układu modelowego do układu rzeczywistego w oparciu o wyznaczoną stałą przeskalowania stężenie (pomnożenie wielkości odpowiadających ilości cząsteczek w układzie modelowym przez wyznaczoną wartość k_{st}).

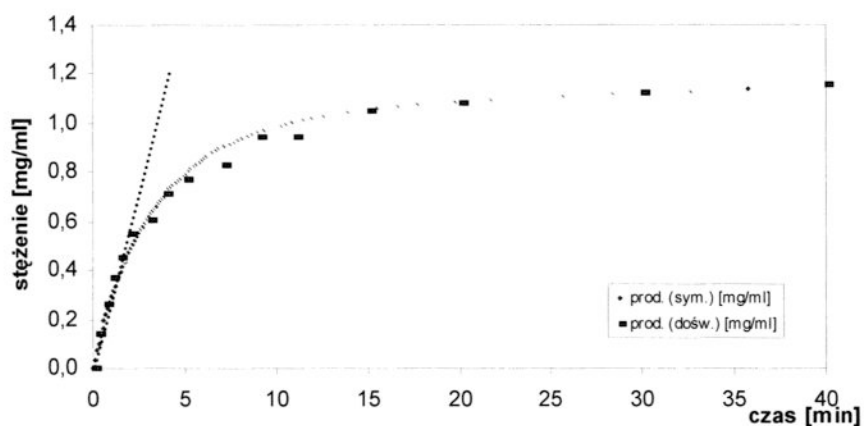
Rys. 4.2. Schemat przeskalowanie liczności cząsteczek z układu modelowego do układu rzeczywistego (liczność cząsteczek [t] $\rightarrow$ stężenie [mg/ml]).



a) Dane eksperymentalne. Określenie współczynnika nachylenia prostej (linia przerywana) dla początkowych punktów doświadczalnych, dla których reakcja przebiega z maksymalną prędkością.



b) Dane z symulacji komputerowej (dokonano wcześniejszego przeskalowania stężenia). Określenie współczynnika nachylenia prostej (linia przerywana) dla początkowych punktów z symulacji dla których reakcja przebiega z maksymalną prędkością.



c) Przeskalowanie liczności cząsteczek z układu modelowego do układu rzeczywistego w oparciu o wyznaczone współczynniki nachylenia prostych.

Rys. 4.3. Schemat przeskalowanie czasu z układu modelowego do układu rzeczywistego (dyskretny czas reakcji $[t'] \rightarrow$ czas $[min]$).

Określenie *stałej przeskalowania czasu* w oparciu o dane eksperymentalne umożliwia prognozowanie kinetyki reakcji dla różnych wartości stężeń c_{S0} oraz c_E . W przypadku przyjęcia, iż czas procesu degradacji skrobi w danych warunkach reakcji jest wprost proporcjonalny do stężenia enzymu i odwrotnie proporcjonalny do ilości substratu, stałą przeskalowania czasowego dla danego układu można wyznaczyć z zależności:

$$k_t^* = \frac{c_{S0}^*}{c_{S0}} \cdot \frac{c_E}{c_E^*} \cdot k_t,$$

gdzie: brak indeksów górnych oznacza, iż wielkości odnoszą się do układu doświadczalnego; indeksami górnymi '*' zaznaczono wielkości dla badanego układu modelowego. Dodatkowo przyjmuje się, że:

$$c_E \ll c_{S0}.$$

Stała przeskalowania stężenia umożliwia natomiast przeliczenie liczby cząsteczek poszczególnych składników układu modelowego (stężenie procentowe) na stężenie molowe. W przypadku całkowitego przereagowania substratu przyjmuje się:

$$k_{st} = \frac{c_{k,p}}{n_{k,p}} \approx \frac{c_{S0}}{n_{k,p}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml} \cdot \text{t}} \right].$$

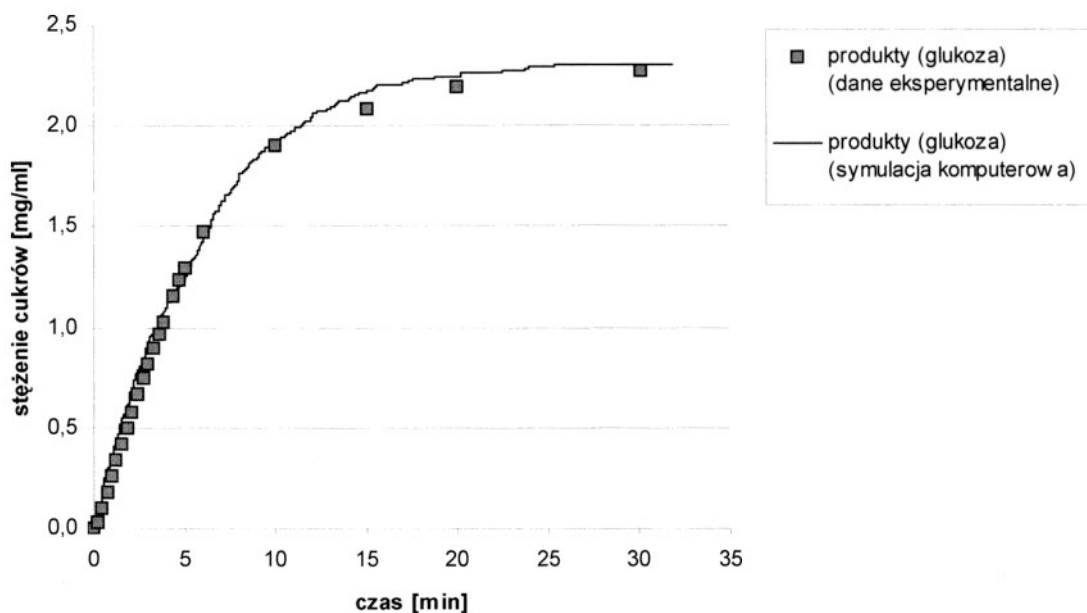
4.4. Porównanie danych doświadczalnych z symulacją komputerową

W celu zachowania przejrzystości pracy szczegółowe zestawienie danych eksperymentalnych z symulacjami komputerowymi dla każdej serii danych przedstawiono w załączniku. Dane zostały przedstawione w postaci powiązanych wzajemnie arkuszy kalkulacyjnych zawierających:

- ❖ dane eksperymentalne uzyskane dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi,
- ❖ wartości parametrów modelu, które zostały przyjęte podczas symulacji komputerowych omawianych procesów,

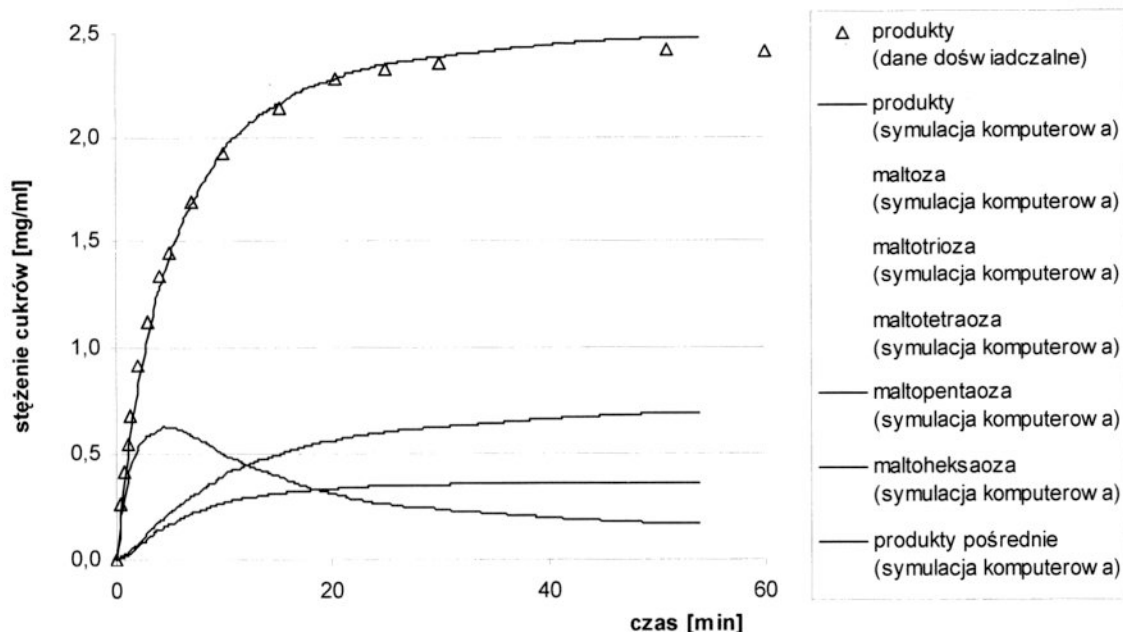
- ❖ wyniki symulacji komputerowych dla danego procesu* (oprócz stężenia „sumarycznego” cukrów redukujących oznaczanego w stosowanej reakcji z DNS, przedstawiono stężenia wybranych cukrów wchodzących w skład mieszaniny reakcyjnej),
- ❖ wyznaczone stałe przeskalowania,
- ❖ zestawione w pojedynczych arkuszach dane eksperymentalne z wynikami symulacji komputerowych (po dokonaniu translacji),
- ❖ interpretację graficzną przedstawiającą zmianę stężenia cukrów w czasie trwania reakcji,
- ❖ zbiorcze zestawienie danych wraz z wyznaczonymi współczynnikami determinacji określającymi dopasowanie modelu do danych empirycznych (patrz rozdział 4.5.2.),
- ❖ dodatkowo do każdego pliku dołączono informację o jego zawartości oraz „zdjęcie” ekranu komputera przedstawiające pracę opracowanego programu.

Na rysunkach 4.4. ÷ 4.8. przedstawiono przykładowe zestawienie danych eksperymentalnych z wynikami symulacji komputerowych.

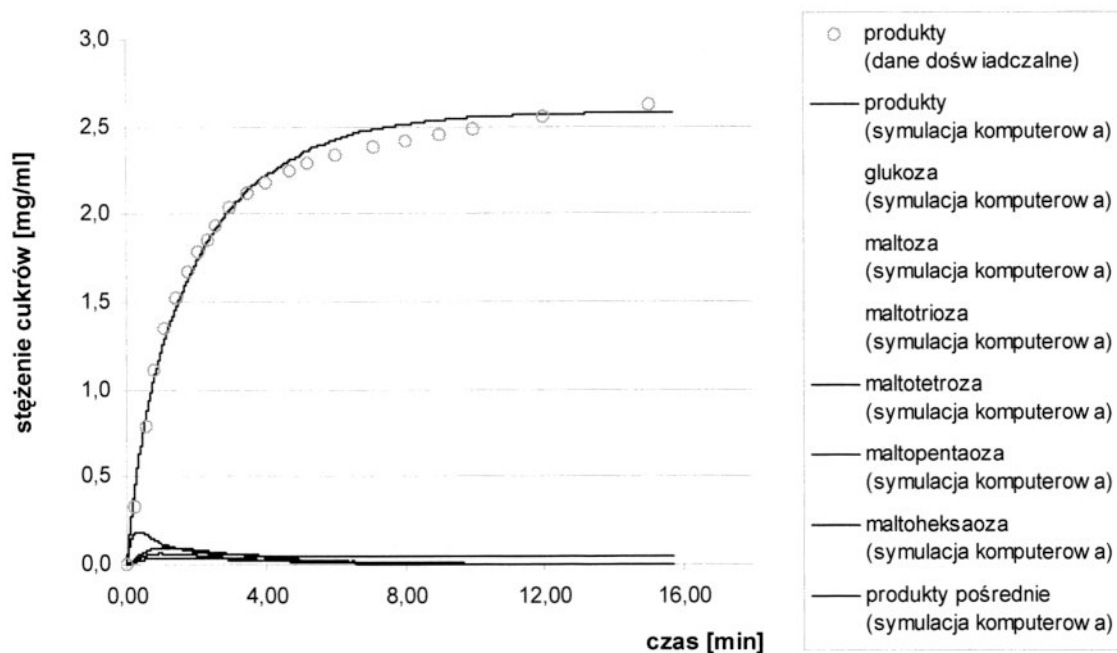


* Wyniki symulacji komputerowej były zapisywane do pliku co setną iterację.

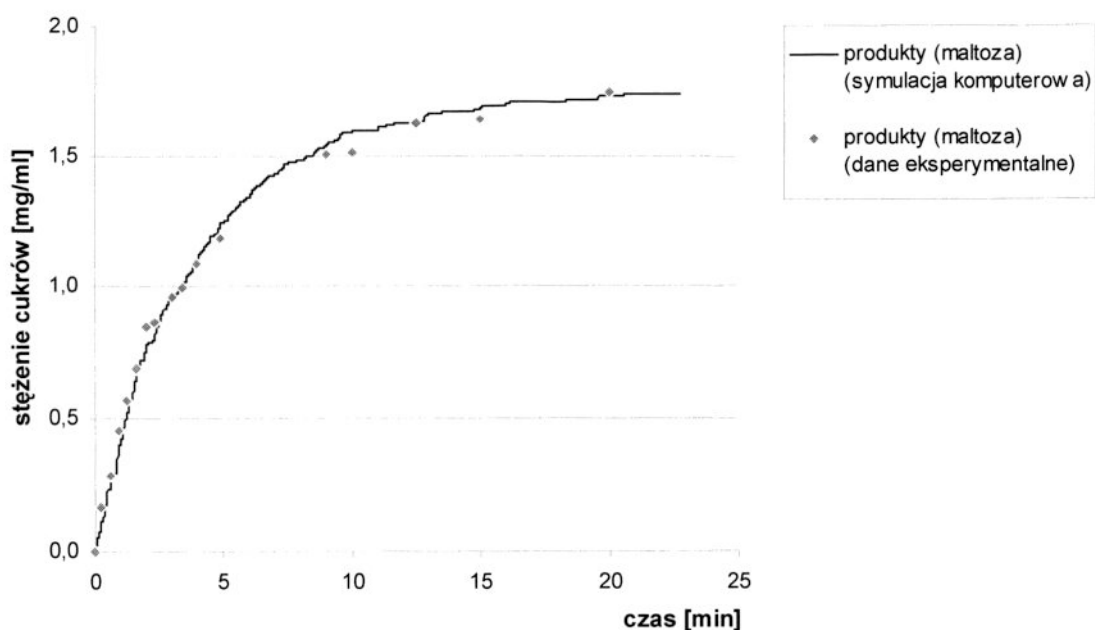
Rys. 4.4. Zestawienie danych doświadczalnych z symulacją komputerową dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale glukoamylazy ($c_E = 2,53 \mu\text{g/ml}$; $c_{S0} = 2,58 \text{ mg/ml}$).



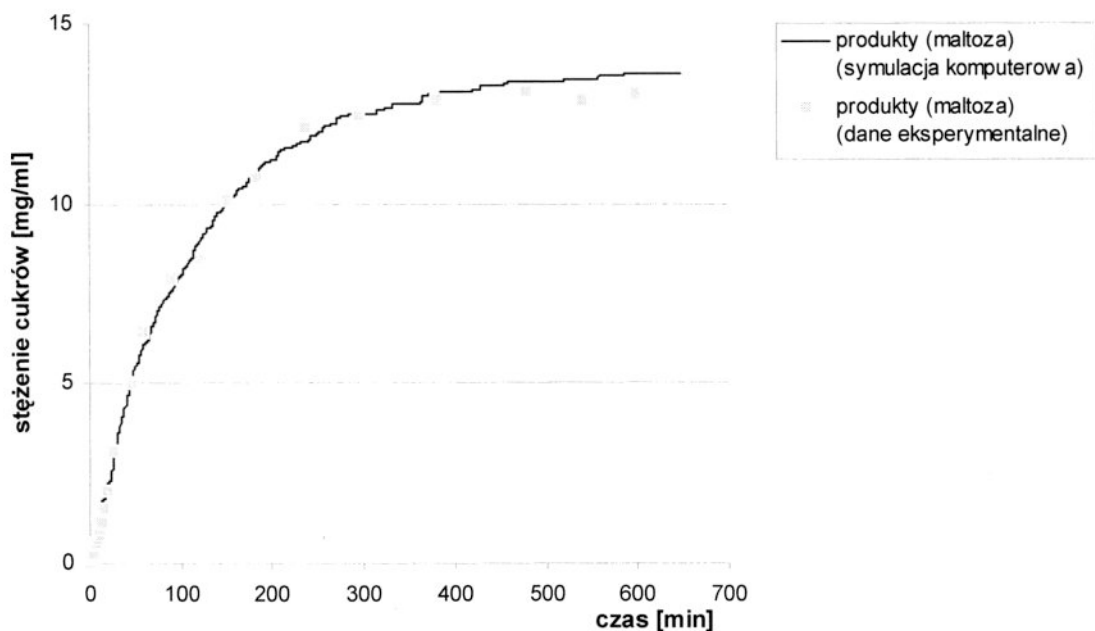
Rys. 4.5. Zestawienie danych doświadczalnych z symulacją komputerową dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy ($c_E = 7,3 \mu\text{g/ml}$; $c_{S0} = 2,48 \text{ mg/ml}$). Na wykresie naniesiono dodatkowo stężenia cukrów o $DP = 1 \div 6$ oraz stężenia produktów pośrednich wyznaczone w symulacji komputerowej (nie były one oznaczane bezpośrednio w stosowanej w analizie reakcji z DNS).



Rys. 4.6. Zestawienie danych doświadczalnych z symulacją komputerową dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale mieszaniny enzymów α -amylazy i glukoamylazy - układ synergistyczny ($c_{E,\alpha} = 4,5 \mu\text{g/ml}$; $c_{E,\gamma} = 45 \mu\text{g/ml}$; $c_{S0} = 5 \text{ mg/ml}$). Dodatkowe stężenia cukrów naniesiona na wykres analogicznie do rys. 4.5.



Rys. 4.7. Zestawienie danych doświadczalnych z symulacją komputerową dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale natywnej β -amylazy ($c_E = 200 \mu\text{g/ml}$; $c_{S0} = 1,79 \text{ mg/ml}$). Przyjęto, że produktem reakcji jest maltoza, a w układzie pozostają niehydrolizowane cząsteczki dekstryn granicznych.



Rys. 4.8. Zestawienie danych doświadczalnych z symulacją komputerową dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale β -amylazy immobilizowanej na nośniku akrylowym ($c_E = 150 \mu\text{g/ml}$; $c_{S0} = 17,07 \text{ mg/ml}$). Przyjęto, że produktem reakcji jest maltoza, a w układzie pozostają niehydrolizowane cząsteczki dekstryn granicznych.

W pracy podjęto także próbę weryfikacji modelu w oparciu o dostępne w literaturze informacje na temat zmian frakcji poszczególnych cukrów podczas procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi oraz końcowego składu mieszaniny reakcyjnej. Niestety zgromadzone dane nie opisują układów enzymatycznych dla których dysponowano danymi kinetycznymi (różne typy enzymów amylolitycznych, odmienne warunki reakcji[#]). W Tabeli 4.9. zestawiono informacje pochodzące ze źródeł literowych [8, 52, 47, 66, 78, 84, 98, 106, 108, 117, 121, 124, 161] z wynikami symulacji komputerowych. Ich interpretacja nie umożliwia jednoznacznej oceny poprawności modelu, a jedynie pozwala stwierdzić, że uzyskane wyniki mieszczą się w zakresie stężeń uzyskanych dla zbliżonych układów enzymatyczny.

Tabela 4.9. Zestawienie udziałów procentowych produktów wg danych literaturowych z symulacją komputerową. W przypadku β -amylazy i glukozamylazy przyjęto, że dekstryny graniczne odpowiadają niehydrolizowanemu substratowi i nie zostały uwzględnione jako produkt reakcji.

układ enzymatyczny	cukier	udział w produkcie	
		źródła literaturowe	symulacja komputerowa
α -amylaza upłynniająca	glukoza	0 ÷ 5 %	0 %
	maltoza	15 ÷ 40 %	29 %
	maltotetraoza	10 ÷ 25 %	14 %
	maltotetraoza	30 ÷ 60 %	8 %
	maltopentaoza		27 %
	maltoheksaoza		16 %
	dekstryny graniczne	5 ÷ 18 %	7 %
β -amylaza	maltoza	dominującym produktem reakcji jest maltoza (w układzie pozostają niehydrolizowane dekstryny graniczne)	~ 100 % (w układzie pozostają niehydrolizowane dekstryny graniczne)
glukozamylaza	glukoza	dominującym produktem reakcji jest glukoza (w układzie pozostają niehydrolizowane dekstryny graniczne)	~ 100 % (ilość pozostałych w układzie dekstryn granicznych zależy od wyboru opcji „hydrolizy wiązań α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowych”)
synergizm α -amylaza - glukozamylaza	glukoza	do 98 %	75 ÷ 95 %*
	maltoza	2 ÷ 35 %	25 ÷ 5 %*
	maltotrioza		~ 0 %*
	maltotetraoza		~ 0 %*
	maltopentaoza		~ 0 %*
	maltoheksaoza		~ 0 %*

[#] Większość spotykanych cytowań dotyczy źródeł amerykańskich [66, 117, 145, 162], gdzie głównie badana jest skrobia uzyskiwana z kukurydzy lub manioku, podczas gdy w pracy stosowano skrobię ziemniaczaną.

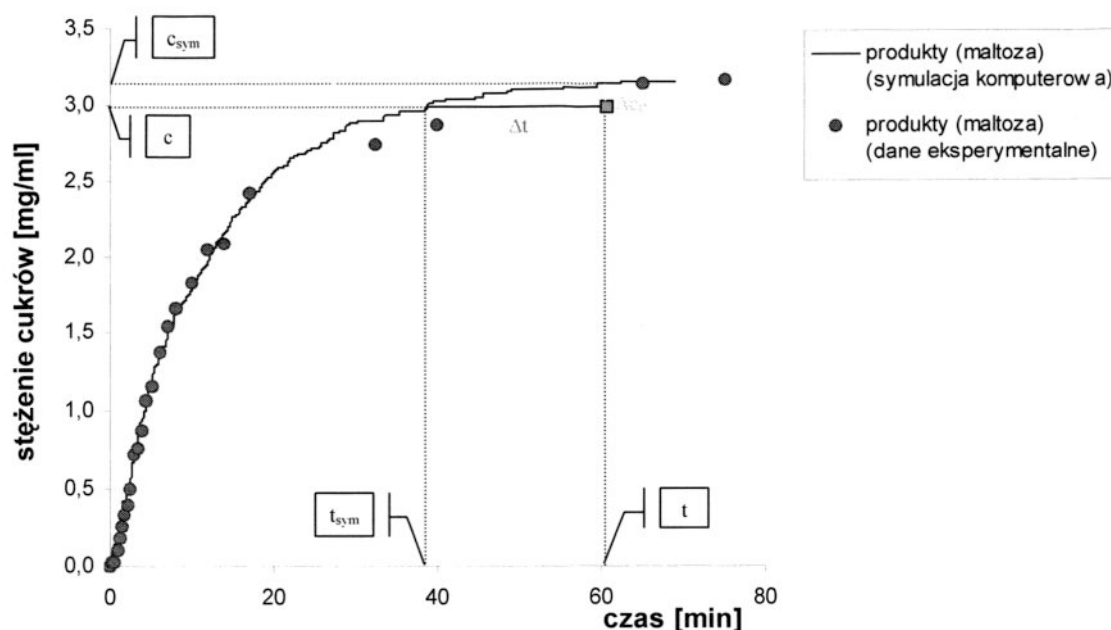
* Skład końcowy mieszaniny reakcyjnej w przypadku układu α -amylaza-glukozamylaza zależał od stosunku ilości cząsteczek obu enzymów w rozpatrywanym układzie modelowym.

4.5. Dyskusja błędów

W celu określenia stopnia odwzorowania przebiegu kinetyki reakcji przez symulację komputerową w pracy podjęto dyskusję błędów. Przedstawiono rachunek korelacji dotyczący zbiorowości generalnej reprezentowanej przez zbiór wszystkich danych kinetycznych [11, 12, 129]. Za autorami poszczególnych prac [14, 15, 16, 18, 54, 61, 67, 80, 85, 99, 100, 151, 153] przyjęto że maksymalny błąd pomiarowy dla pierwszych etapów reakcji wynosił 5%, natomiast pod koniec reakcji występował większy rozrzut punktów doświadczalnych (aż do 20%). Przyczyn dużego rozrzutu danych eksperymentalnych dla długich czasów prowadzenia procesu hydrolizy można dopatrywać się w „cofaniu się reakcji” (wystąpienie reakcji kondensacji [98]), rozkładzie mikrobiologicznym (możliwość zakażenia mikrobiologicznego wynikała z braku sterylności prowadzenia procesu), zanieczyszczeniu preparatu enzymatycznego oraz bardzo powolnej hydrolizie dekstryn granicznych i niejednorodności substratu.

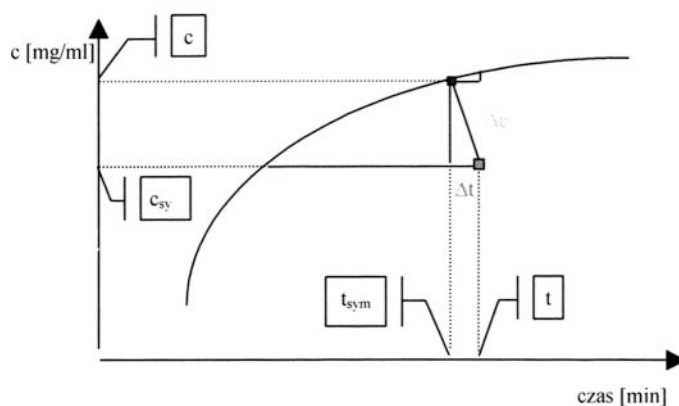
4.5.1. Określenie zgodności danych eksperymentalnych z wynikami symulacji komputerowej

W pracy rozważono możliwość przyjęcia za kryterium błędu modułu różnicy czasów $\Delta(t)_{c_p} = |(t)_{c_p} - (t_{sym})_{c_p}|$ lub modułu różnicy stężeń $\Delta(c_p)_t = |(c_p)_t - (c_{p, sym})_t|$ dla danych doświadczalnych i wyników uzyskanych w symulacji komputerowej. Jednakże w przypadku wyznaczania modułu różnicy czasów uzyskiwano stosunkowo duży błąd względny dla punktów reprezentujących końcowy etap reakcji, przy stosunkowo małym błędzie względnym dla punktów reprezentujących początek reakcji. Ilustruje to rysunek 4.9., na którym kolorem zielonym zaznaczono punkt danych - leży on stosunkowo blisko w sensie euklidesowym krzywej przedstawiającej wyniki symulacji komputerowej, jednakże przy porównywaniu wartości rzeczywistej z wartością oczekiwaną dla danego stężenia produktu reakcji c_p uzyskany błąd względny jest rzędu 30%. Podobna sytuacja zachodzi gdy wyznaczamy moduł różnicy stężeń dla danych początkowych (duże błędy względne dla punktów początkowych, małe błędy dla punktów końcowych).



Rys. 4.9. Interpretacja graficzna wyznaczenia względnego błędu czasu reakcji (opis w tekście). Wykorzystano przykładowe dane dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale natywnej β -amylazy ($c_E = 100 \mu\text{g/ml}$; $c_{S0} = 3,90 \text{ mg/ml}$).

W związku z powyższym, w pracy przyjęto, że każdemu punktowi eksperymentalnemu $p(t, c)$ przyporządkowywany jest punkt reprezentujący wyniki symulacji komputerowej $p(t_{sym}, c_{sym})$ znajdujący się w najmniejszej odległości w sensie euklidesowym od danego punktu doświadczalnego (metoda najmniejszych kwadratów [26, 30, 129]). Interpretację graficzną opisanego przyporządkowania przedstawiono na rysunku 4.10. Kryterium błędu określono w rozdziale 4.5.2. w oparciu o porównanie wartości odciętych t , t_{sym} oraz wartości rzędnych c , c_{sym} dla odpowiednich par punktów reprezentujących dane doświadczalne i wyniki symulacji komputerowej.



Rys. 4.10. Przyporządkowanie punktowi doświadczalnemu $p(t, c)$ (kolor zielony) punktu reprezentującego wyniki symulacji komputerowej $p(t_{sym}, c_{sym})$ (kolor granatowy).

4.5.2. Współczynnik determinacji

Za kryterium błędu w pracy przyjęto współczynnik determinacji (kwadrat współczynnika korelacji Pearsona). Przyjęto, że zbiorowość jest badana ze względu na dwie zmienne X i Y , a realizacja tych zmiennych w próbie n -elementowej zestawiana jest w postaci dwóch szeregów szczegółowych. W prostokątnym układzie współrzędnych na osi odciętych zaznaczane są zmienne niezależne, a na osi rzędnych wartości zmiennych zależnych. Punkty odpowiadające poszczególnym wartościom cech, tworzą korelacyjny wykres rozrzutu [12]. Natężenie współzależności badanych zmiennych wyrażono liczbowo za pomocą kwadratu współczynnika korelacji Pearsona r_{XY} [129]. Współczynnik korelacji liniowej Pearsona przyjmuje wartości z przedziału $[-1,1]$ i wyznaczany jest poprzez standaryzację kowariancji:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{C(X, Y)}{s_x s_y},$$

gdzie $\bar{x}$, $\bar{y}$ są wartościami średnimi x , y ; a s_x oraz s_y są odchyleniami standardowymi tych cech [86]. Kowariancję między cechami X i Y wyznaczono ze wzoru:

$$C(X, Y) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}).$$

W pracy do opisanie miary dokładności dopasowania regresji do danych empirycznych posłużono się współczynnikiem determinacji, który liczbowo równy jest kwadratowi współczynnika korelacji Pearsona i przyjmuje wartości z przedziału $[0,1]$ lub w ujęciu procentowym $[0\%, 100\%]$. Informuje on jaka część zaobserwowanej w próbie całkowej zmienności Y została zdeterminowana regresja względem X [30].

Dla każdej serii danych wyznaczono* po dwa współczynniki determinacji określające:

1. Siłę związku prostoliniowego między dwiema cechami reprezentującymi czas reakcji dla punktów doświadczalnych oraz odpowiadające im wartości czasu uzyskane w symulacji komputerowej. Wartość współczynnika determinacji „czasu” określana była ze wzoru:

$$\left(r_{t,t_{sym}}\right)^2 = \frac{\left(\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t}) \cdot (t_{sym,i} - \bar{t}_{sym,i})\right)^2}{\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})^2 \sum_{i=1}^n (t_{sym,i} - \bar{t}_{sym,i})^2},$$

gdzie t - jest czasem reakcji dla punktów doświadczalnych, t_{sym} - czasem wyznaczonym w oparciu o symulację komputerową, symbolami $\bar{t}$ oraz $\bar{t}_{sym}$ oznaczono wartości średnie.

2. Siłę związku prostoliniowego między dwiema cechami reprezentującymi stężenie cukrów oznaczanych w reakcji z DNS oraz odpowiadającym im wartością stężeń uzyskanych w symulacji komputerowej. Wartość współczynnika determinacji „stężenia produktów” określana była ze wzoru:

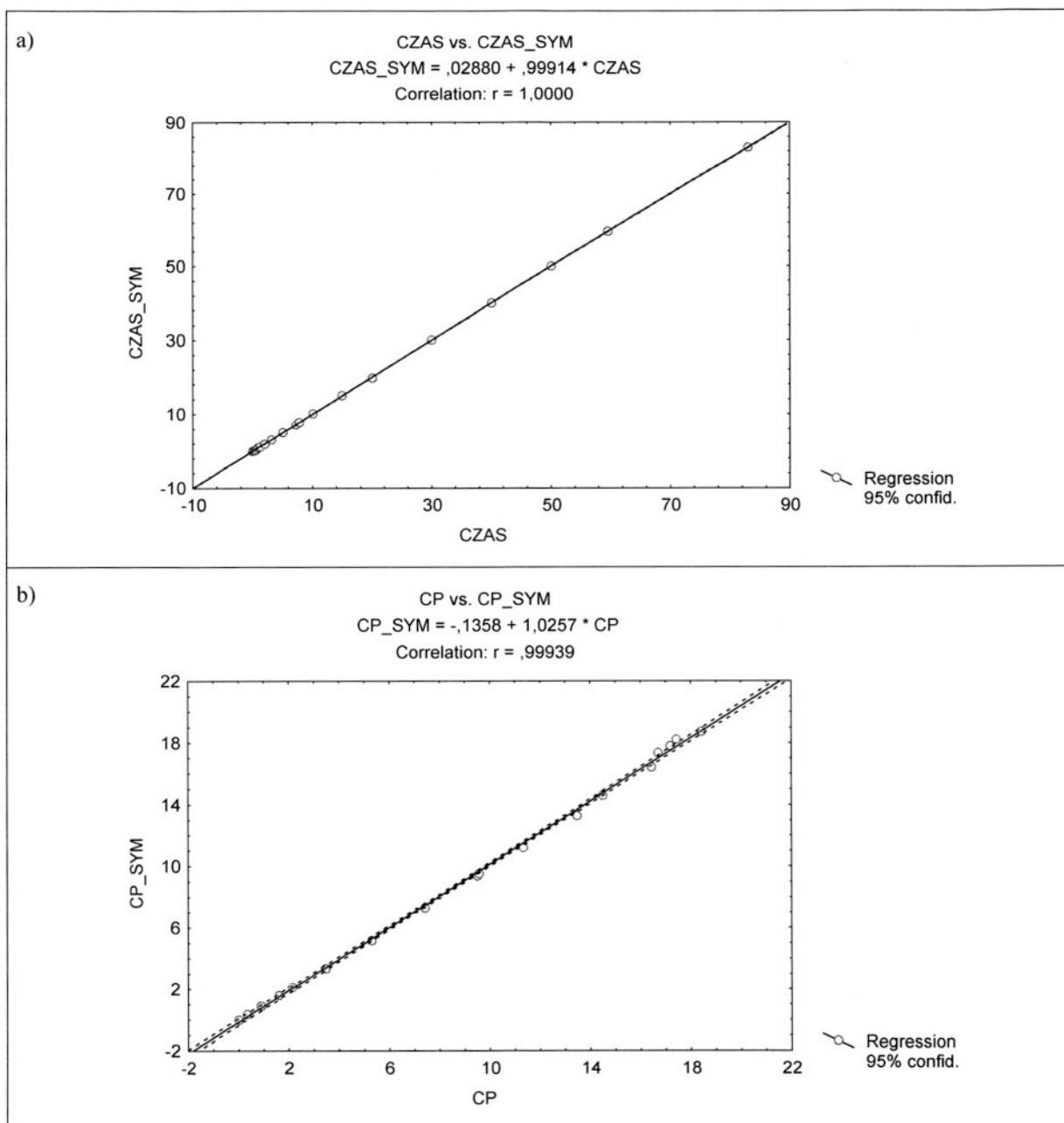
$$\left(r_{c_p,c_{p,sym}}\right)^2 = \frac{\left(\sum_{i=1}^n (c_{p,i} - \bar{c}_p) \cdot (c_{p,sym,i} - \bar{c}_{p,sym,i})\right)^2}{\sum_{i=1}^n (c_{p,i} - \bar{c}_p)^2 \sum_{i=1}^n (c_{p,sym,i} - \bar{c}_{p,sym,i})^2},$$

gdzie c_p odpowiada stężeniu produktów (cukrów zawierających końce redukujące) oznaczanych w reakcji z DNS, $c_{p,sym}$ odpowiada stężeniu tychże cukrów określonego na podstawie symulacji komputerowych, symbole $\bar{c}_p$ oraz $\bar{c}_{p,sym}$ oznaczają wartości średnie.

Dokładny sposób wyznaczenia współczynników determinacji przedstawiono na przykładzie w załączniku. Na rysunku 4.11. przedstawiono korelacyjny wykres rozrzutu opisujący korelację wybranych danych doświadczalnych z symulacją komputerową.

Uzyskane wartości współczynników determinacji wahały się w przedziale od 0,97 do 1,0 co świadczy o bardzo wysokiej korelacji punktów doświadczalnych z symulacją komputerową [21]. Wartości współczynników determinacji wyznaczone dla wszystkich serii danych zostały przedstawione w załączniku.

* Przy wyznaczaniu współczynnika determinacji posłużono się funkcjami PEARSON oraz WSP.KORELACJI wbudowanymi standardowo w arkusz kalkulacyjny Microsoft® Excel 97.



