

TEKST NR 178

1989

**BIOSYNTESSEN AF
PENICILLIN -
en matematisk model.**

Af Ulla Eghave Rasmussen
Hans Oxvang Mortensen
Michael Jarden

Vejleder i matematik : Jesper Larsen

biologi : Erling Lauridsen

TEKSTER fra

IMFUFA

ROSKILDE UNIVERSITETSCENTER
INSTITUT FOR STUDIET AF MATEMATIK OG FYSIK SAMT DERES
FUNKTIONER I UNDERVISNING, FORSKNING OG ANVENDELSER

IMFUFA, Roskilde Universitetscenter
Postbox 260,4000 Roskilde

H.O.Mortensen, M.Jarden, U.Rasmussen: **Biosyntesen af penicillin**
IMFUFA-tekst 178/1989 (iv + 146) sider ISSN 0106-6242

Abstract Projektet omhandler opbygningen af en matematisk/datalogisk model over penicillins biosyntese. Denne model er udviklet i samarbejde med Henrik Møllgaard fra NOVO, der i sit forskningsarbejde har en særlig interesse for netop en sådan model.

Projektet er tværfagligt mellem matematik og biologi, og der indgår elementer fra biokemi, enzymkinetik, første ordens differentialligninger, numerisk analyse, metabolsk kontrolteori samt datalogisk programudvikling.

Biosyntesen af Penicillin

Hans Oxvang Mortensen

Michael Jarden

Ulla Eghave Rasmussen

Rapport om et kombinationsprojekt
fra 3.modul i matematik.

og 2. modul molekylær biologi.

Vejleder matematik : Jesper Larsen

biologi : Erling Lauridsen

IMFUFA, Roskilde Universitetscenter

Postbox 260,4000 Roskilde

Juni 1989

Forord

Denne projektrapport er forfattet af Ulla Eghave Rasmussen, som studerer kemi og matematik, - af Michael Jarden, som studerer molekylær biologi og matematik - og af Hans Oxvang Mortensen, som studerer datalogi og matematik.

Projektet er for alle 3's vedkommende tilknyttet modul 3.b af IMFUFA's matematik-uddannelse efter den nye ordning. Den såkaldte modelbygger uddannelse.

Kravene i den nye studieordning for matematik til projekter i dette modul er

I dette modul behandles
en konkret modelbygningsopgave. Med udgangspunkt i problemstilling inden for et andet fag - eller praksisområde opstiller den/de studerende en eller flere modeller. I arbejdet indgår kommunikation med personer, for hvem den pågældende modelbygning er af interesse.

Projektet er for Michael Jarden's vedkommende også tilknyttet 2. modul af uddannelsen i molekylær biologi ved Institut 1. Kravene i studieordningen for molekylær biologi til projekter i dette modul er i uddrag

Projektarbejdet skal omfatte en fordybelse i en problemstilling inden for molekylærbiologi, biokemi, mikrobiologi, genetik, cellerbiologi eller fysiologi. Den studerende skal tilegne sig evne til kritisk at kunne vurdere: - muligheder for frugtbar

integration mellem biologi og det andet kombinationsfag..

.....

Matematisk/datalogisk modelbygning, analyse og simulering kan indgå i projektarbejdet.

Projektet omhandler opbygningen af en model over penicillins biosyntese og er udviklet i samarbejde med Henrik Mølgaard fra NOVO, der i sit forskningsarbejde har en særlig interesse for netop en sådan model. Vi takker ham herved for godt samarbejde.

Ligeledes takker vi vores vejledere, som har været Jesper Larsen i matematik og Erling Lauridsen i biologi. Vi vil samtidig takke en række personer for råd og bistand i løbet af projektet. Lektor i kemi, Søren Hvidt fra Institut 1 på Roskilde UniversitetsCenter. Professor J.Villadsen og lektor Claus Emborg fra Institut for Bioteknologi på Danmarks Tekniske Højskole og lektor Ulla Christensen fra Kemisk Laboratorium 4, HCØ, Københavns Universitet.

Opbygningen af matematiske modeller kræver en tværfaglighed som kombinationsuddannelsesstrukturen på Roskilde UniversitetsCenter rummer alle muligheder for at levere og at styrke. Vi håber, at læseren vil finde at denne rapport dokumenterer dette. Rapporten bør læses i sin helhed, men det, der af den enkelte læser måtte opfattes som tekniske detaljer, fra et andet fagområde, kan læses mere ekstensivt.

God læselyst

Ulla Eghave Rasmussen
Hans Oxvang Mortensen
Michael Jarden

Indhold

1	Indledning	3
1.1	Problemstilling	6
1.1.1	Matematiske modeller	7
1.1.2	Vores model	8
1.1.3	Formål med projektet	9
1.1.4	Modelopbygningsprocessen	9
2	Biosyntesen	13
2.1	Biosyntese af Penicillin	14
2.2	ENZYMKINETIK	18
2.2.1	Reaktionskinetik	21
2.2.2	Første ordens reaktion	21
2.2.3	Anden ordens reversibel reaktion	22
2.2.4	Enzymkatalyserede reaktioner.	23
2.2.5	Michaelis-Menten ligningen	23
2.2.6	Eksperimentel bestemmelse af K_m og V_m	27
2.2.7	Kinetiske ligninger for enzymer med mere end et substrat	27
2.2.8	Bestemmelse af kinetiske konstanter	31
2.2.9	Kinetiske ligninger for enzymkatalyserede reakti- oner med 3 substrater.	34
2.2.10	Kinetiske ligninger, hvis der er 4 substrater.	36
2.3	Biosyntesen	36
2.3.1	Aminoadipinsyre.	37

2.3.2	Cystein og Valin	39
2.3.3	ACV-syntetase.	39
2.3.4	ACV	40
2.3.5	Cyklase	41
2.3.6	Ilt	41
2.3.7	Isopenicillin N	42
2.3.8	CoA + fex + ligase	42
2.3.9	Acyltransferase	43
3	De første modeller	45
3.1	Reaktionsligninger	47
4	Opstilling af model	51
4.0.1	antagelser	51
4.1	Data til model	55
4.1.1	ATP	55
4.1.2	Aminoadipinsyre	56
4.1.3	Cystein	56
4.1.4	Valin	56
4.1.5	Acvsynthetase	56
4.1.6	Ilt.	57
4.1.7	Fex	57
4.1.8	Cyklase	57
4.1.9	Ligase	57
4.1.10	Acyltransferase.	60
4.1.11	Cellemasse.	60

5	Simulation af modellen	61
5.1	1.ordens,ikke-lineær, sædvanlig vektordifferentialligning .	61
5.2	Eksistens og eentydighed	63
5.2.1	Kontinuitet	65
5.2.2	Partielle afledede	65
5.3	Numerisk løsning	66
5.3.1	4.ordens Runge-Kutta	67
5.3.2	Fejlkilder	67
5.3.3	Konvergens	69
5.3.4	valg af skridtlængde	69
5.4	Vurdering af simuleringer fra modellen	70
6	Metabolsk kontrolteori	73
6.1	Kontrolteori	73
6.2	Generel definition af kontrolkoefficienter	74
6.3	Definition af de enkelte kontrolkoefficienter	75
6.3.1	Systemkoefficienter	75
6.3.2	Lokale koefficienter	77
6.4	Kontrolteori anvendt på penicilins biosyntese	79
6.5	Beregning af sensitivitetskoefficienter	79
6.5.1	Beregning af fluxkontrolkoefficienter	80
6.5.2	Sammenhængen mellem sensitivitets og elasticitetskoefficienter	81
6.6	Analyse	82
7	Sammenfatning	85

INDHOLD	1
A brugervejledning	87
A.1 Opstart	87
A.2 Menu	89
A.3 1. Kør modellen	90
A.3.1 Videre	93
A.4 Juster modellens parametre (j/n)?:	94
A.4.1 Justeringer	95
B Kørsler	99
C Litteraturfortegnelse	107
D Kildetekst	113

Kapitel 1

Indledning

Da vi i efteråret 1988 skulle forberede dette semesters projektarbejde, valgte vi tilskyndet af den nye studieordning på matematik, at opsøge eksterne kontakter fra andre fagområder. Vi sendte derfor nedenstående brev til blandt andre NOVO.

