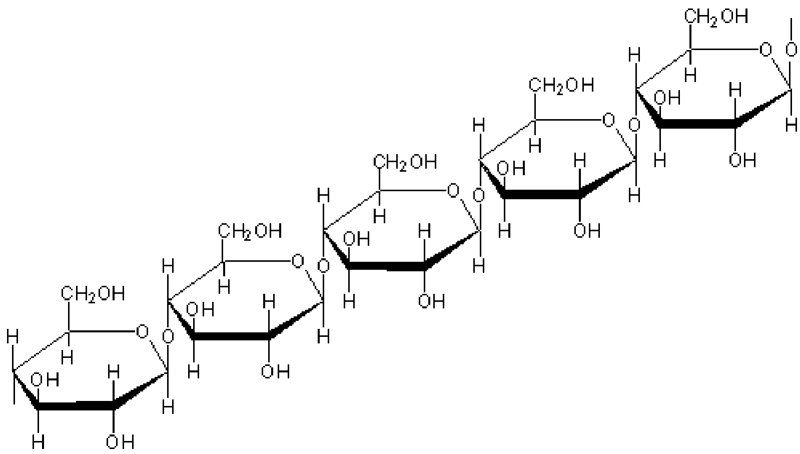
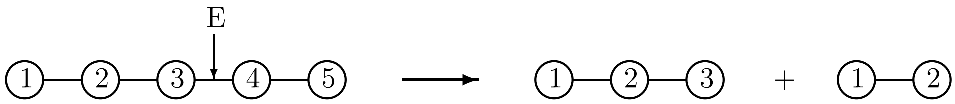
Enzymhydrolyse af cellulose

Bioethanol fremstilles ved fermentering af glucose, der igen kan produceres ved enzymatisk nedbrydning af plante- eller træaffald, f.eks. cellulose, der kan opfattes som en langkædet glukosepolymer. Den enzymatiske nedbrydning af cellulose sker ved, at det eller de aktive enzymer 'klipper' polymerkæden over, som vist på figuren nedenfor, hvor et cellulosefragment, der indeholder 5 glukoseenheder, spaltes til 2 fragmenter, der indeholder henholdsvis 3 og 2 glukoseenheder.



Figur 1: Skitse af cellulose-fragment fra: http://www.madsci.org/posts/archives/2005-06/1120022354.Ch.r.html



Figur 2: Skitse af mekanismen for enzymspaltningen af et cellulose-fragment

Vi noterer, at den oprindelige 5-mer indeholdt 4 bindinger, som vi skal nummerere således at binding 1 er mellem glukoseenhed 1 og 2 o.s.v. Produkterne i eksemplet indeholder ialt 3 bindinger, 2 i trimeren og 1 i dimeren, hvor vi har omnummereret de oprindelige glukoseenheder 4 og 5 til 1 og 2. Det skal endelig bemærkes, at kæderne ikke er symmetriske. Visse enzymer har præference for at angribe fra den ene ende, og andre fra den anden.

Nedbrydningsprodukterne hæmmer enzymaktiviteten, og i praksis er det nødvendigt at benytte en blanding af enzymer med forskellig virkemåde. Hovedingredienserne er her:

1. Endoglucanase - Et enzym, der klipper de lange kæder over et tilfældigt sted.

2. Cellobiohydrolase - Et enzym, der klipper cellobiose (dimeren indeholdende 2 glucoseenheder) fra i kædens 'venstre' ende (med de lave numre).

3. β-glucosidase - Et enzym, der spalter cellobiose til glukose.

Formålet med opgaven her er at analysere, hvordan nedbrydningsprocessen af cellulose forløber, idet vi for enkelthedens skyld kun betragter det vigtigste af de tre enzymer, endoglucanase.

Det kan yderligere bemærkes, at helt tilsvarende processer forløber, når polymerer (plastaffald) nedbrydes i naturen under påvirkning af sollys, eller gennem biologisk aktivitet.