Rys. 4.11. Korelacyjny wykres rozrzutu. Przedstawiono powiązanie punktów doświadczalnych z odpowiadającymi im punktami uzyskanym w symulacji komputerowej (rys. 4.11.a - wykres rozrzutu danych reprezentujących czas reakcji dla punktów doświadczalnych z odpowiadającymi im wartościami czasu uzyskanymi podczas symulacji komputerowej ; rys. 4.11.b - wykres rozrzutu danych reprezentujących stężenie produktów dla punktów doświadczalnych z korelującymi z nimi stężeniami produktu uzyskanymi podczas symulacji komputerowej). W przykładzie wykorzystano dane dla procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy ($c_E = 33,5 \mu\text{g/ml}$; $c_{S0} = 19,0 \text{ mg/ml}$).

Interpretacji graficznej dokonano w oparciu o program *Statistica 6.0* firmy *StatSoft Inc.* wykorzystując funkcje „Pearson Product - Moment Correlation” zawartą w module „Basic Statistic and Tables - Correlation matrices”.

4.6. Czas wykonywania obliczeń

Ważną kwestią, aczkolwiek często pomijana przez autorów, w przypadku symulacji komputerowych jest czas potrzebny na uzyskanie wyników symulacji danego procesu enzymatycznego. Dla omawianych w pracy zagadnień przeciętny czas wykonania jednej symulacji wynosił około $10 \div 20$ minut, natomiast translacja do układu fizycznego około $5 \div 10$ minut. Można więc przyjąć iż rozwiązanie numeryczne modelu jest osiągane w rozsądnym czasie pozwalającym na praktyczne zastosowanie modelu. Opracowany program umożliwia zapis wybranych parametrów modelu do pliku co pozwala na wcześniejsze przygotowanie symulacji oraz umożliwia szerszą analizę modelu i uzyskanych danych*.

4.7. Dodatkowa weryfikacja modelu

Przy modelowaniu procesu hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych oparto się na danych kinetycznych uzyskanych w ramach niezależnych badań prowadzonych w Zakładzie Inżynierii Bioprosesowej w Instytucie Inżynierii Chemicznej. Część parametrów modelu została przyjęta na podstawie danych literaturowych ze świadomością iż mogą one nie w pełni opisywać układy dla którego dysponowano danymi kinetycznymi. Niewątpliwie dużym atutem pracy, byłaby możliwość dysponowania kompletem danych kinetycznych opisujących przebieg procesu hydrolizy dla określonego enzymu i substratu. Pozwoliło by to nie tylko na pełniejszą weryfikację modelu, a także na dokładniejsze wyznaczenie wszystkich parametrów modelu. Zaproponowano przeprowadzenie dodatkowych eksperymentów pozwalających lepiej zdefiniować stosowane we wcześniejszych badaniach odczynniki chemiczne i preparaty enzymatyczne. Proponowane analizy miałyby na celu:

- * określenie średniej masy cząsteczkowej skrobi ziemniaczanej użytej w badaniach kinetycznych,

* Przykładowo wykorzystując wygenerowaną przez program tablicę przedstawiającą ilość poszczególnych cukrów w układzie możliwe jest określenie niezbędnych parametrów modelu multisubstratowego Michaelisa-Menten [24].

- * wyznaczenie ilości podjednostek glukozy przy całkowitej hydrolizie substratu (hydroliza kwaśna) oraz określenie stopnia polimeryzacji dla amylopektyny,
- * analizę składu mieszaniny reakcyjnej dla wybranych etapów reakcji [161],
- * zbadanie możliwości wystąpienia w układzie reakcji kondensacji (np. poprzez dodanie do mieszaniny glukozy, maltozy, maltotriozy i maltotetraozy enzymów amylolitycznych i określenie, czy w układzie zachodzi reakcja kondensacji tych cukrów),
- * określenie stabilności enzymu w układzie oraz występujących oddziaływań inhibicyjnych (np. poprzez wprowadzenie pewnej ilości inhibitora w początkowym etapie reakcji – dla układu z β -amylazą odpowiadałoby to wprowadzeniu określonej ilości maltozy do układu reakcyjnego).

Badania te można wykonać w oparciu o standardowe procedury laboratoryjne [1, 19, 20, 28, 29, 32, 34, 35, 38, 40, 42, 44, 45, 53, 71, 77, 79, 95, 121, 127, 147, 164, 176] niemniej ze względu na stosunkowo wysoki koszt ich wykonanie planuje się przeprowadzić w późniejszym terminie.

4.8. Wyniki modelowania procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi

W wyniku modelowania komputerowego procesów hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych dla rozpatrywanych układów:

- rozszerzono informacje o układach doświadczalnych poprzez wyznaczenie stężeń poszczególnych sacharydów (w załączniku przedstawiono przykładowo zmianę stężenia glukozy, maltozy, maltotriozy, maltotetraozy, maltopentaozy, maltoheksaozy oraz produktów pośrednich w trakcie reakcji),
- określono zmiany jakim podlegają podczas reakcji cząsteczki amylozy i amylopektyny (podczas symulacji komputerowych wyprowadzono informacje na temat ilości końców redukujących oraz niezhydrolizowanych wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 i α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowych znajdujących się w cząsteczkach obecnych w układzie - załącznik),
- wyznaczono stałe przeskalowania, co umożliwi prognozowania zachowania się układów zawierających inne stężenia substratów i enzymów, niż układy dla których dysponowano danymi doświadczalnymi. (W tabeli 4.10. zestawiono wyznaczone stałe przeskalowania

dla modelu iteracyjnego z parametrami wybranych modeli „klasycznych”*. Szczegółowy sposób wyznaczenia stałych kinetycznych wraz z określoną dla każdego modelu funkcją błędu przedstawiono załączniku.),

- dla układu synergistycznego α -amylaza-glukoamylaza w zakresie danych doświadczalnych określono jak zmiana stężeń poszczególnych enzymów wpływa na skład końcowy mieszaniny reakcyjnej (wyniki przedstawiono w załączniku),
- umożliwiono analizę wpływu zmiany określonych parametrów układu na przebieg procesu (np. określenie wpływu stopnia polimeryzacji amylopektyny na skład końcowy produktu),
- stosunkowo małe błędy symulacji mogą sugerować o trafności przyjętych założeń oraz pozwalają przypuszczać że rzeczywisty przebieg reakcji zbliżony jest do schematu przedstawionego w modelu, niemniej do potwierdzenia powyższej hipotezy wymagane jest przeprowadzenie dalszych badań laboratoryjnych sugerowanych w podrozdziale 4.7.

Przyjęte przy modelowaniu wartości parametrów modelu przedstawiono w załączniku. W oparciu o opracowany program możliwe jest prognozowanie zachowania układów multisubstratowych i multienzymatycznych w oparciu o dane eksperymentalne uzyskane dla układów monosubstratowych. Istnieje potencjalna możliwość ekstrapolowania wyników poza zakres danych doświadczalnych użytych do wyznaczania stałych przeskalowania. Program pozwala analizować także wpływ potencjalnie występujących w układzie oddziaływań inhibicyjnych na przebieg procesu hydrolizy skrobi, co zostało przedstawione w rozdziale 5.5.

* Stałe wyznaczono w oparciu o dostępne dane kinetyczne wykorzystując moduł SOLVER zawarty w arkuszu kalkulacyjnym *Microsoft® Excel 97*. Wybrano program estymowania stycznej metodą Newtona z tolerancją 5% i narzuconą zbieżnością 0,001.

Tab. 4.10. Zestawienie wyznaczonych parametrów wybranych modeli kinetycznych (dla układu dwuenzymatycznego uwzględniono stężenia obydwu enzymów)
Sposób wyznaczenia stałych kinetycznych oraz przyjęte kryteria błędów przedstawiono w załączniku.

układ enzymatyczny	immobilizowana α -amylaza	immobilizowana β -amylaza z jęczmienia	natywna β -amylaza z jęczmienia	glukoamylaza z <i>Apergillus niger</i>	synergizm α -amylaza-glukoamylaza
równanie Michaelisa-Menten [93]: $v = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{k_M + c_S}$	$k_3 = 48,8 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 5,47 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 10,83 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 175,3 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 16,42 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 107,8 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 298,20 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 13106 \text{ [mg/ml]}$	$k_{3,\alpha} = 73,98 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_{M,\alpha} = 451,6 \text{ [mg/ml]}$ $k_{3,\gamma} = 0,877 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_{M,\gamma} = 202,1 \text{ [mg/ml]}$
równanie Hilla [46]: $v = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S^n}{k_M + c_S^n}$	$k_3 = 51,01 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 5,42 \text{ [mg/ml]}$ $n = 0,91 \text{ [-]}$	$k_3 = 25,91 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 174,0 \text{ [mg/ml]}$ $n = 0,60 \text{ [-]}$	$k_3 = 58,22 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 92,93 \text{ [mg/ml]}$ $n = 0,48 \text{ [-]}$	$k_3 = 423 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 779 \text{ [mg/ml]}$ $n = 0,11 \text{ [-]}$	
równanie Michaelisa-Menten z inhibicją kompetycyjną produktem [115]: $v = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{k_M + c_S + \frac{k_M \cdot c_P}{k_{IP}}}$	$k_3 = 7,84 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 0,152 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP} = 0,0035 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 9,96 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 175,0 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP} = 0,249 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 11,62 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 107,2 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP} = 0,371 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 435 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 12999 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP} = 0,230 \text{ [mg/ml]}$	$k_{3,\alpha} = 472,9 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_{M,\alpha} = 15,34 \text{ [mg/ml]}$ $k_{3,\gamma} = 470,0 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_{M,\gamma} = 240,6 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP,\gamma} = 0,0407 \text{ [mg/ml]}$
równanie Michaelisa-Menten z inhibicją substratową oraz kompetycyjną produktem [115]: $v = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{k_M + c_S + \frac{k_M \cdot c_P}{k_{IP}} + \frac{c_S^2}{k_{IS}}}$	$k_3 = 45,69 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 4,12 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP} = 0,0181 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IS} = 0,793 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 15,62 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 174,5 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP} = 0,158 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IS} = 2,839 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 228,9 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 57,92 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP} = 0,0103 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IS} = 0,126 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 400,4 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 0,587 \text{ [mg/ml]}$ $k_{IP} = 2,16 \cdot 10^{-5} \text{ [mg/ml]}$ $k_{IS} = 0,0344 \text{ [mg/ml]}$	
równanie Michaelisa-Menten z inhibicją niekompetycyjną produktem [115]: $v = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{k_M + c_S + \frac{(k_M + c_S) \cdot c_P}{k_i}}$	$k_3 = 33,63 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 6,27 \text{ [mg/ml]}$ $k_i = 0,071 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 15,99 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 174,44 \text{ [mg/ml]}$ $k_i = 0,154 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 13,75 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 106,57 \text{ [mg/ml]}$ $k_i = 0,366 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 316,47 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 12999 \text{ [mg/ml]}$ $k_i = 0,3494 \text{ [mg/ml]}$	
równanie Michaelisa-Menten z inhibicją akompetycyjną produktem [115]: $v = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{k_M + c_S + \frac{c_S \cdot c_P}{k_i}}$	$k_3 = 138,6 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 708,7 \text{ [mg/ml]}$ $k_i = 0,0100 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 10,62 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 174,93 \text{ [mg/ml]}$ $k_i = 0,00748 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 21,44 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 106,27 \text{ [mg/ml]}$ $k_i = 0,0169 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 1807 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 1020 \text{ [mg/ml]}$ $k_i = 0,000105 \text{ [mg/ml]}$	
równanie Michaelisa-Menten - „metoda całkowa” [23]: $t = \frac{1}{k_3 \cdot c_E} \cdot (c_P + k_M \cdot \ln \frac{c_{S0}}{c_S})$	$k_3 = 14,43 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 0,77 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 0,446 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 2,987 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 2,068 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 2,201 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 353,9 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 5577 \text{ [mg/ml]}$	
równanie empiryczne [61, 122]: $c_S = c_{S0} \cdot x \cdot e^{-k_1 \cdot c_E \cdot t} + c_{S0} \cdot (1 - x) \cdot e^{-k_2 \cdot c_E \cdot t}$	$k_1 = 0,433 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $k_2 = 4,32 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $x = 0,214 \text{ [-]}$	$k_1 = 0,037 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $k_2 = 5,946 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $x = 0,95 \text{ [-]}$	$k_1 = 0,195 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $k_2 = 5,956 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $x = 0,984 \text{ [-]}$	$k_1 = 0,0289 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $k_2 = 0,0214 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $x = 0,501 \text{ [-]}$	$k_1 = 10,55 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $k_2 = 3,55 \text{ [ml/mg} \cdot \text{min]}$ $x = 0,22 \text{ [-]}$
metoda Lineara-Burka (linearyzacja równania Michaelisa-Menten) [75]: $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{k_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S}$	$k_3 = 1,203 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 1,000 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 0,155 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 255,7 \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 1 \cdot 10^{10} \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 2,05 \cdot 10^{-10} \text{ [mg/ml]}$	$k_3 = 0,2421 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ $k_M = 18,95 \text{ [mg/ml]}$	
wyznaczone stałe przeskalowania dla modelu enzymatycznej hydrolizy skrobi	$k_t = 5,06 \cdot 10^{-6} \text{ [min/n]}$ $k_M = c_{S0}/n_{PK} \text{ [mg/ml} \cdot \text{t]}$	$k_t = 3,23 \cdot 10^{-5} \text{ [min/n]}$ $k_M = c_{S0}/n_{PK} \text{ [mg/ml} \cdot \text{t]}$	$k_t = 8,52 \cdot 10^{-6} \text{ [min/n]}$ $k_M = c_{S0}/n_{PK} \text{ [mg/ml} \cdot \text{t]}$	$k_t = 1,95 \cdot 10^{-7} \text{ [min/n]}$ $k_M = c_{S0}/n_{PK} \text{ [mg/ml} \cdot \text{t]}$	$k_{t,\alpha} = 1,50 \cdot 10^{-6} \text{ [min/n]}$ $k_{t,\gamma} = 3,16 \cdot 10^{-5} \text{ [min/n]}$ $k_M = c_{S0}/n_{PK} \text{ [mg/ml} \cdot \text{t]}$

5. Przykładowe zastosowania modelu iteracyjnego

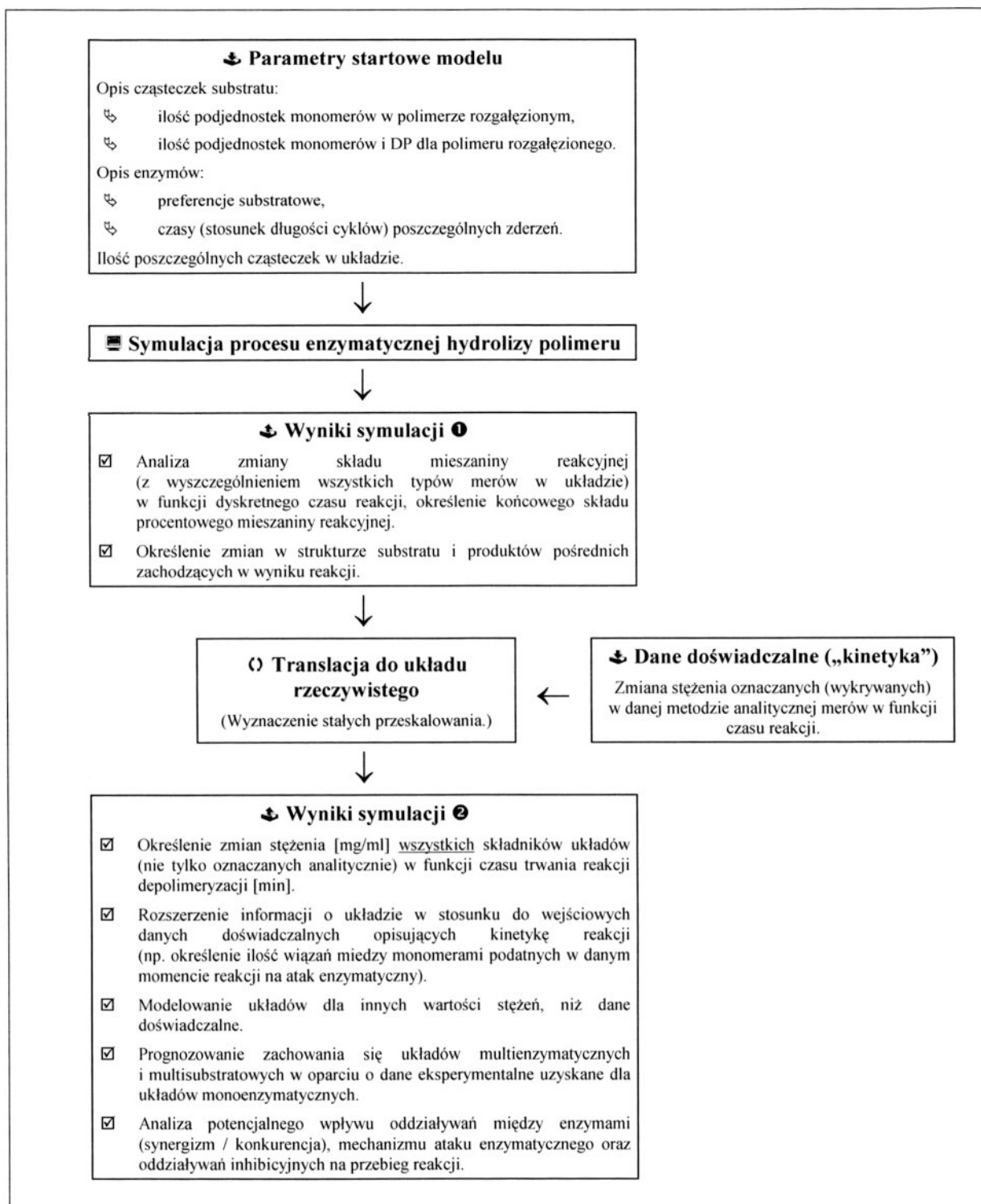
W niniejszym rozdziale przedstawiono przykładowe zastosowania modelu iteracyjnego, skupiając się na prezentacji możliwości trudnych do osiągnięcia w oparciu o „klasyczne” modele bazujące na opisanu procesów poprzez podanie równań kinetycznych.

5.1. Modelowanie procesów laboratoryjnych i przemysłowych

Opracowany model iteracyjny może zostać wykorzystany do modelowania reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej (tabela 5.1). Na rysunku 5.1. przedstawiono zakres podstawowych informacji uzyskiwanych w wyniku modelowania omawianych reakcji depolimeryzacji.

Tab. 5.1. Przykładowe zastosowania modelu iteracyjnego.

zastosowanie modelu iteracyjnego	przykład
określenie składu mieszaniny reakcyjnej z wyszczególnieniem wszystkich składników układu	podanie wartości stężeń wszystkich polisacharydów uczestniczących w procesie enzymatycznej hydrolizy skrobi
rozszerzenie informacji o układzie	określenie zmian w strukturze amylopektyny i amylozy zachodzących w wyniku reakcji enzymatycznej hydrolizy
planowanie doświadczeń	określenie na podstawie preferencji substratowych enzymów amylolitycznych maksymalnej liczby cukrów mogących powstać w wyniku hydrolizy skrobi
modelowanie złożonych procesów przemysłowych (układy multienzymatyczne i multisubstratowe)	opis procesu wstępnego upłynniania skrobi z późniejszym jej scukrzaniem; określenie składu końcowego mieszaniny w zależności od warunków prowadzenia reakcji
optymalizacja procesów przemysłowych	w przypadku stosowania mieszaniny enzymów amylolitycznych, określenie optymalnego stosunku między enzymami w układzie reakcyjnym; dla procesów w których enzymy ulegają procesowi dezaktywacji, możliwe jest także wyznaczenie optymalnego czasu wprowadzenia danego enzymu do układu.
wyznaczanie parametrów innych modeli w oparciu o model iteracyjny	patrz rozdział 5.2.
określenie typu współpracy między enzymami: konkurencja / synergizm	patrz rozdział 5.3.
analiza oddziaływań inhibicyjnych oraz mechanizmu ataku enzymów	patrz rozdział 5.5.



Rys. 5.1. Zakres informacji uzyskiwanych w wyniku modelowania procesów degradacji biopolimerów.

5.2. Wyznaczanie parametrów innych modeli w oparciu o model iteracyjny

Prezentowany model iteracyjny można wykorzystać do wyznaczenia parametrów innych modeli oraz do opisanie i analizy stechiometrii reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów. Przykładowo *stała przeskalowania czasu* koresponduje z *liczbą obrotów enzymu* [27, 131, 144], która jest parametrem modelu Michaelisa-Menten. W rozdziale przedstawiono przykładowe zastosowania modelu iteracyjnego do określenia parametrów modeli deterministycznych i stochastycznych spotykanych w literaturze przy opisywaniu procesu hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych.

5.2.1. Określenie ilości substratu

Ze względu na charakter reakcji degradacji biopolimerów, przy opisie reakcji wygodnie jest założyć iż substratem w reakcji nie jest sama cząsteczka, lecz wiązania podatne na działanie poszczególnych enzymów [100, 150, 151]. Uproszczenie to pozwala określić postęp reakcji oraz uniknąć wielu pozornych paradoksów, związanych ze wzrostem lub pozornie stałym stężeniem substratu przy wyrażeniu jego koncentracji poprzez stężenie masowe lub stężenie molowe (tabela 5.2.).

Tab. 5.2. Zmiana stężenia substratu w początkowym etapie reakcji. W tabeli określeniem „substrat” przyjęto oznaczać cząsteczki mogące ulec hydrolizie w wyniku działania danego enzymu amylolitycznego.

enzym	stężenie molowe	stężenie masowe	model iteracyjny: ilość wiązań glikozydowych
α -amylaza	↑ stężenie molowe substratu rośnie	≡ stężenie masowe substratu, rozumiane jako całkowita masa wszystkich cząsteczek substratów w danej objętości, nie ulega zmianie	↓ całkowita ilość wiązań α -1→4-glikozydowych maleje o jeden ilość potencjalnie podatnych na atak α -amylazy wiązań α -1→4-glikozydowych określana jest rekurencyjnie
β -amylaza	≡ stężenie substratu nie ulega zmianie	↓ stężenie masowe substratu maleje o masę uwalnianej cząsteczki maltozy	↓ całkowita ilość wiązań α -1→4-glikozydowych w układzie maleje o jeden ilość potencjalnie podatnych na atak β -amylazy wiązań α -1→4-glikozydowych maleje o dwa
glukoamylaza	≡ stężenie substratu nie ulega zmianie	↓ stężenie masowe substratu maleje o masę uwalnianej cząsteczki glukozy	↓ całkowita ilość wiązań α -1→4-glikozydowych maleje o jeden ilość potencjalnie podatnych na atak glukoamylazy wiązań α -1→4-glikozydowych maleje o jedno

W przypadku opisu procesu hydrolizy skrobi, w niektórych modelach deterministycznych [15, 54, 61, 67, 72, 80, 85] i stochastycznych [97, 100, 150] przyjmuje się, że substratem dla enzymów amylolitycznych jest pewna pula wiązań α -glikozydowych łączących podjednostki glukozy*. Dla skrobi sumaryczna ilość wiązań glikozydowych może być określona z zależności:

$$n_{\alpha-1,4} = \frac{M_w - 18}{162} - 1 \text{ [mol/dm}^3\text{]},$$

gdzie $n_{\alpha-1,4}$ jest ilością wiązań glikozydowych w danej cząsteczce, a M_w jest jej masą molową. Dla amylozy wielkość $n_{\alpha-1,4}$ odpowiada ilości wiązań α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowych. Natomiast w przypadku amylopektyny powyższy wzór podaje zależność określającą całkowitą ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 i α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowych†. Problemem jest natomiast określenie ilości wiązań glikozydowych podatnych na działanie danego enzymu oraz oszacowanie jak zmienia się ta wielkość w trakcie reakcji [64]. Należy tu zaznaczyć iż różni autorzy odmiennie definiują liczbę wiązań podatnych na działanie enzymu, przyjmując na przykład iż jest ona proporcjonalna do ilości wszystkich wiązań glikozydowych, odpowiada sumarycznej ilości wszystkich wiązań potencjalnie mogących ulec hydrolizie pod wpływem danego enzymu lub wyznaczając ilość miejsc podatnych na działanie enzymu w określonym czasie [20, 24, 97, 102, 113]. Niezależnie od przyjętej definicji miejsca podatnego na działanie enzymu, opracowany model iteracyjny pozwala określić te wielkości w sposób rekurencyjny dla zdefiniowanego układu, a tym samym może dostarczyć parametrów wykorzystywanych w innych modelach. W tabeli 5.3. przedstawiono wyznaczone w oparciu o model iteracyjny wielkości opisujące ilość wiązań glikozydowych podatnych na atak β -amylazy dla przykładowych cząsteczek amylozy i amylopektyny.

* W pracach [15, 67, 80, 85, 151], z których zaczerpnięto dane doświadczalne wykorzystane w niniejszej pracy przyjęto, że substratem w reakcji są wiązania glikozydowe, natomiast produktem reakcji są *końce redukujące* uwalniane w wyniku procesu enzymatycznej hydrolizy skrobi i oznaczane w reakcji z DNS.

† W celu określenia ilości wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 glikozydowych w cząsteczce amylopektyny konieczna jest dodatkowa informacja podająca stosunek wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 do ilości wiązań α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowych.

Tab. 5.3. Ilość miejsc podatnych na atak β -amylazy dla amylozy i amylopektyny w zależności od przyjętej definicji miejsca podatnego na atak enzymu.

przyjęte określenie ilości miejsc podatnych na atak β -amylazy	amyloza złożona z 1225 podjednostek glukozy	amylopektyna o stopniu polimeryzacji DP = 25 złożona z 1225 podjednostek glukozy
całkowita ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowych w cząsteczce	1224	~ 1200
ilość wiązań podatnych na atak β -amylazy w „danej chwili”	1 (jeden koniec nieredukujący)	~ 25 (liczba ta odpowiada ilości „skrajnych gałęzi” w amylopektynie)
całkowita ilość wszystkich wiązań w substracie potencjalnie podatnych na działanie β -amylazy	612 (hydrolizowane jest co drugie wiązanie począwszy od końca nieredukującego)	~ 300 (hydroliza wiązań α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowych zostaje zatrzymana przed „punktami rozgałęzienia”)
ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowych, o które może być zubożony substrat w przypadku jego całkowitej hydrolizy przy udziale β -amylazy	1224 (amyloza hydrolizowana jest przez β -amylazę „do końca”)	~ 600 (w układzie pozostają niehydrolizowane dekstryny graniczne)

5.2.2. Określenie udziałów poszczególnych frakcji polisacharydów w skrobi

W literaturze spotyka się podział skrobi na dwie frakcje [79]: bardziej podatną na działanie enzymu amylolitycznego i frakcję wolniej hydrolizowaną*. Przyjmuje się, że początkowy stosunek tych frakcji odpowiada stosunkowi amylozy do amylopektyny w skrobi lub ilość wiązań bardziej podatnych na hydrolizę określa się eksperymentalnie [162]. Dla uproszczenia przy opisie kinetycznym przyjmuje się, że stosunek obydwu frakcji jest zachowany podczas reakcji depolimeryzacji [61], mimo iż na podstawie rozważań teoretycznych można przypuszczać, że szybciej całkowicie zostanie zhydrolizowana frakcja bardziej podatna na działanie enzymu. Opracowany model iteracyjny umożliwia oszacowanie zmian stosunku ilościowego pomiędzy dwoma frakcjami skrobi, do jakich dochodzi w trakcie reakcji depolimeryzacji.

Interesującym wydaje się także analiza stosunku wiązań podatnych na działanie enzymu do ilości całkowitej wiązań glikozydowych w układzie[†] oraz badanie jak zmienia się stężenie amylozy i amylopektyny w trakcie reakcji. Przykładowo zauważono, że w przypadku hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy upłynniającej, cząsteczki amylozy i amylopektyny są

* Nie uwzględnienie złożoności substratu może prowadzić np. przy opisie reakcji w oparciu o model Michaelisa-Menten, iż reakcja w rzeczywistości w pierwszym etapie przebiega szybciej (degradowany jest substrat lepiej hydrolizowalny), a w końcowym wolniej (degradowany jest substrat o bardziej „oporny” na działanie enzymu) niż wynikałoby to z opisu kinetycznego zakładającego monosubstratowość reakcji.

[†] W literaturze [61] stosunek ten używany bywa do określenia względnej dostępności substratu dla danego enzymu

hydrolizowane ze zbliżoną prędkością. Natomiast w przypadku hydrolizy skrobi przy udziale glukoamylazy (założono atak wielokrotny i możliwość hydrolizy wiązań α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowych), glukoamylaza szybciej hydrolizowała cząsteczki amylozy, podczas gdy w przypadku amylopektyny „zwalniała” na punktach rozgałęzienia.

5.2.3. Wyznaczenie stałych kinetycznych z zastosowaniem symulacji komputerowej

Model iteracyjny, poprzez dostarczenie dodatkowych informacji o układzie, umożliwia wyznaczenie wartości stałych występujących w „klasycznych” równaniach kinetycznych. Zgodnie z [27, 146], aby wyznaczyć stałe kinetyczne równań deterministycznych opisujących mieszane typy inhibicji potrzebna jest znajomość przebiegu stężeń inhibitora^{*}. Na ogół dla układów wieloskładnikowych informacja ta jest trudna do uzyskania na drodze doświadczalnej [42], wymaga zastosowania dodatkowych procedur analitycznych powodując wzrost kosztów eksperymentów. Natomiast zastosowanie modelowania komputerowego umożliwia we względnie krótkim czasie rozszerzenie informacji o układzie o niezbędne stężenia inhibitora (inhibitorów).

Przykładowo załóżmy, że rozpatrujemy hipotetyczny przypadek, gdy α -amylaza inhibowana jest kompetycyjnie poprzez maltotriozę będącą jednym z produktów reakcji oraz że dysponujemy jedynie pomiarami kinetycznymi przedstawiającymi zmianę stężenia cukrów redukujących w czasie. Chcąc rozpatrzeć model Michaelisa-Menten poszerzony o inhibicje substratową produktem reakcji:

- ☒ przeprowadzamy symulację danego procesu,
- ☒ zestawiamy dane eksperymentalne z wynikami symulacji komputerowej, uzyskując oprócz informacji o zmianie stężenia produktu reakcji w czasie, dodatkowo także zmianę stężenia inhibitora (maltotriozy) względem czasu reakcji,

^{*} Graficzny sposób wyznaczenia stałych kinetycznych dla układów α -amylaza-skrobia, w których występuje mieszany typ inhibicji: inhibicja kompetycyjna-niekompetycyjna lub inhibicja niekompetycyjna-akompetycyjna przedstawiono w [27, str. 148 ÷ 150].

☒ w oparciu o rozszerzony wektor zmiennych przedstawiających zmianę stężeń substratu (dane doświadczalne) i maltotriozy (symulacja komputerowa) w czasie reakcji wyznaczamy szukane stałe kinetyczne (stałe k_3 , k_M oraz k_{ip}).

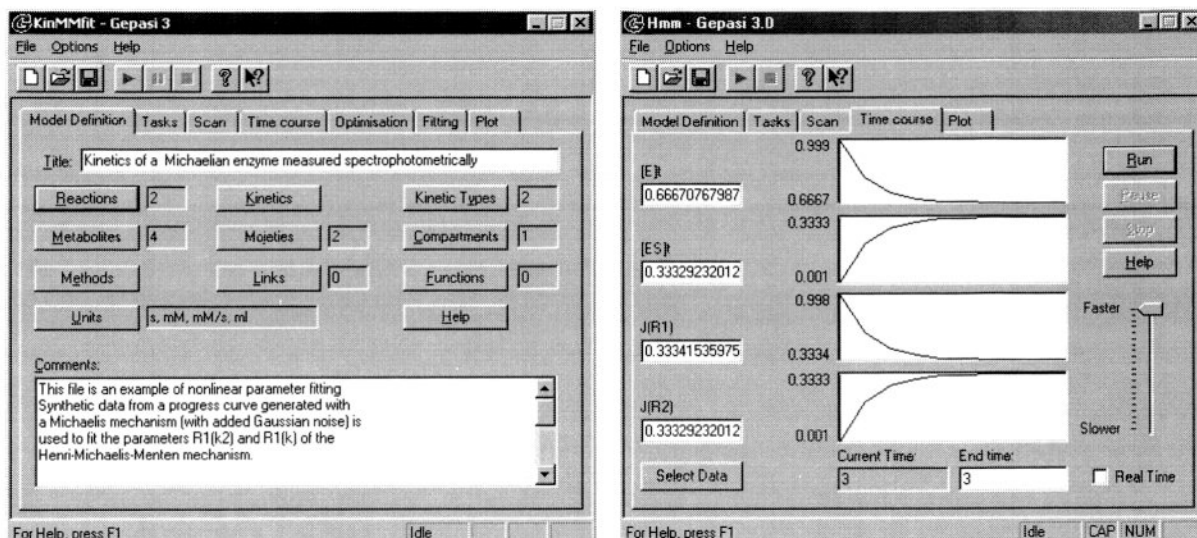
W tabeli 5.4. przedstawiono stałe kinetyczne dla układu α -amylaza - skrobia wyznaczone w oparciu o dane kinetyczne dla α -amylazy scukrzającej i symulację komputerową zgodnie z przedstawionym powyżej przykładem. Arkusz kalkulacyjny przedstawiający sposób wyznaczenia parametrów znajduje się w załączniku.

Tab. 5.4. Wyznaczone stałe równań kinetycznych w oparciu o symulację komputerową (opis w tekście).

równanie kinetyczne	wyznaczone stałe kinetyczne		
równanie Michaelisa-Menten: $v = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{k_M + c_S}$	Liczba obrotów: $k_3 = 48,08 \text{ [min}^{-1}\text{]}$	Stała Michaelisa-Menten: $k_M = 5,47 \text{ [mg/ml]}$	
równanie Michaelisa-Menten z inhibicją kompetycyjną produktem reakcji: $v = \frac{k_3 \cdot c_E \cdot c_S}{k_M + c_S + \frac{k_M \cdot c_P}{k_{ip}}}$	Liczba obrotów: $k_3 = 42,14 \text{ [min}^{-1}\text{]}$	Stała Michaelisa-Menten: $k_M = 7,69 \cdot 10^{-3} \text{ [mg/ml]}$	Stała inhibicji kompetycyjnej produktem reakcji (maltotriozą): $k_{ip} = 5,44 \cdot 10^{-4} \text{ [mg/ml]}$

5.2.4. Wyznaczenie parametrów startowych dla innych programów symulacyjnych

Dyskusyjnym jest wykorzystanie modelu iteracyjnego do wyznaczenia parametrów innych programów symulacyjnych. W praktyce wykorzystano opracowany model iteracyjny do wyznaczenia parametrów programu edukacyjnego *Gepasi* [171], który umożliwia w oparciu o przyjęte równania kinetyczne symulowanie procesów enzymatycznych oraz metabolicznych [128, 133]. Przykładowo, dla serii danych opisujących proces hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy przeprowadzono symulację komputerową wykorzystując przedstawiony w pracy model iteracyjny. W jej wyniku uzyskano dodatkowe informacje o układzie, które uwzględniono przy deklarowaniu parametrów startowych w programie *Gepasi*. Na rysunku 5.2. przedstawiono symulację procesu kinetycznego opisywanego poprzez równanie monosubstratowe Henriego (parametrów startowe wyznaczono w oparciu o model iteracyjny). Wersję instalacyjną programu *Gepasi* zamieszczono w załączniku.



Rys. 5.2. Symulacja reakcji przebiegającej wg mechanizmu Henriego przy wykorzystaniu programu *Gepasi*.