IMFUFA ROSKILDE UNIVERSITETSCENTER

INSTITUT FOR STUDIET AF MATEMATIK OG FYSIK SAMT DERES
FUNKTIONER I UNDERVISNING, FORSKNING OG ANVENDELSER

Att: Forskningssekretær
Jarl Andersen
NOVO INDUSTRI A/S
NOVO Alle 1,
2880 Bagsværd

POSTBOX 260
DK-4000 ROSKILDE
DANMARK

TELEFON 02-757711
LOKAL:

1.12.1988/hm/mj

DATO/REFERENCE

JOURNALNUMMER

DERES REFERENCE/JOURNALNUMMER

Vedr: Matematisk modelbygnings projekt.

Efter telefonsamtale d. 1.12.88 fremsendes hermed det brev, der forklarer vores forespørgsel. Vi er som nævnt en projektgruppe ved matematikuddannelsen på Roskilde UniversitetsCenter, som af denne vej søger en matematisk modelbygnings opgave.

Gruppen består af:

Hans Oxvang Mortensen, som studerer matematik og datalogi og
Michael Jarden, som studerer matematik og molekylar biologi.

Vi skal i foråret 1989 (fra 1.februar til medio maj) lave et 3. moduls projekt om hvilket, der i studieordningen for matematik er skrevet:

"I dette modul behandles en konkret modelopbygningsopgave, der tager sit udgangspunkt i en problemstilling inden for et andet fag - eller praksisområde. Den studerende opstiller og bearbejder en eller flere modeller af relevans for den indledende problemstilling. I arbejdet indgår kommunikation med og formidling til personer for hvem, den pågældende modelbygningsopgave er af interesse."

Vi har valgt at søge en opgave indenfor molekylarbiologi og har derfor fundet det naturligt med denne henvendelse til NOVO. Vi håber I indenfor dette område har en problemstilling, som I er interesseret i at få skabt en matematisk model for. Vi er eventuelt interesseret i at lade den matematiske model danne grundlag for en datalogisk model.

Til projektet vil der her på Roskilde UniversitetsCenter være tilknyttet en vejleder i henholdsvis matematik og molekylar biologi.

Hvis dette skulle have NOVOs interesse kan undertegnede kontaktes skriftligt på ovenstående adresse.

Med venlig hilsen

Michael Jarden

Hans Oxvang Mortensen

Det resulterede i et svar fra Henrik Møllgaard på NOVO.

8/12-88

Att: Michael Jarden og Hans Oxvang Mortensen.
IMFUFA
Roskilde Universitetscenter
Postbox 260
4000 Roskilde.

Vedr: Matematisk modelbygnings projekt.

Fra Jarl Andersen har jeg modtaget jeres henvendelse angående et modelbygningsprojekt. Jeg vil foreslå et sådant angående penicillins biosyntese i svampen *Penicillium chrysogenum*. Man er i forbindelse med kloningsteknikkernes anvendelse til udbytteforbedringer interesseret i at identificere flaskehalse i biosyntesen, og en model vil være en oplagt mulighed for dette. Området er inde i en rivende udvikling rent biokemisk/fysiologisk, og vi vil kunne give den biokemiske viden i form af litteratur og hjælp til afgrænsning af projektet.

Hvis der stadig er interesse fra jeres side, vil jeg foreslå et møde for at finde ud af om projektet er realistisk.

Med venlig hilsen



Henrik Møllgaard, Ph.D.
Project Leader
Biochemicals R&D

NOVO INDUSTRI A/S
Biochemicals Division

Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd, Denmark
Telephone 02 68 23 38 . Telex 37178

På et møde afholdt i december 1988 besluttedes det at igangsætte projektet.

1.1 Problemstilling

Penicillin dannes som et sekundært produkt i stofskiftet hos svampe af familien *Penicillium notatum*. Den industrielle produktion foregår således ved hjælp af levende organismer. Da penicillin for mere end 40 år siden blev opdaget og sat i industriel produktion var det muligt at fremstille 100 enheder pr. milliliter. Siden har der været ydet en kraftig indsats for at få syntesen af penicillin intensiveret. Særligt højtydende stammer af svampen er blevet udvalgt og klonet¹. Gæringsmediet er blevet forfinet således at de nødvendige næringsstoffer er tilstede i rigtig mængde og hæmmende affaldsstoffer begrænses mest muligt. Omrøring, temperatur, iltning, forbehandling og efterbehandling er blevet optimeret o.s.v.. Resultatet af indsatsen på alle disse fronter har lønnet sig. I dag frembringes mere end 50.000 enheder pr. milliliter og penicillin er blevet relativt meget billigere og tilgængeligt. På verdensplan forhandles for omkring 3 milliarder dollars penicillin om året².

Penicillin produktionen må således indtil nu siges at have været en udviklingsmæssig (og økonomisk) succes. Denne meget kraftige udvikling er i høj grad baseret på en prøven sig frem vejledt af empiriske resultater, mens der vides overraskende lidt om detaljerne i selve dannelsen af penicillin (syntesevejen) inde i svampen. I dag synes man imidlertid at nærme sig et loft for en udvikling af denne vej og det overvejes derfor i stedet at satse på at forbedre de producerende svampeceller ved hjælp af gensplejsning.

Gensplejsning er imidlertid en bekostelig affære med en relativ lang vej fra en bestemt satsning besluttes og til at resultatet kan ses og måles. Denne udviklingsvej kræver derfor en langt mere detaljeret viden om de egentlige processer, der foregår i svampen. En forudsætning for et fornuftigt arbejde er et indgående kendskab til syntesevejen og flaskehalsene i denne. Dette sætter spørgsmålet om en matematisk model på dagsordenen.

¹En mængde ensartede celler er blevet udviklet ved fortsatte delinger af et særligt gunstigt individ.

²De her angivne tal skal tages med et gran salt. De tjener alene til at angive størrelsesordenen (ref.5)

1.1.1 Matematiske modeller

En matematisk model er en tilnærmelse til virkeligheden, der kan være mere eller mindre god. Værdien af modellen er derfor ikke givet på forhånd, men må i hvert tilfælde vurderes ud fra sine forudsætninger og den sammenhæng, hvori den bruges. En vurdering af modellens validitet kan foretages ved at se på følgende kategorier³:

1. Forventningsvaliditet. Modellens adfærd er i overensstemmelse med, hvad der er forventet (af modellen eller af systemet).
2. Reproduktionsvaliditet. Modellen kan reproducere data, som er kendt fra systemet (data er kendt ved opstilling af modellen).
3. Forudsigelsesvaliditet. Modellen opfylder 1. og 2. og kan forudsige data, som kan findes i systemet. (Modellen er opbygget uden kendskab eller uden udnyttelse af kendskabet til disse data).
4. Strukturvaliditet. Udover at opfylde 1., 2. og 3. er modellens struktur en afspejling af systemets struktur.