Opgavebeskrivelse

Del 1

I første del af opgaven skal nedbrydningsprocessen analyseres under et antal simplificerende antagelser:

i Vi antager, at til starttidspunktet er al cellulose til stede som ren N-mer, $(N \geq 3)$, i koncentrationen $c_N = c_0$ (mol/L).

ii Kun et enkelt enzym, endoglucanase, medvirker til nedbrydningsprocessen. Endoglucanase klipper polymerkæden over et vilkårligt sted, og vi antager her, at enzymet ikke har nogen præference for specifikke bindinger, således at sandsynligheden for, at en binding klippes, er den samme for alle bindinger.

iii Reaktionshastigheden for den enzymatiske reaktion er givet ved

$$r_i = (i-1)k_r c_i[E_1] \tag{1}$$

hvor r_i er det antal mol af i-meren, der nedbrydes pr. tids- og volumenenhed (mol/(L s)), k_r er en hastighedskonstant (L/(mol s)), $[E_1]$ er koncentrationen (mol/L) af enzym og c_i (mol/L) er molærkoncentrationen af i-mer.

Reaktionshastighedsudtrykket kan også skrives

$$r_i = k(i-1)c_i$$

hvor $k = k_r[E_1]$.

iv Enzymkoncentrationen $[E_1]$ er konstant og hastighedskonstanten k_r ændrer sig ikke under hele reaktionsforløbet.

Vi starter med tilfældet N=5.

1. Vis, at koncentrationerne kan beskrives ved

$$\frac{d\boldsymbol{c}}{dt} = k\boldsymbol{A}_5\boldsymbol{c}, \quad \boldsymbol{c}(0) = (0,0,0,0,c_0)^T \tag{2}$$

hvor $\boldsymbol{c} = (c_1, c_2, c_3, c_4, c_5)^T$.

2. Indfør dimensionsløse koncentrationer givet ved $y_i = c_i/(Nc_0)$ og en dimensionsløs tid, $\tau = tk$, og udled at

$$\frac{d\boldsymbol{y}}{d\tau} = \boldsymbol{A}_5\boldsymbol{y}, \quad \boldsymbol{y}(0) = (0,0,0,0,1/5)^T \tag{3}$$

3. Vis, at $\boldsymbol{A}_5$ har fem egenværdier, $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 > \lambda_4 > \lambda_5$. Find tilsvarende egenvektorer og opstil en matrix $\boldsymbol{U}_5$, hvor den j-te søjle er en egenvektor for λ_j.

4. Vis, at den fuldstændige løsning til systemet i (3) kan angives på formen

$$\boldsymbol{y}(\tau) = \boldsymbol{U}_5 \begin{pmatrix} K_1 e^{\lambda_1 \tau} \\ \vdots \\ K_5 e^{\lambda_5 \tau} \end{pmatrix} \tag{4}$$

hvor $K_1, \dots, K_5$ er arbitrære konstanter.

5. Find løsningen til (3) og plot $y_i(\tau),\ i = 1, \dots, 5$.

Vi vender nu tilbage til det generelle tilfælde.

6. Indfør de samme størrelser som i spm. 2 og vis, at koncentrationerne er bestemt ved

$$\frac{dy_i}{d\tau} = \sum_{j=1}^{N} A_{ij} y_j, \quad y_i(0) = 0 \ (i < N), \quad y_N(0) = 1/N$$

hvor

$$A_{ij} = \begin{cases} 0 & : \quad j < i \\ 1 - i & : \quad j = i \\ 2 & : \quad j > i \end{cases}$$

eksempelvis for $N = 3$:

$$\boldsymbol{A}_3 = \begin{pmatrix} 0 & 2 & 2 \\ 0 & -1 & 2 \\ 0 & 0 & -2 \end{pmatrix}$$

Altså på matrixform igen:

$$\frac{d\boldsymbol{y}}{d\tau} = \boldsymbol{A}_N \boldsymbol{y}, \quad \boldsymbol{y}(0) = (0, 0, \ldots, 1/N)^T \tag{5}$$

Udregn hver af summerne $\sum_{i=1}^{N} A_{ij}$ og $\sum_{i=1}^{N} iA_{ij}$ (de finder anvendelse i spm. 10 og 11).