5.3. Modelowanie typu oddziaływań pomiędzy enzymami (synergizm, konkurencja)

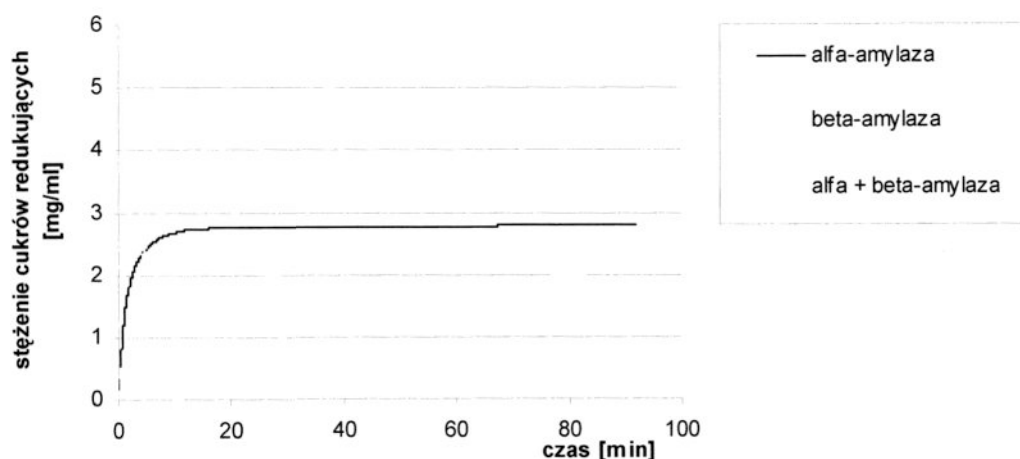
W pracy zaproponowano stochastyczny opis układów wieloenzymatycznych. Z powodzeniem udało się uwzględnić w modelu takie zjawiska jak synergizm* lub konkurencja† pomiędzy różnymi typami enzymów uczestniczących w reakcji enzymatycznej degradacji skrobi [2, 36, 37, 92, 155]. Wzajemne interakcje pomiędzy enzymami mogą być określone z zastosowaniem modelu iteracyjnego między innymi w oparciu o analizę:

1. zmiany liczby miejsc podatnych na działanie danego enzymu po wprowadzeniu do układu modelowego cząsteczek innego enzymu,
2. zmiany ilości zderzeń aktywnych i nieaktywnych w określonym czasie po dodaniu innego enzymu,
3. różnicy składu mieszaniny reakcyjnej dla układów monoenzymatycznych i multienzymatycznych.

* Przykładem synergistycznego oddziaływania między enzymami, jest udostępnianie substratu dla β - i glukoamylazy (końców nieredukujących) przez α -amylazę, hydrolizującą wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe wewnątrz łańcucha poliglukozowego.

† Konkurencją nazywamy przypadek gdy różne enzymy współzawodniczą z sobą o dany substrat (np. β - i glukoamylaza konkurują między sobą przeprowadzając atak na końce nieredukujące substratów). W załączniku V przedstawiono symulację dla układu β -amylaza-glukoamylaza, w którym obydwa enzymy konkurują pomiędzy sobą o dostęp do końców nieredukujących w cząsteczkach skrobi.

Przykład współpracy pomiędzy enzymami amylolitycznymi podczas procesu hydrolizy skrobi przedstawiono na rysunku 5.3. Dla układu zawierającego mieszaninę enzymów α - i β -amylazy obserwuje się wyższy poziom degradacji skrobi, niż dla układów zawierających pojedyncze enzymy. Wynika to z faktu, iż α -amylaza, udostępnia β -amylazie miejsca położone wewnątrz cząsteczek amylopektyny oraz z możliwości hydrolizy przez β -amylazę krótkich oligosacharydów uwalnianych przez α -amylazę.



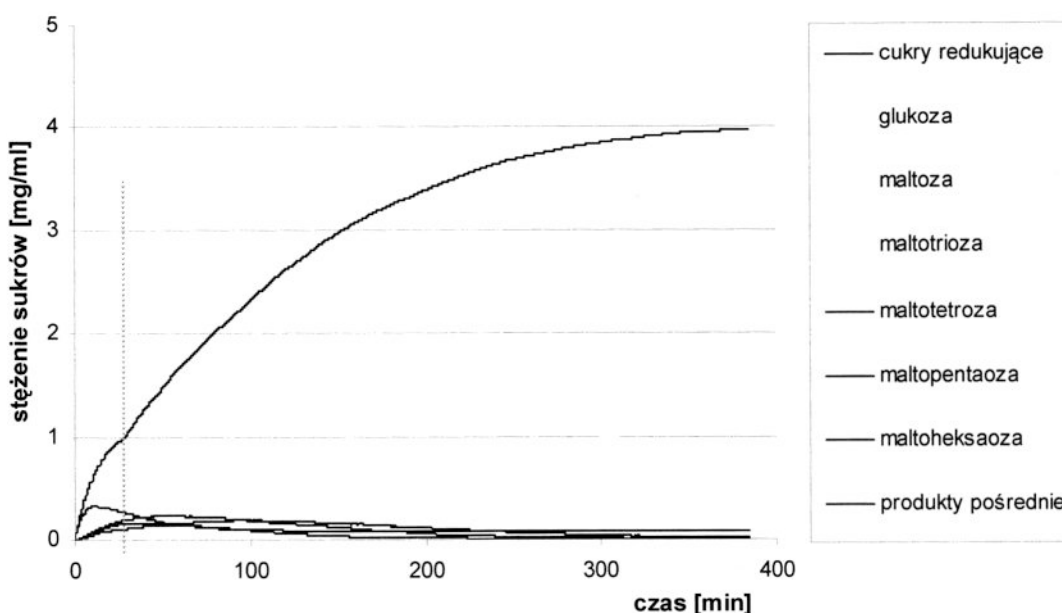
Rys. 5.3 Zmiana stężenia cukrów redukujących podczas reakcji hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy, β -amylazy i mieszaniny równomolowej obydwu enzymów.

Przy modelowaniu procesów, w których zachodzą oddziaływania synergistyczne pomiędzy enzymami istotne jest określenie wpływu stosunku stężeń użytych enzymów na skład poszczególnych frakcji produktów powstających w reakcji. Jest to szczególnie ważne w przypadku modelowania procesów, w których pozyskuje się syropy glukozowe, gdyż ilość frakcji poszczególnych cukrów w produkcie końcowym decyduje o zastosowaniu syropów glukozowych [17, 154]. W tabeli 5.5. przedstawiono wpływ stosunku ilości cząsteczek α -amylazy i glukoamylazy na skład końcowy produktu.

Tab. 5.5. Wpływ stosunku ilości α -amylazy do glukoamylazy na skład końcowy mieszaniny reakcyjnej.

stosunek α -amylazy do glukoamylazy	Produkty końcowe						
	glukoza	maltoza	maltotrioza	maltotetraoza	maltopentaoza	maltoheksaoza	dekstryny graniczne
100 : 1	3,30%	26,61%	13,65%	8,73%	26,11%	15,09%	6,21%
10 : 1	63,36%	26,13%	4,43%	2,58%	0,90%	0,27%	2,36%
1 : 1	70,99%	26,29%	0,48%	0,17%	0,05%	0,01%	2,03%
1 : 10	81,02%	16,68%	0,26%	0,11%	0,06%	0,02%	1,87%
1 : 100	91,05%	6,83%	0,09%	0,06%	0,03%	0,03%	1,80%

Opracowany model iteracyjny umożliwia także modelowanie procesów synergistycznych, w których wprowadza się do układu po określonym czasie drugi enzym. Przykładem takiego procesu, wykorzystywanego na skalę przemysłową, jest wstępne upłynnianie skrobi przez α -amylazy z późniejszym dodaniem enzymu scukrzającego [2, 17, 152]. Na rysunku 5.4. przedstawiono symulację procesu hydrolizy skrobi przy udziale mieszaniny enzymów: α -amylazy i glukoamylazy [36] (pionową zieloną linią zaznaczono czas, po którym zostaje wprowadzona do układu glukoamylaza).

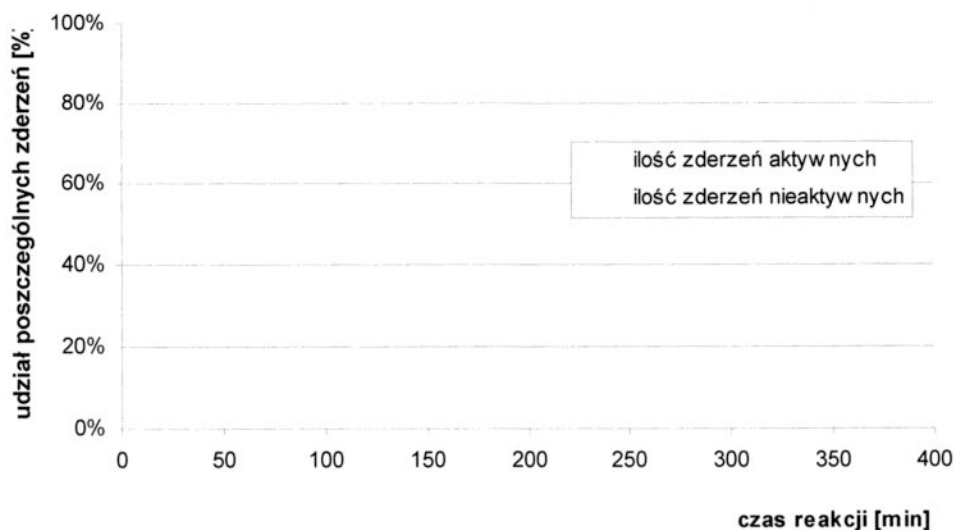


Rys. 5.4. Symulacja procesu wstępnego upłynniania skrobi i późniejszego dodania enzymu upłynniającego. W symulacji przyjęto, że do układu zawierającego cząsteczki α -amylazy, po wystąpieniu 50 kolejnych zderzeń nieaktywnych zostanie wprowadzony enzym scukrzający - glukoamylaza. Czas po którym dodano drugi enzym reprezentuje na wykresie pionowa, zielona linia. (Przebieg symulacji przedstawiono w załączniku).

5.4. Efektywność wykorzystania enzymu

Parametrem ważnym szczególnie ze względów ekonomicznych jest *efektywność wykorzystania enzymu*. Parametr ten jest różnie określany w zależności od specyfiki procesu, jednak generalnie określa się nim dla danych warunków prowadzenia reakcji zdolność katalityczną enzymu [150]. Wykorzystując model iteracyjny efektywność wykorzystania enzymu w układzie można wyrazić np. poprzez określenie stosunku ilości zderzeń aktywnych

do całkowitej ilości zderzeń enzymu z cząsteczkami cukrów. Na rysunku 5.5. przedstawiono w jaki sposób zmienia się ilość zderzeń w układzie α -amylaza skrobia.



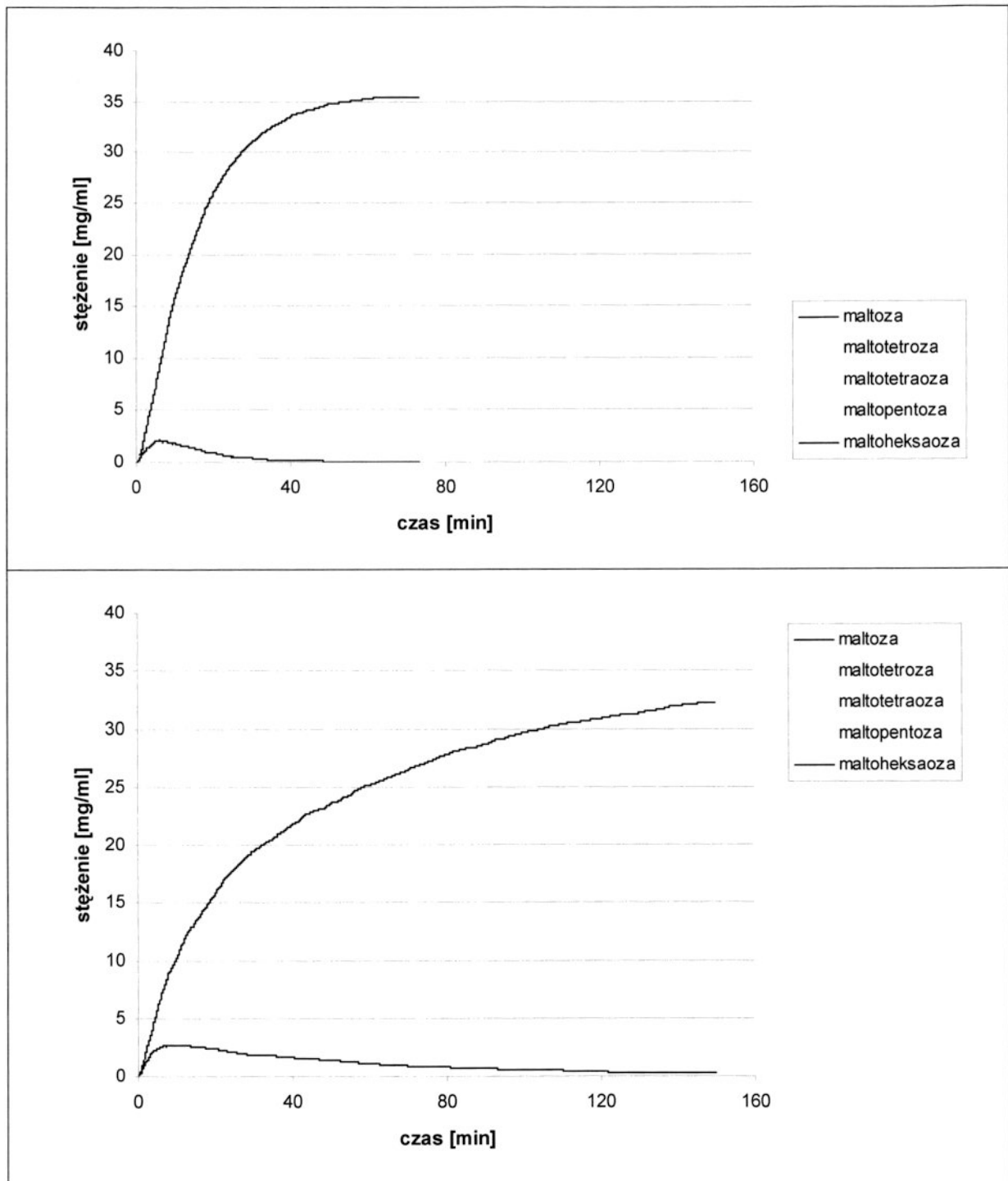
Rys. 5.5. Efektywność wykorzystania enzymu w układzie wyrażona jako ilość zderzeń aktywnych w stosunku do całkowitej ilości zderzeń enzymu z cząsteczkami cukrów. Wykorzystano dane dla α -amylazy upłynniającej ($c_E = 33,5 \mu\text{g/ml}$; $c_{S0} = 19,0 \text{ mg/ml}$).

5.5. Analiza oddziaływań inhibicyjnych oraz mechanizmu ataku enzymów

W modelu zdefiniowano różnorodne oddziaływania inhibicyjne^{*} oraz uwzględniono podstawowe modele ataku enzymu na substrat (atak losowy, pojedynczy atak łańcuchowy, wielokrotny atak łańcuchowy)[†]. Umożliwia to modelowanie układów, w których zachodzą wymienione oddziaływania oraz analizę wpływu określonych oddziaływań na zachowanie układu enzymatycznego oraz prognozowanie mechanizmu reakcji enzymatycznej [131, 146]. Przykładowo rozpatrzono hydrolizę skrobi przy udziale mieszaniny enzymów α -amylazy i β -amylazy. W układzie tym, zachodzi inhibicja kompetycyjna β -amylazy maltozą uwalnianą w trakcie procesu hydrolizy powodując spadek szybkości reakcji adekwatny do stężenia inhibitora. W układzie można także zaobserwować nieznaczne różnice w udziale procentowym poszczególnych produktów reakcji. Symulacje obydwu omawianych procesów przedstawiono na rysunku 5.6.

^{*} W opracowanym programie komputerowym zawartym w załączniku wprowadzono możliwość wyboru opcji związanych z inhibicją poszczególnych enzymów amylolitycznych. Zostały one zdefiniowane w oparciu o dostępne źródła literaturowe [6, 7, 14, 15, 17, 34, 35, 38, 41, 53, 71, 78, 117, 145, 148, 151, 162, 177].

[†] W załączniku przedstawiono przykładową symulację procesu hydrolizy skrobi przez β -amylazę z uwzględnieniem wielokrotnego ataku łańcuchowego [17, 97].



Rys. 5.6. Symulacja procesu hydrolizy skrobi przy udziale mieszaniny enzymów α - i β -amylazy. Na rysunku 5.6.a. przedstawiono zmianę stężenia produktów w funkcji czasu przy założonym braku występowania inhibicji w układzie. Rysunek 5.6.b. uzyskano przyjmując w symulacji komputerowej że β -amylazy jest inhibowana kompetycyjnie maltoza uwalniana w reakcji. (Dla ułatwienia porównania przebiegów stężeń, na obydwu wykresach przyjęto jednakowe zakresy wartości na poszczególnych osiach.)

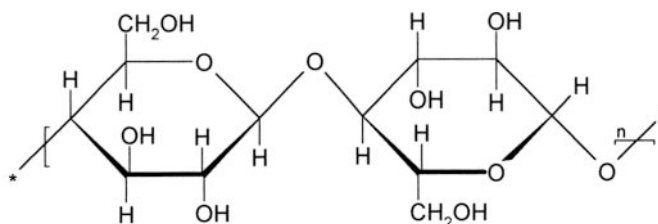
W symulacji założono, że substratem reakcji jest skrobia zawierająca 30% amylozy i 70% amylopektyny oraz przyjęto jednakowy stosunek aktywności obu enzymów. Za koniec symulacji uznano iterację w której nastąpiło 1000 kolejnych zderzeń nieaktywnych.

5.6. Opis enzymatycznej biodegradacji biopolimerów

Przedstawiony w pracy model enzymatycznej degradacji biopolimerów można zaadaptować do opisu większości procesów degradacji enzymatycznej biopolimerów zarówno o strukturze liniowej, zbliżonej do amylozy, jak i rozgałęzionej o strukturze rozgałęzionej zbliżonej do amylopektyny. Adaptacja przedstawionego w rozdziale trzecim modelu do opisu procesów degradacji innych biopolimerów odbywa się w trzech etapach:

1. zdefiniowanie reagentów (określenie substratu, produktów pośrednich i końcowych reakcji),
2. określenie mechanizmu działania enzymów przeprowadzających degradację,
3. wyboru w modelu iteracyjnym przedstawionych opcji odzwierciedlających specyfikę danego procesu.

Przykładowo, procesem który jest równie intensywnie badany jak hydroliza enzymatyczna skrobi i który cieszy się dużym zainteresowaniem przemysłu jest proces enzymatycznej hydrolizy celulozy [125]. Celuloza jest naturalnym polisacharydem o strukturze liniowej, występującym w większości organizmów roślinnych, złożonym z połączonych ze sobą wiązaniami β -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowymi podjednostek glikozy (rysunek 5.7.).



Rys. 5.7. Schemat podjednostki celulozy.

Proces hydrolizy celulozy, można utożsamić z procesem hydrolizy amylozy, przyjmując że hydrolizowane są wiązania β -glikozydowe łączące monomery glikozy (zamiast wiązań α -glikozydowych w cząsteczce amylozy) i odpowiednio definiując mechanizm ataku enzymów hydrolizujących celulozę. W tabeli 5.6. przedstawiono określone na podstawie danych literaturowych [20, 33, 92, 102, 103, 113, 124, 126, 148] parametry modelu opisujące proces degradacji celulozy przy udziale celulaz.

Tab. 5.6. Określenie parametrów modelu dla biodegradacji celulozy.

substrat	przyjęte parametry modelu
celuloza	średnia ilość podjednostek glikozy w cząsteczkach celulozy (polimer liniowy)
cellulazy	przyjęte założenia w modelu
<i>endo</i> -1→4-β-glukanaza [*]	podatne na atak są wiązania β-1→4-glikozydowe leżące wewnątrz cząsteczek celulozy
<i>egzo</i> -1→4-β-glukanaza [†]	podatne na atak są skrajne wiązania β-1→4-glikozydowe w cząsteczkach celulozy; inhibitorem kompetycyjnym jest dimer glikozy (celobioza) uwalniana jako produkt reakcji [92]; wiązania przy końcu nieredukującym są hydrolizowane 1,7 razy szybciej, niż pozostałe wiązania β-1→4-glikozydowe [113]
1→4-β-glukozydazy [‡]	katalizują hydrolizę celobiozy do glikozy

^{*} E.C. 3.2.1.4; endoglukanaza; 4-glukanohydrolaza *endo*-1,4-β-D-glukanu (hydrolizuje cząsteczkę celulozy wewnątrz łańcucha, analogicznie jak α-amylaza w przypadku amylozy).

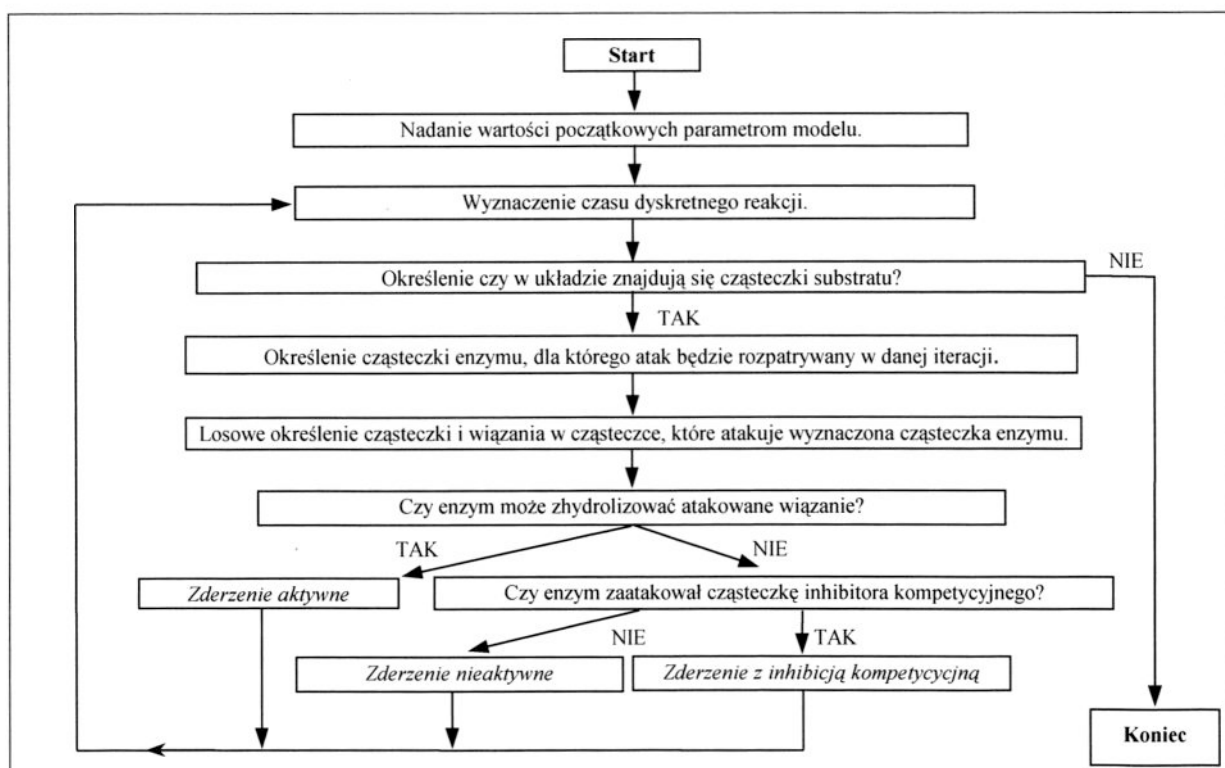
[†] E.C. 3.2.1.91; celobiohydrolaza; celobiohydrolaza 1,4-β-D-glukanu (katalizuje uwalnianie cząsteczek celobiozy, analogicznie do działania β-amylaza na cząsteczkę amylozy).

[‡] E.C. 3.2.1.21; β-glukozydaza; glukozydaza β-D-glukozydowa.

6. Podsumowanie

6.1. Opis modelu

Opracowany model iteracyjny spełnia wszystkie założenia jakie postawiono przy określaniu celów pracy. Opierając się na metodzie *Monte Carlo* zaproponowano stochastyczny sposób opisu reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów. Zgodnie z teorią zderzeń przyjęto, iż w układzie reakcyjnym dochodzi do nieustannych zderzeń cząsteczek enzymu z cząsteczkami substratów. Rozróżniono *zderzenia produktywne*, w wyniku których zachodzi reakcja enzymatyczna oraz *zderzenia nieproduktywne* nie prowadzące do hydrolizy substratu [97, 151]. W modelu uwzględniono także możliwość także zderzenia enzymu z cząsteczkami inhibitorów. Przedstawiony w rozdziale trzecim algorytm zakłada iteracyjność procesu degradacji biopolimeru. Atakowaną przez enzym cząsteczkę określa się w sposób (pseudo)losowy. Schemat ogólny modelu enzymatycznej degradacji biopolimerów przedstawiono na rysunku 6.1.



Rys. 6.1. Ogólny schemat blokowy modelu enzymatycznej hydrolizy polimeru.

6.2. Uzyskane wyniki

Opracowano uniwersalny model umożliwiający symulację większości procesów enzymatycznej degradacji biopolimerów. W przeciwieństwie do modeli spotykanych w literaturze, umożliwia on jednocześnie uwzględnienie złożoności substratu oraz symulowanie procesów multisubstratowych i multienzymatycznych, w których dopuszcza się możliwość wystąpienia szeregu dodatkowych oddziaływań enzymów z określonymi składnikami układu. Zaproponowano zapis omawianej reakcji w oparciu o zdefiniowane w modelu binarną *funkcję charakterystyczną* oraz *funkcję połączeń*. Podano parametry startowe modelu dla układów: skrobia - amylazy (rozdział 4.2.2.) oraz celuloza - celulazy (rozdział 5.6.).

Na bazie opracowanego modelu stworzono program komputerowy umożliwiający symulację omawianych w rozdziale czwartym procesów (opis programu został zamieszczony w dodatku IV). Przeanalizowano wpływ wybranych parametrów modelu na uzyskiwane wyniki symulacji (np. stopnia polimeryzacji amylopektyny na skład końcowy produktu). Przedstawiono algorytm, pozwalający na szybką translację parametrów modelu do odpowiadających im wielkości fizycznych. Opracowany model iteracyjny wykorzystano do modelowania reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych, uzyskując bardzo wysoką zgodność danych doświadczalnych z symulacjami komputerowymi. Uwzględniono specyfikę opisywanego procesu (np. budowę skrobi, inhibicję kompetycyjną β -amylazy maltozą uwalnianą podczas reakcji). Określono przebiegi stężeń powstających w reakcji oligosacharydów i produktów pośrednich. W przypadku układu α - i β -amylaza potwierdzono występowanie oddziaływań synergistycznych pomiędzy enzymami. Dla analizowanych układów enzymatycznych wyznaczono parametry modelu pozwalające na modelowanie opisywanych procesów dla innych wartości stężeń enzymu i substratu, niż wykorzystane w pracy dane eksperymentalne. Rozszerzono informacje o układach eksperymentalnych (m.in. wyznaczono przebiegi stężeń produktów pośrednich i wybranych oligocukrów oraz określono zmiany jakim podlegają podczas reakcji cząsteczki amylozy i amylopektyny). Podjęto także próbę symulacji procesów nie opisane przez dostępne dane doświadczalne*. Wyniki wszystkich symulacji zostały przedstawione w załączniku.

* Wykonano m. in. symulację komputerową procesu, w którym po określonym czasie zostaje wprowadzony do układu drugi enzym (rys.5.4.).

6.3. Zalety modelu

W pracy zaprezentowano założenia modelu iteracyjnego opisującego proces enzymatycznej degradacji biopolimerów. Poniżej przedstawiono podstawowe zalety opracowanego modelu iteracyjnego:

- ☑ Model iteracyjny pozwala na uwzględnienie:
 - ✓ budowy biopolimeru (struktura liniowa lub rozgałęziona [106]),
 - ✓ miejsca ataku enzymu na cząsteczkę substratu [151],
 - ✓ mechanizmu ataku enzymatycznego (atak losowy, pojedynczy atak łańcuchowy, wielokrotny atak łańcuchowy [17]),
 - ✓ różnych powinowactw enzymów do cząsteczek substratu [50],
 - ✓ występowania różnych typów inhibicji (inhibicja substratowa, produktami reakcji, kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna [144]),
 - ✓ wzajemnych interakcji między enzymami (synergizm, konkurencja [24]),
 - ✓ reakcji nieenzymatycznych przebiegających równolegle z rozpatrywanym procesem enzymatycznej degradacji biopolimeru (np. izomeryzacji lub kondensacji [98]),
 - ✓ wpływu czynników fizycznych, takich jak np.: temperatura, gęstość lub lepkość roztworu [27],
 - ✓ zmiany warunków procesu lub stężenia reagentów podczas trwania reakcji, co umożliwia np. uwzględnienie inaktywacji enzymu lub analizę układu, do którego wprowadzamy po określonym czasie inny enzym.
- ☑ Model iteracyjny pozwala na określenie przebiegów stężeń wszystkich zdefiniowanych reagentów w analizowanym układzie.
- ☑ Parametry modelu iteracyjnego korespondują z parametrami charakterystycznymi dla innych modeli (np. liczba zderzeń aktywnych $\Rightarrow$ liczba obrotów enzymu).
- ☑ Model iteracyjny jest jednym z nielicznych modeli, który opisuje jednocześnie układy multienzymatyczne i multisubstratowe (w tym także układy w których występuje

mieszanina substratów o strukturze liniowej i rozgałęzionej) pozwalając na określenie zmian stężeń wszystkich reagentów w układzie.

- ☑ Model ułatwia badanie stochiometrii reakcji i pozwala na pełniejszą analizę układu poprzez rozszerzenie informacji o układzie (np. określenie ilości miejsc w substracie podatnych na działanie określonego typu enzymu; określenie *stopnia wykorzystania enzymu* poprzez wyznaczenia dla danego enzymu stosunku zderzeń aktywnych i zderzeń nieaktywnych, w których uczestniczy w określonym przedziale czasu).
- ☑ Modyfikacja modelu pozwala na symulowanie procesów, w których są selektywnie odprowadzane lub dodawane reagenty podczas trwania reakcji (np. procesy o charakterze ciągłym, procesy w których odprowadzamy substraty).
- ☑ W porównaniu z innymi modelami multisubstratowymi [25, 122, 155], model iteracyjny operuje małą liczbą parametrów.
- ☑ Na podstawie zdefiniowanych w modelu *funkcji charakterystycznej A* oraz *funkcji połączeń B*, możliwe jest śledzenie i analizowanie zmian jakim ulega biopolimer podczas procesu jego degradacji.
- ☑ Model iteracyjny cechuje dużą elastyczność pozwalającą na jego adaptację do opisu, symulacji i optymalizacji różnorodny procesów przemysłowych i laboratoryjnych.

6.4. Możliwości zastosowania modelu

Dzięki uwzględnieniu szeregu zjawisk towarzyszącym procesom enzymatycznej hydrolizy biopolimerów, opracowany model iteracyjny może znaleźć szerokie zastosowanie m.in. do:

- ⇒ opisu, symulacji i optymalizacji procesów przemysłowych (np. procesu upłynniania i scukrzania skrobi przy udziale mieszaniny *egzo-* i *endo-*amylaz),
- ⇒ rozszerzenia informacji o układzie (np. poprzez określenie stężeń wszystkich reagentów występujących w badanym układzie, określenie zmian w strukturze substratu zachodzących podczas reakcji),

- ⇒ prognozowania zmiany określonych parametrów układu na przebieg reakcji depolimeryzacji (np. określenie wpływu stosunku ilości α -amylazy do glukoamylazy w preparacie enzymatycznym na skład produktu końcowego uzyskiwanego w procesie hydrolizy skrobi - tabela 5.5.),
- ⇒ wyznaczenia parametrów innych modeli (rozdział 5.2),
- ⇒ określenia wzajemnych interakcji pomiędzy enzymami (rozdział 5.3),
- ⇒ analizy oddziaływań inhibicyjnych oraz mechanizmu ataku hydrolaz (rozdział 5.4).

Modelowanie omawianych procesów jeszcze 5 lat temu wymagało drogich maszyn liczących, jednak obecnie nawet na średniej klasy komputerze domowym możliwa jest symulacja układów zawierających tysiące podjednostek monomerów tworzących biopolimery. Tym samym stworzona została możliwość szybkiego i taniego modelowania oraz analizowania przebiegów skomplikowanych reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów.

Dodatek I

Opis skrobi i wybranych enzymów amylolitycznych

A. Opis skrobi	85
B. Opis wybranych enzymów amylolitycznych.....	87

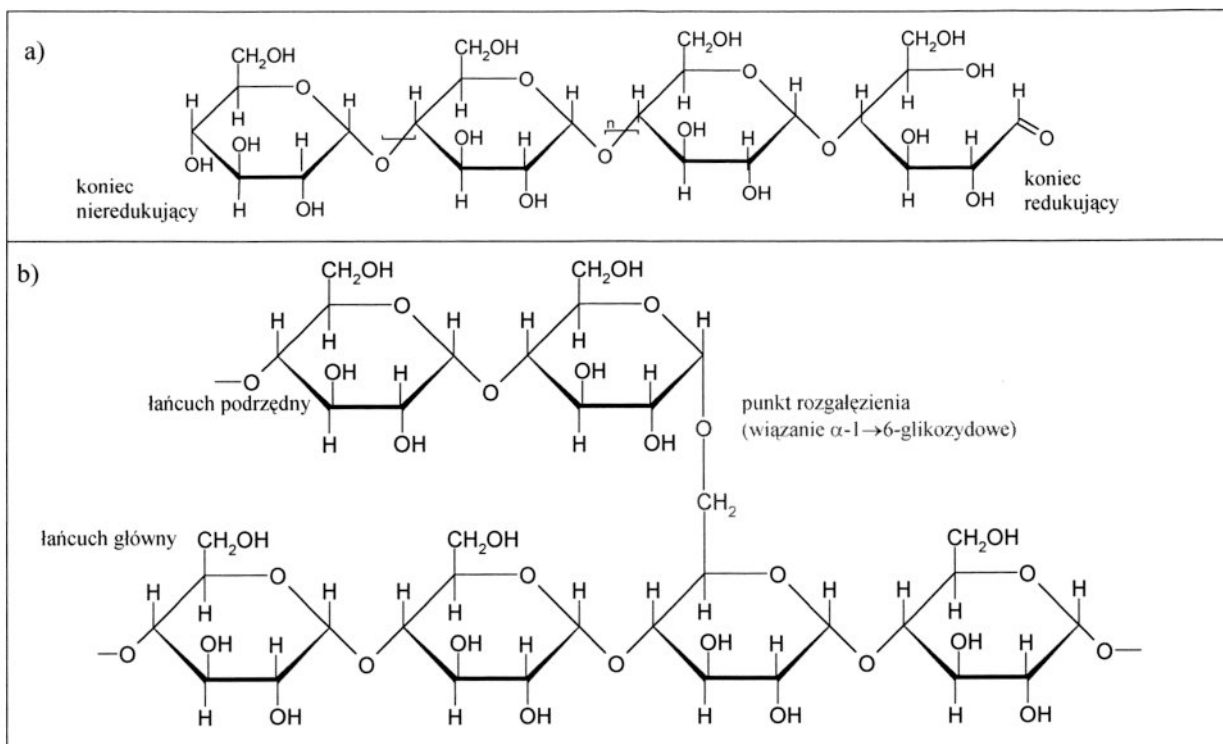
A. Opis skrobi

Skrobia należy do najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie wielocukrów, stanowiąc podstawowy materiał zapasowy w komórkach roślinnych. Powstaje ona w wyniku asymilacji dwutlenku węgla przez fotosyntezujące rośliny. Jest głównym składnikiem węglowodanowym pokarmu człowieka obecnym w większości warzyw, a także we wszystkich potrawach mącznych [48, 105].