Allerede flere hundrede år tilbage i tiden kan man finde anvendelse af modeller. Efter at Newton havde opstillet sine love for massetiltrækning, kunne man formulere en model af solsystemet og ved hjælp af denne forudsige planeten Neptuns eksistens. Det er klart at en sådan model tilfredsstiller alle de ovenstående kategorier. Modellerne for planeternes bevægelser henter hele deres teoretiske grundlag i den Newton'ske mekanik. Modeller af denne karakter kan derfor siges at besidde en kvalitet yderligere, idet de læner sig op ad erfaringer fra utallige gennemførte forsøg, der alle bekræfter den Newton'ske mekanik, en teori, hvis fundering beror på en verificering af en mangfoldighed af enkeltmodeller. I modsætning til sådanne teoribaserede modeller står de rent beskrivende modeller eller ad hoc modeller. Ad hoc modeller er en matematisk konstruktion, hvor man får de "rigtige" tal ud i den anden ende. Med rigtig tal menes tal der stemmer overens med eksperimentelle måleresultater. Sådanne modeller bestræber sig alene

³Hentet fra "ODIN. Undervisningsmateriale til et kursus i differentiaalligningsmodeller". (ref. 27)

på at tilfredsstille de 3 første kategorier i ovenstående klassifikation⁴. De fleste matematiske modeller befinder sig et sted midt mellem disse yderpunkter. De rummer visse islæt af etableret teori, men opererer derudover med en række ad hoc antagelser.

1.1.2 Vores model

Den model, vi i dette projekt har arbejdet med kan indlejres i 2 teori-områder. Dels en molekylarbiologisk, der beskæftiger sig med opsamling af viden om de biologiske fænomener, der forekommer på molekylært niveau og dels et enzym kinetisk, der beskæftiger sig med, hvorledes enzymatiske processer foregår.

Det er indtil nu kun lykkedes at lave modeller - som både er teoretisk funderet og giver de rigtige tal for systemer, hvor der indgår to enzymer⁵. Hertil kommer at den opsamlede viden om syntesevejen for penicillin er meget mangelfuld. Dette drejer sig både om kendskabet til de molekylære biologiske processer, der rent faktisk foregår og til talværdierne for enzymprocesserne. Det er således klart, at man ikke på dette område skal forvente det muligt at opstille en rent teoribaseret model. Dette forhold er ingenlunde specielt for netop biosyntesen af penicillin, men præger generelt modelarbejdet med biologiske systemer. Komplexiteten på disse områder gør det nødvendigt at bygge på antagelser, der blandt andet må begrundes i utilstrækkelig viden. Ved teoribaserede modeller kan antagelserne begrundes i en viden om at denne eller hin faktor er uden væsentlig betydning for det modellerede problem.

Vi har i arbejdet bestræbt os for så langt som muligt at begrænse ad hoc antagelserne og basere så meget af modellen som muligt på overvejelser med belæg i den eksisterende viden på områderne. Imidlertid har vi som modelbyggere også måttet se et andet problem i øjnene. Vi er ikke i stand til selv at godtgøre modellens forudsigelsesvaliditet. Dels ligger en sådan praktisk afprøvning uden for vores hænder og dels vil det tage

⁴I den politiske debat ses ofte eksempler på sådanne modeller, der alene tilfredsstiller kategori 1, men hævder at tilfredsstille kategori 3. Rasmussen rapporten, der opstiller en sandsynlighedsmodel for uheld på A-kraftværker er et eksempel herpå. Se IMFUFA tekst nr. 26 "Om matematiske modeller" (ref. 28).

⁵Samtale med professor Villadsen, DTH

lang tid at gennemføre et forsøg, der kan godtgøre at modellen faktisk udpeger flaskehalse i syntesevejen.

Man kunne således mene, at der er al mulig grund til at stille sig skeptisk over for resultaterne at et sådant modelbygningsprojekt. Der mangler viden om kvalitative forhold og om kvantitative størrelser og modellen kan ikke verificeres. Dette betyder imidlertid ikke at modelarbejdet er spildt på forhånd, for det er en alt for snæver betragtning blot at måle en model ud fra dens kvantitative forudsigelser. Følgende formulering af den polsk-amerikanske matematiker Mark Kac kan belyse dette punkt:

Models are for the most parts caricatures of reality, but if they are good, then like good caricatures, they portray, though perhaps in distorted manner, some of the features of the real world. The main role of models is not so much to explain and to predict - though ultimately these are the main functions of science - as to polarize thinking and to pose sharp questions"⁶.

1.1.3 Formål med projektet

Dette projekt er et led i et uddannelsesforløb og det er væsentligt for os at stifte bekendtskab med de overvejelser og problemer, man møder i modelbygningsprocessen og se på de metoder, man kan anvende i givne situationer. For at opnå dette har vi målrettet vores arbejde efter at opstille en model, der kan sige noget om flaskehalse i penicillin fremstillingen. I projektarbejdet har opstillingen af den 'rigtige' model således været det primære, mens indlæringen har været den medfølgende sidegevinst.

1.1.4 Modelopbygningsprocessen

Projektet er tværfagligt og hvert fag har sit eget sprog, hvilket rejser en første barriere, der må overvindes. Dette er dels et spørgsmål om at tilegne sig et specielt fagligt ordforråd, men nok så nødvendigt er det,

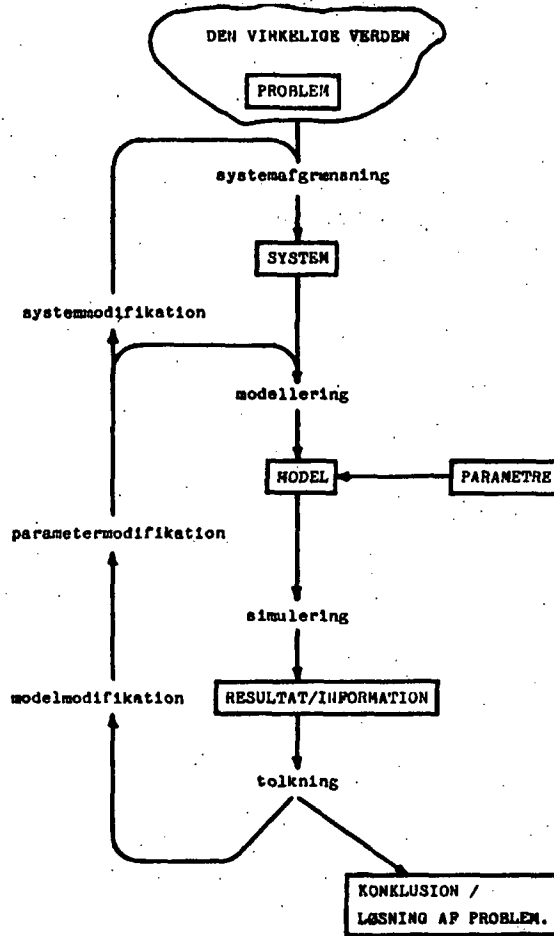
⁶Fra "Some mathematical models in science", *Science*, 166 (1969), 695-699. Her hentet fra "Rapport fra Landsmødet om Matematikken i Danmark" 1981 side 366 (ref. 36)

at tilegne sig et fagligt indblik i modellens genstandsområde. Den første periode har været domineret af at opnå et sådan indblik. Vi har dels måttet tilegne os et billede af virkeligheden (hvad er det, der foregår ved dannelsen af penicillin) og dels tilegne os tilstrækkelig faglig viden til at kunne kommunikere rimeligt med de faglige eksperter. Foruden Henrik Møllgaard har vi i forløbet måttet opsøge en række eksperter på forskellige delområder. Lektor Søren Hvidt har vi konsulteret angående almen biologisk kemi. Professor J. Villadsen angående opstilling af den senere omtalte 24 ligningers model. Lektor Claus Emborg angående almindelig biologisk forståelse og lektor Ulla Christensen, der særligt har hjulpet os angående flersubstrat kinetikken.