7. Vis, at $\boldsymbol{A}_N$ har N forskellige egenværdier $\lambda_1 > \lambda_2 > \ldots > \lambda_N$, og find de tilhørende egenvektorer.

8. Vis, at løsningen til (5) kan angives således

$$\begin{aligned} y_N(\tau) =& 1/N e^{-(N-1)\tau} \\ y_i(\tau) =& (1 - (i-1)/N) e^{-(i-1)\tau} - 2(1 - i/N) e^{-i\tau} \\ &+ (1 - (i+1)/N) e^{-(i+1)\tau}, \quad i < N \end{aligned} \tag{6}$$

Plot $y_1(\tau)$, $y_5(\tau)$ og $y_{10}(\tau)$ for N=10.

9. Giv et fysisk argument for at funktionerne $y_1(\tau)$ og $y_N(\tau)$ er monotone, og at funktionerne $y_i(\tau)$, $1 < i < N$, har en størsteværdi. Find størsteværdien for $y_{N-1}(\tau)$. Vis, at størsteværdien for $y_i(\tau)$, $1 < i < N-1$ antages i et punkt τ_i^{max}, som er en løsning til en ligning af formen

$$e^{-(i-1)\tau} p_i(e^{-\tau}) = 0, \quad \tau \in [0, +\infty[\tag{7}$$

hvor $p_i(x)$ er et andengradspolynomiun. Vis at der (for fastholdt i) gælder

$$\tau_i^{\max} = -\ln x_i \to \ln \frac{i+1}{i-1} \text{ for } N \to \infty$$

og

$$y_i^{\max} = y_i(\tau_i^{\max}) \to 4 \frac{(i-1)^{i-1}}{(i+1)^{i+1}} \text{ for } N \to \infty$$

For meget lange kæder, d.v.s. for $N >> i$, gælder der altså med tilnærmelse

$$\tau_i^{\max} = \ln \frac{i+1}{i-1}$$

$$y_i^{\max} = 4 \frac{(i-1)^{i-1}}{(i+1)^{i+1}}$$

Check hvorledes dette resultat harmonerer med forløbet for $N = 5$.

10. Giv en fysisk fortolkning af summen $\sum_{i=1}^{N} iy_i(\tau)$ og vis herved, at der gælder

$$\sum_{i=1}^{N} iy_i(\tau) = 1 \text{ for alle } \tau \in [0, +\infty[\tag{8}$$

Giv et forslag til hvorledes (8) også kan vises matematisk.

11. Giv en fysisk fortolkning af summen $z(\tau) = \sum_{i=1}^{N}(i-1)y_i(\tau)$. Udled nedenstående differentialligning for $z(\tau)$ og løs denne ved brug af en passende begyndelsesbetingelse.

$$\frac{dz}{d\tau} = -z \tag{9}$$

12. Ved en eksperimentel undersøgelse af nedbrydningsforløbet er reaktionsproduktet analyseret efter henholdsvis 2, 4 og 6 timers forløb. Resultaterne i nedenstående tabel viser, hvor stor en procentdel af reaktionsproduktet (omregnet til monomer), der findes som i-mer.

Kædelængde	2 timer	4 timer	6 timer
1	17.6	43.1	61.7
2	18.0	25.8	23.4
3	17.4	15.9	10.2
4	12.8	8.8	3.6
5	10.0	4.0	0.5
6	7.8	2.4	0.6
7	6.3	0.0	0.0
8	4.8	0.0	0.0
9	0.9	0.0	0.0
Over 9	4.4	0.0	0.0

Diskuter om modellen giver en rimelig beskrivelse af resultaterne og angiv, hvilke modelparametre (k og N) der kan uddrages fra de eksperimentelle målinger (kan løses på flere måder, udnyt f.eks. resultatet fra spm. 11).