Pod względem chemicznym jest produktem niejednorodnym, złożonym z dwóch glukanów: amylopektyny (15÷80%) i amylozy (20÷85%). Amyloza jest liniowym polimerem złożonym z reszt D-glukozy powiązanych wiązaniami α -1→4-glikozydowymi (rys. I.1a), natomiast amylopektyna jest polimerem rozgałęzionym, zawierającym dodatkowo pewną ilość wiązań α -1→6-glikozydowych (rys. I.1b)*. W roztworach wodnych amyloza tworzy roztwory koloidalne, w przeciwieństwie do amylopektyny, która ogrzana w wodzie pęcznieje i tworzy klajster (kisiel, krochmal). Stosunek amylozy do amylopektyny w skrobi oraz stosunek ilości wiązań α -1→4 do α -1→6 w cząsteczkach amylopektyny zależy nie tylko od gatunku rośliny, z której pochodzi, ale i od jej wieku, okresu i warunków wegetacji, a także w mniejszym stopniu od sposobu pozyskiwania skrobi. Powyższe różnice w budowie i wielkości cząsteczek skrobi wpływają w sposób znaczący na jej właściwości fizykochemiczne, a także organoleptyczne (przykładowo na rys. I.2. przedstawiono wpływ modyfikacji skrobi na jej konsystencję).

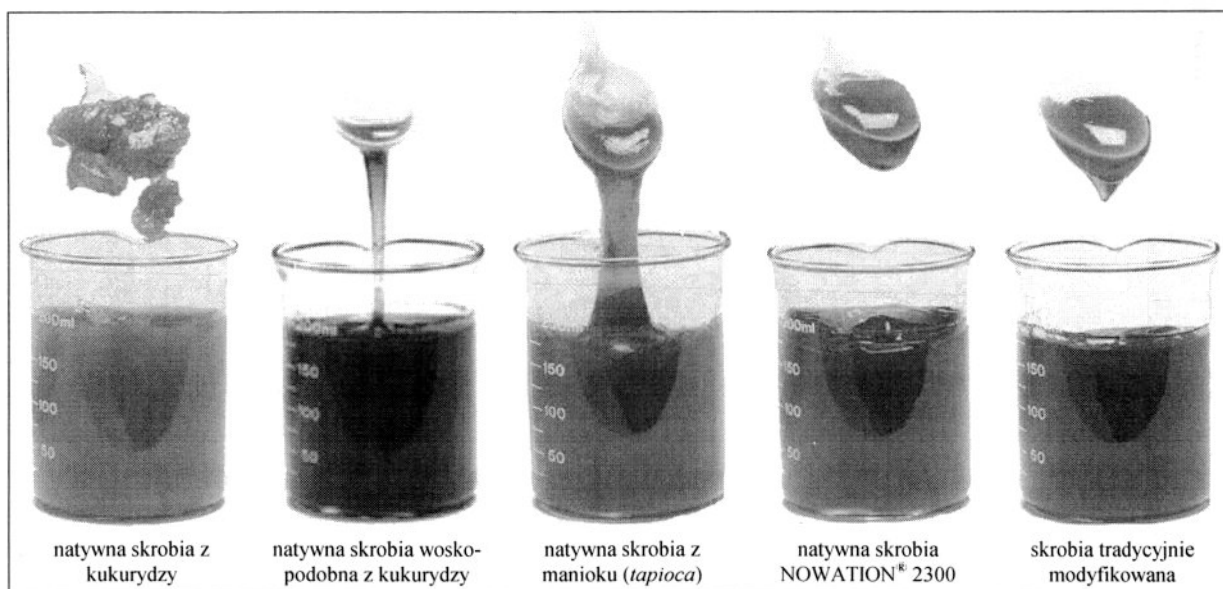
Średnia masa amylozy ze skrobi ziemniaczanej waha się od 4 do 17 kDa, natomiast amylopektyny od 200 do 600 kDa. Niektóre prace wzmiankują o bardziej złożoną budowę skrobi, przedstawiając ją jako „ziarno” złożone z dwóch warstw różniących się wzajemnie proporcjami amylozy (w większym stopniu skupionej we wnętrzu ziarenek) i amylopektyny (przeważającej w otoczce ziarenek) [10, 173, 174, 181].

* Stosunek liczby wiązań α -1→4-glikozydowych do ilości wiązań α -1→6-glikozydowych określany bywa w literaturze jako stopień polimeryzacji DP (ang. *polimerization degree*).



Rys. I.1. Budowa cząsteczki skrobi [88, 175].

- a) struktura cząsteczki amylozy;
b) fragment cząsteczki amylopektyny (kolorem niebieskim zaznaczono fragment określany jako punkt rozgałęzienia w cząsteczce).



Rys. I.2. Porównanie przykładowych typów skrobi (roztwory skrobi zabarwiono czerwonym barwnikiem, wg National Starch and Chemical Company) [166].

B. Opis wybranych enzymów amylolitycznych

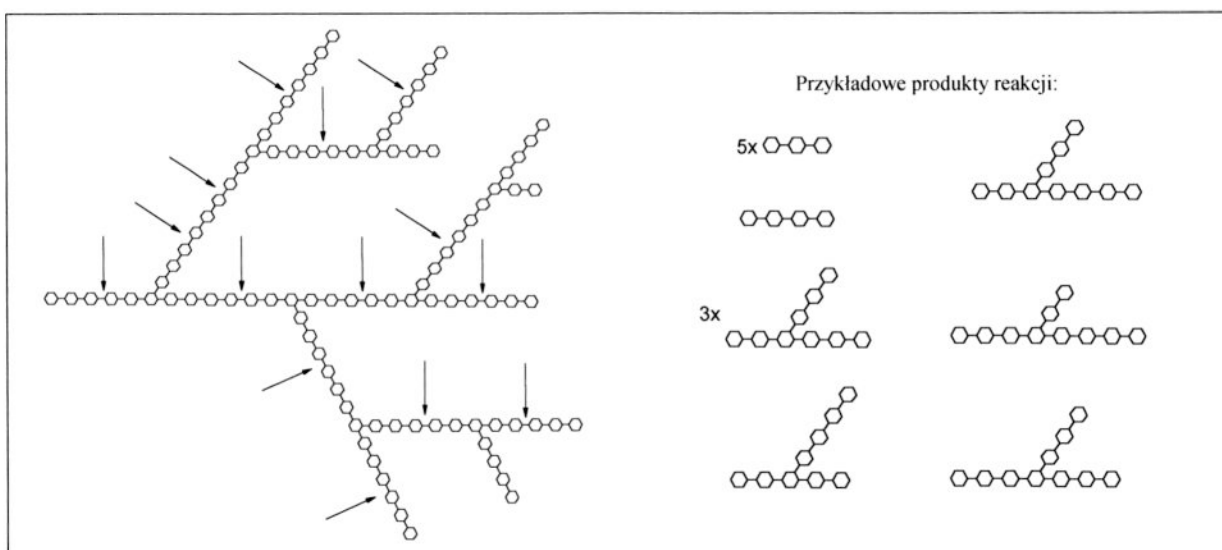
Amylasy są enzymami produkowanymi zarówno przez rośliny, zwierzęta, jak i grzyby. U kręgowców pełnią one funkcje typowych enzymów trawiennych i są obecne m.in. w ślinie i wydzielinie trzustkowej. W świecie roślinnym, występują one zwłaszcza w ziarnach kielkujących zbóż, gdzie następuje ich synteza mająca za zadanie „uaktywnienie” zgromadzonego w formie skrobi materiału energetycznego. Podstawowe kryteria podziału enzymów amylolitycznych spotykane w literaturze przedstawiono w Tab. I.1.

Tab. I.1. Różne kryteria podziału enzymów amylolitycznych.

Kryterium podziału enzymów amylolitycznych:	Typy enzymów amylolitycznych:
❖ ze względu na typ hydrolizowanego wiązania glikozydowego	☐ hydrolizujące wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe: α-amylazy, β-amylazy, - endo-α-amylazy. ☐ hydrolizujące wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe: - enzymy znoszące rozgałęzienia (izoamylazy, pullulanazy) ☐ hydrolizujące wiązania α -1 $\rightarrow$ 4- i α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe: - glukoamylazy, - pullulanazy.
❖ ze względu na miejsce hydrolizowanego wiązania glikozydowego w cząsteczce skrobi (cięcie „z brzegu” lub „wewnątrz łańcucha”)	☐ endoamylazy: α-amylazy, - pullulanazy, - cyklodekstrynazy. ☐ egzoamylazy: β-amylazy, - glukoamylazy, - egzo-α-amylazy.
❖ ze względu na zachodzące procesy	☐ amylazy upłynniające: α-amylazy, - izoamylazy, - pullulanazy, - cyklodekstrynazy. ☐ amylazy scukrzające: β-amylazy, - glukoamylazy, - egzo-α-amylazy.
❖ ze względu na pochodzenie	☐ roślinne, ☐ zwierzęce, ☐ bakteryjne, ☐ grzybowe.
❖ ze względu na formę anomeryczną produktów	☐ amylazy uwalniające produkty w formie anomerycznej (np. α -amylazy, cyklodekstrynazy), ☐ amylazy uwalniające produkty w formie nieanomerycznej (β -amylazy i glukoamylazy).
❖ ze względu na budowę przestrzenną oraz centów aktywnych amylaz	☐ struktura walca (β/α) ₈ , ☐ struktura (β/α) ₅ { β -amylazy}, ☐ struktura walca (α/α) {glukoamylazy}.
❖ ze względu na właściwości fizykochemiczne	☐ termostabilne, ☐ „kwaśne”, „zasadowe” (optimum pH), ☐ metalozależne (wymagające obecności jonów metali, np. Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} lub wrażliwe na obecność jonów Ca^{2+}).
❖ ze względu na czynnik wywołujący inhibicję enzymu	☐ inhibowane substratem, ☐ inhibowane produktem (produktami) reakcji, ☐ inhibowane (ulegające inaktywacji) pod wpływem innego czynnika.
❖ ze względu na mechanizm inhibicji	☐ enzymy ulegające inhibicji kompetycyjnej, niekompetycyjnej, akompetycyjnej, itp.

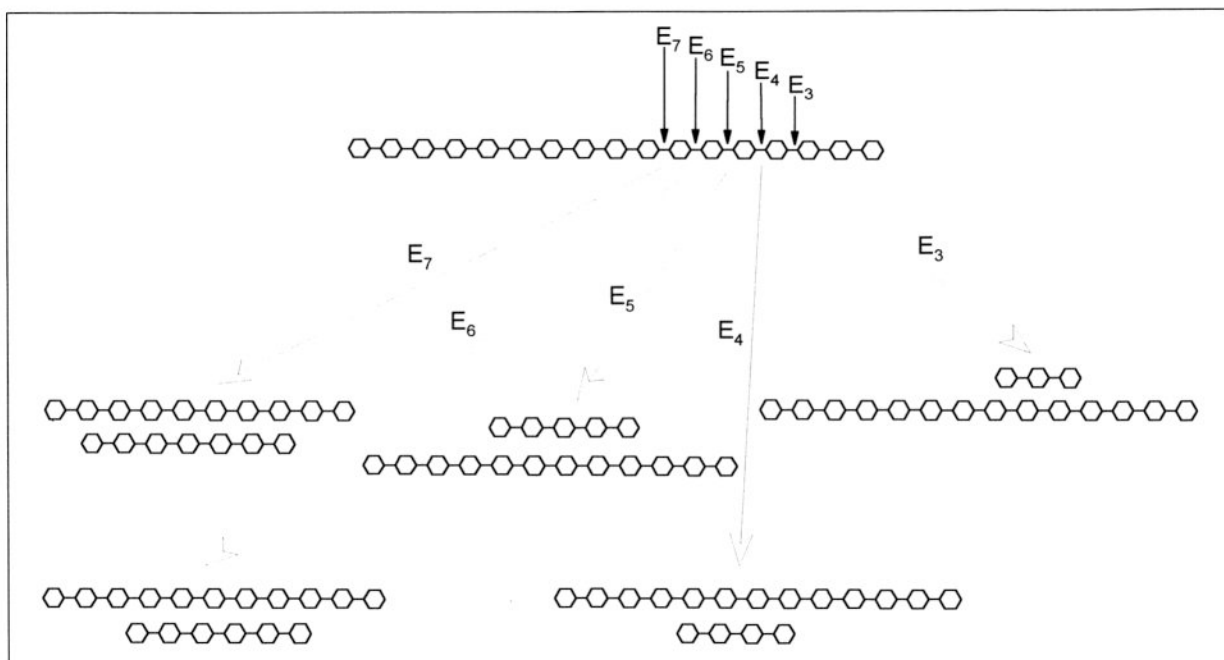
Enzymy amylolityczne, zgodnie z klasyfikacją stworzoną w 1961 roku przez Komisję Enzymową Międzynarodowej Unii Biochemicznej, zaliczane są do klasy hydrolaz, podklasy hydrolaz atakujących wiązania glikozydowe (EC 3.2.). Klasyfikacja na podpodklasy oparta jest na położeniu hydrolizowanego wiązania glikozydowego w cząsteczce substratu. Ze względu na charakter pracy przedstawiono skupiono się jedynie na przedstawieniu schematu działania wybranych enzymów amylolitycznych oraz innych enzymów związanych z procesem hydrolizy skrobi.

α -amylazy (EC 3.2.1.1) - hydrolizują wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe usytuowane wewnątrz cząsteczki skrobi. Większość α -amylaz nie hydrolizuje wiązań α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowych znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie miejsc rozgałęzienia w cząsteczkach amylopektyny. Schemat działania α -amylazy na cząsteczkę amylopektyny przedstawiono na rys. I.3. Dodatkowo w załączniku zawarto animację komputerową przedstawiającą atak losowy α -amylazy na cząsteczkę amylopektyny.



Rys. I.3. Schemat ataku α -amylazy na cząsteczkę amylopektyny. Podjednostki glukozy w cząsteczkach skrobi zaznaczono sześciokątami, miejsca ataku enzymu na wiązania glikozydowe zaznaczono strzałkami, czerwonym kolorem oznaczono koniec redukujący w łańcuchu.

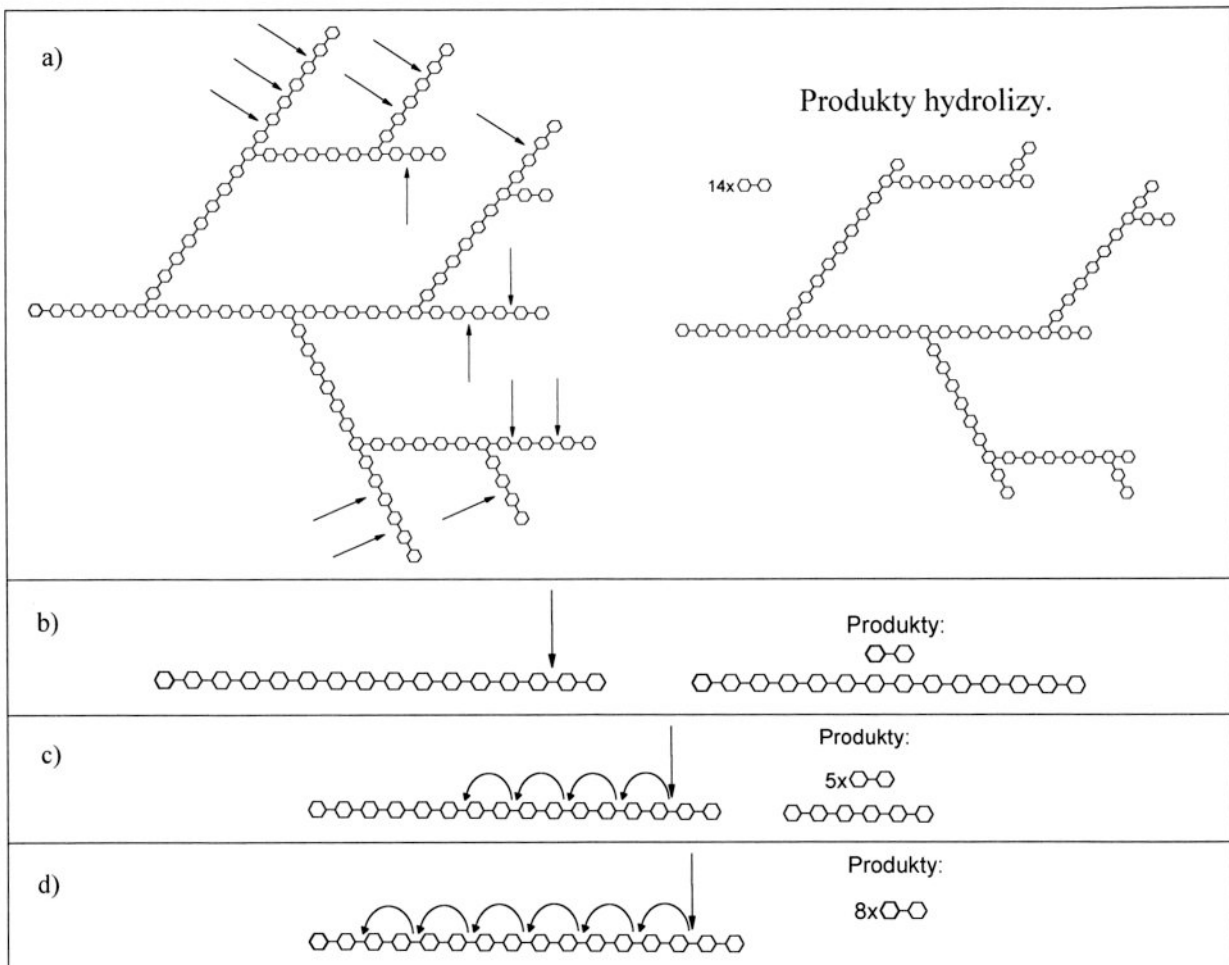
egzo- α -amylazy - katalizują reakcję uwalniania od końców nieredukujących skrobi liniowych oligosacharów. W zależności od typu enzymu zawierają one od trzech do sześciu reszt glukozyowych.



Rys. I.4. Schemat ataku *egzo- α -amylaz* na cząsteczkę amylozy, zaznaczono miejsca ataku poszczególnych typów *egzo- α -amylaz* (oznaczenia jak na rys. I.3.).

pullulanazy (EC 3.2.1.41) - hydrolizują wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe w cząsteczce skrobi. Wyróżniane są także amylopullulanazy i neopullulanazy hydrolizujące zarówno wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe, jak i wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe. Produktami reakcji hydrolizy skrobi przy udziale amylopullulanaz i neopullulanaz jest mieszanina krótkich oligochacharydów (DP = 3 ÷ 8) pozbawiona praktycznie dekstryn granicznych zawierających wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe [163].

β -amylazy (EC 3.2.1.2) - katalizują hydrolizę wiązań α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowych między drugą, a trzecią podjednostką glukozy licząc od końca nieredukującego w cząsteczce skrobi. W zależności od wielkości od budowy centrum aktywnego enzymu, reakcja hydrolizy skrobi, zostaje zatrzymana w odległości od 2 do 5 podjednostek glukozy od miejsca położenia wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowego. Przyjmuje się, że niektóre β -amylazy ulegają inhibicji kompetycyjnej maltozą uwalnianą w wyniku reakcji. Na rys. I.5. przedstawiono schematy ataku β -amylazy na cząsteczkę amylopektyny oraz różnych mechanizmów reakcji.



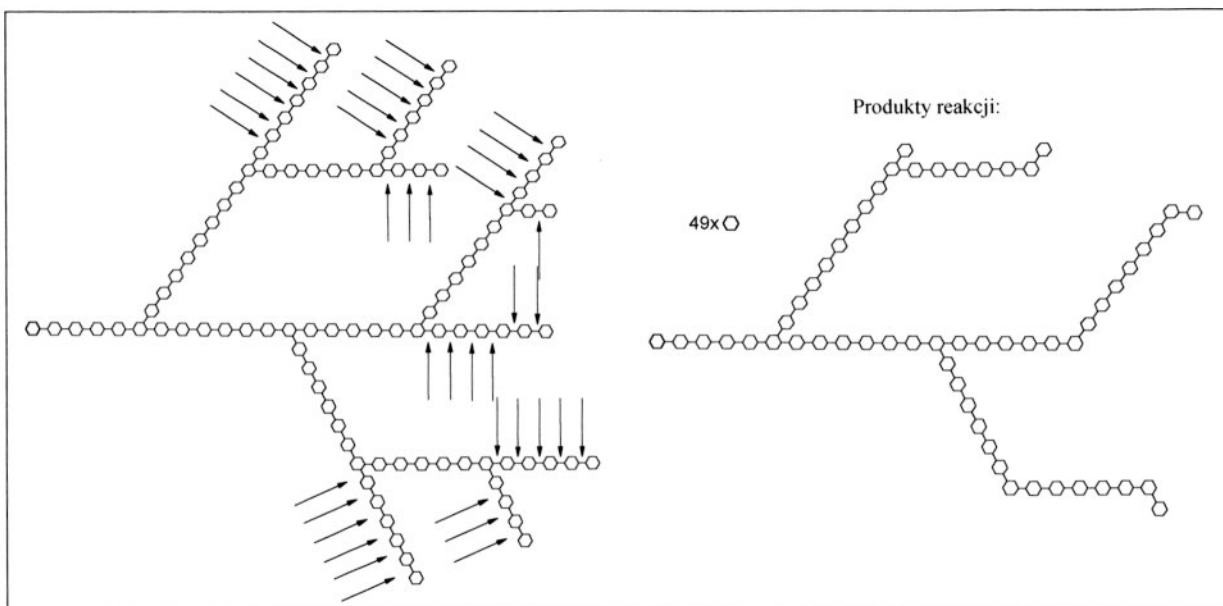
Rys. I.5. Schemat ataku β -amylazy (oznaczenia jak na rys. I.3.).

a) atak β -amylazy na cząsteczkę amylopektyny,

Możliwe mechanizmy działania β -amylazy [17]:

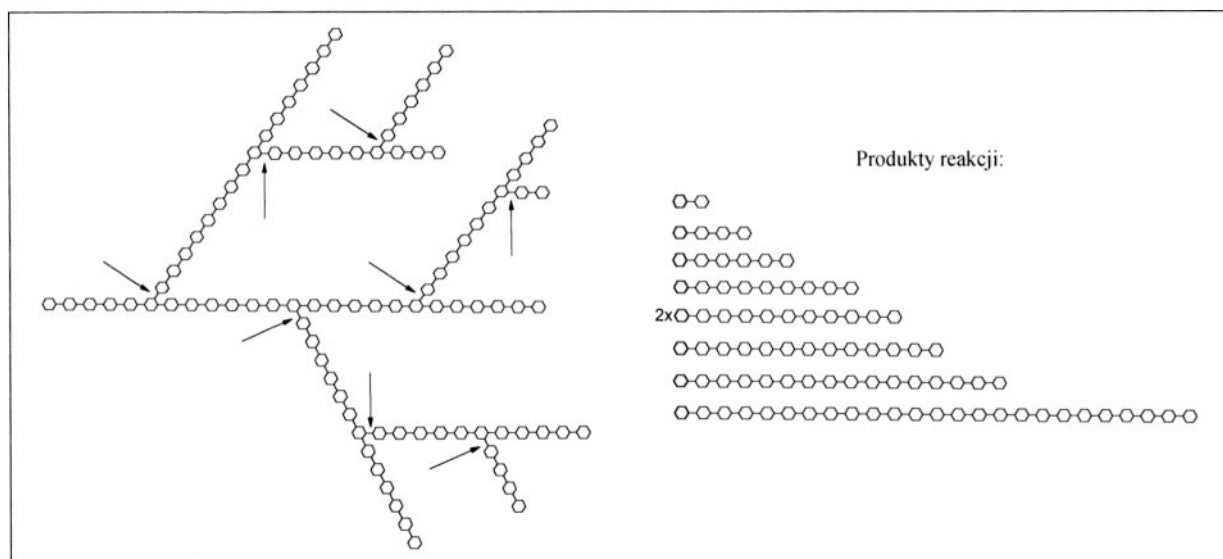
- b) atak losowy (ang. *random attack*) - adsorpcja, pojedyncze cięcie wiązania glikozydowego, desorpcja z uwolnieniem jednej cząsteczki maltozy,
- c) wielokrotny atak łańcuchowy (ang. *multiple chain attack*) - adsorpcja, seria cięć prowadząca do sekwencyjnego uwalniania cząsteczek maltozy, desorpcja. Animację komputerową przedstawiającą ten typ ataku β -amylazy na cząsteczkę amylozy zaprezentowano w załączniku.
- d) pojedynczy atak łańcuchowy (ang. *single chain attack*) - adsorpcja, hydroliza do końca łańcucha co drugiego wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowego u uwalnianiem cząsteczek maltozy, desorpcja.

glukoamylazy (γ -amylazy) (EC 3.2.1.3) - uwalniają cząsteczki glukozy, hydrolizując wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe od nieredującego końca łańcucha poliglukozowego. Większość glukoamylaz posiada również zdolność hydrolizy także wiązań α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowych znajdujących się przy nieredukującej reszcie glukozowej w łańcuchu.



Rys. I.6. Schemat ataku glukoamylazy na cząsteczkę oznaczenia jak na rys. I.3.).

izoamylazy* (EC 3.2.1.68) - hydrolizują wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe wewnątrz cząsteczki skrobi, powodując uwolnienie liniowych polisacharydów.

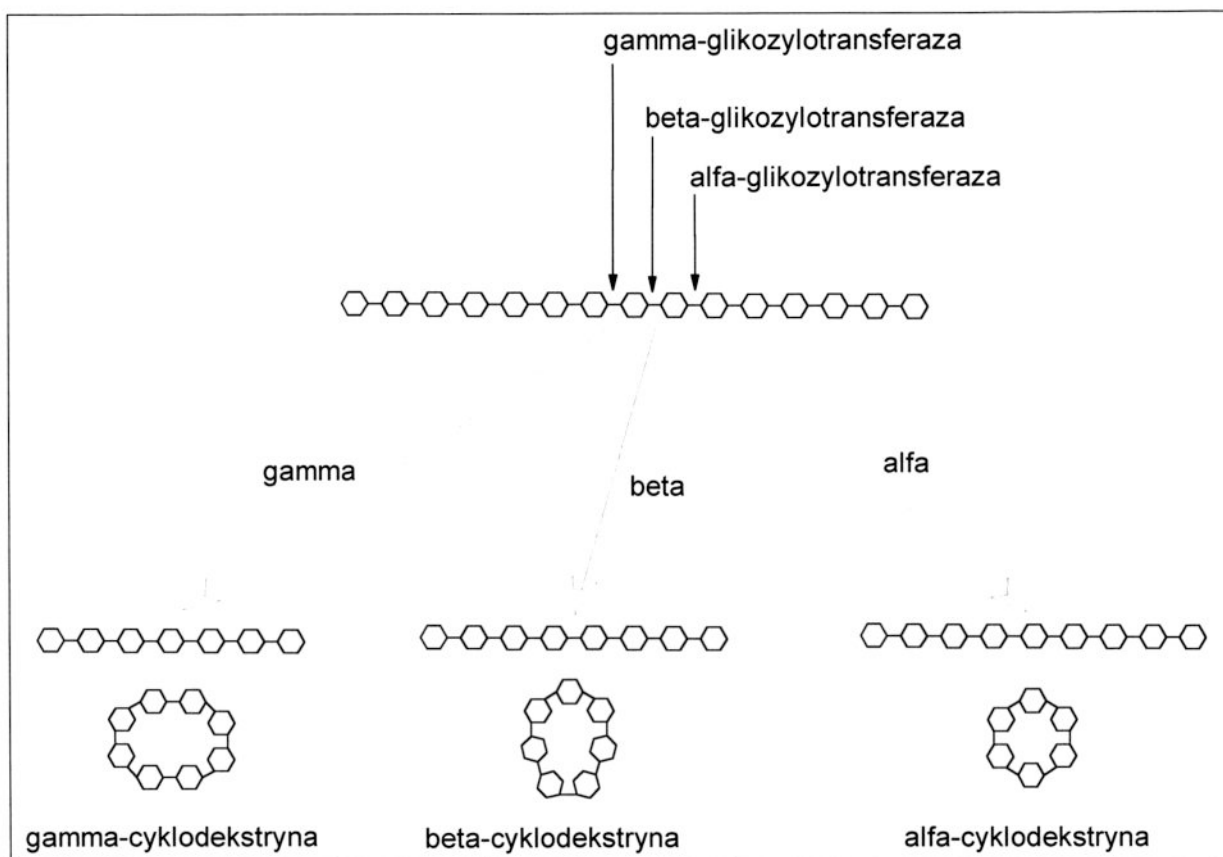


Rys. I.7. Schemat ataku izoamylaz na cząsteczkę amylopektyny (oznaczenia jak na rys. I.3.).

* Potocznie izoamylazy nazywane są enzymami znoszącymi rozgałęzienia.

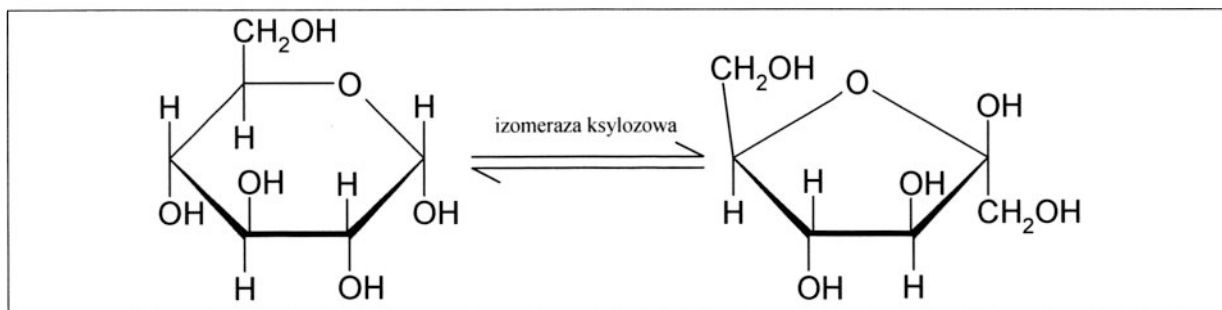
Oprócz hydrolaz w procesach związanych konwersją skrobi i glukozy stosowane są także inne enzymy, takie jak:

cyklotransferazy (EC 2.4.1.19) - należą do klasy transferaz, i podobnie jak *egzo- α -amylazy* katalizują reakcję uwalniania oligosacharydów od końców nieredukujący skrobi. W przeciwieństwie jednak do *egzo- α -amylazy* uwalniane produkty nie są w formie liniowej, lecz mają formę zamkniętych pierścieni cyklodekstrynowych (rys. I.8.).



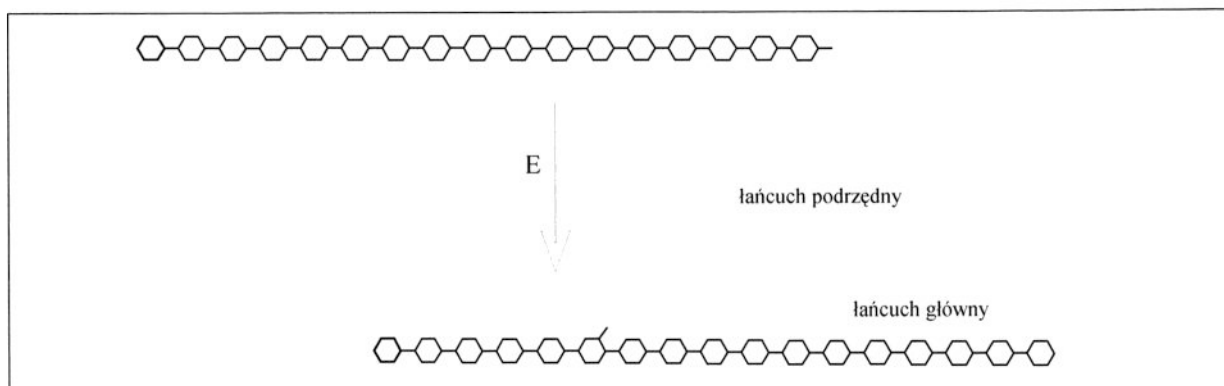
Rys. I.8. Schemat ataku cyklotransferaz na cząsteczkę amylozy, zaznaczono miejsca ataku poszczególnych typów cyklotransferaz (oznaczenia jak na rys. I.3.).

izomerazy ksylozowe (izomeraza glukozy) (EC 5.3.1.5) - wykorzystywana przemysłowo głównie w procesie izomeryzacji D-glukozy do D-fruktozy (rys. I.9.).



Rys. I.9. Schemat działania izomerazy ksylozowej, na przykładzie izomeryzacji glukozy do fruktozy.

glikozylotransferaza rozgałęzień α -glukanu (amyl-1 $\rightarrow$ 4-1 $\rightarrow$ 6-glikozylotransferaza), katalizuje reakcje przeniesienia fragmentu liniowego łańcucha poliglukozowego z utworzeniem wiązania α -1 $\rightarrow$ 6-glikozydowego [121], zgodnie ze schematem przedstawionym na rys. I.10.



Rys. I.10. Schemat działania glikozylotransferazy rozgałęzień α -glukanu na cząsteczkę amylozy. Kolorem zielonym zaznaczono przenoszony fragment poliglukozowy, pozostałe oznaczenia zgodne rys. I.3.

Należy tutaj zaznaczyć, że nawet enzymy otrzymywane w różnych szczepów tego samego gatunku bakterii, mogą się różnić powinowactwem do substratu, wrażliwością na temperaturę, a także wydajnością procesu konwersji skrobi. Enzymy, w tym enzymy amylolityczne mogą także prowadzić reakcje odwrotne (ang. *reverse reaction*). Uwidacznia się to szczególnie w końcowym etapie reakcji, gdy występuje niedobór substratu, przy jednocześnie wysokim stężeniu produktu. Przykładowo glukoamylaza może katalizować reakcję „łączenia” się cząsteczek glukozy z utworzeniem m.in.: α,β -trehalozy (α -D-glukopyranozylo- β -D-glukopyranozy), kojibiozy (2-O- α -D-glukopyranozylo-D-glukozy), nigerozy (3-O- α -D-glukopyranozylo-D-glukozy), maltozy (4- α -D-glukopyranozylo-D-glukozy), izomaltozy (6-O- α -D-glukopyranozylo-D-glukozy), maltotriozy (4-O- α -D-glukopyranozylo-maltozy), panozy (6-O- α -D-glukopyranozylo-D-maltozy), izopanozy (4-O- α -D-glukopyranozylo-izomaltozy) oraz izomaltotriozy (6-O- α -D-glukopyranozylo-D-izomaltozy) [98].

Dodatek II

Przykład wyznaczenia czasu reakcji dla układu multienzymatycznego

A. Przykład wyznaczenia czasu reakcji dla układu multienzymatycznego

Założmy, że w opisywanym przykładzie rozpatrujemy pięć cząsteczek enzymów (trzy α -amylazy i po jednym β -amylazy i glukoamylazy). W celu lepszego zobrazowania przypiszmy odpowiednim stałym czasowym wartości liczbowe charakteryzujące poszczególne enzymy^{*}:

- ⌘ α -amylaza: czas zderzenia aktywnego: $t_{a,ak} = 20$ [ns]; czas zderzenia nieaktywnego: $t_{a,nak} = 7$ [ns],
- ⌘ β -amylaza: czas zderzenia aktywnego: $t_{b,ak} = 15$ [ns]; czas zderzenia nieaktywnego: $t_{b,nak} = 6$ [ns] oraz dodatkowo czas zderzenia nieaktywnego z inhibicją kompetycyjną maltozą: $t_{b,ik} = 30$ [ns]
- ⌘ glukoamylaza: czas zderzenia aktywnego: $t_{g,ak} = 8$ [ns]; czas zderzenia nieaktywnego: $t_{g,nak} = 5$ [ns],

Cząsteczki enzymów zostały ponumerowane w następujący sposób: trzem cząsteczką α -amylazy zostały przypisane numery: 1, 2 i 3. β -amylazie numer 4, a glukoamylazie numer 5. Ponieważ na początku symulacji wartości wszystkich parametrów t_e wynoszą zero, o kolejności rozpatrywania poszczególnych zderzeń enzymów decyduje parametr ξ . Rozpatrzmy jak hipotetycznie może przebiegać proces hydrolizy polocukru w przedstawionym układzie według przedstawionego modelu:

- (0) W chwili rozpoczęcia symulacji, wartości parametru t_e dla wszystkich cząsteczek enzymu wynoszą zero.
- (1) Ponieważ wszystkie wartości t_e są sobie równe, jako pierwsza rozpatrywana jest cząsteczka enzymu o najniższej wartości parametru ξ . W przykładzie jest to α -amylaza₁. Symulowany jest akt pojedynczego zderzenia α -amylazy wg założeń odpowiedniego modelu (model hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy). Założmy, że doszło do zderzenia aktywnego, czas reakcji dla $\xi=1$, wynosi: $(t_e)_1 = (t_e)_1 + t_{a,ak} = 0 + 20 = 20$ [ns].
- (2) Podobnie jak w (1) rozpatrujemy zderzenia α -amylazy₂. Przyjmijmy, że i tym razem dochodzi do zderzenia aktywnego: $(t_e)_2 = (t_e)_2 + t_{a,ak} = 0 + 20 = 20$ [ns].