At opbygge en model er sammensat af flere komponenter. På baggrund af en opfattelse af den virkelige verden og et problem, som denne stiller, skal der foretages en afgrænsning af systemet. Denne systemafgrænsning definerer de elementer, som anses for betydende for modellens validitet. Denne afgrænsning er ikke enkel, men består af en lang række afvejninger, der inddrager skøn over elementernes kvantitative og kvalitative betydning og skøn over begrænsningerne i egen viden om sammenhængende i den virkelige verden.

Det afgrænsede system gøres herefter til genstand for en omformning til matematiske objekter, hvor sammenhænge og begrænsninger beskrives, således at den resulterende model afspejler systemet. Denne omformning stiller krav om en eksakthed i den foretagne systemafgrænsning, der kan føre til ændringer i de beslutninger, der er foretaget. Ligeledes kan, der stilles krav om kvantitative oplysninger, der kan medføre at man må ændre det modellerede system.

Modellen udsættes for en analyse, hvis formål det er at finde de informationer frem, der ligger gemt i modellen. Ved at sammenholde disse informationer med eksperimentelle data eller anden viden om sammenhængen i den virkelige verden kan man enten nå frem til en løsning af det oprindelige problem eller til en erkendelse af fejl i modelopbygningen. Dette kan igen føre til formuleringen af en bedre model på et mere afklaret grundlag. Modellerings processen er således en iterativ proces, der enten umiddelbart kan producere konkrete resultater eller som kan bruges som en motor i erhvervelsen af ny viden om modellens genstandsområde. Processen kan samlet skildres ved figur 1.1 (der er



Figur 1.1: Modelopbygningsprocessen

hentet fra ref. 36).

Kapitel 2

Biosyntesen

Penicillin fremstilles i store tanke (fermenteringstanke). I disse tanke befinder sig et medie bestående af vand opblandet med diverse næringsstoffer. Temperaturen er kritisk for enzymatiske processer, hvorfor denne nøje kontrolleres. Desuden er det vigtigt for processens forløb at der foregår en stadig tilførsel af ilt og en omrøring, der sikrer homogen fordeling af næringsstofferne.

Til dette medie tilsættes en mængde celler fra svampen, *Penicillium crysogenum*. Cellemassen vil vokse i dette medie og samlet kaldes denne proces i et væskemedie for en fermentering.

Syntesen af penicillin finder under normale omstændigheder ikke sted i disse celler. Men produktionen igangsættes ved tilsætning af et eddikesyre derivat, fenyleddikesyre (fex). Fex indgår som et led i det dannede penicillin molekyle og penicillinen bliver udskilt fra cellerne til mediet. Det menes derfor at selve penicillin syntesen er en afgiftningsreaktion for cellen, hvor den skiller sig af med giftstoffet ved at binde det til et for den uskadeligt molekyle.

I takt med cellemassens vækst ændres faktorerne i mediet. Dels ophobes en række affaldsstoffer i mediet, som er en følge af det almindelige stofskifte. Mediet bliver mere tyktflydende som følge af den stigende mængde celler, hvilket besværliggør opretholdelsen af en tilstrækkelig mængde ilt i de enkelte cellers umiddelbare nærhed. Bl.a. disse faktorer betyder at cellemassevæksten og penicillin produktionen aftager. Processen stoppes derfor.

Det samlede forløb af penicillin produktionen består således af en for-

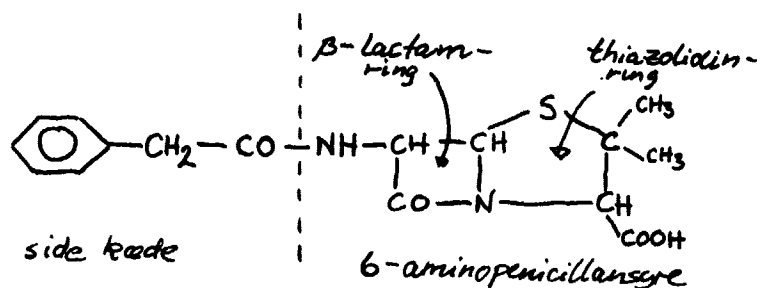
behandling af medie og cellekultur, selve fermenteringsprocessen, som typisk strækker sig over 5 døgn (120 timer) og en efterbehandling, hvor den producerede penicillin opsamles fra mediet. Produktet fra denne proces er Penicillin V eller Penicillin G. Dette produkt danner basis for en videreforarbejdning til de slutprodukter, der anvendes medicinsk.

2.1 Biosyntese af Penicillin

I dette afsnit gives en oversigt over de biokemiske reaktioner, der fører til dannelsen af penicillin i svampen *Penicillium chrysogenum*.

En samling af kemiske reaktioner, der fører til et bestemt slutprodukt med bestemte udgangsstoffer kaldes en syntesevej (syntese = fremstilling). En syntesevej i den biologiske celle kaldes en biosyntese.

Men før syntesevejen gennemgås beskrives her slutproduktet penicillin G- eller benzylpenicillin som det også kaldes.



Figur 2.1: Et penicillin molekyle.(ref.13)

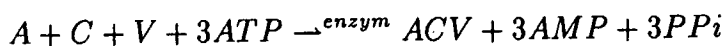
Industrielt tilsættes en syre til mediet, hvor svampen vokser, enten fenyl- eller fenoxylacetat.

På figur 2.1 ses den såkaldte β -lactamring, som er grundstammen i alle β -lactam antibiotika. Denne og den afbildede thiazolidinring danner tilsammen 6-aminopenicillansyre (6-APA), der med den tilsatte syre udgør penicillin.

I det følgende beskrives syntesevejen til penicillin samt de stoffer, der indgår og reagerer i denne.

Den organisme, der industrielt benyttes til produktion af penicillin er, svampen *Penicillium chrysogenum*. Udgangspunktet for denne svamps biosyntese af penicillin er tre aminosyrer; α aminoacidpansyre (A), cystein (C) og valin (V) (Se figur 2.2 og 2.3). C og V er kendt som værende blandt de 20 livsvigtige aminosyrer og de er begge slutprodukt i hver deres biosyntese. A er derimod et mellemprodukt i svampens syntese af lysin, dvs. at A deltager i to biosynteser samtidig. De tre nævnte aminosyrer kondenseres, som første trin i biosyntesen, til et tripeptid; $\delta(\alpha$ aminoacidpansyrcysteinylvalin) (ACV). Mekanismen for denne kondensering er ikke kendt i detaljer, men man mener at reaktionen er katalyseret af et enkelt enzym, ACV-syntetase og forløber på følgende måde: Under forbrug af ATP kobles først A til enzymet, dernæst C og til slut V. På figur 2.2 er de kemiske formler indtegnet - forbogstavet L angiver, at det pågældende molekyle har en bestemt rumlig struktur. Hvis to stoffer er isomere, dvs. at de har de samme kemiske byggesten, mens de rumlige former er spejlbilleder af hinanden, kaldes de for hhv. en L form og en D form. α og δ benyttes til nummerering af atomerne i molekylet, og de er her medtaget for fuldstændighedens skyld.