Del 2

I praksis kan enzymkinetikken ikke beskrives ved det ovenfor anvendte simple udtryk, (1). Binding af enzymet til reaktanter og reaktionsprodukter vil nedsætte reaktionshastigheden, og et mere realistisk hastighedsudtryk er:

$$r_i = \frac{k_r(i-1)c_i[E_1]}{1 + \sum_{j=1}^{N}(j-1)c_j/\hat{k}_e}$$

hvor $\hat{k}_e$ (mol/L) er en ligevægtskonstant. Hvis denne er meget stor genfindes det simple udtryk. Vi antager i dette spørgsmål, at enzymaktiviteten ikke varierer med tiden.

1. Vis, at ligningssystemet (5) nu bliver:

$$\frac{d\boldsymbol{y}}{d\tau} = f(\boldsymbol{y})\boldsymbol{A}_N\boldsymbol{y} \tag{10}$$

hvor

$$f(\boldsymbol{y}) = \frac{1}{1 + \beta\sum_{j=1}^{N}(j-1)y_j}$$

Angiv udtrykket for β. Vis derpå, at der under disse betingelser gælder

$$\frac{dz}{d\tau} = -\frac{z}{1+\beta z}, \quad z(0) = 1 - 1/N \tag{11}$$

hvor z er givet i spm. 11 i Del 1.

2. Den fuldstændige løsning til differentialligningen i (10) kan udtrykkes ved hjælp af en ikke-elementær funktion, *Lamberts W-funktion.* Løs (10) for værdierne $N = 10$, $\beta = 20$ ved hjælp af SymPy og plot løsningen.

3. Indfør i ligningssystemet (10) variabeltransformationen $u = u(\tau)$, hvor funktionen u på dette tidspunkt er ubestemt. Vis, at ligningssystemet reducerer til

$$\frac{d\boldsymbol{y}}{du} = \boldsymbol{A}_N \boldsymbol{y} \tag{12}$$

   således at vi kan benytte den tidligere fundne løsning, såfremt $u(\tau)$ opfylder

$$\frac{du}{d\tau} = \frac{1}{1 + \beta z(\tau)} \tag{13}$$

4. Benyt (10) og (12) til at vise, at ze^u er konstant. Find herved $u(\tau)$ når $u(0) = 0$. Vis, at der for små τ med tilnærmelse gælder, at u og τ er proportionale. Plot $y_1(\tau)$, $y_5(\tau)$ og $y_{10}(\tau)$ for $N = 10$, $\beta = 20$. Sammenlign med tilfældet $N = 10$, $\beta = 0$.

LambertW-funktionen

En funktion *f* er bestemt ved $f(x) = x \cdot e^x$.

Opgave 1:

Bestem den mest omfattende mængde af reelle tal A, hvor funktion *f* er voksende.

Opgave 2:

Bestem værdimængden B for $f(x)$, når $x \in$ A.

Definition:

LambertW-funktionen er den omvendte funktion til *f,* når $x \in$ A . Dette betyder, at

$$y = x \cdot e^x \Leftrightarrow x = LambertW(y) .$$

Opgave 3:

Løs ligningerne uden brug af SymPy eller lignende programmer.

a) $5 = 3\,x\,e^{x}$.

b) $5 = 3\,x\,e^{x}+1$

c) $5 = 3\,x\,e^{2x} + 1.$

Opgave 4:

Lad *a b ,k* og *t* være reelle tal .

Løs ligningen $t = a\,x\,e^{bx} + k$.

Hvad må man kræve af konstanterne *a ,b , k* og *t ,* for at ligningen har netop en reel løsning *x*.

Opgave 5:

Løs ligningerne uden brug af SymPy eller lignende programmer.

a) $5 = x+\ln(x)$.

b) $5 = x+\ln(2x)$.

c) $5 = 3x+\ln(2x)$.

d) $5 = 3x+4 \cdot \ln(2x)$.

e) $5 = 3\,x + 4\,\ln(2x) + 1$.

Opgave 6:

Lad *a ,b ,c, k* og *t* være reelle tal .

Løs ligningen $t = a\,x + b \cdot \ln(c \cdot x) + k$.

Hvad må man kræve af konstanterne *a ,b ,c, k* og *t ,* for at ligningen har netop en reel løsning *x*.

Opgave 7:

Vis, at $\text{LambertW}(y) = y \cdot e^{-\text{LambertW}(y)}$.