^{*} Podane tu wartości służą jedynie zilustrowaniu przykładu i nie są związane z konkretnym enzymem.

- (3) Rozpatrujemy trzecią cząsteczkę α -amylazy₃. Tym razem założmy, że doszło do zderzenia nieaktywnego: $(t_e)_3 = (t_e)_3 + t_{a,nak} = 0 + 7 = 7$ [ns].
- (4) Tym razem rozpatrywaną cząsteczką enzymu jest β -amylaza, jeśli doszło do zderzenia aktywnego to: $(t_e)_4 = (t_e)_4 + t_{b,ak} = 0 + 15 = 15$ [ns].
- (5) Ostatnią cząsteczką enzymu, dla której wartość parametru t_e jest równa zero jest glukoamylaza. Przyjmijmy, iż doszło do zderzenia nieaktywnego: $(t_e)_5 = (t_e)_5 + t_{g,nak} = 0 + 5 = 5$ [ns].
- (6) Rozpatrywane jest zderzenie enzymu, dla którego wartość parametru t_e jest najmniejsza. Ponieważ aktualne wartości parametrów t_e wynoszą: $(t_e)_1 = 20$; $(t_e)_2 = 20$; $(t_e)_3 = 7$; $(t_e)_4 = 15$ i $(t_e)_5 = 5$, najniższą wartość ma parametr t_e dla enzymu o numerze porządkowym 5, także ponownie rozpatrywany jest atak glukoamylazy. Założmy, że tym razem dochodzi do zderzenia aktywnego: $(t_e)_5 = (t_e)_5 + t_{g,ak} = 5 + 8 = 13$ [ns].
- (7) Tym razem, najniższą wartość parametru t_e ma α -amylaza₃. Jeśli dojdzie do zderzenia aktywnego to: $(t_e)_3 = (t_e)_3 + t_{g,ak} = 7 + 20 = 27$ [ns].
- (8) Rozpatrywany jest atak glukoamylazy, w przypadku zderzenia nieaktywnego: $(t_e)_5 = (t_e)_5 + t_{g,nak} = 13 + 5 = 18$ [ns].
- (9) W dziewiątej iteracji najniższą wartość parametr t_e przyjmuje dla β -amylazy. Założmy enzym zaatakował cząsteczkę maltozy i doszło do inhibicji kompetycyjnej: $(t_e)_4 = (t_e)_4 + t_{nak} = 15 + 30 = 45$ [ns].
- (10) Kolejno rozpatrujemy atak cząsteczki glukoamylazy, w przypadku zderzenia nieaktywnego: $(t_e)_5 = (t_e)_5 + t_{nak} = 18 + 5 = 23$ [ns].

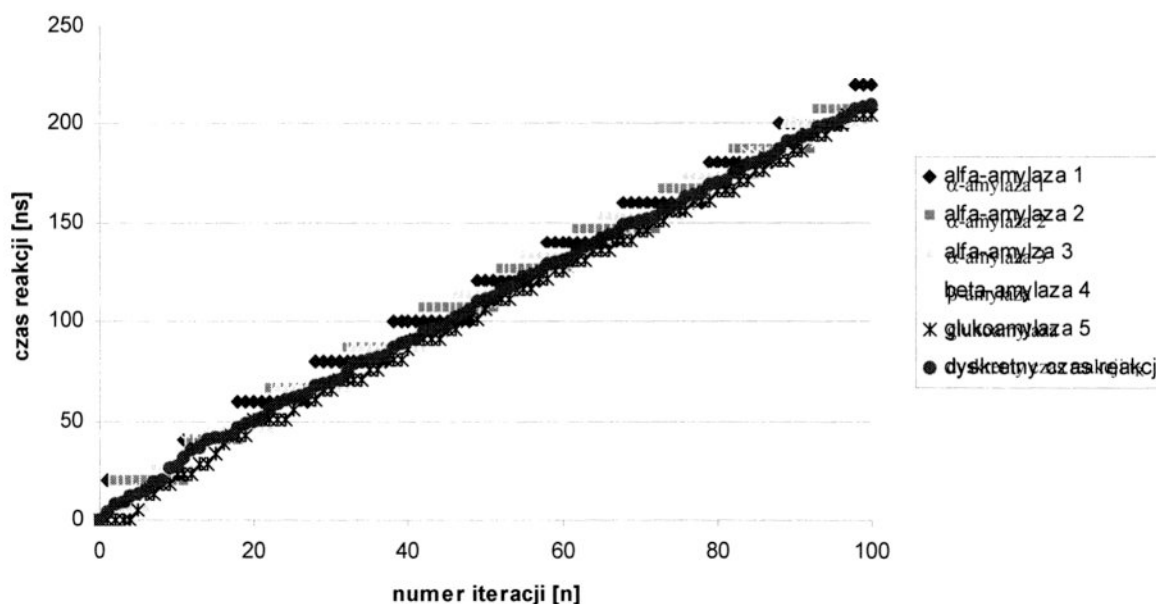
Symulacja reakcji przebiega, aż zakończenia reakcji. Rozpatrywany przykład dla pierwszych dziesięciu cykli symulacji przedstawiono w skróconej formie w tabeli II.1. Dyskretny czas reakcji został wyznaczony z zależności:

$$t_R = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 (t_e)_i .$$

Tab. 1. Przykład symulacji układu zawierającego pięć cząsteczek enzymów. Literą Ξ oznaczono w tabeli symbol zderzenia jakie jest rozpatrywanie względem danej cząsteczki enzymu (**ak** - zderzenie aktywne; **nak** - zderzenie nieaktywne, **ik** - inhibicja kompetycyjna).

Iteracja	α -amylaza ₁ ($\xi=1$)		α -amylaza ₂ ($\xi=2$)		α -amylaza ₃ ($\xi=3$)		β -amylaza ₄ ($\xi=4$)		γ -amylaza ₅ ($\xi=5$)		dyskretny czas reakcji
n	Ξ_1	$(t_e)_{\xi=1}$	Ξ_2	$(t_e)_{\xi=2}$	Ξ_3	$(t_e)_{\xi=3}$	Ξ_4	$(t_e)_{\xi=4}$	Ξ_5	$(t_e)_{\xi=5}$	t_R
0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0
1	ak	0→20	-	0	-	0	-	0	-	0	4
2	-	20	ak	0→20	-	0	-	0	-	0	8
3	-	20	-	20	nak	0→7	-	0	-	0	9,4
4	-	20	-	20	-	7	ak	0→15	-	0	12,4
5	-	20	-	20	-	7	-	15	nak	0→5	13,4
6	-	20	-	20	-	7	-	15	ak	5→13	15
7	-	20	-	20	ak	7→27	-	15	-	13	19
8	-	20	-	20	-	27	-	15	nak	13→18	20
9	-	20	-	20	-	27	ik	15→45	-	18	26
10	-	20	-	20	-	27	-	45	nak	18→23	27

Interpretację graficzną obrazującą zmianę wyznaczanych czasów reakcji dla stu pierwszych iteracji przedstawiono na rys. II.1.



Rys. II.1. Zależność czasów reakcji $(t_e)_{\xi}$ oraz t_R w funkcji numeru iteracji (n).

Rys. II.1. Zależność czasów reakcji $(t_e)_{\xi}$ oraz t_R w funkcji numeru iteracji (n).

Dodatek III

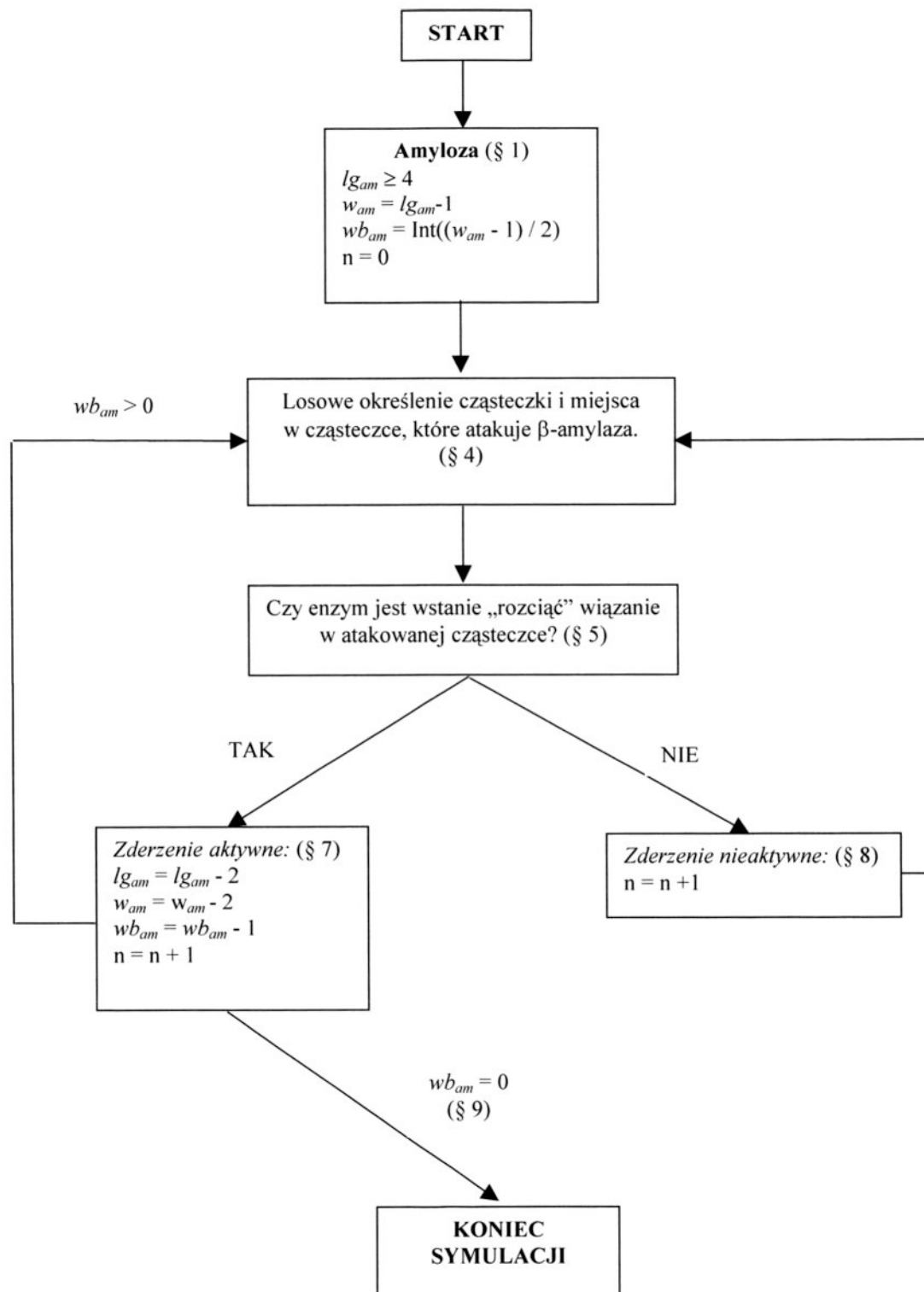
Algorytmy szczegółowe hydrolizy amylozy i amylopektyny przy udziale wybranych enzymów amylolitycznych

A. Hydroliza amylozy przy udziale β-amylazy.....	99
B. Hydroliza amylozy przy udziale glukoamylazy (γ-amylazy).	101
C. Hydroliza amylozy przy udziale α-amylazy.	103
D. Hydroliza skrobi przy udziale β-amylazy.	105
E. Hydroliza skrobi przy udziale glukoamylazy (γ-amylazy).	107
F. Hydroliza skrobi przy udziale α-amylazy.	109
G. Hydroliza skrobi (amylopektyny) przy udziale pullulanazy.....	111
H. Hydroliza skrobi przy udziale egzo-α-D-glukanazy.	113
I. Inhibicja kompetycyjna - hydroliza skrobi przy udziale β-amylazy z uwzględnieniem inhibicji kompetycyjnej produktem reakcji (maltozą).....	115
J. Inhibicja akompetycyjna - hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem inhibicji akompetycyjnej	117
K. Inhibicja niekompetycyjna i (de)aktywacja enzymu - hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem inhibicji niekompetycyjnej i deaktywacji enzymu	120
L. Atak wielokrotny - hydroliza skrobi przy udziale β-amylazy z uwzględnieniem ataku wielokrotnego	123
M. Transferazy	126
N. Powinowactwo enzymu do substratu	126
O. Zestawienie warunków definiujących zderzenia aktywne dla wybranych enzymów amylolitycznych.....	128

A. Hydroliza amylozy przy udziale β -amylazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylozy, ($l_{am} \geq 4$) oraz ($w_{am} \geq 3$).
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy i maltotriozy.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div l_{calc}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylozy, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylozy w miejscu niepodatnym na działanie β -amylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie β -amylazy jest wiązanie α -1 $\rightarrow$ 4 między drugą i trzecią podjednostką glukozy w cząsteczce amylozy, licząc od końca nieredukującego wiązanie podatne na atak β -amylazy posiada numer ($w_{am} - 2$).
6. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylozy potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi: $wb_{am} = \text{Int}((w_{am} - 1) / 2)$.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy maleje o dwie: $[l_{am}]_n \Rightarrow [l_{am} - 2]_{n+1}$,
 - 7.2. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylozy maleje o dwa: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am} - 2]_{n+1}$,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy pozostaje bez zmian: $[l_{am}]_n \Rightarrow [l_{am}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylozy pozostaje bez zmian: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4, w cząsteczkach amylozy, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi zero: $wb_{am} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylozy przez β -amylazę.

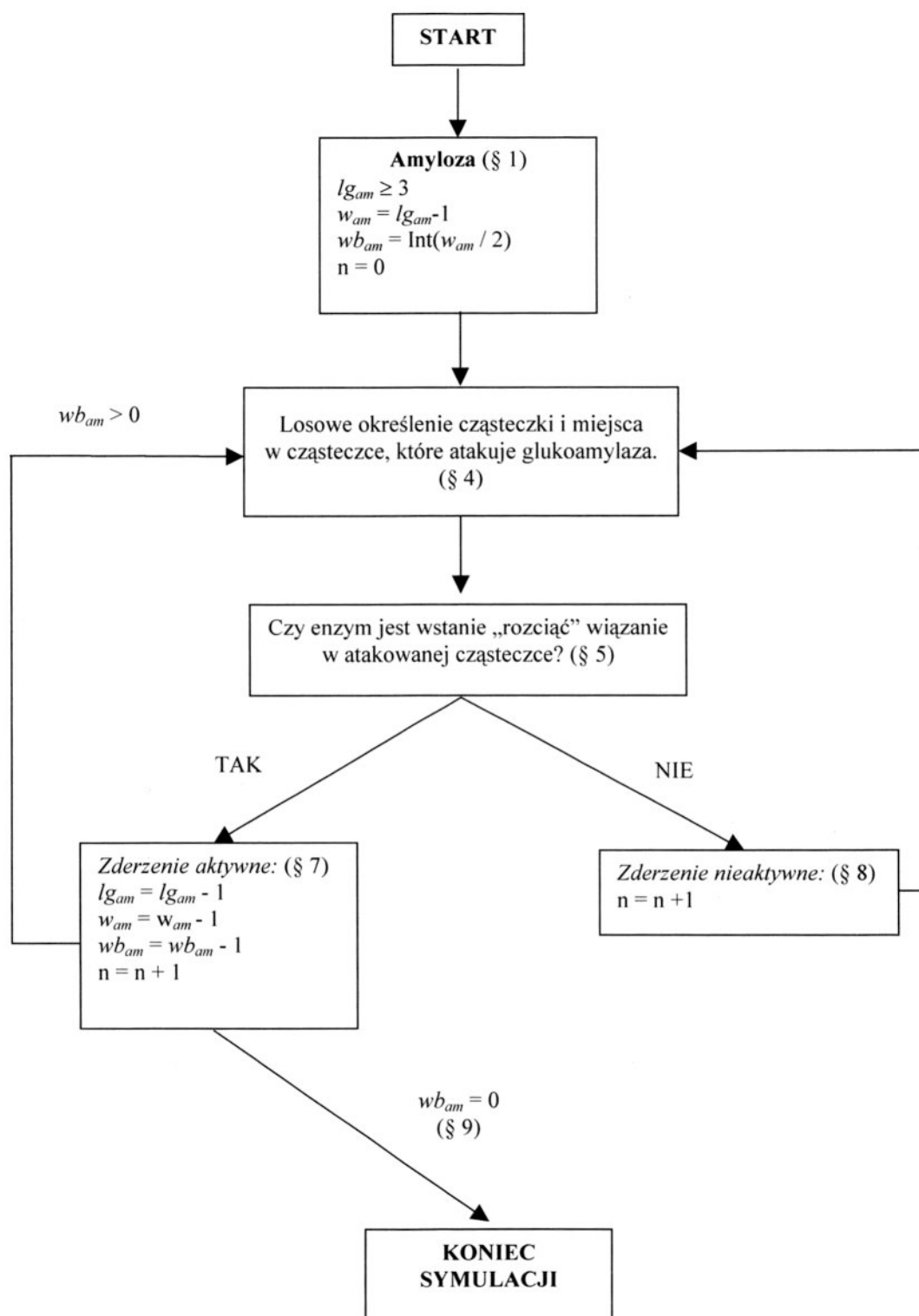
Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy amylozy przy udziale β -amylazy. Symbolem *paragraf* - "§" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza amylozy przy udziale β -amylazy - schemat blokowy.

B. Hydroliza amylozy przy udziale glukoamylazy (γ -amylazy).

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylozy, ($lg_{am} \geq 3$) oraz ($w_{am} \geq 2$).
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki glukozy i maltozy.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div lg_{calc}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C_1 w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylozy, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylozy w miejscu niepodatnym na działanie glukoamylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie glukoamylazy jest wiązanie α -1 $\rightarrow$ 4 między pierwszą i drugą podjednostką glukozy w cząsteczce amylozy licząc od końca nieredukującego, wiązanie podatne na atak β -amylazy posiada numer ($w_{am} - 1$).
6. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylozy potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi: $wb_{am} = \text{Int}(w_{am} / 2)$.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka glukozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy maleje o jedną: $[lg_{am}]_n \Rightarrow [lg_{am} - 1]_{n+1}$,
 - 7.2. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylozy maleje o jedno: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am} - 1]_{n+1}$,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy pozostaje bez zmian: $[lg_{am}]_n \Rightarrow [lg_{am}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylozy pozostaje bez zmian: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4, w cząsteczkach amylozy, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania glukoamylazy wynosi zero: $wb_{am} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylozy przez glukoamylazę.

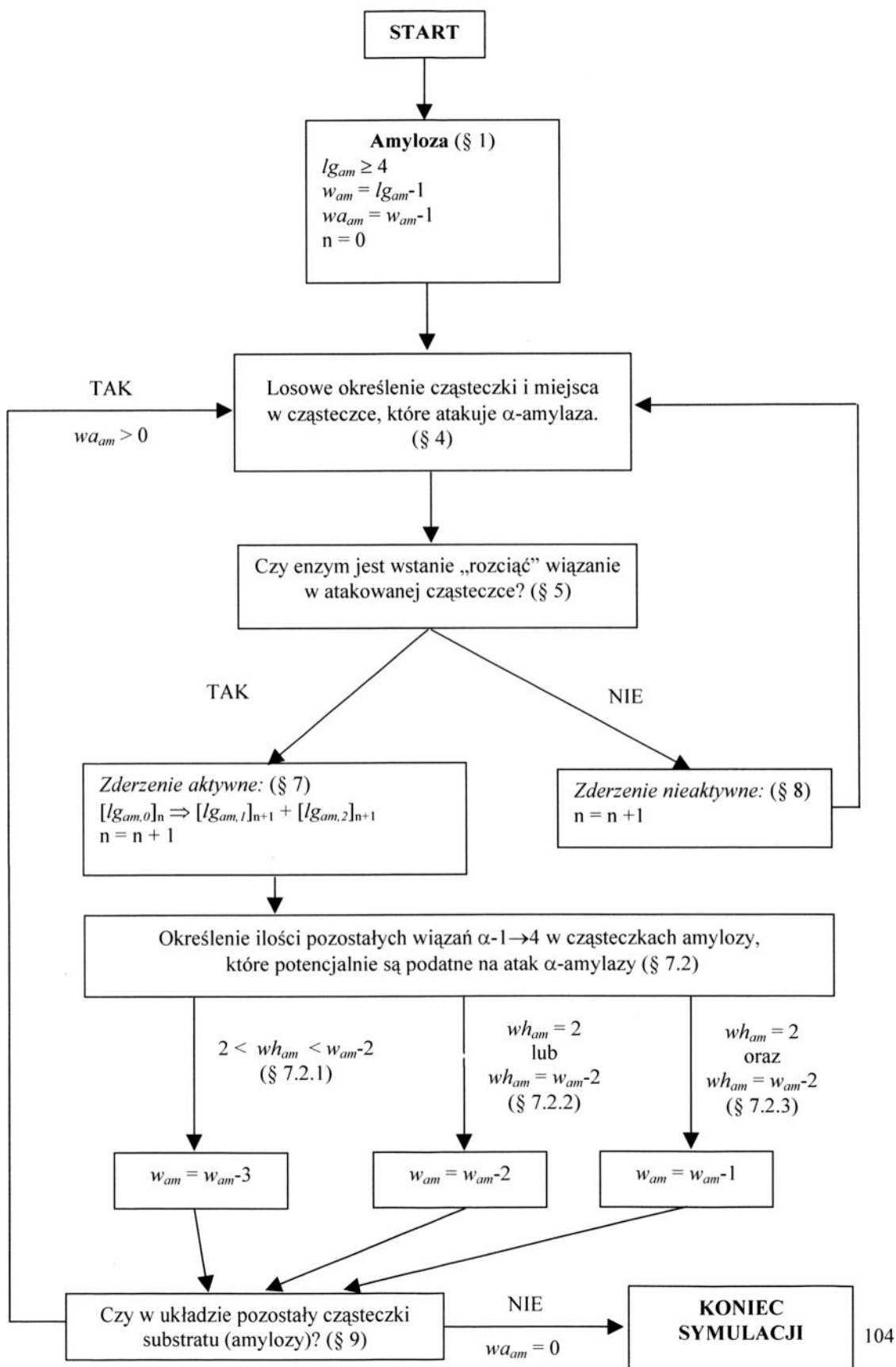
Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy amylozy przy udziale glukoamylazy. Symbolem *paragraf* - "§" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza amylozy przy udziale glukoamylazy - schemat blokowy.

C. Hydroliza amylozy przy udziale α -amylazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylozy, ($l_{g_{am}} \geq 4$) oraz ($w_{am} \geq 3$).
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy i maltotriozy.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div l_{g_{calc}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C_1 w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylozy, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylozy w miejscu niepodatnym na działanie α -amylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie α -amylazy są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4 wewnątrz łańcucha poliglukozowego amylozy. Wiązanie hydrolizowane przez α -amylazę w cząsteczce amylozy musi być co najmniej oddalone o dwie reszty glukozy od końca redukującego i o dwie reszty glukozy od końca nieredukującego: $2 \leq wh_{am} \leq (w_{am} - 2)$.
6. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylozy, które potencjalnie są podatne na atak α -amylazy wynosi: $wa_{am} = w_{am} - 2$.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, cząsteczka amylozy rozcinana jest na dwa policukry:
 - 7.1. suma ilości podjednostek glukozy w obu powstałych policukrach odpowiada ilości podjednostek glukozy w wyjściowej cząsteczce amylozy: $[l_{g_{am},0}]_n \Rightarrow [l_{g_{am},1}]_{n+1} + [l_{g_{am},2}]_{n+1}$,
 - 7.2. suma dostępnych dla α -amylazy wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w powstałych cząsteczkach policukrów, maleje w stosunku do wyjściowej cząsteczki amylozy o:
 - 7.2.1. 3 wiązania: $[wh_{am}]_n = [wh_{am} - 3]_{n+1}$, gdy: $2 < wh_{am} < (w_{am} - 2)$
 (np. 01111111111 $\xrightarrow{\alpha\text{-amylaza}}$ 011111+011111),
 - 7.2.2. 2 wiązania: $[wh_{am}]_n = [wh_{am} - 2]_{n+1}$, gdy: $wh_{am} = 2$ lub $wh_{am} = (w_{am} - 2)$
 (np. 0111111 $\xrightarrow{\alpha\text{-amylaza}}$ 01+01111 lub 0111111 $\xrightarrow{\alpha\text{-amylaza}}$ 01111+01),
 - 7.2.3. 1 wiązanie: $[wh_{am}]_n = [wh_{am} - 1]_{n+1}$, gdy $wh_{am} = 2$ oraz $wh_{am} = (w_{am} - 2)$
 (0111 $\xrightarrow{\alpha\text{-amylaza}}$ 01+01),
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylozy pozostaje bez zmian: $[l_{g_{am}}]_n \Rightarrow [l_{g_{am}}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylozy pozostaje bez zmian: $[w_{am}]_n \Rightarrow [w_{am}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4, w cząsteczkach amylozy, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania α -amylazy wynosi zero: $wa_{am} = 0$.
10. Miara postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylozy przez α -amylazę.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy amylozy przy udziale α -amylazy. Symbolem *paragraf* - "§" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza amylozy przy udziale α -amylazy - schemat blokowy.

D. Hydroliza skrobi przy udziale β -amylazy.

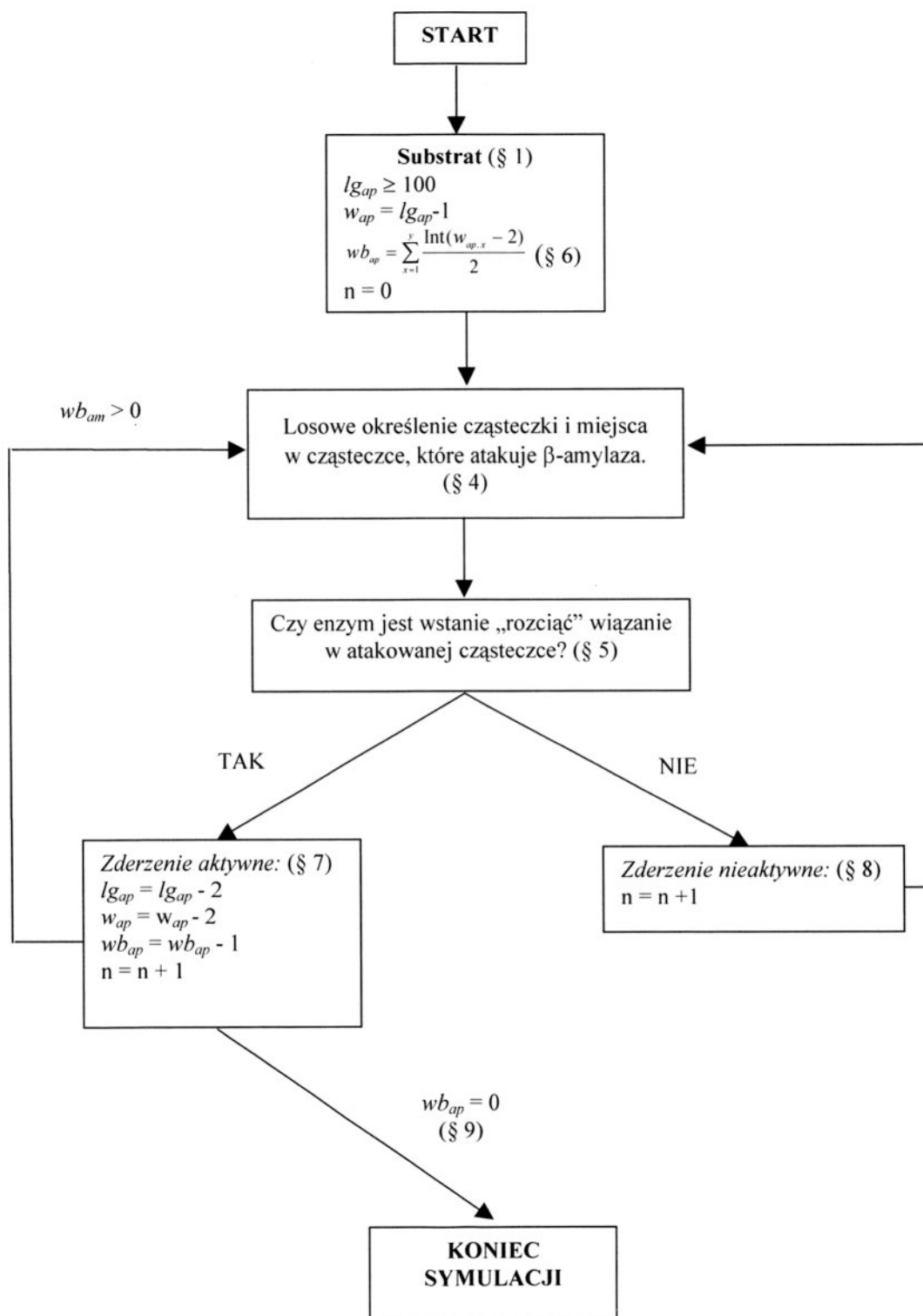
1. Częsteczkami substratów są cząsteczki amylozy i amylopektyny.
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy, maltotriozy i dekstryn granicznych.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div l_{g_{calc}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylopektyny, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylopektyny w miejscu niepodatnym na działanie β -amylazy lub enzym atakuje cząsteczkę produktu.
5. Miejscem podatnym na działanie β -amylazy są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4 między drugą i trzecią podjednostką glukozy w łańcuchu A, B lub C cząsteczki amylopektyny, licząc od końca nieredukującego. Hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki, licząc od punktu rozgałęzienia.
6. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi:

$$wb_{ap} = \sum_{x=1}^y \frac{\text{Int}(w_{ap,x} - 2)}{2},$$

gdzie y jest ilością łańcuchów w cząsteczce amylopektyny, a x ilością podjednostek glukozy w danym łańcuchu licząc od końca nieredukującego do pierwszego miejsca rozgałęzienia.

7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny maleje o dwie: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap} - 2]_{n+1}$,
 - 7.2. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny maleje o dwa: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap} - 2]_{n+1}$,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny pozostaje bez zmian: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi zero: $wb_{ap} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez β -amylazę.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy skrobi przy udziale β -amylazy. Symbolem *paragraf* - "§" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza skrobi przy udziale β -amylazy - schemat blokowy.

E. Hydroliza skrobi przy udziale glukoamylazy (γ -amylazy).

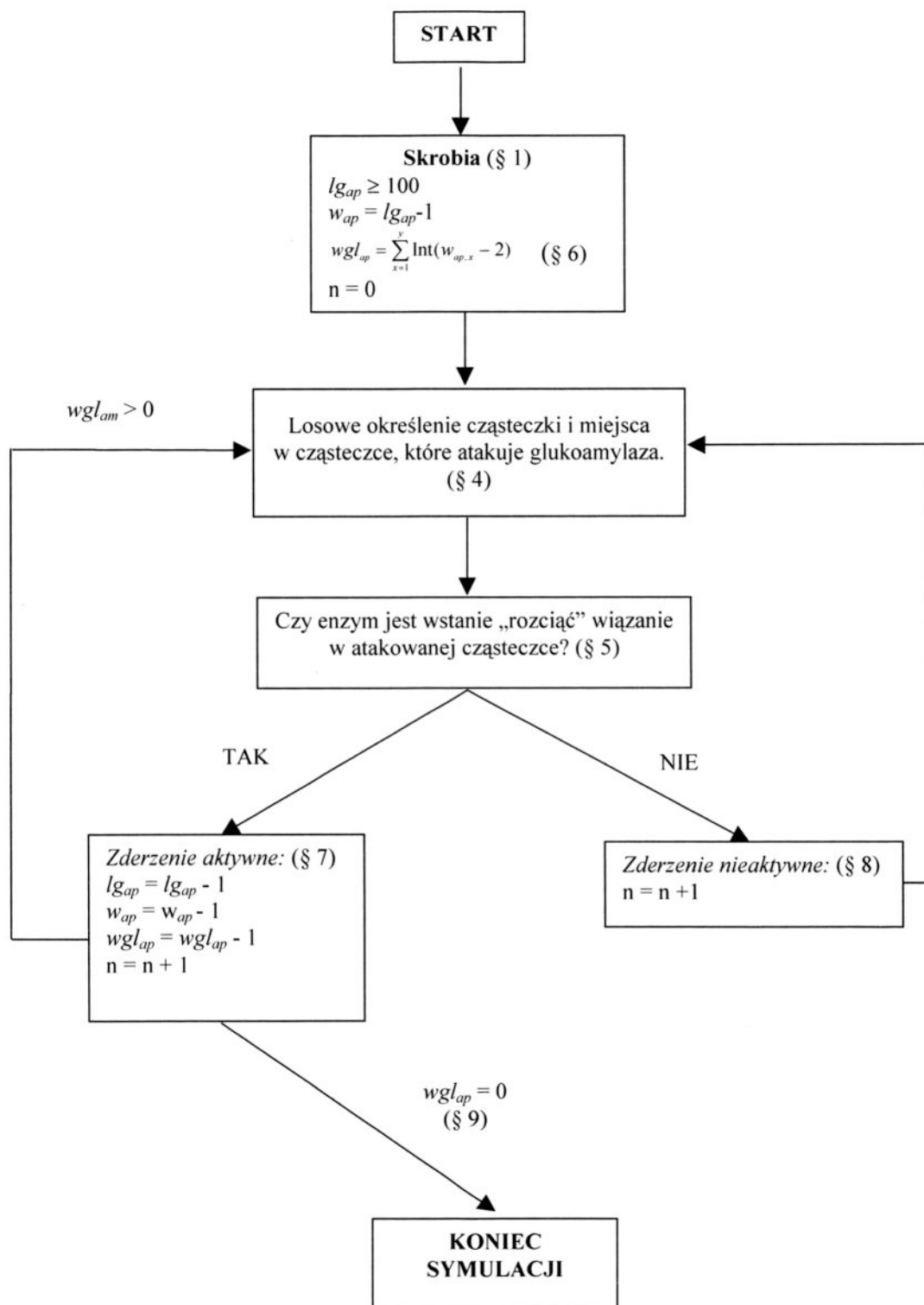
1. Częsteczkami substratów są cząsteczki skrobi (amylozy i amylopektyny).
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki glukozy, maltozy i dekstryn granicznych.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z z przedziału $1 \div l_{g_{calc}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C_1 w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylopektyny, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylopektyny w miejscu niepodatnym na działanie glukoamylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie glukoamylazy są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4 między pierwszą i drugą podjednostką glukozy w łańcuchu A, B lub C cząsteczki amylopektyny, licząc od końca nieredukującego. Hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki, licząc od punktu rozgałęzienia.
6. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi:

$$wgl_{ap} = \sum_{x=1}^y \text{Int}(w_{ap,x} - 2),$$

gdzie y jest ilością łańcuchów w cząsteczce amylopektyny, a x ilością podjednostek glukozy w danym łańcuchu licząc od końca nieredukującego do pierwszego miejsca rozgałęzienia.

7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny maleje o jedną: $[l_{g_{ap}}]_n \Rightarrow [l_{g_{ap}} - 1]_{n+1}$,
 - 7.2. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny maleje o jedno: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap} - 1]_{n+1}$,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny pozostaje bez zmian: $[l_{g_{ap}}]_n \Rightarrow [l_{g_{ap}}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania glukoamylazy wynosi zero: $wgl_{ap} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez glukoamylazę.