Ved at benytte ovenstående forkortelser kan den støkiometriske ligning for første trin skrives



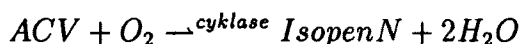
Aktiveringsenergien fra ATP-molekylerne skyldes brydningen af to energirige fosfatbindinger, således at ATP (adeonosintrifosfat) omdannes til AMP (adeonosinmonofosfat) og to PP_i (pyrofosfat):



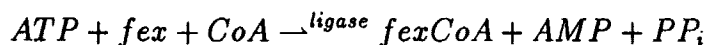
med ligevægten stærkt forskudt mod højre. Derfor angives kun den ene pil.

For at få overblik over reaktionerne er der i figur 2.3 indtegnet de samme reaktioner som i figur 2.2, men hvor der kun benyttes forkortelser.

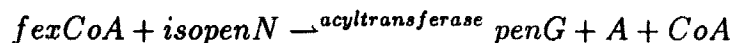
Det næste syntesetrin er omdannelsen af det ovenfor omtalte tripeptid ACV til isopenicillin N (isopen N). På figur 2.2 er den kemiske formel for isopen N indtegnet og det ses, at der dannes en β -lactam ring og en thiazolidin ring. Reaktionen kræver ilt og der spaltes vand fra. Enzymet, der katalyserer denne reaktion kaldes for cyklase og enzymet er undersøgt ganske nøje. Reaktionsligningen for dette trin bliver da



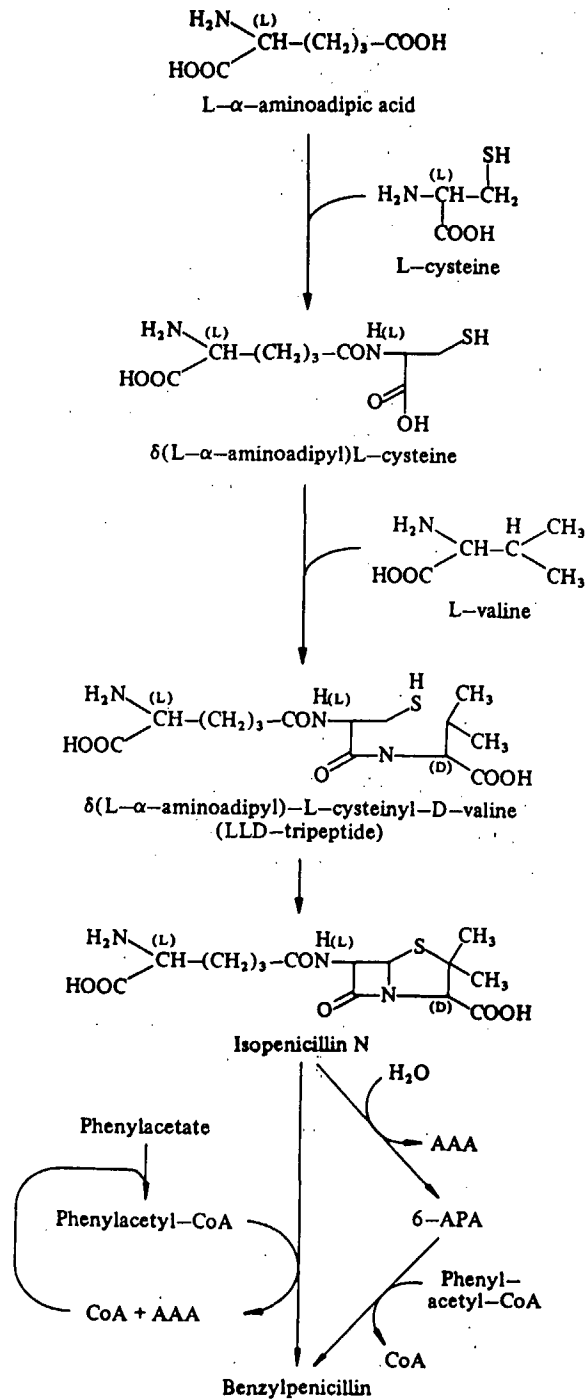
Dannelsen af penicillin fra isopen N kræver nu at A spaltes fra og erstattes af en fenylacetyl- eller fenoxycetylgruppe, der tilsættes vækstmediet som fenyl- eller fenoxycetat afhængig af hvilket produkt, der ønskes (henholdsvis penicillium G eller V). For at kunne binde fenyl- eller fenoxycetylgruppen må fenyl- eller fenoxycetaten aktiveres, når den er vandret igennem cellemembranen, med Coenzym-A (CoA), der findes i cellen. Det vil sige der skal dannes en energirig binding fra syren til CoA, som der spaltes under forbrug af energi når syren bindes istedet for A. Binding af syre og CoA er ATP-forbrugende for at få dannet den energirige binding og forløber således, hvor "fex" står for fenylacetat:



og



Der er nu dannet fenylacetyl- eller fenoxycetyl-CoA, der kan bindes til kvælstofatomet (hvor A er spaltet fra) under fraspaltning af CoA og dermed er penicillin G eller V dannet.



Figur 2.2: Syntesevejen til penicillin. Efter Demain (1984)

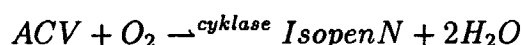
Ligasen katalyserer sammensætningen af de to molekyler, mens acyltransferasen overfører acylgrupper fra et molekyle til et andet.

Processen kan forløbe på to måder (se figur 2.2):

1) A hydrolyseres (det vil sige A spaltes fra under forbrug af vand) og mellemproduktet 6-APA dannes, hvorpå en fenylacetyl- eller fenoxycetylgruppe bindes under fraspaltning af CoA.

2) A erstattes direkte af en fenylacetyl- eller fenoxycetylgruppe uden mellemproduktet 6-APA. - Denne er ifølge (ref.1) den mest sandsynlige. Det dannede penicillin G efterbehandles så på forskellig vis inden det kan anvendes til medicinsk brug.

Det samlede sæt af støkiometriske ligninger kan da opstilles

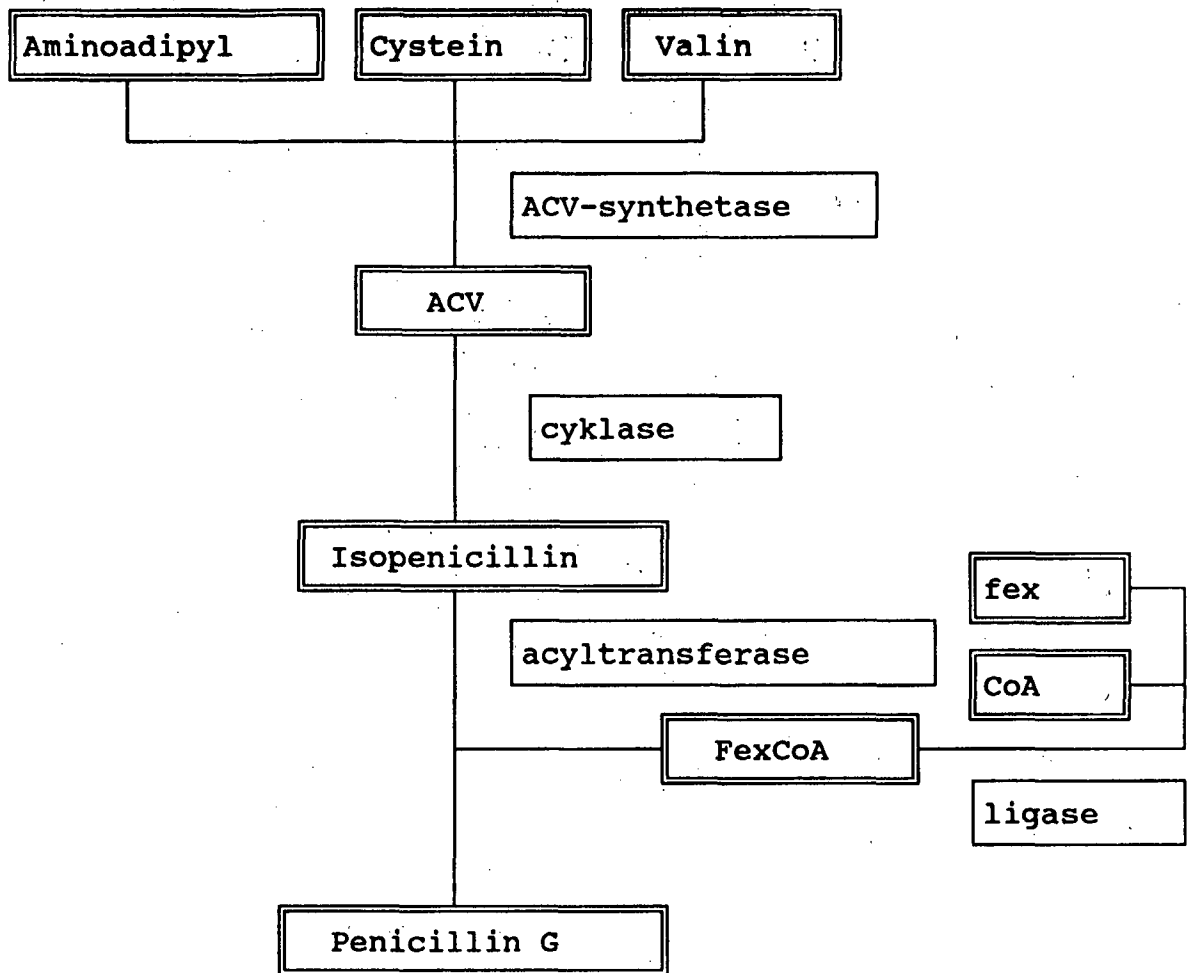


og

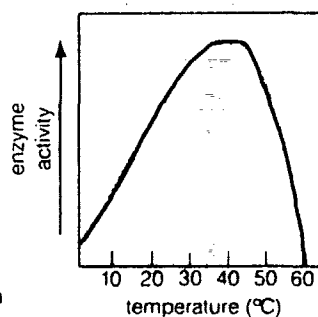


2.2 ENZYMKINETIK

I alle levende celler foregår til stadighed en lang række forskellige omdannelser. Det kan være dannelse af diverse molekyler, det kan være nedbrydning af affaldsstoffer. Fælles for alle disse reaktioner i den biologiske celle er at de forløber langsomt eller går helt istå, hvis der ikke er en katalysator til stede til at forøge reaktionshastigheden. Tilstedeværelsen og reguleringen af disse katalysatore er derfor af stor betydning for biologisk liv. En biologisk katalysator kaldes et enzym.



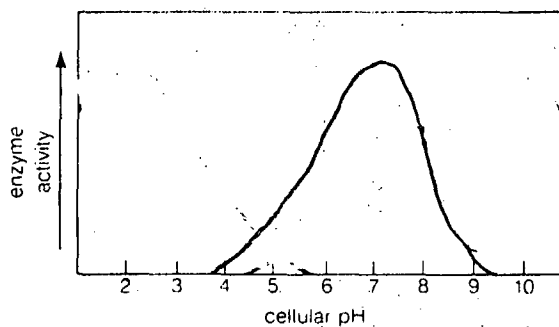
Figur 2.3: Oversigt over biosyntesen af penicillin



Figur 2.4: Enzymaktivitet som funktion af temperatur. (ref.30)

Indenfor den kemiske reaktionskinetik arbejder man med begreber som hastighedskonstanter, reaktionshastighed, ligevægt etc. og når man overfører disse resultater til biologiske systemer, der i reglen er overordentlig komplekse, kan anvendelsen af de kinetiske ligninger fra den fysiske kemi kun ske under en række antagelser og simplificeringer. En af grundene hertil er at biokemiske reaktioner, især i levende celler, er mere følsomme overfor ændringer i temperatur, pH etc., end de fleste ikke-biologiske kemiske reaktioner. (se figur 2.4 og 2.5). (Dette skyldes egenskaberne ved de pågældende enzymer, idet deres aktivitet bl.a. afhænger af temperatur og pH.) Når man undersøger og arbejder med enzymer og deres kinetik er det væsentligt at være klar over at mange faktorer kan have indflydelse og det er derfor vigtigt kun at variere en faktor og holde de andre konstante. De mest betydende faktorer, der indgår når hastigheden af en biokemisk reaktion skal bestemmes er enzymkoncentration (enzymmængde per. volumen), substratkoncentration (mængde af reaktanter per. volumen), pH, temperatur og tilstedeværelse af aktivatorer eller inhibitorer (hæmmere).

De reaktanter, et enzym katalyserer reaktionen mellem, kaldes substrater og et enzym er i reglen selektivt overfor hvilken reaktion det kan katalysere, det vil sige hvilke substrater det kan reagere overfor. De fleste enzymer er store kugleformede molekyler med nogle områder



Figur 2.5: Enzymaktivitet som funktion af pH. (ref.30)

på overfladen, hvortil substrater kan bindes. Et sådant område kaldes et "aktivt site", og er det sted hvor omdannelsen finder sted. Når et substrat er bundet til et site er der dannet et såkaldt enzym-substrat-kompleks.

Et enzyms evne til at omsætte et givet substrat til produkt angives ved dets aktivitet. Aktivitet måles oftest i enheden mol/sek¹ eller i mol/sek · g. protein, hvis der er tale om den specifikke aktivitet. Den specifikke aktivitet er et mål for aktiviteten i forhold til den samlede mængde protein.

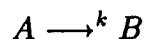
2.2.1 Reaktionskinetik

Formålet med reaktionskinetikken er at udsige noget om hastigheden af en given kemisk reaktion. Med hastigheden af en reaktion forstås den hastighed hvormed udgangsstoffet forsvinder, hvilket stort set svarer til den hastighed hvormed produktet dannes. I reglen afhænger hastigheden af substratkoncentrationen som vist i følgende afsnit.

2.2.2 Første ordens reaktion

Givet reaktionen

¹1 katal = 1 mol/sek



hastigheden afhænger af koncentrationen af A betegnet a og bliver da

$$V = -\frac{da}{dt} = \frac{db}{dt} = ka$$

hvor k er hastighedskonstanten. Denne hastighedskonstant forstås som

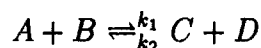
$$k = \alpha e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

hvor E_a er reaktionens aktiveringsenergi², R gaskonstanten, T den absolute temperatur og α er den såkaldte Arrhenius faktor (ref.37).