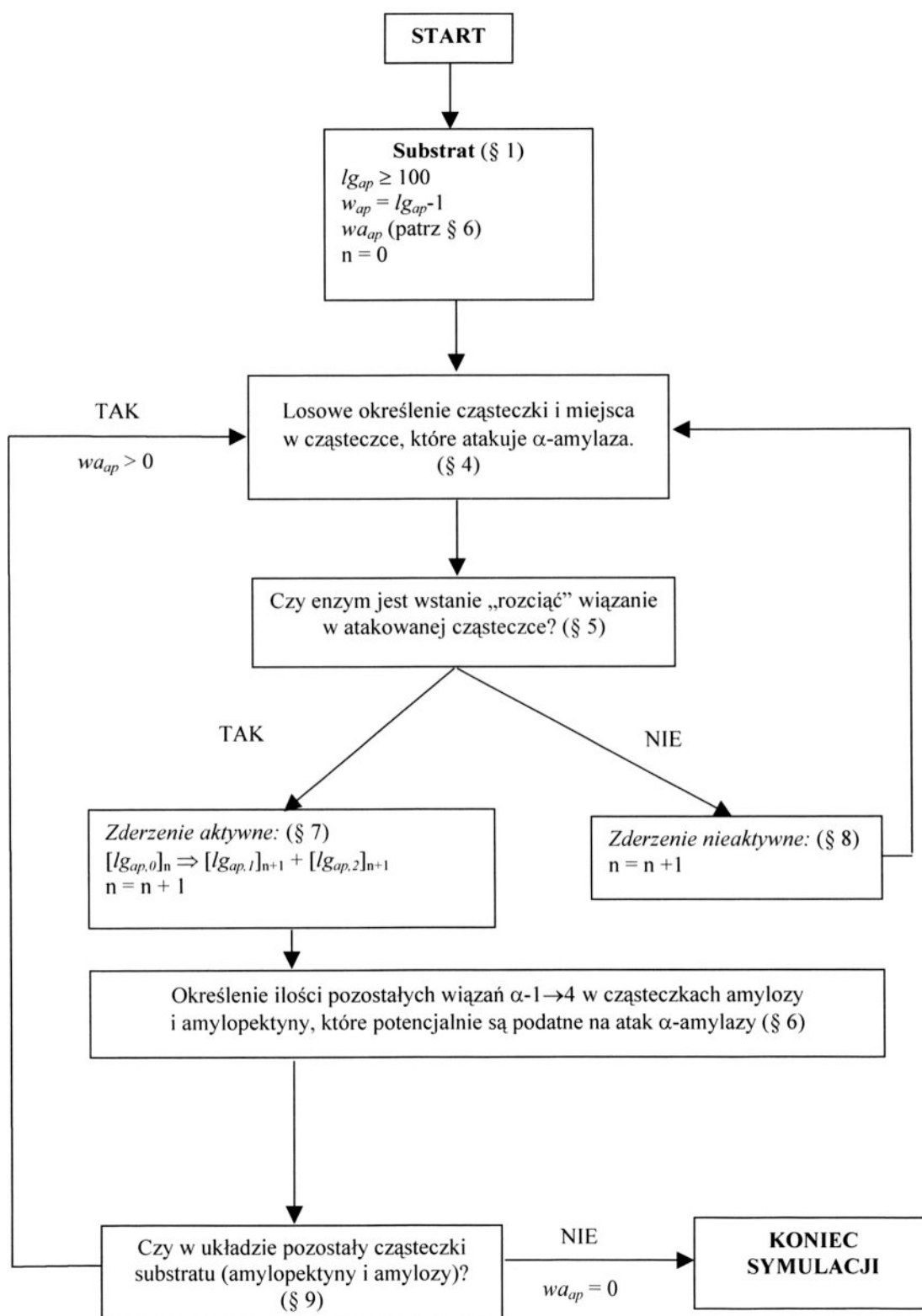
Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy skrobi przy udziale glukoamylazy. Symbolem *paragraf* - "§" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza skrobi przy udziale glukoamylazy - schemat blokowy.

F. Hydroliza skrobi przy udziale α -amylazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki skrobi (amylozy i amylopektyny).
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy, maltotriozy i dekstryny graniczne.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div l_{g_{calc}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C_1 w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę cukru, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę polimeru w miejscu niepodatnym na działanie α -amylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie α -amylazy są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4 wewnątrz łańcucha poliglukozowego. Wiązanie hydrolizowane przez α -amylazę w cząsteczce amylozy musi być:
 - 5.1. co najmniej oddalone o dwie reszty glukozowe od końca redukującego,
 - 5.2. co najmniej oddalone o dwie reszty glukozowe od końca nieredukującego,
 - 5.3. co najmniej oddalone o dwie reszty glukozowe miejsca rozgałęzienia w kierunku końca redukującego,
 - 5.4. co najmniej oddalone o dwie reszty glukozowe miejsca rozgałęzienia w kierunku końca nieredukującego w łańcuchu nadrzędnym,
 - 5.5. co najmniej oddalone o trzy reszty glukozowe miejsca rozgałęzienia w kierunku końca redukującego w łańcuchu podrzędnym.
6. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczkach policukrów, które potencjalnie są podatne na atak α -amylazy zliczana jest w sposób rekurencyjny. Równa jest ona sumie wszystkich wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny spełniających jednocześnie wszystkie warunki zawarte w pkt. 5.1. ÷ 5.5.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, cząsteczka polimeru rozcinana jest na dwa policukry:
 - 7.1. suma ilości podjednostek glukozy w obu powstałych policukrach odpowiada ilości podjednostek glukozy w wyjściowej cząsteczce amylopektyny: $[l_{g_{ap},0}]_n \Rightarrow [l_{g_{ap},1}]_{n+1} + [l_{g_{ap},2}]_{n+1}$,
 - 7.2. suma dostępnych dla α -amylazy wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w powstałych cząsteczkach policukrów obliczana jest wg § 6,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu polimeru pozostaje bez zmian: $[l_{g_{ap}}]_n \Rightarrow [l_{g_{ap}}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce polimeru pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4, w cząsteczkach policukrów, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania α -amylazy wynosi zero: $w_{ap} = 0$.
10. Miara postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez α -amylazę.

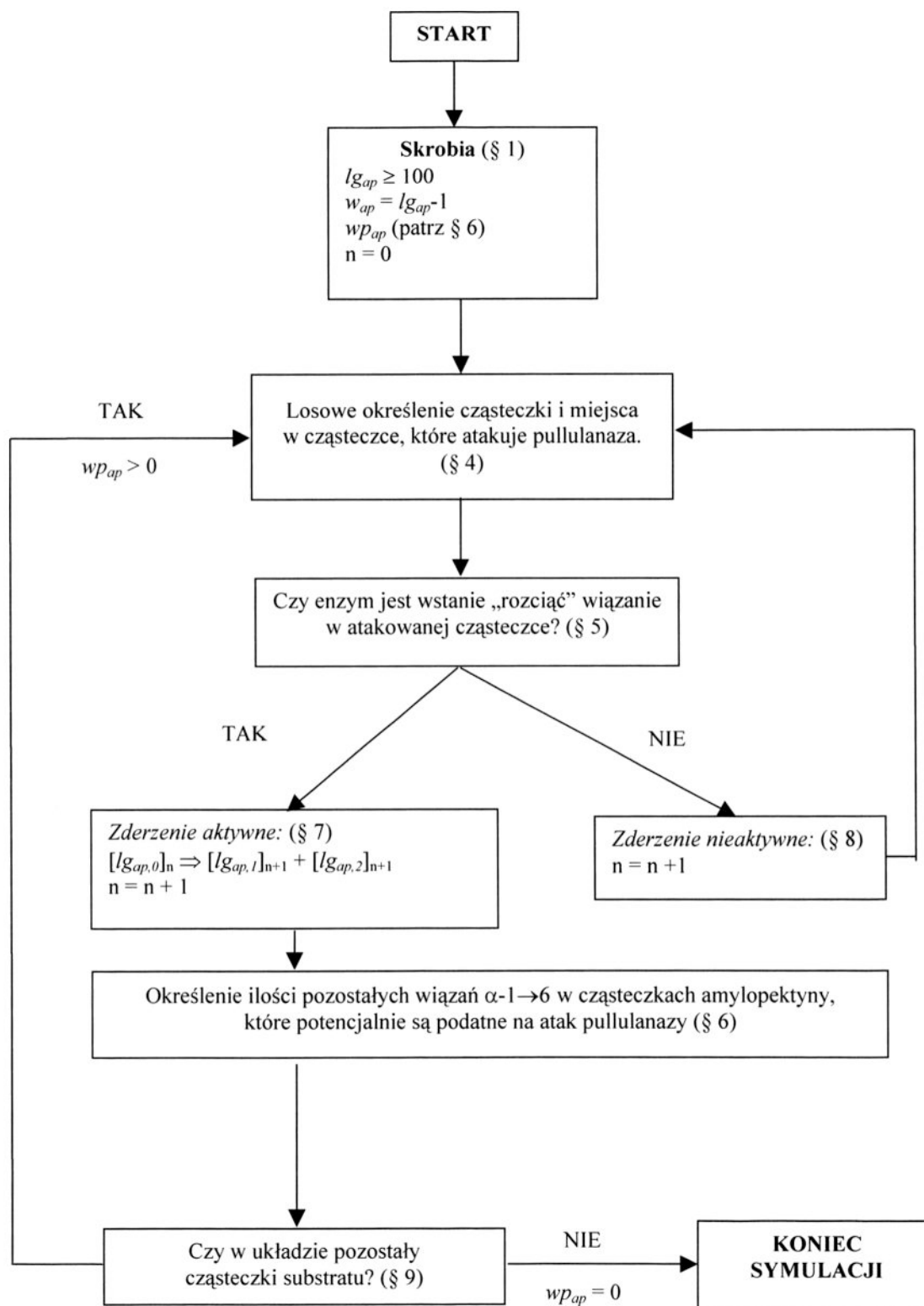
Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy skrobi przy udziale α -amylazy. Symbolem *paragraf*- "§" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza skrobi przy udziale α -amylazy - schemat blokowy.

G. Hydroliza skrobi (amylopektyny) przy udziale pullulanazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki skrobi (amylopektyny).
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki amylozy.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczkę zawartą w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div l_{g_{catk}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę cukru, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę polimeru w miejscu niepodatnym na działanie α -amylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie pullulanazy są wiązania α -1 $\rightarrow$ 6 w cząsteczkach amylopektyny. Aby wiązanie α -1 $\rightarrow$ 6 łączą łańcuch nadrzędny z podrzędnym uległo hydrolizie w wyniku działania pullulanazy, muszą być spełnione jednocześnie następujące warunki:
 - 5.1. cząsteczka amylopektyny musi zawierać dwie podjednostki glukozy w łańcuchu nadrzędnym, licząc od miejsca rozgałęzienia w kierunku końca redukującego,
 - 5.2. cząsteczka amylopektyny musi zawierać jedną podjednostkę glukozy w łańcuchu nadrzędnym, licząc od miejsca rozgałęzienia w kierunku końca nieredukującego,
 - 5.3. hydrolizowane wiązanie α -1 $\rightarrow$ 6 musi być oddalone przynajmniej o trzy podjednostki glukozy (zarówno w łańcuchu nadrzędnym, jak i podrzędnym) od innych punktów rozgałęzienia.
6. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 6 w cząsteczkach amylopektyny, które potencjalnie są podatne na atak pullulanazy zliczana jest w sposób rekurencyjny. Równa jest ona sumie wszystkich wiązań α -1 $\rightarrow$ 6 w cząsteczce amylopektyny spełniających jednocześnie wszystkie warunki zawarte w pkt. 5.1. ÷ 5.3.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, cząsteczka polimeru rozcinana jest na dwa polocukry:
 - 7.1. suma ilości podjednostek glukozy w obu powstałych policukrach odpowiada ilości podjednostek glukozy w wyjściowej cząsteczce amylopektyny: $[l_{g_{ap},0}]_n \Rightarrow [l_{g_{ap},1}]_{n+1} + [l_{g_{ap},2}]_{n+1}$,
 - 7.2. suma dostępnych dla pullulanazy wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w powstałych cząsteczkach policukrów obliczana jest wg § 6.,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu polimeru pozostaje bez zmian: $[l_{g_{ap}}]_n \Rightarrow [l_{g_{ap}}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce polimeru pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 6, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania pullulanazy wynosi zero: $w_{p_{ap}} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez pullulanazę.

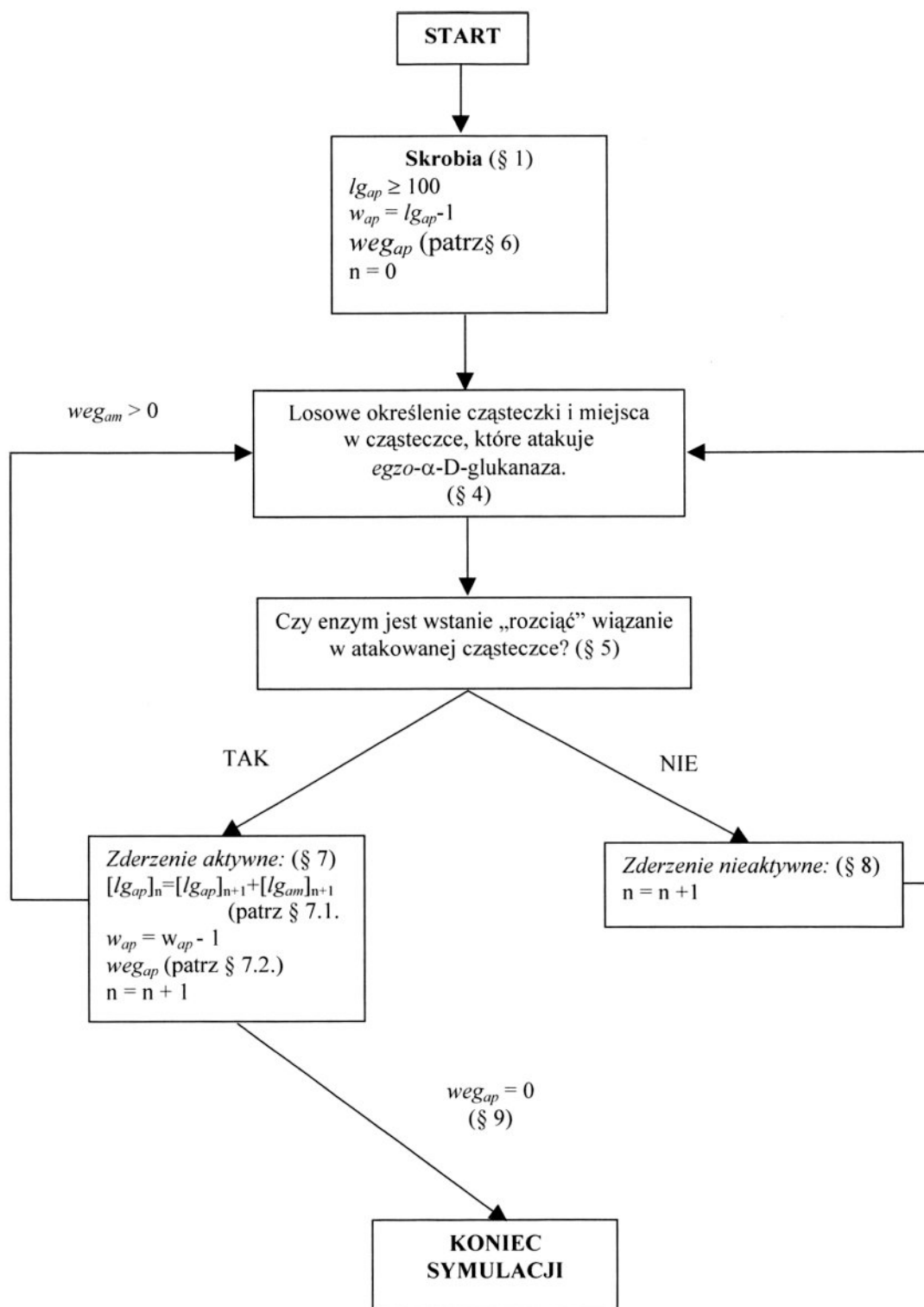
Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy skrobi przy udziale pullulanazy. Symbolem *paragraf* - "§" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza skrobi przy udziale pullulanazy - schemat blokowy.

H. Hydroliza skrobi przy udziale egzo- α -D-glukanazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki skrobi (amylozy i amylopektyny).
2. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltooligosacharydów zawierających od 4 do 7 podjednostek glukozy oraz dekstryny graniczne.
3. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczkę zawartą w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z przedziału $1 \div l_{g_{calc}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz z cząsteczką cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C₁ w danej podjednostce.
4. Rozpatrywane są dwa typy zderzeń:
 - 4.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylopektyny, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 4.2. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylopektyny w miejscu niepodatnym na działanie glukoamylazy lub enzym atakuje inną cząsteczkę.
5. Miejscem podatnym na działanie egzo- α -D-glukanazy są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4 zlokalizowane w łańcuchach A, B lub C cząsteczek amylopektyny, oddalone od 4 do 7 podjednostek glukozy licząc od końca nieredukującego danego łańcucha. Aby atakowane wiązanie α -1 $\rightarrow$ 4 uległo hydrolizie w wyniku działania egzo- α -D-glukanazy muszą być spełnione jednocześnie następujące warunki:
 - 5.1. hydrolizowane wiązanie musi być oddalone od 4 do 7 podjednostek glukozy od końca nieredukującego danego łańcucha,
 - 5.2. potencjalnie „odcinany” łańcuch maltooligosacharydowy nie może zawierać miejsc rozgałęzienia,
 - 5.3. hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki glukozy od miejsca rozgałęzienia.
6. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczkach amylopektyny, które potencjalnie są podatne na atak egzo- α -D-glukanazy zliczana jest w sposób rekurencyjny. Równa jest ona sumie wszystkich wiązań α -1 $\rightarrow$ 6 w cząsteczce amylopektyny spełniających jednocześnie wszystkie warunki zawarte w pkt. 5.1. ÷ 5.3.
7. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltooligosacharydu zawierającego odpowiednio od 4 do 7 podjednostek glukozy:
 - 7.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny o określoną ilość podjednostek glukozy: $[l_{g_{ap}}]_n = [l_{g_{ap}}]_{n+1} + [l_{g_{am}}]_{n+1} \therefore [l_{g_{am}}]_{n+1} = 4 \div 7$,
 - 7.2. suma dostępnych dla egzo- α -D-glukanazy wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 glikozydowych w cząsteczce amylopektyny obliczana jest wg § 6,
 - 7.3. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
8. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 8.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,
 - 8.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny pozostaje bez zmian:
 $[l_{g_{ap}}]_n \Rightarrow [l_{g_{ap}}]_{n+1}$,
 - 8.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,
 - 8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.
9. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania egzo- α -D-glukanazy wynosi zero: $w_{g_{ap}} = 0$.
10. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez egzo- α -D-glukanazę.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy skrobi przy udziale egzo- α -D-glukanazy. Symbolem *paragraf* - "§" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu.

Hydroliza skrobi przy udziale *egzo-α-D*-glukanazy - schemat blokowy.

1. Inhibicja kompetycyjna - hydroliza skrobi przy udziale β -amylazy z uwzględnieniem inhibicji kompetycyjnej produktem reakcji (maltozą)

Z inhibicją kompetycyjną spotykamy się gdy inhibitor współzawodniczy z substratem w obsadzeniu centrum aktywnego enzymu. Jednoczesne wiązanie się substratu i inhibitora kompetycyjnego z enzymem jest wykluczone. Przykładem inhibicji kompetycyjnej może być wspomniana na inhibicja maltozą β -amylazy. W tym przypadku maltoza powstająca w wyniku reakcji, jako analog substratu, może ulec związaniu z miejscem aktywnym enzymu. Ponieważ jednak β -amylaza nie jest w stanie zhydrolizować maltozy, reakcja zostaje zatrzymana do momentu oddysocjowania maltozy od β -amylazy. Opisany przypadek nosi nazwę inhibicji kompetycyjnej produktem reakcji.

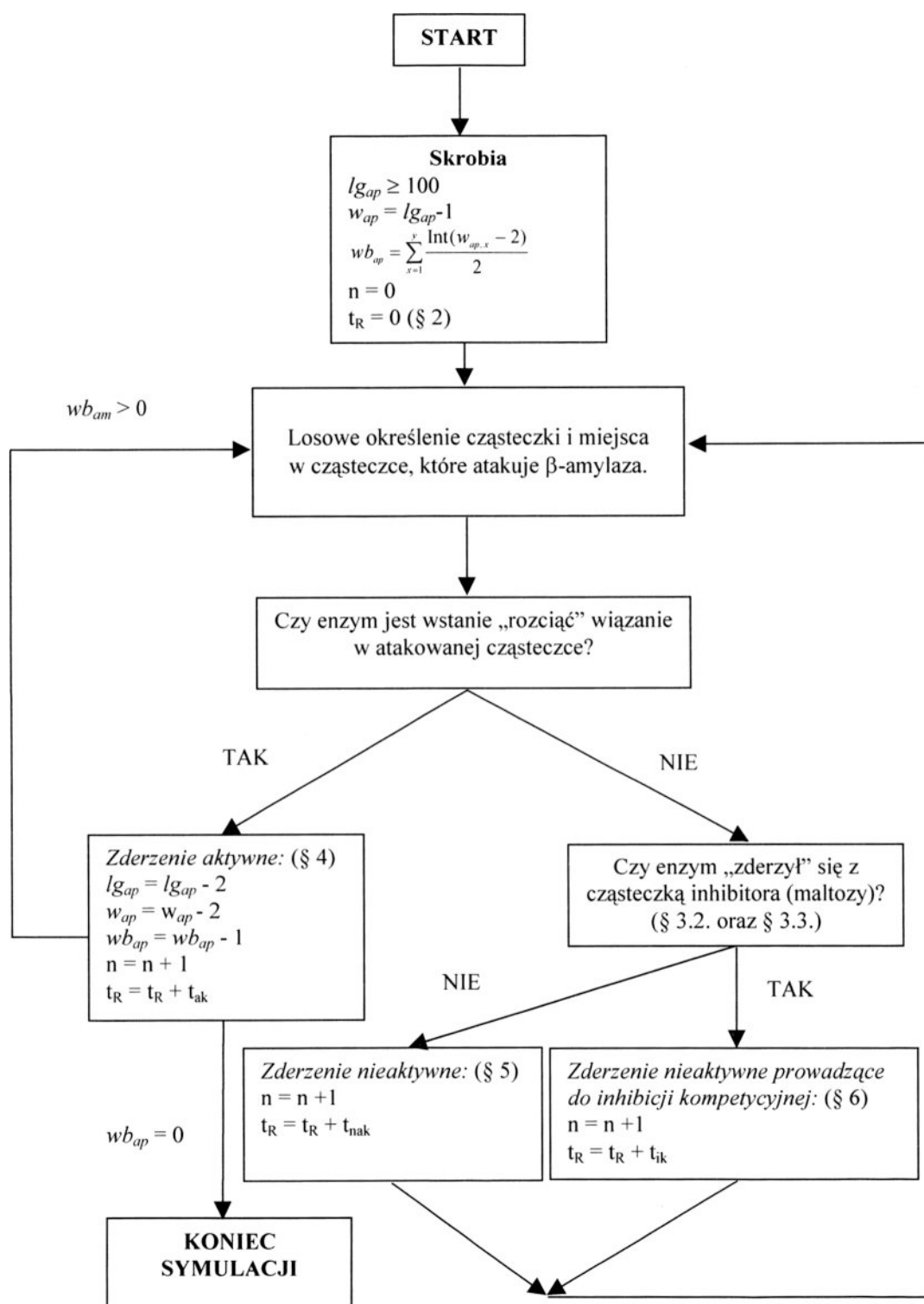
Cechą charakterystyczną inhibicji kompetycyjnej jest możliwość jej cofnięcia przy dostatecznie dużym stężeniu substratu. Zjawisko to wykorzystuje się np. przy zatruciu metanolem lub glikolem etylenowym, a leczenie polega na podaniu bardzo dużej ilości etanolu [3].

W przypadku rozpatrywania inhibicji celowe jest operowanie czasem reakcji (t_R), oraz czasami zderzenia aktywnego (t_{ak}), zderzenia nieaktywnego (t_{nak}) i inhibicji kompetycyjnej (t_{ik}). Uwzględnienie inhibicji kompetycyjnej zakłada nałożenie na wcześniejsze modele następujących założeń:

1. W modelu uwzględniany jest czas reakcji.
2. W momencie rozpoczęcia reakcji wartość zmiennej określającej czas reakcji wynosi zero ($t_R = 0$).
3. Rozpatrywane są trzy typy zderzeń:
 - 3.1. *zderzenie aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie,
 - 3.2. *zderzenie nieaktywne* - zachodzące w przypadku, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu niepodatnym na jego działanie lub enzym atakuje inną cząsteczkę, nie będącą substratem i inhibitorem,
 - 3.3. *zderzenie prowadzące do inhibicji kompetycyjnej* - zachodzące w przypadku kiedy enzym atakuje cząsteczkę inhibitora kompetycyjnego (np. maltozy w przypadku β -amylazy).
4. W wyniku zderzenia aktywnego:
 - 4.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden,
 - 4.2. enzym katalizuje hydrolizę określonego miejsca w cząsteczce substratu, zgodnie z opisem przyjętym w danym modelu dla określonego procesu enzymatycznego,
 - 4.3. czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego: $t_R = t_R + t_{ak}$.
5. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 5.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden
 - 5.2. czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia nieaktywnego: $t_R = t_R + t_{nak}$.
6. W wyniku zderzenia prowadzącego do inhibicji:
 - 6.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden
 - 6.2. czas reakcji zwiększany jest o średni czas trwania kompleksu enzym-inhibitor kompetycyjny:
 $t_R = t_R + t_{ik}$.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono przykładowy model uwzględniający inhibicję kompetycyjną opisujący omawiany przypadek inhibicji β -amylazy powstającą w trakcie procesu scukrzania skrobi maltozą. Zaznaczone na schemacie symbolem § numery odwołań dotyczą przedstawionych powyżej modyfikacji modelu.

Hydroliza skrobi przy udziale β -amylazy z uwzględnieniem inhibicji kompetycyjnej produktem reakcji (maltozą) - schemat blokowy.



J. Inhibicja akompetycyjna - hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem inhibicji akompetycyjnej

Inhibicja akompetycyjną dotyczy przypadku, gdy inhibitor wiąże się z kompleksem substrat-enzym, powodując wydłużenie czasu reakcji. Inhibitor akompetycyjny jest w stanie przyłączyć się jedynie do kompleksu enzym-substrat.

Przy tworzeniu modelu rozważano dwie równorzędne ze względu na otrzymywane wyniki metody uwzględnienia inhibicji akompetycyjnej. Pierwsza zakładała, iż w przypadku zderzenia aktywnego, będzie rozpatrywana możliwość zderzenia cząsteczki kompleksu enzym-substrat z inhibitorem kompetycyjnym. Druga możliwość sprowadzała się do zastąpienia rozpatrywania zderzeń losowych, poprzez określenie prawdopodobieństwa takiego zdarzenia. Po przeprowadzeniu szeregu teoretycznych rozważań zdecydowano się wybrać drugi sposób, gdyż używając prawdopodobieństwa wystąpienia inhibicji akompetycyjnej stosunkowo łatwo można uwzględnić inne zjawiska występujące w układzie. Przykładowo, można założyć, że prawdopodobieństwo to jest funkcją długości (masy) cząsteczki substratu związanego z enzymem.

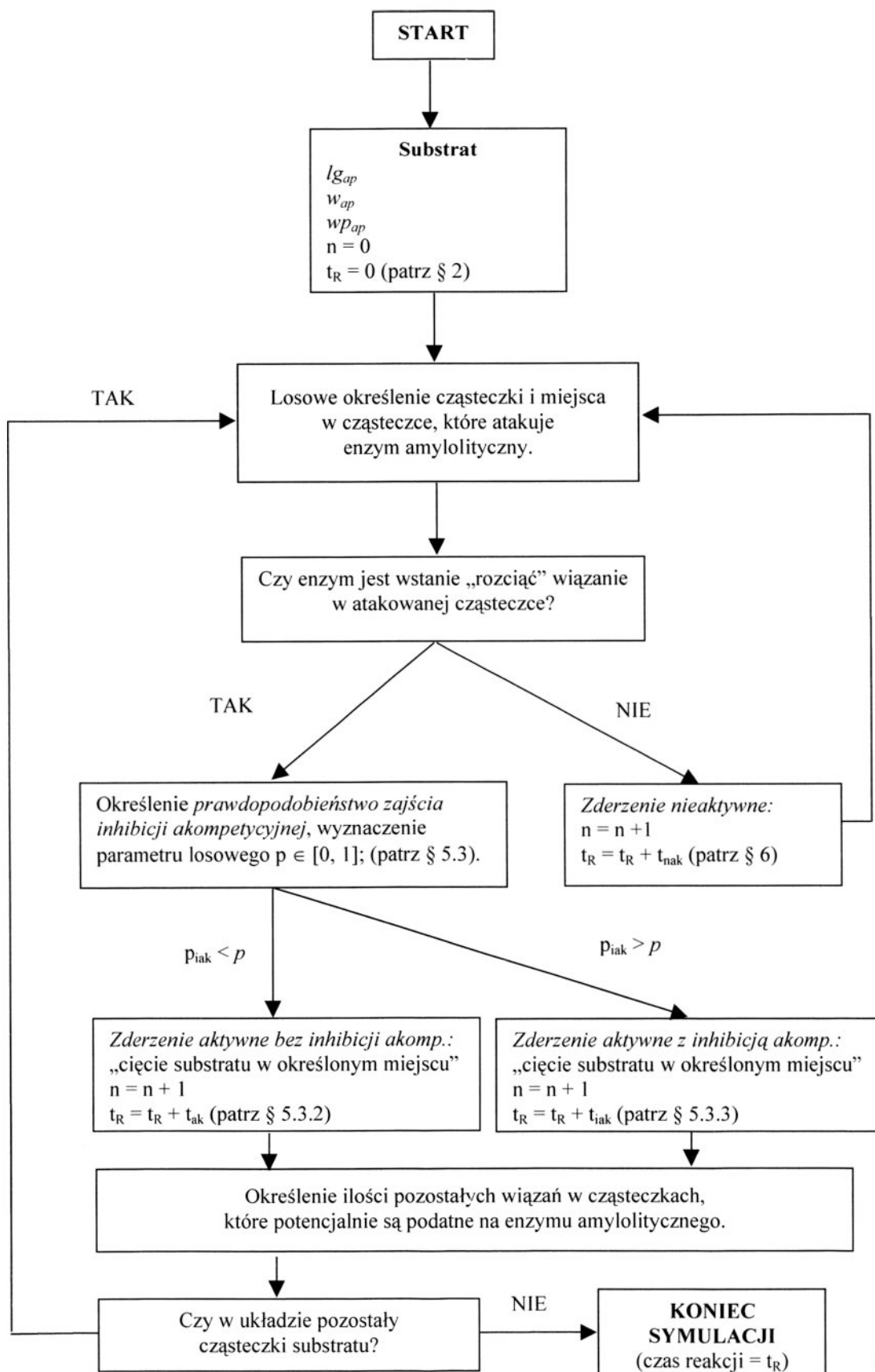
Podobnie jak w przypadku inhibicji kompetycyjnej, w model uwzględniający inhibicje akompetycyjną zakłada parametry opisujące czasy poszczególnych procesów: czas reakcji (t_R), czas zderzenia aktywnego (t_{ak}), zderzenia nieaktywnego (t_{nak}) i inhibicji akompetycyjnej (t_{iak}). Dodatkowo wprowadzono dodatkowy parametr nazwany *prawdopodobieństwem zajścia inhibicji akompetycyjnej* p_{iak} . Uwzględnienie inhibicji akompetycyjnej zakłada nałożenie na wcześniejsze modele następujących założeń:

1. W modelu uwzględniany jest czas reakcji.
2. W momencie rozpoczęcia reakcji wartość zmiennej określającej czas reakcji wynosi zero ($t_R = 0$).
3. Rozpatrywane są trzy typy zderzeń:
 - 3.1. *zderzenie aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie; kompleks enzym-substrat nie jest stabilizowany przez obecność inhibitora akompetycyjnego,
 - 3.2. *zderzenie aktywne z inhibicją akompetycyjną* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie, a powstały kompleks enzym-substrat jest stabilizowany przez obecność inhibitora akompetycyjnego co wpływa na wydłużenie reakcji: $t_{ak} < t_{iak}$,
 - 3.3. *zderzenie nieaktywne* - zachodzące w przypadku, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu niepodatnym na jego działanie lub enzym atakuje inną cząsteczkę, nie będącą substratem i inhibitorem,
4. W celu opisanie *prawdopodobieństwa zajścia inhibicji akompetycyjnej*, został wprowadzony dodatkowy parametr p_{iak} określający prawdopodobieństwo tej reakcji. Został on zdefiniowany następująco:
 - 4.1. *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej* określane jest liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden: $p_{iak} \in [0, 1]$,

-
- 4.2. dla substancji nie wykazujących powinowactwa do kompleksu enzym-substrat (nie będących inhibitorami akompetycyjnymi) wartość *prawdopodobieństwa zajścia inhibicji akompetycyjnej* przyjmuje wartość zero: $p_{iak} = 0$,
 - 4.3. w miarę wzrostu powinowactwa inhibitora kompetycyjnego do kompleksu enzym-substrat wartość parametru określającego *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej* zbliża się do jedności. Wartość jeden oznacza, że każdy kompleks enzym-substrat zostaje związany z cząsteczką inhibitora akompetycyjnego: $p_{iak} = 1$,
 - 4.4. wartość parametru określającego *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji akompetycyjnej* może być także zdefiniowana poprzez określenie zależności, np. poprzez określenie funkcji p_{iak} od masy kompleksu enzym-substrat: $p_{iak} = f(m_{ES})$ lub ilości cząsteczek inhibitora w układzie: $p_{iak} = f(c_{iak})$.
5. W wyniku zderzenia aktywnego, bądź zderzenia aktywnego z inhibicją akompetycyjną:
 - 5.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden,
 - 5.2. enzym katalizuje hydrolizę określonego miejsca w cząsteczce substratu, zgodnie z opisem przyjętym w danym modelu dla określonego procesu enzymatycznego,
 - 5.3. w oparciu o parametr p_{iak} oraz o parametr pomocniczy p , będący każdorazowo wyznaczaną losowo liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden, określana jest możliwość zajścia inhibicji akompetycyjnej:
 - 5.3.1. jeżeli $p_{iak} = p$ to wartość p jest wyznaczana w sposób losowy ponownie do momentu do póki nie zajdzie warunek: $p_{iak} \neq p$,
 - 5.3.2. jeżeli $p_{iak} < p$ to zderzenie traktowane jest jako zderzenie aktywne bez inhibicji akompetycyjnej, a czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego: $t_R = t_R + t_{ak}$.
 - 5.3.3. jeżeli $p_{iak} > p$ to zderzenie traktowane jest jako zderzenie aktywne z inhibicją akompetycyjną, a czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego z inhibicją akompetycyjną: $t_R = t_R + t_{iak}$.
 6. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 6.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden
 - 6.2. czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia nieaktywnego: $t_R = t_R + t_{nak}$.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono ogólny model uwzględniający inhibicję akompetycyjną. Zaznaczone na schemacie symbolem § numery odwołań dotyczą przedstawionych powyżej modyfikacji modelu.

Hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem inhibicji akompetycyjnej - schemat ogólny



K. Inhibicja niekompetycyjna i (de)aktywacja enzymu - hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem inhibicji niekompetycyjnej i deaktywacji enzymu

W inhibicji substrat i inhibitor niekompetycyjny mogą się jednocześnie wiązać z danym enzymem, co oznacza iż centrum aktywne enzymu nie pokrywa się z miejsce przyłączania inhibitora niekompetycyjnego. W efekcie inhibitor może przyłączać się zarówno do cząsteczki wolnego enzymu jak i do kompleksu enzym-substrat. Przy opisywaniu inhibicji niekompetycyjnej posłużono parametrami analogicznymi do wprowadzony przy opisie wcześniej prezentowanych typ inhibicji. Parametrami tymi są: czas reakcji (t_R), czas zderzenia aktywnego (t_{ak}), zderzenia nieaktywnego (t_{nak}) i inhibicji niekompetycyjnej (t_{ink}) oraz *prawdopodobieństwem zajścia inhibicji niekompetycyjnej* p_{ink} . Opisanie inhibicji niekompetycyjnej zakłada nałożenie na poprzednio przedstawiane modele następujących założeń:

1. W modelu uwzględniany jest czas reakcji.
2. W momencie rozpoczęcia reakcji wartość zmiennej określającej czas reakcji wynosi zero ($t_R = 0$).
3. Rozpatrywane są trzy typy zderzeń:
 - 3.1. *zderzenie aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie; a do cząsteczki enzymu nie jest przelączona cząsteczka inhibitora niekompetycyjnego,
 - 3.2. *zderzenie aktywne z inhibicją niekompetycyjną* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu podatnym na jego działanie, jednocześnie do enzymu poza jego centrum aktywnym przyłączona jest cząsteczka inhibitora niekompetycyjnego, co wpływa na wydłużenie reakcji: $t_{ak} < t_{ink}$,
 - 3.3. *zderzenie nieaktywne* - zachodzące w przypadku, kiedy enzym atakuje cząsteczkę substratu w miejscu niepodatnym na jego działanie lub enzym atakuje inną cząsteczkę, nie będącą substratem i inhibitorem,
4. W celu opisanie *prawdopodobieństwa zajścia inhibicji niekompetycyjnej*, został wprowadzony dodatkowy parametr p_{ink} określający prawdopodobieństwo tej reakcji. Został on zdefiniowany następująco:
 - 4.1. *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej* określane jest liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden: $p_{ink} \in [0, 1]$,
 - 4.2. dla substancji nie wykazujących powinowactwa do enzymu poza jego centrum aktywnym (nie będących inhibitorami niekompetycyjnymi) wartość *prawdopodobieństwa zajścia inhibicji niekompetycyjnej* przyjmuje wartość zero: $p_{ink} = 0$,
 - 4.3. w miarę wzrostu powinowactwa inhibitora niekompetycyjnego do cząsteczki enzymu z wyłączeniem jego centrum aktywnego, wartość parametru określającego *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej* zbliża się do jedności. Wartość jeden oznacza, że każdy każda cząsteczka enzymu jest związana z cząsteczką inhibitora niekompetycyjnego: $p_{ink} = 1$,
 - 4.4. wartość parametru określającego *prawdopodobieństwo zajścia inhibicji niekompetycyjnej* może

być także zdefiniowana poprzez określenie zależności, np. jako funkcja stężenia inhibitora niekompetycyjnego w układzie: $p_{ink} = f(c_{ink})$.

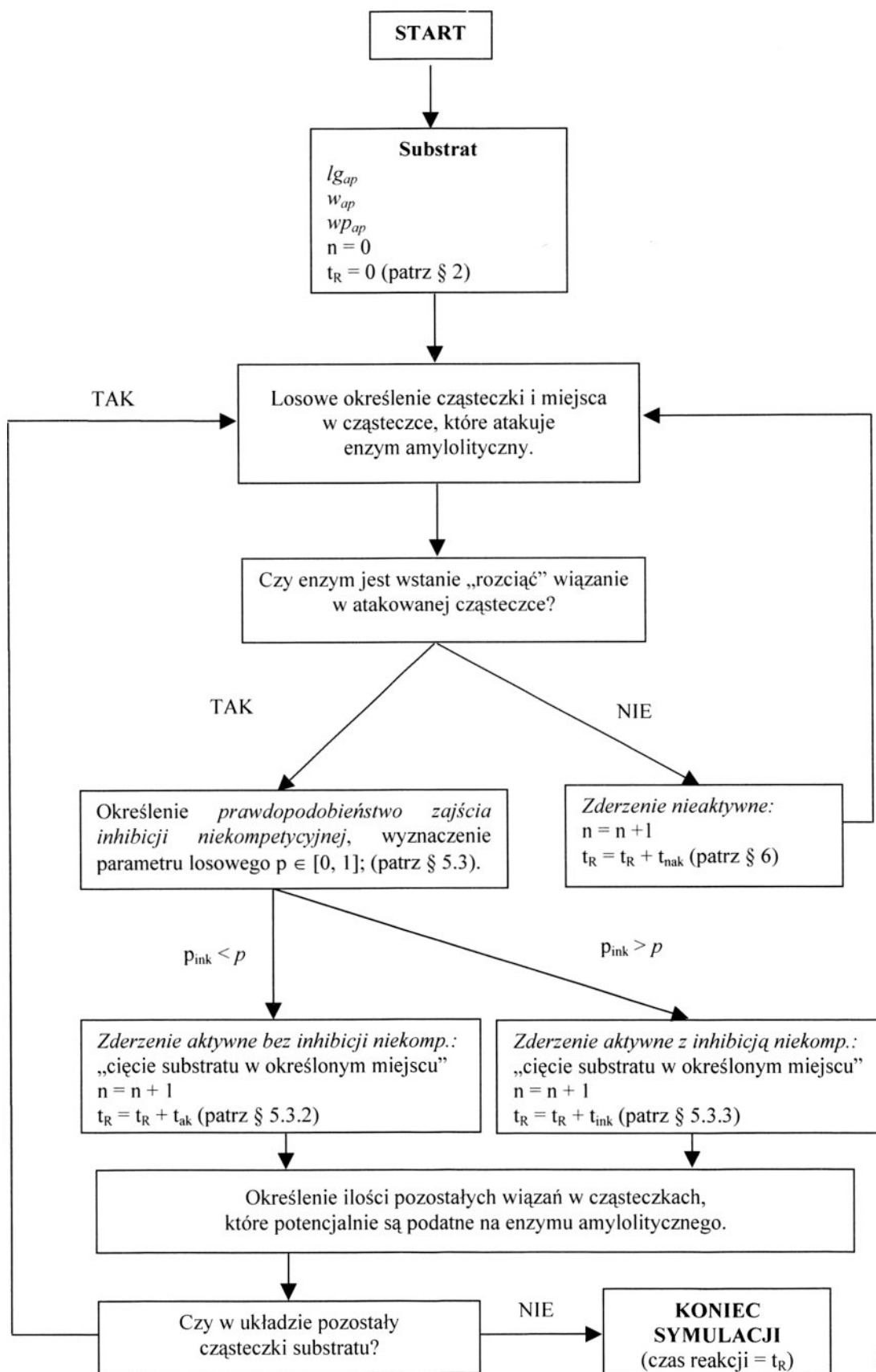
5. W wyniku zderzenia aktywnego, bądź zderzenia aktywnego z inhibicją niekompetycyjną:
 - 5.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden,
 - 5.2. enzym katalizuje hydrolizę określonego miejsca w cząsteczce substratu, zgodnie z opisem przyjętym w danym modelu dla określonego procesu enzymatycznego,
 - 5.3. w oparciu o parametr p_{iak} oraz o parametr pomocniczy p , będący każdorazowo wyznaczaną losowo liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden, określana jest możliwość zajścia inhibicji niekompetycyjnej:
 - 5.3.1. jeżeli $p_{ink} = p$ to wartość p jest wyznaczana w sposób losowy ponownie do momentu do póki nie zajdzie warunek: $p_{iak} \neq p$,
 - 5.3.2. jeżeli $p_{ink} < p$ to zderzenie traktowane jest jako zderzenie aktywne bez inhibicji niekompetycyjnej, a czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego: $t_R = t_R + t_{ak}$.
 - 5.3.3. jeżeli $p_{ink} > p$ to zderzenie traktowane jest jako zderzenie aktywne z inhibicją niekompetycyjną, a czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia aktywnego z inhibicją niekompetycyjną: $t_R = t_R + t_{ink}$.
6. W wyniku zderzenia nieaktywnego:
 - 6.1. krok symulacji zwiększany jest o jeden
 - 6.2. czas reakcji zwiększany jest o czas trwania zderzenia nieaktywnego: $t_R = t_R + t_{nak}$.

Na sąsiedniej stronie przedstawiono ogólny model uwzględniający inhibicję niekompetycyjną. Zaznaczone na schemacie symbolem § numery odwołań dotyczą przedstawionych powyżej modyfikacji modelu.

Przyłączenia cząsteczki inhibitora niekompetycyjnego wydłuża czas reakcji w porównaniu z procesem katalizowanym przez enzym wolny od obecności inhibitora, czyli: $t_{ink} > t_{ak}$. Jednakże istnieją cząsteczki (aktywatory), które powodują dodatkową aktywację enzymu: $t_{ink} < t_{ak}$. W opracowanym modelu symulowanie tego procesu sprowadza się od strony matematycznej do wyznaczenia wielkości parametru p_{ink} właściwie do konkretnego układu substrat-enzym-aktywator oraz przypisaniu parametrowi t_{ink} , zamiast czasu aktywnego zderzenia z inhibicją niekompetycyjną, czasu zderzenia aktywnego z aktywacją enzymu. Reasumując jeżeli cząsteczka enzymu związana jest z inhibitorem to czas pojedynczego zderzenia aktywnego ulega odpowiedniemu wydłużeniu, a jeżeli z aktywatorem to skróceniu, w stosunku do czasu reakcji katalizowanej przez wolny enzym. Aktywatorem enzymu, może być nie tylko substancja chemiczna, ale także promieniowanie, np. mikrofalowe lub światło dostarczające do układu dodatkowej energii ułatwiającej lub umożliwiającej przebieg reakcji*. Przy opisie reakcji tego typu, uwidacznia się trafność przyjętego w modelu opisu reakcji, gdyż poprzez wprowadzoną stałą prawdopodobieństwa, możemy uwzględnić wpływ dodatkowych czynników.

* Enzym poprzez stabilizuje struktury odpowiadające stanowi pośredniemu reakcji obniża energię aktywacji reakcji ($\Delta G^\ddagger$). Natomiast promieniowanie elektromagnetyczne może dostarczać energię, niezbędną do zajścia tej reakcji, a tym samym powodując, że reakcja jest termodynamicznie możliwa lub/i dodatkowo ją przyspieszając [4].

Hydroliza skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych z uwzględnieniem inhibicji niekompetycyjnej - schemat ogólny



L. Atak wielokrotny - hydroliza skrobi przy udziale β -amylazy z uwzględnieniem ataku wielokrotnego

Aby opisać atak wielokrotny wprowadzono dodatkowy parametr: *prawdopodobieństwo ataku wielokrotnego*: p_w , który opisuje zachowanie się enzymu, tj. czy enzym oddysocjowuje od substratu, czy dokona kolejnego cięcia. Teoretycznie czas jednego cyklu przy pojedynczym cięciu w przypadku ataku wielokrotnego, powinien być krótszy niż w przypadku ataku pojedynczego, gdyż nie występuje zjawisko oddysocjowania enzymu od substratu i ponownej asocjacji enzym-substrat. Dlatego, do opisu można wprowadzić także dodatkowy parametr czasu, który opisuje czas pojedynczego cyklu przy ataku wielokrotnym: t_{wak} . Poniżej przedstawiono założenia ataku wielokrotnego w przypadku β -amylazy.

1. Częsteczkami substratów są cząsteczki skrobi (amylozy i amylopektyny).
2. Przyjmuje się że czas reakcji w chwili rozpoczęcia symulacji wynosi zero: $t_R = 0$.
3. Końcowymi produktami reakcji są cząsteczki maltozy, maltotriozy i dekstryn granicznych.
4. Symulacja reakcji odbywa się w oparciu o losowe określenie miejsca ataku enzymu na cząsteczki zawarte w roztworze. W sposób losowy określana jest liczba z z przedziału $1 \div l_{g_{calc}}$, która w jednoznaczny sposób określa podjednostkę glukozy wraz cząsteczkę cukru w której się zawiera oraz wiązanie przy węglu C_1 w danej podjednostce. Jeśli doszło do zderzenia aktywnego (patrz § 4.1. oraz § 4.2.) to rozpatrywane jest prawdopodobieństwo zajścia ataku wielokrotnego:
 - 4.1. Prawdopodobieństwo ataku wielokrotnego określone jest liczbą rzeczywistą z z przedziału domkniętego od zera do jeden: $p_w \in [0,1]$.
 - 4.2. Określany jest parametr pomocniczy p , będący każdorazowo wyznaczaną losowo liczbą rzeczywistą z przedziału domkniętego od zera do jeden:
 - 4.2.1. jeżeli $p_w = p$ to wartość p jest wyznaczana w sposób losowy ponownie do momentu do póki nie zajdzie warunek: $p_{iak} \neq p$,
 - 4.2.2. jeżeli $p_w < p$ to w przypadku gdy enzym jest w stanie dokonać kolejnego cięcia, zderzenie traktowane jest jako atak wielokrotny (patrz § 8.),
 - 4.2.3. jeżeli $p_w > p$ to w sposób losowy określana jest liczba z z przedziału $1 \div l_{g_{calc}}$, określająca kolejną podjednostkę glukozy atakowaną przez β -amylazę.
5. Rozpatrywane są następujące typy zderzeń:
 - 5.1. *aktywne* - zachodzące w momencie, kiedy enzym atakuje cząsteczkę amylopektyny, w miejscu podatnym na działanie enzymu,
 - 5.2. *aktywne z atakiem wielokrotnym* - zachodzi w momencie, gdy w poprzedniej iteracji doszło do zderzenia aktywnego β -amylazy z substratem i enzym atakuje ponownie dany łańcuch w kolejnym miejscu podatnym na jego działanie,
 - 5.3. *nieaktywne* - kiedy enzym, atakuje cząsteczkę amylopektyny w miejscu niepodatnym na działanie β -amylazy lub enzym atakuje cząsteczkę produktu.

6. Miejscem podatnym na działanie β -amylazy są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4 między drugą i trzecią podjednostką glukozy w łańcuchu A, B lub C cząsteczki amylopektyny, licząc od końca nieredukującego. Hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki, licząc od punktu rozgałęzienia.

7. Ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi:

$$wb_{ap} = \sum_{x=1}^y \frac{\text{Int}(w_{ap,x} - 2)}{2},$$

gdzie y jest ilością łańcuchów w cząsteczce amylopektyny, a x ilością podjednostek glukozy w danym łańcuchu licząc od końca nieredukującego do pierwszego miejsca rozgałęzienia.

8. W wyniku zderzenia aktywnego, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:

8.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny maleje o dwie: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap} - 2]_{n+1}$,

8.2. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny maleje o dwa: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap} - 2]_{n+1}$,

8.3. czas reakcji zwiększany jest o czas zderzenia aktywnego: $t_R = t_R + t_{ak}$,

8.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.

9. W wyniku zderzenia aktywnego z atakiem wielokrotnym, od końca nieredukującego odcinana jest cząsteczka maltozy:

9.1. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny maleje o dwie: $[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap} - 2]_{n+1}$,

9.2. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny maleje o dwa: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap} - 2]_{n+1}$,

9.3. czas reakcji zwiększany jest o czas zderzenia aktywnego z atakiem wielokrotnym:

$$t_R = t_R + t_{wak},$$

9.4. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.

10. W wyniku zderzenia nieaktywnego:

10.1. liczba cząsteczek w układzie pozostaje bez zmian,

10.2. liczba podjednostek glukozy w łańcuchu amylopektyny pozostaje bez zmian:

$$[lg_{ap}]_n \Rightarrow [lg_{ap}]_{n+1},$$

10.3. ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4 w cząsteczce amylopektyny pozostaje bez zmian: $[w_{ap}]_n \Rightarrow [w_{ap}]_{n+1}$,

10.4. czas reakcji zwiększany jest o czas zderzenia nieaktywnego: $t_R = t_R + t_{nak}$,

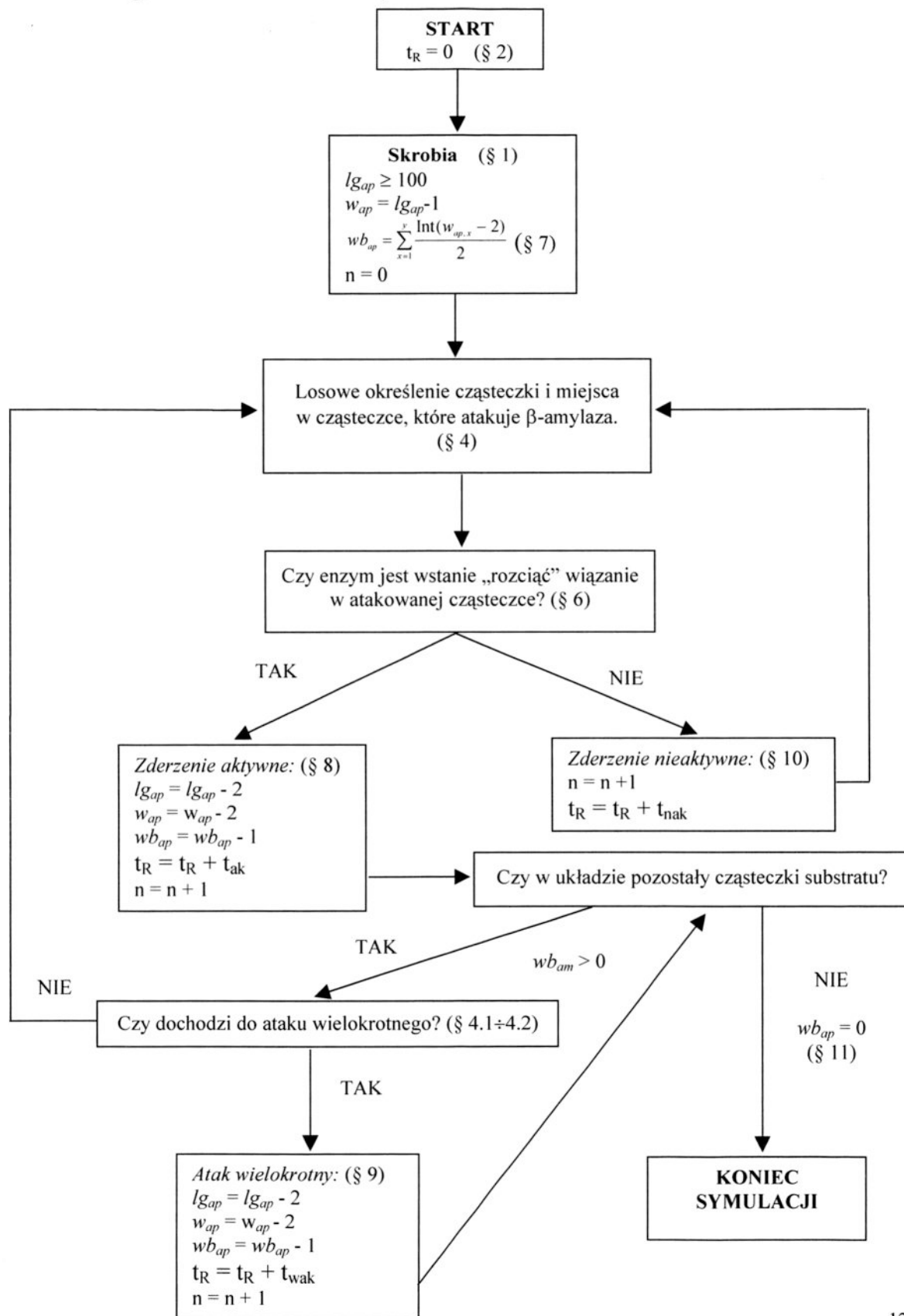
10.5. krok symulacji zwiększany jest o jeden: $n \Rightarrow n+1$.

11. Za koniec reakcji przyjmuje się najmniejszą iterację, dla której ilość wiązań α -1 $\rightarrow$ 4, w cząsteczkach amylopektyny, potencjalnie mogących ulec hydrolizie w wyniku działania β -amylazy wynosi zero: $wb_{ap} = 0$.

12. Miarą postępu reakcji jest ilość końców redukujących uwalnianych podczas procesu hydrolizy amylopektyny przez β -amylazę.

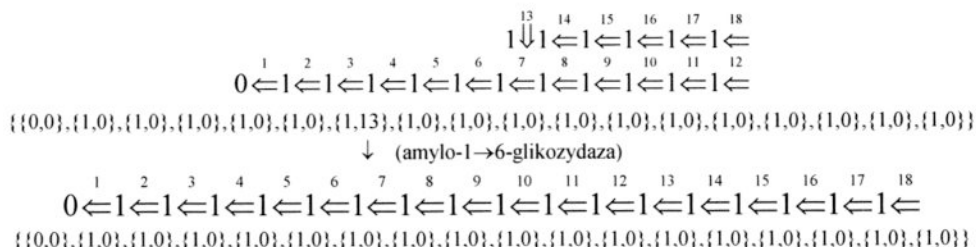
Na sąsiedniej stronie przedstawiono schemat blokowy hydrolizy skrobi przy udziale β -amylazy. Symbolem *paragraf* - "\$" zaznaczono na schemacie blokowym odnośniki do powyższego tekstu. Analogicznie może być rozpatrywany atak wielokrotny glukoamylazy, z tym, że zamiast maltozy uwalniane są cząsteczki glukozy.

Hydroliza skrobi przy udziale β -amylazy z uwzględnieniem ataku wielokrotnego - schemat blokowy.



M. Transferazy

Proponowany w pracy zapis reakcji degradacji polimerów przy użyciu zdefiniowanej funkcji charakterystycznej A i funkcji rozgałęzień umożliwia także zapis reakcji katalizowanych przez transferazy. Poniżej przedstawiono schemat działania amylo-1→6-glikozydazy*, katalizującej przeniesienie łańcucha podrzędnego na koniec nieredukujący łańcucha nadrzędnego wraz z zapisem reakcji w formie przyjętego w pracy łańcucha liczb:

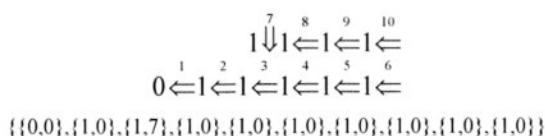


Po uwzględnieniu specyficzności enzymu, schemat blokowy modelu opisującego działanie transferazy, jest analogiczny z schematem przedstawionym na rys. 3.1.

N. Powinowactwo enzymu do substratu

W dotychczasowych rozważaniach przyjęto, że prawdopodobieństwo zderzenia (ataku) enzymu ze wszystkimi podjednostkami glukozy w objętości modelowej jest takie samo lub w przypadku ataku wielokrotnego, wprowadzono zmienną określającą prawdopodobieństwo zajścia tego zjawiska. Można jednak wyobrazić sobie inny rozkład prawdopodobieństwa, przykładowo możemy przypuszczać że elementy skrajne amylopektyny (podjednostki glukozy leżące blisko końców łańcuchów) będą częściej atakowane, niż fragmenty leżące wewnątrz struktury cząsteczki.

W celu uwzględnienia tego zjawiska przyjmuje się, że rozkład prawdopodobieństwa ataku enzymu na poszczególne monomery w układzie jest nieliniowy. Przyjmuje się, że gęstość prawdopodobieństwa ataku na dany monomer, może być określona przykładowo jako funkcja jego położenia względem końca łańcucha w którym się zawiera lub może być wyznaczana w oparciu o energie powinowactwa centrum enzymu (porównaj rys. III.1). Dopuszcza się także zadeklarowanie tablicy określającej poszczególne prawdopodobieństwa, przykładowo dla następującej cząsteczki amylopektyny złożonej z dziesięciu podjednostek glukozy:



standardowo w modelu prawdopodobieństwo ataku enzymu na każdą podjednostkę glukozy, które w tym przypadku wynosi: 1/10:

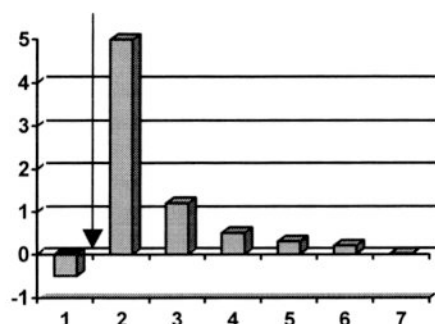
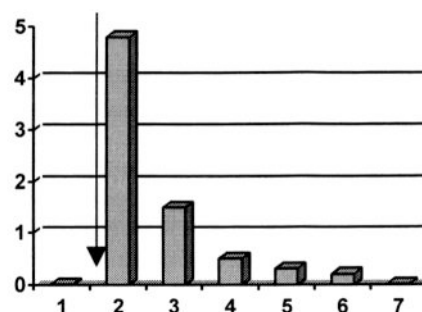
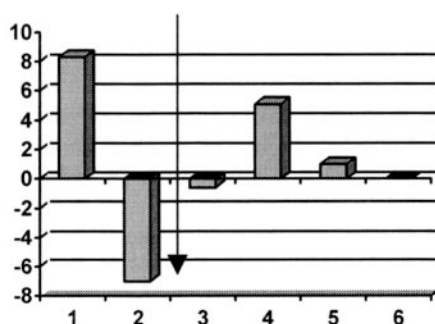
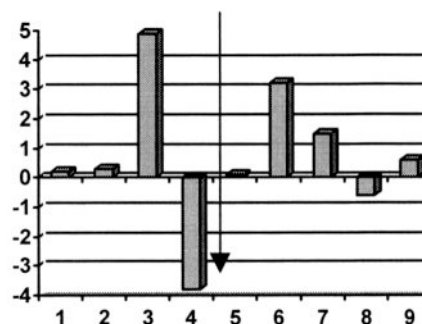
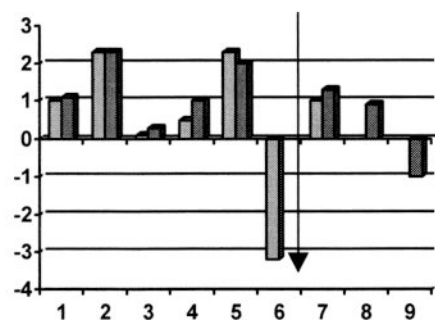
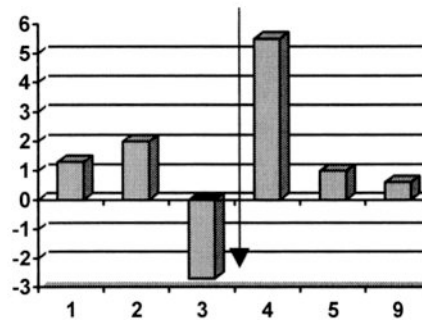
$$P_1 = 0,10 ; P_2 = 0,10 ; P_3 = 0,10 ; P_4 = 0,10 ; P_5 = 0,10 ; P_6 = 0,10 ; P_7 = 0,10 ; P_8 = 0,10 ; P_9 = 0,10 ; P_{10} = 0,10 .$$

Jeżeli jednak przyjmiemy, że najbardziej prawdopodobny jest atak enzymu na dwie skrajnie położone podjednostki glukozy w każdym łańcuchu, a prawdopodobieństwo ataku na punkt rozgałęzienia jest najniższe, tablica rozkładu prawdopodobieństwa ataku enzymu na podjednostki glukozy w omawianej w przykładzie cząsteczki może wyglądać następująco:

$$P_1 = 0,15 ; P_2 = 0,10 ; P_3 = 0,04 ; P_4 = 0,07 ; P_5 = 0,10 ; P_6 = 0,15 ; P_7 = 0,07 ; P_8 = 0,07 ; P_9 = 0,10 ; P_{10} = 0,15 .$$

W przypadku uwzględnienia powinowactwa enzymu do substratu na wszystkie prezentowane w pracy schematy blokowe, nakłada się warunek, iż przy wyznaczaniu (pseudo)losowym cząsteczki oraz miejsca w danej cząsteczce atakowanego przez enzym, przyjmuje się dodatkową funkcję lub tablicę definiującą gęstość prawdopodobieństwa ataku na poszczególne monomery.

* Enzymem który katalizuje reakcje odwrotną przy procesach anabolicznych jest glikozylotransferaza rozgałęzień α -glukanu (amylo-1,4→1,6-glikozylotransferaza).

Glucoamylaza z *Rh. niveus* [50].Glucoamylaza z *Rh. delemar* [51] β -amylaza z ziaren soji [63].Glucoamylaza z *Rh. delemar* [132]Upłynniająca α -amylaza z *B. subtilis*.Scukrzająca α -amylaza z *B. subtilis* [49].

Energia powinowactwa została wyznaczona w oparciu o metody kinetyczne [55] - kolor niebieski oraz w oparciu o analizę produktu [136] - kolor bordowy.

Rys. III.1. Zestawienie energii powinowactwa centrum aktywnego do substratu (fragmentu substratu) dla różnych enzymów amylolitycznych [50]. Na osi odciętych zaznaczono numery podjednostek glukozy, z którymi wiąże się centrum katalityczne danego enzymu, na osi rzędnych przedstawiono energię powinowactwa A_i [kcal/mol]. Strzałkami zaznaczono hydrolizowane wiązanie w substracie.

O. Zestawienie warunków definiujących zderzenia aktywne dla wybranych enzymów amylolitycznych

W tabeli III.1. zreasumowano warunki definiujące zderzenia aktywne dla przedstawionych w dodatku enzymów amylolitycznych. Parametry podane w trzeciej kolumnie określające specyficzność enzymów (specyficzność substratowa) wobec skrobi odnoszą się ściśle do enzymów wykorzystanych w pracach doświadczalnych badających kinetykę procesu hydrolizy skrobi [14, 15, 16, 18, 54, 61, 67, 80, 85, 99, 100, 151].

Tab. III.1. Podatność wiązań glikozydowych na działanie poszczególnych enzymów amylolitycznych.

Enzym	Opis działania enzymu	Warunki definiujące zderzenia aktywne
α -amylaza	Hydrolizowane są wiązania α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe wewnątrz cząsteczek skrobi.	Zderzenie aktywne zachodzi w przypadku gdy atakowane wiązanie α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe jest jednocześnie: $\Rightarrow$ Oddalone co najmniej o trzy podjednostki glukozy od końca nieredukującego NRE, $\Rightarrow$ Oddalone co najmniej o trzy podjednostki glukozy od końca redukującego RE, $\Rightarrow$ Dla cząsteczek rozgałęzionych atakowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o dwie podjednostki glukozy od miejsca rozgałęzienia w łańcuchu głównym i o trzy w łańcuchu podrzędnym
β -amylaza	Uwalniane są cząsteczki maltozy od nieredukujących końców cząsteczek skrobi. W przypadku amylopektyny reakcja hydrolizy zostaje zatrzymana na punktach rozgałęzienia.	Zderzenie aktywne zachodzi w przypadku gdy atakowane wiązanie α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe spełnia jednocześnie następujące warunki: $\Rightarrow$ Oddalone jest o dwie podjednostki glukozy od końca nieredukującego cząsteczki, $\Rightarrow$ Oddalone jest przynajmniej o dwie podjednostki glukozy od końca redukującego cząsteczki, $\Rightarrow$ Dla polimerów rozgałęzionych hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki glukozy od punktu rozgałęzienia.
glukoamylaza	Uwalniane są cząsteczki wolnej glukozy od nieredukujących końców cząsteczek skrobi.	Zderzenie aktywne zachodzi w przypadku gdy atakowane wiązanie α -1 $\rightarrow$ 4-glikozydowe spełnia jednocześnie następujące warunki: $\Rightarrow$ Oddalone jest o jedną podjednostkę glukozy od końca nieredukującego cząsteczki, $\Rightarrow$ Oddalone jest przynajmniej o dwie podjednostki glukozy od końca redukującego cząsteczki, $\Rightarrow$ Dla polimerów rozgałęzionych hydrolizowane wiązanie musi być oddalone co najmniej o trzy podjednostki glukozy od punktu rozgałęzienia. Dodatkowo dla glukoamylaz hydrolizujących wiązania α-1$\rightarrow$6-glikozydowych dopuszcza się możliwość hydrolizy wiązań α-1$\rightarrow$6-glikozydowych gdy są one zlokalizowane bezpośrednio na końcach nieredukujących cząsteczek amylopektyny.

Dodatek IV

Charakterystyka programu komputerowego przeznaczonego do symulacji reakcji hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych

Charakterystyka programu komputerowego przeznaczonego do symulacji reakcji hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych

W oparciu o przedstawiony w pracy model hydrolizy skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych opracowano program komputerowy umożliwiający komputerową symulację w/w procesu. Poniżej przedstawiono podstawowe cechy programu:

- ☐ Algorytm programu opiera się na przedstawionym w pracy modelu zakładającym iteracyjność procesu. Działanie każdego enzymu zostało zdefiniowane w oddzielnej procedurze. Zdefiniowano także niezależne funkcje określające, czy w układzie dostępne są cząsteczki substratu (wiązania glikozydowe) podatne na działanie danego enzymu.
- ☐ W programie predefiniowano następujące enzymy amylolityczne:
 - ☐ α -amylazę scukrzającą oraz α -amylazę upłynniającą,
 - ☐ β -amylazę,
 - ☐ glukoamylazę,
 - ☐ pullulenazę (enzym usuwający rozgałęzienia).
- ☐ Użytkownik ma możliwość bezpośredniego zadeklarowania w programie:
 - ☞ ilości poszczególnych cząsteczek enzymów w układzie,
 - ☞ określenia substratu (wielkości cząsteczek, stosunku amylozy do amylopektyny oraz stopienia polimeryzacji dla amylopektyny)
 - ☞ czasów poszczególnych zderzeń,
 - ☞ wyboru zdefiniowanych oddziaływań inhibicyjnych,
 - ☞ wyboru mechanizmu ataku (dla β - i glukoamylazy istnieje możliwość określenia *ataku wielokrotnego*, podanie wartości *prawdopodobieństwa ataku wielokrotnego* równej 1 jest jednoznaczne z rozpatrywaniem *pojedynczego ataku łańcuchowego*),
 - ☞ możliwa jest zmiana także wybranych parametrów modelu związanych z dodaniem lub usunięciem z układu modelowego określonej ilości cząsteczek glukozy, bądź maltozy; przerywaniem symulacji w zależności od ilości kolejnych zderzeń nieaktywnych lub numeru iteracji; określeniem inaktywacji enzymu, itp.

Pozostałe parametry programu można zmodyfikować, dokonując zmian w kodzie źródłowym programu.

- W programie istnieje możliwość wyboru opcji zapisu określonych parametrów symulacji do pliku. Dane zapisywane są w postaci pliku tekstowego, liczby reprezentowane są „z kropką dziesiętną” i oddzielone są znakiem średnika (format CSV). Dane w tym formacie mogą być m. in. importowane do arkuszy kalkulacyjnych *Microsoft® Excel* oraz *KyPlot* [169]. Dodatkowo istnieje możliwość określenia kroku, co ile iteracji mają być wyprowadzane dane.
- W trakcie działania programu wyświetlana jest informacja o zmianie jego podstawowych parametrów. Istnieje możliwość zatrzymania programu, zmiany jego określonych parametrów, wyświetlenia funkcji charakterystycznej i funkcji połączeń oraz ponowne uruchomienie programu pozwalające na kontynuację symulacji.
- Ze względu na dostępność licencji oraz przejrzystość kodu program napisano wykorzystując *Pascal* jako język programowania [60]. Opracowano dwie wersje programu:
 - Przeznaczoną na komputery klasy PC z procesorem 486 lub lepszym. Wykorzystano kompilator TURBO PASCAL 7.0 firmy Borland International. Program pracuje w środowisku MS-DOS*, przyjęto maksymalny rozmiar tablicy wszystkich zmiennych równy 64kb.
 - Przeznaczoną na komputery Amiga™ z procesorem Motorola 68060 lub lepszym, pracującym pod kontrolę systemu Amiga OS 3.0+. Wykorzystano kompilator KICKPASCAL (© Maxon Computer GmbH.). Rozmiar tablicy danych ograniczony jest ilością dostępnej pamięci oraz wolnej pamięci na dysku twardym.
- W programie zdefiniowano dwie tablice określające:
 - *funkcję charakterystyczną* - **Tablica A**, wartości zmiennych typu *boolean*, wartość *TRUE* oznacza obecność wiązania glikozydowego przy węglu C₁, wartość *FALSE* oznacza brak wiązania (koniec redukujący).
 - *funkcję połączeń* - **Tablica B**, w celu przyspieszenia działania programu rozszerzono dziedzinę wartości funkcji na zbiór liczb naturalnych. Przyjęto, że

* Przy wystartowaniu programu z poziomu systemu Windows, program uruchamia się „w okienku DOS’owym”.

wartość $-n$ będzie oznaczać iż dana podjednostka glukozy w łańcuchu podrzędnym przyłączona jest do podjednostki glukozy w łańcuchu nadrzędnym o numerze n .
 Częsteczki cykliczne w modelu nie są rozpatrywane.