Hvis den givne reaktion er af anden orden, dvs. at der indgår to reaktanter kan reaktionshastigheden afhænge af produktet af de to reaktants koncentrationer som vist i følgende afsnit.

2.2.3 Anden ordens reversibel reaktion

Givet



hvor A og B er reaktanter og k_1 hastighedskonstant for den fremadrettede reaktion og k_2 for den bagudrettede reaktion. Reaktionshastigheden er da

$$V = V_{frem} - V_{tilbage} = k_1 ab - k_2 cd$$

og hvis der er ligevægt, dvs $V = 0$ er

$$k_1 ab = k_2 cd$$

og

$$\frac{cd}{ab} = \frac{k_1}{k_2} = K_{eq}$$

hvor K_{eq} er ligevægtskonstanten eller den reciprokke dissociationskonstant (K_S). ($\frac{1}{K_{eq}} = K_S$)

²Nødvendig energi for at reaktionen kan forløbe

2.2.4 Enzymkatalyserede reaktioner.

Hvordan ændres reaktionskinetikken hvis der er enzymer tilstede i reaktionsblandingen? Enzymer formindsker aktiveringsenergien således at hastigheden hvormed en given ligevægt indstiller sig forøges, men selve ligevægten ændres ikke.

Det er naturligtvis nødvendigt for cellen at kunne regulere enzymaktiviteten, for eksempel hvis der er mangel på eller produktionen er ved at blive for stor af et bestemt produkt. Det sidste kan forhindres ved en simpel feed-back mekanisme, idet det givne slutprodukt i en vis mængde virker hæmmende på enzymet, der katalyserer den første reaktion.

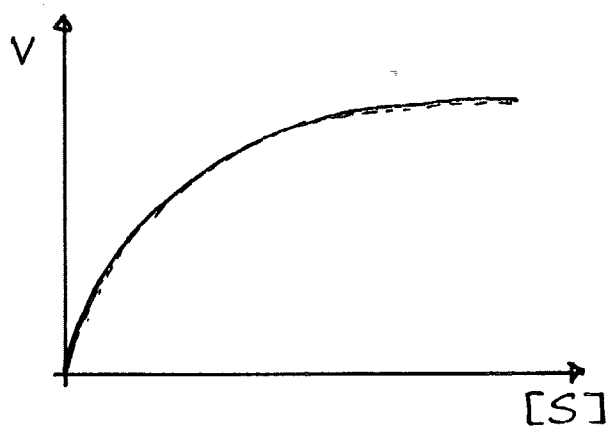
Et allosterisk enzym er et enzym, der kan reguleres af andre stoffer, idet det har ekstra sites til regulatorer. En regulator kan for eksempel være det sidste produkt i en lang række af reaktioner, hvor det pågældende enzym måske katalyserer den første reaktion. Ved at slutproduktet bindes til disse ekstra sites hæmmes enzymet - det vil sige dets aktivitet falder - og hele kæden af reaktioner kommer til at mangle substrat. Dermed falder hastigheden hvormed reaktionerne forløber og resultatet bliver at der dannes mindre af slutproduktet. Dette medfører så at enzymet fra den første reaktion ikke længere hæmmes af slutproduktet, således at reaktionerne igen kan forløbe med "normal" hastighed³ - og der dannes atter en større mængde af slutproduktet, der kan bindes til det allosteriske enzym - og så fremdeles.

Det gælder for mange enzymer at reaktionshastigheden afhænger af substratkoncentrationen, som vist i figur 2.6. Det antages at der kun er et substrat ligesom der ses bort fra forskellige former for hæmning. Af grafen ses at hastigheden nærmer sig en maksimal værdi (V_m) for stigende substratkoncentration.

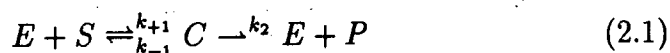
2.2.5 Michaelis-Menten ligningen

Formålet er at beskrive reaktionen mellem et enzym og et enkelt substrat. Michaelis og Menten (ref.40) antager at enzymet og substratet reagerer reversibelt og danner et kompleks. Dette kompleks omdannes dernæst irreversibelt til frit enzym samt produkt:

³dette forudsætter, at slutproduktet forsvinder, f.eks. ved at diffundere gennem cellevæggen



Figur 2.6: Reaktionshastighed som fkt. af substratkoncentration.



hvor E er enzym, S substrat, C kompleks og P produkt. De tilsvarende små bogstaver angiver koncentration. Man kan da opstille følgende hastighedsligninger (jvnf. afsnittet om reaktionskinetik):

$$\frac{ds}{dt} = -k_{+1}es + k_{-1}c \quad (2.2)$$

$$\frac{de}{dt} = -k_{+1}es + (k_{-1} + k_2)c \quad (2.3)$$

$$\frac{dc}{dt} = k_{+1}es - (k_{-1} + k_2)c \quad (2.4)$$

$$\frac{dp}{dt} = k_2c \quad (2.5)$$

hvor k er hastighedskonstanter og positive led angiver tilgang og negative fragang til den pågældende koncentration.

For at løse dette system af ikke-lineære differentilligninger benyttede Michaelis og Menten en række antagelser om den enzymkatalyserede reaktion.

MichaelisMenten forudsætter at dannelseshastigheden af komplekset (C) til ethvert tidspunkt er ligeså stor som nedbrydningshastigheden, således at koncentrationen kan antages konstant i små tidsrum. Over større tidsrum vil c selvfølgelig ændres, når substratkoncentrationen falder, men ændringshastigheden af c antages meget mindre end hastigheden af enzymreaktionen. Alt i alt sætter de $\frac{dc}{dt} = 0$. Iøvrigt gøres den antagelse at koncentrationen af frit substrat kan anses at være invariant; dvs. at koncentrationen af frit substrat stort set er uændret i den initiale periode. Det antages således at koncentrationen af frit substrat er lig den totale substrat koncentration. Disse antagelser er især gangbare, hvis den totale substratkoncentration er meget større end enzymkoncentrationen, hvilket normalt er tilfældet. En anden situation som kan føre til en konstant koncentration af frit substrat, men hvor substratkoncentrationen ikke behøver at være meget større, er når

substratet tilføres enzymet ligeså hurtigt som det omdannes. Denne antagelse kan være gyldig i metaboliske synteseveje i cellen.

Ved at addere ligning (2.3) og (2.4) ses $\frac{d(e+c)}{dt} = 0$, hvilket medfører at $e + c = \text{konstant}$ og ved at sætte begyndelsesbetingelserne til $(s, e, c, p) = (s_0, e_0, 0, 0)$ til tiden $t = 0$ fås at $e + c = e_0$. Dette sidste udtryk kan benyttes til at eliminere e fra ligningerne (2.2) og (2.4) og så fås

$$\frac{ds}{dt} = -k_{+1}e_0s + (k_{+1}s + k_{-1})c \quad (2.6)$$

$$\frac{dc}{dt} = k_{+1}e_0s - (k_{+1}s + k_{-1} + k_2)c \quad (2.7)$$

det vil sige 2 ikke-lineære differentiaalligninger.