Poniżej przedstawiono zapis procesu hydrolizy skrobi zgodnie z przyjętą w programie notacją (przypadek przedstawiony w rozdziale 2.3.1., podkreśleniem zaznaczono miejsce ataku poszczególnych enzymów),:

```
{0,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,41};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-8};{1,0};
{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,34};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,-27};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-12};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,50};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-45};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0}
```

↓ β – amylaza

```
{0,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,41};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-8};{1,0};
{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,34};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,-27};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-12};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,50};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-45};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0}
```

↓ α – amylaza

```
{0,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,41};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-8};{1,0};
{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,34};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,-27};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-12};{1,0};{1,0};{1,0};
{1,50};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0};{1,-45};{1,0};{1,0};{1,0};{1,0}
```

- ☐ Na podstawie czasów reakcji dla poszczególnych enzymów określana jest cząsteczka enzymu, której atak rozpatrywany jest w danej iteracji. Następnie w oparciu o generator liczb (pseudo)losowych określana jest cząsteczka i miejsce ataku enzymu. Na podstawie analizy warunków zdefiniowanych w programie, określane jest czy dochodzi do „cięcia substratu”. W zależności od przebiegu symulacji odpowiednio modyfikowana jest funkcja charakterystyczna, funkcja połączeń, zwiększany jest numer iteracji oraz zmianie ulegają odpowiednio pozostałe zmienne programu.

Skompilowane wersje programu wraz z ich kodami źródłowe zawarto w załączniku. Dodatkowo w kodach źródłowych zawarto komentarze identyfikujące zmienne oraz opisujące zadeklarowane w programie funkcje i procedury. W tabeli IV.1. przedstawiono w formie „zdjęć ekranu” przykład użytkowania programu komputerowego *SKROBIA*.

Załącznik

Płyta CD



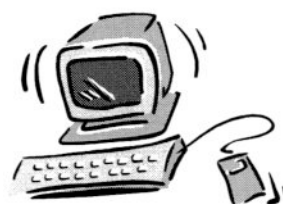
Płyta CD

Ze względu dużą objętość arkuszy danych zawierających wyniki symulacji do pracy załączono nośnik multimedialny w formie płyty CD-ROM (standard *ISO9660 data disk*). Jej zawartość przedstawiono w tabeli Z.1. Po wykryciu płyty w napędzie CD-ROM, w komputerach pracujących pod kontrolą systemu Windows 98[®] automatycznie wczytywany jest dokument hipertekstowy z zawartością płyty. Na innych platformach sprzętowych sugerowane jest wczytanie do przeglądarki stron WWW pliku *INDEX.HTM* znajdującego się w głównym katalogu na płycie CD. Zalecane jest użycie przeglądarki internetowej obsługującej ramki. Część dokumentów hipertekstowych zawiera aktywne połączenia internetowe ze stronami WWW i plikami wykorzystanymi w pracy. Sprawdzono poprawność odczytu płyty na komputerach zgodnych z IBM PC, Amiga, Macintosh oraz Silicon Graphics.

Tab. Z.1. Spis zawartości płyty.

katalog	zawartość katalogu
SKROBIA	Program SKROBIA umożliwiający symulację procesu hydrolizy skrobi przy udziale predefiniowanych enzymów amylolitycznych. Załączono programy skompilowane wersje programu przeznaczone na komputery zgodne z IBM PC 486+ oraz na komputery Amiga 4000 (procesor MOTOROLA 68060, system OS 3.0) wraz z kodami źródłowymi.
EXCEL	Arkusze kalkulacyjne w formacie <i>Microsoft® Excel</i> zawierające: 1. pełne zestawienie danych kinetycznych wykorzystanych pracy, 2. wyniki symulacji komputerowych przeprowadzonych dla procesów opisywanych przez dane kinetyczne (wyniki symulacji zestawiono z poszczególnymi seriami danych doświadczalnych w osobnych arkuszach; w symulacjach komputerowych modelowano m.in. stężenie cukrów DP = 1 ÷ 6 oraz dekstryn granicznych), 3. wyznaczone stałe kinetyczne dla wybranych modeli liniowych, 4. przykłady modelowania innych procesów, niż układy dla których dysponowano danymi doświadczalnymi.
HTML	Dokumenty hipertekstowe zawierające między innymi: 1. historię rozwoju enzymologii, 2. schemat działania wybranych enzymów amylolitycznych wraz z animacjami komputerowymi przedstawiającymi mechanizmy ataku enzymatycznego, 3. opis typów inhibicji produktami reakcji [27, 131, 144], 4. przykład procesu technologicznego pozyskiwania skrobi modyfikowanej z kukurydzy, 5. opis stosowanej analityki wykorzystującej reakcję z DNS [72], 6. wybrane adresy Internetowe zawierające informacje związane z degradacją i wykorzystaniem biopolimerów [165 ÷ 181].
PUBLIKACJE	Przegląd publikacji autora niniejszej pracy doktorskiej. Artykuły zostały przedstawione w formie plików hipertekstowych.
LITERATURA	Udostępnione przez autorów publikacje cytowane w pracy doktorskiej. (Prace zostały zapisane w oryginalnej formie dostarczonej przez autorów.)
INSTALL	Wersje instalacyjne programów: 1. <i>Gepasi</i> [171] (program wykorzystano do symulacji w rozdziale 5.5.), 2. <i>KyPlot</i> [169] (arkusz danych)
WORD	Treść niniejszej pracy doktorskiej w formie plików <i>Microsoft® Word</i> .
ADOBE	Dokumenty tekstowe i hipertekstowe przekonwertowane do formatu <i>Adobe Portable Document Format (pdf)</i> .

 Płyta CD-ROM



Piśmiennictwo cytowane

- [1] Ajandouz E. H., J.-I. Abe, B. Svensson, G. Marchis-Mouren; Barley malt- α -amylase. purification, action pattern, and subsite mapping of isozyme 1 and two members of the isozyme 2 subfamily using *p*-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates; *Biochimica et Biophysica Acta*, **1159**, 193-202 (1992).
- [2] Arasaratnam V., K. Balasubramanian; Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on raw corn; *Starch/Stärke*, **45**, 231-233 (1993).
- [3] Baranowski T.; Podręcznik biochemii dla studentów medycyny i lekarzy, wydanie IV; Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa (1969).
- [4] Barley J. E., David F. Ollis; Biochemical engineering fundamentals; McGraw-Hill Book Company, Singapore (1986).
- [5] Baryszewska M., W. Leyko; Biofizyka dla biologów; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1997).
- [6] Beldman G., A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, M. F. Searle-van Leeuwen, W. Pilnik; Adsorption and kinetic behavior of purified endoglucanases and exoglucanases from *Trichoderma viride*; *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 251-257 (1987).
- [7] Beldman G., A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, M. F. Searle-van Leeuwen, W. Pilnik; Specific and nonspecific glucanases from *Trichoderma viride*; *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 160-167 (1988).
- [8] Bertoft E.; Hydrolysis of amylopectin by the α -amylase of *B. subtilis*; *Carbohydr. Res.*, **149**, 379-389 (1986).
- [9] Blanco M., J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, M. Redón; Artificial neural networks for multicomponent kinetic determinations; *Anal. Chem.*, **67**, 4477 (1995).
- [10] Botham R. L., V. J. Morris, T. R. Noel, S. G. Ring; A study on the *in vivo* digestibility of retrograded starch; *Carbohydr. Polymers*, **29**, 347-352 (1996).
- [11] Brandt S.; Metody statystyczne i obliczeniowe analizy danych; PWN, Warszawa (1976).
- [12] Brandt S.; Analiza danych; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1998).
- [13] Bryjak J., A. Noworyta; Kinetic behavior of penicillin acylase immobilized on acrylic carrier; *Bioproc. Engin.*, **9**, 37-42 (1993).
- [14] Bryjak J., B. Kołacz, A. Noworyta; Immobilizacja α -amylazy na nośnikach akrylowych; XV Ogólnopolska Konferencja naukowa Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Materiały konferencyjne Komitet Inżynierii Chemicznej i Procesowej PAN, tom 4, Właściwości materiałów, procesy membranowe, bioprocasy i bioreaktory, zagadnienia ochrony środowiska; Gdańsk (1995).
- [15] Bryjak J., B. Kołacz, A. Szczeszek, M. Majkowska; Immobilizacja β -amylazy na syntetycznych nośnikach akrylowych; IV Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa, Postępy Inżynierii Bioreaktorowej, Łódź (1996).

- [16] Bryjak J.; Immobilization of amylase on acrylic carriers; 7th European Congress on Biotechnology, Nicea (1995).
- [17] Bryjak J.; Enzymatyczna hydroliza skrobi to syropów maltodektrynowych i skrobiowych. Część I. Enzymy; *Biotechnologia*, **44**, 180-200 (1999).
- [18] Bryjak J.; Enzymatyczna hydroliza skrobi to syropów maltodektrynowych i skrobiowych. Część II. Procesy; *Biotechnologia*, **44**, 201-225 (1999).
- [19] Buonocore V., C. Caporale, M. De Rosa, A. Gambacorta, *J. Bacteriol.*, **128**, 515-21 (1995).
- [20] Carbonell J. V., L. Izquierdo, J. M. Sendra, P. Manzanares; A Monte Carlo simulation of the depolymerization of linear homopolymers by *endo*-enzymes exhibiting random-attack probability and single-attack mechanism: application to the (1→3),(1→4)-β-D-Glucan/*endo*-(1→3),(1→4)-β-D-Glucanase system; *Biotechnol. Bioeng.*, **60**, 105-113 (1998).
- [21] Caulcutt R., R. A. Boddy; *Statistic for analytical chemists*; Chapman and Hall, London (1983).
- [22] Chmiel A.; *Biotechnologia*; PWN, W-wa (1991).
- [23] Colonna P., A. Buléon, F. Lemarié; Action of *Bacillus subtilis* α-amylase on native wheat starch; *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 895-904 (1988).
- [24] Converse A. O., J. D. Optekar; A synergistic kinetics model for enzymatic cellulose hydrolysis compared to degree-of-synergism experimental results; *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 145-148 (1993).
- [25] Costa R.M., F.X. Malcata; Multisubstrate Michaelis-Menten kinetics: Explicit dependence of substrate concentration on time for batch reactors; *Bioproc. Engn.*, **10**, 155-159 (1994).
- [26] Czermiński J. B.; *Metody statystyczne dla chemików*; PWN, W-wa (1986).
- [27] Dawes E. A.; *Quantitative problems in biochemistry*; Longman Group Ltd., London and New York, sixth ed. (1980).
- [28] De Mot R., H. Verachtert, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1474-1482 (1985).
- [29] De Mot R., H. Verachtert, *Eur. J. Biochem.*, **164**, 643-654 (1987).
- [30] Dziobiński I., T. Świętkowski; *Poradnik matematyczny*; PWN, 602-614, W-wa (1985).
- [31] Eerlingen R. C., H. Jacobs, K. Block, J. A. Delcour; Effects of hydrothermal treatments on the rheological properties of potato starch; *Carbohydr. Res.*, **297**, 347-356 (1997).
- [32] Emanuel N. M., G. B. Siergiejew; *Wybrane metody badania kinetyki reakcji chemicznych*; PWN, Warszawa (1988).
- [33] Father M. S., J. F. Harris; Partial hydrolysis and acetolysis of cellotriose-1-C¹⁴, *J. ACS*, **89**, 5661 (1967).

- [34] Freer S. N.; Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Streptococcus bovis* JB1; *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 1398-1402 (1993).
- [35] Freire D. M. G., G. L. Sant'Anna Jr.; Hydrolysis of starch with immobilized glucoamylase; *Applied Biochemistry and Biotech.*, **26**, 23-34 (1990).
- [36] Fujii M., T. Homma, M. Taniguchi; Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules; *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 910-915 (1988).
- [37] Fujii M., Y. Kawamura, Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch; *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 260-265 (1985).
- [38] Газова Н. В., Г. А. Тищенко, Т. Д. Муравьева, Т. С. Потежина, Г. З. Елькин, Г. В. Самсонов, Сорбционная иммобилизация α -амилазы *Bacillus subtilis* сетчатыми карбоксильными полиэлектролитами, Прикладная Бионимия И Микробиология, **23**, 542 (1987).
- [39] Gillespie D. T.; Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions; *J. Phys. Chem.*, **81**(25), 2340 (1977).
- [40] Gorinstein S.; Kinetics studies during enzyme hydrolysis of potato and cassava starches; *Starch/Stärke*, **45**, 91-95 (1993).
- [41] Govindasamy S., C. G. Oates, H. A. Wong; Characterization of changes of sago starch components during hydrolysis by a thermostable α -amylase; *Carbohydr. Polymers*, **18**, 89-100 (1992).
- [42] Hagenimana V., L.-P. Vézina, R. E. Simard; Sweetpotato α - and β -amylases: Characterization and kinetic studies with endogenous inhibitors; *J. Food Sci.*, **59**, 373-376 (1994).
- [43] Hakkarainen L., P. Linko; State vector model for contherm scraped surface heat exchanger used as an enzyme reactor in wheat starch conversion; *J. Food Eng.*, **4**, 135-153 (1985).
- [44] Hellendoorn L., S. P. P. Ottengraf, J. C. van der Heuvel, J. A. M. M. Pennings, V. A. P. M. dos Santos, R. H. Wijffels; Kinetics and performance of co-immobilised system of amyloglucosidase and *Zymomonas mobilis*; *Biochem. Bioeng.*, **63**, 694-704 (1999).
- [45] Henderson W. E., W. M. Teague; A kinetic model of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase under process conditions; *Starch*, **40**, 412-418 (1988).
- [46] Henri V., *Acad. Sc.*, Paris **135**, 916 (1902); Lois generales de l'action des diastases; Herman, (1903).
- [47] Henriksnäs H., T. Lövgren; Chain-length distribution of starch hydrolyzate after α - or β -amylase action; *Biochem. Bioeng.*, **20**, 1303-1307 (1978).
- [48] Hiromi K., Developments in Food Science, Elsevier Scientific Publishing Company, Tokyo-Amsterdam-Oxford-New York, **1**, (1979).
- [49] Hiromi K., Developments in Food Science, Elsevier Scientific Publishing Company, Tokyo-Amsterdam-Oxford-New York, **2**, (1979).

- [50] Hiromi K., M. Ohnishi, A. Tanaka; Subsite structure and ligand binding mechanism of glucoamylase; *Molecular and Cellular Biochemistry*, **51**, 79-95 (1983).
- [51] Hiromi K., Y. Nitta, C. Kumata, S. Ono, *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 362-375 (1973).
- [52] Hizukuri S.; Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectin, and its significance; *Carbohydr. Res.*, **147**, 342-347 (1986).
- [53] Hui Z., K. Wei, C. Xiao, L. Wei, S. Jiacong; Simultaneous saccharification and isomerization by immobilized glucoamylase and glucose isomerase; *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **54**, 43-46 (1992).
- [54] Iskra A.; Badanie procesu hydrolizy skrobi przy udziale glucoamylazy; praca magisterska (1997), Inst. Inż. Chem. PWr BI-13.
- [55] Iwasa S., H. Aoshima, K. Hiromi, H. Hatano, *J. Biochem.*, **75**, 969-978 (1974).
- [56] Jane J.-L., J. J. Shen; Internal structure of the potato starch granule revealed by chemical gelatinization; *Carbohydr. Res.*, **247**, 279-290 (1993).
- [57] Janiak W.; Wstęp do "Mathematica"; Wyd. PLJ, W-wa (1994).
- [58] Kaczkowski J.; Podstawy biochemii; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa (1993).
- [59] Kafarski P., B. Lejczak; Chemia bioorganiczna; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1994).
- [60] Kamiński K.; *Turbo Pascal 5.0*; Wyd. Nauk.-Tech., W-wa (1990).
- [61] Karaban A.; Kinetyka reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z udziałem enzymów amylolitycznych; Inst. Inż. Chem. PWr BI-13 (1999).
- [62] Karlin S., H. M.; *Corse in stochastic processes*; Academic Press, NY (1975) & (1981).
- [63] Kato M., K. Hiromi, Y. Morita, *J. Biochem.*, **75**, 563-576 (1974).
- [64] Keleti T.; *Basic enzyme kinetics*; Akadémiai Kiadó, Budapest (1986).
- [65] Kędzierski P., M. Kowal, P. Wojciechowski, R. Gancarz; A computer program "CLUSTER" for cluster analysis; Materiały konferencyjne: 3rd Conference Computers in Chemistry, 45, Wrocław (1994).
- [66] Kimura A., J. F. Robyt; Reaction of enzymes with starch granules: kinetics and products of the reaction with glucoamylase; *Carbohydr. Res.*, **277**, 87-107 (1995).
- [67] Kołacz B.; Immobilizacja α -amylazy na nośniku akrylowym; praca magisterska (1995), Inst. Inż. Chem. PWr BI-13.
- [68] Komolprasert V., R. Y. Ofoli; Starch hydrolysis kinetics of *Bacillus licheniformis* α -amylase; *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **51**, 209-223 (1991).
- [69] Kumakura M., I. Kaetsu; Radiation-induced Decomposition and enzymatic hydrolysis of cellulose; *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1309-1315 (1978).
- [70] Kurtz T. G.; The relationship between stochastic and deterministic models for chemical reactions; *J. Chem. Phys.*, **57**, 2976 (1972).

- [71] Kusonoki K., K. Kawakami, F. Shieraishi, K. Kato, M. Kai; A kinetic expression for hydrolisis of soluble starch by glukoamylase; *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 347-354 (1982).
- [72] Kuśnierz S.; Współpraca enzymów amylolitycznych; praca magisterska (1998), Inst. Inż. Chem. PWr BI-13.
- [73] Lee B., Yen. j., Yang L., J. C. Liao; Incorporating qualitative in enzyme kinetic models using fuzzy logic; *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 722-729 (1999).
- [74] Lim H. C.; On kinetic behavior at high enzyme concetrations; *AIChE J.*, **19**, 659-662 (1973).
- [75] Lineweaver H., D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1945).
- [76] Lowry G. G.; Marcov chains and Monte Carlo calculations in polymer science; Marcel Dekker, NY (1970).
- [77] Lowry O. H., N. J. Rosebrough, N. J. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- [78] MacGregor E. A., A. W. MacGregor, L. J. Marci. J. E. Morgan; Models for the action of barley alpha-amylase isozymes on linear substrates; *Carbohydr. Res.*, **257**, 249-268 (1994).
- [79] Madhusadhan B., R. N. Tharanathan; Structural studies of linear and branched fractions of chickpea and finger millet starches; *Carbohydr. Res.*, **284**, 101-109 (1996).
- [80] Majkowska M., A. Szczeszek; Immobilizacja β -amylazy na nośniku akrylowym i badania kinetyki reakcji hydrolizy skrobi z udziałem enzymu natywnego i immobilizowanego; praca magisterska (1996), Inst. Inż. Chem. PWr BI-13.
- [81] Malcata F. X., *Bioproc. Engn.*, **11**, 23-28 (1994).
- [82] Manners D. J., N. K. Matheson; The fine strukture of amylopectin; *Carbohydr. Res.*, **90**, 99-110 (1981).
- [83] Marc A., J. M. Engasser, M. Moll, R. Flayeux; A kinetic model of starch hydrolisis by α - and β -amylase during mashing; *Biotech. Bioeng.*, **25**, 481-496 (1983).
- [84] Marchal L. M., J. Jonkers, G. Th. Franke, C. D. de Gooijer, J. Tramper; The effect of process conditions on the α -amylolytic hydrolysis of amylopectin potato starch: an experimental design approach; *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 348-357 (1999).
- [85] Maron W., B. Sidorowicz-Kotełko, praca magisterska (1996), Inst. Inż. Chem. PWr BI-13.
- [86] Marquardt D. W., *SIAM J.*, **11**, 431 (1963).
- [87] Mårtensson K.; Preparation of an immobilized two-enzyme system, β -amylase-pullulanase, to an acrylic copolymer for the conversion of starch to maltose. III. Process kinetic studies on continuous reactors; *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1567-1587 (1974).
- [88] Mastalerz P.; Chemia organiczna; PWN, W-wa (1986).

- [89] McDermott J. B., C. Libanati, C. LaMarca, M. T. Klein; Quantitative use of model compound information: Monte Carlo simulation of the reactions of complex macromolecules; *Ind. Eng. Chem. Res.*, **29**, 22 (1990).
- [90] McDermott J. B., M. T. Klein; Chemical and probabilistic modelling of complex reactions: a lignin depolymerization example; *Chem. Eng. Sci.*, **41**, 1053 (1986).
- [91] McQuarrie D. A.; Methuen's monographs on applied probability and statistic: 8. Stochastic approach to chemical kinetics, Methuen & Co., Ltd., London (1967).
- [92] Medve J., J. Karlsson, D. Lee, F. Tjerneld; Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes; *Biotechnol. Bioeng.*, **59**, 621-634 (1998).
- [93] Michaelis L., M. L. Menten, *Biochem. Z.*, **49**, 333, (1903).
- [94] Miller G. L., *Anal. Chem.*, **31**, 426-428 (1959).
- [95] Moates G. K., T. R. Noel, R. Parker, S. G. Ring; The effect of chain length and solvent interactions on the dissolution of the B-type crystalline polymorph of amylose in water; *Carbohydr. Res.*, **298**, 327-333 (1997).
- [96] Murugesan G., K. Shibamura, S. Hizukuri; Charakterisation of hot-water-soluble components of starches, *Carbohydr. Res.*, **242**, 203-215 (1993).
- [97] Nakatani H.; Monte Carlo simulation of multiple attack mechanism of α -amylase; *Biopolymers*, **39**, 665-669 (1996).
- [98] Nikolov Z. L., M. M. Meagher, P. J. Reilly; Kinetics, equilibria, and modeling of the formation of oligosaccharides from D-glucose with *Aspergillus niger* glucoamylases I and II; *Biotech. Bioeng.*, **34**, 694-704 (1989).
- [99] Noworyta A., J. Bryjak, i współ.; Bioreaktory enzymatyczne do równoległo-następczej reakcji hydrolizy skrobi; Raport z realizacji grantu KBN 3 P 405 011 07, Wrocław (1997).
- [100] Noworyta A., P. Wojciechowski, J. Bryjak; Modelowa analiza enzymatycznego procesu upłynniania skrobi; XV Ogólnopolska Konferencja Naukowa Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Materiały konferencyjne: Komitet Inżynierii Chemicznej i Procesowej PAN, tom 4, Właściwości materiałów, procesy membranowe, bioproceny i bioreaktory, zagadnienia ochrony środowiska; 160-165, Gdańsk (1995).
- [101] Oikiwa T., Y. Tsukagawa, K. Soda; Endo- β -grucanese secreted by a psychotrophic yeast: purification and characterization; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (9), 1751-1756 (1998).
- [102] Okazaki M., M. Moo-Young; Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model; *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 637-663 (1978).
- [103] Olsen K., U. Christensen, M. R. Sierks, B. Svensson; Reaction mechanisms of Trp120 $\rightarrow$ Phe and wild-type glucoamylases from *Aspergillus niger*. Interactions with maltooligodextrins and acarbose; *Biochemistry*, **32**, 9686-9693 (1993).

- [104] Oppenheim I., K. E. Shuller, G. H. Weiss; Stochastic and deterministic formulation of chemical rate equation; *J. Chem. Phys.*, **50**, 460 (1969).
- [105] Pałasiński M.; Jakość skrobi w świetle badań w 20-lecie Oddziału Technologii Żywności; *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie*, **290**, Kraków (1994).
- [106] Park J. T., J. E. Rollings; Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerization of mixed linear and branched polysaccharides: I. amylose/amylopectin α -amylolysis; *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 792-800 (1994).
- [107] Park J. T., J. E. Rollings; Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerization of mixed linear and branched polysaccharides: II. amylose/amylopectin α -amylolysis; *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 36-42 (1995).
- [108] Park J. T., L.-P. Yu, J. E. Rollings; Depolymerization of amylose, amylopectin and glukogen; *Ann. NY Acad. Sci.*, **542**, 53-60 (1988).
- [109] Parker J. W., C. S. Schwartz; Modeling the kinetics of immobilized glucose oxidase; *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 724-735 (1987).
- [110] Parzen E; Stochastic processes; Holden-Day, San Francisco (1962).
- [111] Pasari A. B., R. A. Korus, R. C. Heimsch; Kinetics of the amylase system of *Schwanniomyces castelli*; *Enzyme Microbiol. Technol.*, **10**, 156-160 (1988).
- [112] Pazur J. H.; Oligosaccharides; *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*, **II-A**. 2nd ed., W. Pigman and D. Horton, eds., Academic Press, new York (1970).
- [113] Pinto J.-H. Q., S. Kaliaguine; A Monte Carlo analysis of acid hydrolysis glycosidic bonds in polysaccharides; *AIChE J.*, **37**, 905-914 (1991).
- [114] Planchot V., P. Colonna, A. Buléon; Enzymatic hydrolysis of α -glucan crystallites; *Carbohydr. Res.*, **298**, 319-326 (1997).
- [115] Rawn J. D.; Biochemistry; Harper & Row, Publishers Inc., NY (1983)
- [116] Reinikainen P., T. Suortti, J. Olkku, Y. Malkki, P. Linko; Extrusion cooking in enzymatic liquefaction of wheat starch; *Starch*, **38**, 20-26 (1986).
- [117] Rollings J. E., R. W. Thompson; Kinetics of enzymatic starch liquefaction: simulation of the high-molecular weight product distribution; *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1475-1484 (1984).
- [118] Rollings J. E.; Enzymatic depolymerization of polysaccharides; *Carbohydr. Polymers*, **5**, 37-82 (1985).
- [119] Ross S. M.; Introduction to probability models; 2nd ed, Academic Press, NY (1980).
- [120] Russel S.; Biotechnologia; PWN, W-wa (1990).
- [121] Sanroman A., M. A. Murano, J. M. Lema; The influence of substrate structure on the kinetics of the hydrolysis of starch by glucoamylase; *Applied Biochem. Biotech.*, **59**, 329-336 (1996).

- [122] Segel I. H.; Enzyme Kinetics - Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems; John Wiley & Sons, Inc., New York-London-Sydney-Toronto (1975).
- [123] Seinfeld J. H., L. Lapidus; Mathematical methods in chemical engineering: process modeling, estimation, and identification, **3**, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ (1974).
- [124] Sendra J. M., J. V. Carbonell; A theoretical equation describing the time evolution of the concentration of a selected range of substrate molecular weights in depolymerization processes mediated by single-attack mechanism *endo*-enzymes; *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 387-393 (1998).
- [125] Sęk D., A. Włochowicz; Chemia polimerów i polimery biodegradowalne; Politechnika Łódzka - Filia w Bielsku Białej (1996).
- [126] Sharples A.; Degradation of cellulose and its derivatives: a. acid hydrolysis and alcoholysis; *Cellulose and cellulose derivatives*: N. M. Bikales and L. Segal, eds., Wiley-Interscience, New York (1968).
- [127] Shiraishi F., K. Kawakami, A. Yuasa, T. Kojima, K. Kusunoki; Kinetic expression for maltose production from soluble starch by simultaneous use of β -amylase and debranching enzymes; *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 374-380 (1987).
- [128] Snoep J., P. Mendes, H. Westerhoff; Teaching metabolic control analysis and kinetic modelling; *Biochemist*, 25-28, Feb. (1999).
- [129] Stanisław A.; Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA PL na przykładach z medycyny; StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków 1998.
- [130] Stevenson E. M., R. A. Korus, W. Admassu, R. C. Heimsch; Kinetics of the amylase system of *Saccharomycopsis fibuliger*; *Enzyme Microbiol Technol.*, **6**, 549-554 (1984).
- [131] Stryer L.; Biochemia; Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa (1986).
- [132] Suganuma T., R. Matsuno, M. Ohnishi, K. Hiromi, *J. Biochem.*, **84**, 293-316 (1978).
- [133] Szewczyk K. W.; Bilansowanie i kinetyka procesów biochemicznych; Wydawnictwo Politechniki Warszawskiej, Warszawa (1993).
- [134] Tanaka A., S. Takeda; Random attack as the hydrolytic reaction mode of oligosaccharides by *Rhizopus* glucoamylase; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1372-1373 (1995).
- [135] Terashima M., A. Kubo, M. Suzawa, Y. Itoh, S. Katoh; The role of the N-linked carbohydrate chain of rice α -amylase in thermostability and enzyme kinetics; *Eur. J. Biochem.*, **226**, 249-254 (1994).
- [136] Thoma J. A., C. Brothers, J. Spradlin, *Biochemistry*, **9**, 1768-1775 (1970).
- [137] Train P. M., Klein M. T.; Chemical modelling of lignin: a Monte Carlo simulation of its structure and catalytic liquefaction; *ACS Symp. Ser.*, **376**, 241 (1988).
- [138] Trivedi K. S.; Probability and statistics with reliability, queueing, and computer science applications; Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NY (1982).

- [139] Tse P. H. S., J. K. Leypoldt, D. A. Gough; Determination of the intrinsic kinetic constants of immobilized glucose oxidase and catalase; *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 697-704 (1987).
- [140] Turner J. S.; Discrete simulation methods for chemical kinetics; *J. Phys. Chem.*, **81**(25), 2379 (1977).
- [141] Vardar-Sukan F., S. S. Sukan, G. Önger-Baysal; Enzymatic hydrolysis of complex substrates following thermal pretreatment operations; *Biotech. L.*, **15**, 657-660 (1993).
- [142] Vihinen M., P. Mästsälä, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **47**, 329-418 (1989).
- [143] Viles F. J. Jr., L. Silverman, *Anal. Chem.*, **21**, 950-953 (1949).
- [144] Voet D., J. G. Voet; Biochemistry; John Wiley & Sons, Inc., New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore (1990).
- [145] Waliszewski K. N., M. Garcia, A. & J. De La Cruz Medina; Kinetics of enzymic hydrolysis of cassava flour starch - optymalization and modelling; *International J. of Food and Technology*, **27**, 465-472 (1992).
- [146] Wang J., T. Araki, T. Ogawa, M. Matsuoka, H. Fukuda; A method of graphically analyzing substrate-inhibition kinetics; *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 402-411 (1999).
- [147] Weintraub M. S., D. French; Acid hydrolisis of (1→4)- α -D-glucans; II. Analysis of product from radioactive oiligosaccharides, *Carbohydr. Res.*, **15**, 215 (1970).
- [148] Wheatley M., M. Moo-Young; Degradation of polysaccharode by endo- and exo-enzymes: dextran-dextranase model system; *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 219-233 (1977).
- [149] Witekowa S.; Kinytyka Chemiczna; PWN, W-wa (1962).
- [150] Wojciechowski P.; Stochastyczny zapis reakcji enzymatycznej degradacji biopolimerów na przyjadzie procesu hydrolizy skrobi; Materiały konferencyjne: X Międzynarodowa Wiosenna Szkoła Biotechnologii, Karpacz (1994).
- [151] Wojciechowski P.; Modelowanie reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi; praca magisterska (1995), Inst. Inż. Chem. PWr BI-13.
- [152] Wojciechowski P.; Symulowanie reakcji enzymatycznej hydrolizy polimerów; Materiały konferencyjne: 4th Conference Computers in Chemistry; 65, Polanica Zdrój (1996).
- [153] Wojciechowski P.; Modelowanie reakcji enzymatycznej hydrolizy biopolimerów; Materiały konferencyjne: XLI Zjazd naukowy PTCH i SITPCh, Wrocław (1998).
- [154] Wojciechowski P., I. Grad, A. Prusek, D. Dudkiewicz; Praktyczne zastosowania iteracyjnego modelu reakcji enzymatycznej degradacji skrobi; Materiały konferencyjne: X Ogólnopolska Szkoła Chemii, Karpacz (1999).
- [155] Wojciechowski P., E. Zienkiewicz, A. Koziół, A. Noworyta; Analiza modelowa kinetyki reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi przy udziale *endo*- i *egzo*-enzymów amylolitycznych; Materiały konferencyjne: VII Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Postępy Inżynierii Bioreaktorowej w ramcha I Krajowego Kongresu Biotechnologii, Wrocław (1999).

- [156] Wojciechowski P., I. Grad; A *Monte Carlo* analysis of the depolymerization of linear and branched polisaccharides by single and/or multiple attack mechanism by endo- and exo-amylases; 5th Conference Computers in Chemistry, Szklarska Poręba (1999).
- [157] Wolff R.W.; Stochastic modelling and the theory of queues; Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ (1989).
- [158] Xiao C., Z. Hui, L. Wei, S. Jiacong; Simultaneous saccharification and isomerization by immobilized glucoamylase and glucose isomerase; *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **47**, 161-169 (1990).
- [159] Yang Y., H. A. Chase; Immobilization of α -amylase on poly(vinyl alcohol)-coated perfluoropolymer supports for use in enzyme reactors; *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **28**, 145-154 (1998).
- [160] Yankov D., E. Dobрева, V. Beschkov, E. Emanuilova; Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable α -amylase; *Enzyme Microbiol. Technol.*, **8**, 665-667 (1986).
- [161] Yu L., J. Rollings; Quantitative branching of linear and branched polysaccharide mixture by size exclusion chromatography and on-line low-angle laser light scattering detection; *J. Appl. polym. Sci.*, **35**, 1085-1102 (1988).
- [162] Zanin G. M., F. F. de Moraes; Modeling cassava starch saccharification with amyloglucosidase; *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **57/58**, 617 (1996).
- [163] Zhou J.; Kinetic model for the co-action of β -amylase and debranching enzymes in the production of maltose; *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 618-622 (1999).
- [164] Zhu O.; Composition and structural analysis of alpha dextrins from potato amylopectin; *Carbohydr. Res.*, **288**, 155-174 (1996).

Źródła multimedialne:

- [165] Strona WWW Eco-Foam®; <http://www.eco-foam.com/>
- [166] Strony WWW National Starch and Chemical Company®;
<http://www.nationalstarch.com/> oraz <http://www.foodstarch.com/>
- [167] Strona WWW Novation® (grupa National Starch and Chemical Company®);
<http://www.novationstarches.com/>
- [168] CD-ROM; The Hutchinson Encyclopedia; Attica Cybernetics LTD. (1991).
- [169] Strona WWW *KyPlot* - K. Yoshioka;
http://www.qualest.co.jp/Download/KyPlot/kyplot_e.htm
- [170] Strona WWW BEAM Technologies Inc.; Accelerate Chemical kinetics a thousandfold;
<http://www.beamtech.com/products/isat-ck/>
- [171] Strona WWW "GEPASI - simulation of biochemical kinetics";
<http://gepasi.dbs.aber.ac.uk/softw/gep3ed.html>
- [172] Strona WWW "Cerestar - Company of Beridania Béghin-Say"
<http://www.cerestar.com/>
- [173] Thomson N. H., M. J. Miles, G. S. Ring, P. R. Shewry, A. S. Tatham; Atomic Force Microscopy of Starch - "Real-time imaging of enzymatic degradation of starch granules by atomic force microscopy"; *Journal of Vacuum Science and technology*, **B12** (3), 1565 (1994).
<http://polymer.physics.bristol.ac.uk/~phaab/starch.html>
- [174] Clip Video "Degradation of a starch granule by α -amylase (343 kBytes). Images by Nesi Thomson. Movie by P. Hallett."
<http://polymer.physics.bristol.ac.uk/spm/movies.html>
- [175] Strona WWW „opis struktury cząsteczek skrobi i celulozy”
<http://www.eng.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/FUNDAMNT/cellulos.htm>
- [176] Strona WWW Precision Detectors, Inc. (rozkład masy cząsteczek skrobi)
<http://www.lightscatter.com/starch.htm>
- [177] Strona WWW Dyadic International, Inc. (opis enzymów przemysłowych)
<http://www.dyadic-group.com/enzymes.htm>
- [178] Strona WWW The Plastic "Starch-based tubes" (przykład wykorzystania skrobi)
<http://www.plasticmag.com/TA000770.htm>
- [179] Strona WWW Siemens AG (schemat instalacji przemysłowej do produkcji cukrów)
<http://www.atd.siemens.de/sugar/>
- [180] Encyklopedia Internetowa: <http://www.infoplease.com/ce5/CE009070.html>
- [181] Lewandowicz G., J. Fornal, M. Soral-Śmietana, A. Walkowski; Microwave modified starch - structure, properties and resistant starch formation;
<http://www.man.poznan.pl/~lewal/wied97/index.htm>