MichaelisMenten antagelse om en steady-state $\frac{dc}{dt} = 0$ betyder at ligning 2.7 bliver til en ren algebraisk ligning med løsning

$$c(t) = \frac{k_{+1}e_0s(t)}{k_{+1}s(t) + k_{-1} + k_2} \quad (2.8)$$

Ved at indsætte dette udtryk i 2.6 fås

$$\frac{ds}{dt} = -k_2c(t) = -\frac{k_2k_{+1}e_0s(t)}{k_{+1}s(t) + k_{-1} + k_2} \quad (2.9)$$

Da man er interesseret i at bestemme hastigheden af reaktionen, det vil sige finde V ses

$$V = \frac{dp}{dt} \approx \left| \frac{ds}{dt} \right| \quad (2.10)$$

Ialt fås da

$$V = \frac{V_m s}{s + K_m} \quad (2.11)$$

hvor indeks m angiver MichaelisMenten konstanter, der er givet ved

$$V_m = k_2e_0 \quad (2.12)$$

og

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}} = K_S + \frac{k_2}{k_{+1}} \quad (2.13)$$

hvoraf det ses at hvis $k_2 \ll k_{-1}$ er $K_m \approx K_S$. Det erindres at K_S gælder for ligevægt og der gør K_m ikke nødvendigvis.

Dette udtryk kan især bruges til at bestemme den initiale hastighed for reaktionen. Det bemærkes, at da k_2 er den eneste hastighedskonstant, der indgår vil dette trin blive det hastighedsbegrænsende trin.

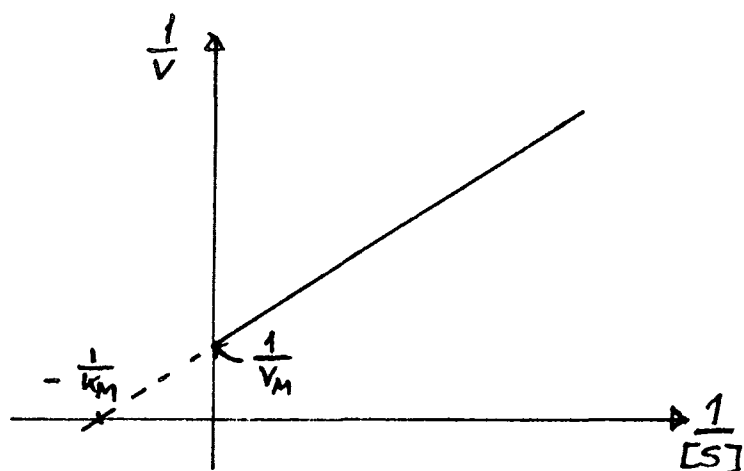
2.2.6 Eksperimentel bestemmelse af K_m og V_m

For at bestemme K_m og V_m ud fra MichaelisMenten ligningen kræver det naturligtvis, at man forudsætter at de betingelser, der indgik i udledningen er opfyldt. Men samtidig må man forudsætte, at alle andre faktorer ikke ændres under forsøget, dvs at pH og temperatur samt evt. metalioner holdes på et konstant niveau. Hvis disse betingelser er opfyldt kan man eksperimentelt bestemme K_m og V_m ved at variere substratkoncentrationen og måle reaktionshastigheden. En afbildning af $\frac{1}{V}$ mod $\frac{1}{S}$ vil så, hvis der er tale om MichaelisMenten kinetik, se ud som figur 2.7. Dette kaldes et Lineweaver-Burke plot og af skæringerne med de to akser kan henholdsvis $\frac{1}{V_m}$ og $\frac{1}{K_m}$ bestemmes.

K_m er en egenskab ved det pågældende enzym og er den koncentration, der giver $V = \frac{1}{2}V_m$. Dens størrelse siger noget om hvor effektivt enzymet omsætter det pågældende substrat. En høj K_m betyder at der skal meget substrat til at opnå den halve hastighed af den maksimale - en lav K_m betyder omvendt at lav substratkoncentration er nødvendig. V_m - maksimalhastigheden - er den maksimale hastighed, der kan opnås for det pågældende enzym ved en bestemt enzymkoncentration. V_m afhænger altså af enzymmængden, men er uafhængig af substratkoncentrationen.

2.2.7 Kinetiske ligninger for enzymer med mere end et substrat

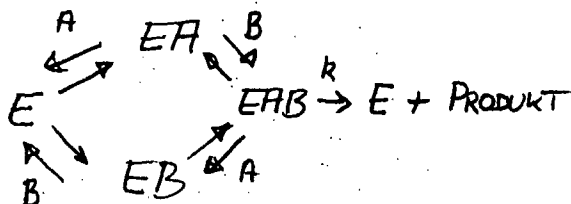
I praksis er det sjældent, at et givet enzym kun har et substrat, idet det i reglen har to eller flere. De kinetiske ligninger bliver da mere omfattende og man må sædvanligvis forudsætte at der opstår en række



Figur 2.7: *Lineweaver-Burke plot*

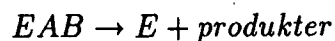
kemiske ligevægte for at udlede et håndterbart (i eksperimentel forstand) hastighedsudtryk.

I det følgende beskrives en reaktion (ref.4) med 2 substrater og et enzym. Det antages at de 2 substrater kan reagere med enzymet i tilfældig orden. Idet A og B er substrater kan reaktionerne skematisk beskrives

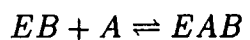
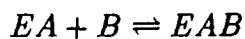
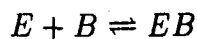
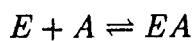


Figur 2.8: Reaktion i tilfældig orden

Det hastighedsbestemmende trin bliver da reaktionen



Der antages at følgende ligevægte indstiller sig;



Dette giver 4 tilsvarende ligevægtsligninger:

$$(e_0 - ea - eb - eab) \cdot a = K_S^A \cdot ea$$

$$(e_0 - ea - eb - eab) \cdot b = K_S^B \cdot eb$$

$$ea \cdot b = K_m^B eab$$

$$eb \cdot a = K_m^A eab$$

her angiver de små bogstaver koncentrationer. K 'erne er dissociationskonstanter for de 4 ligevægte⁴. Hastigheden for dannelse af produktet afhænger af koncentrationen af EAB samt hastighedskonstanterne, det vil sige

$$V = keab$$

Ved at eliminere eab fås

$$V = \frac{ke_0}{1 + \frac{K_m^A}{a} + \frac{K_m^B}{b} + \frac{K_S^A K_m^B}{a \cdot b}} \quad (2.14)$$

hvor $K_S^A K_m^B = K_m^A K_S^B$

Ledet i tælleren, ke_0 , kan vises at være den maksimale hastighed ved følgende overvejelser. Når a og b er store i forhold til K_m^A og K_m^B , vil V nærme sig ke_0 , der så bliver den maksimale hastighed V_m .

Hvis reaktionen med A indeholder et irreversibelt trin før B bindes til enzymet vil den tilsyneladende⁵ dissociationskonstant være nul og produktledet i hastighedsudtrykket forsvinder og reduceres til

$$V = \frac{ke_0}{1 + \frac{K_m^A}{a} + \frac{K_m^B}{b}}$$

idet $K_S^A = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \approx 0$ hvis k_{-1} er lille eller nul.

⁴ K_m^A er koncentrationen af A, når $V = \frac{1}{2}V_m$ og B har en høj koncentration. K_m^B defineres tilsvarende. K_S^A er den tilsyneladende dissociationskonstant af komplekset med enzymet med A

⁵strækker sig over to reaktioner

2.2.8 Bestemmelse af kinetiske konstanter

Her gælder som tidligere en række forudsætninger bestemt af ovenstående udledning. Hvis disse er opfyldt for det pågældende enzym kan de kinetiske konstanter bestemmes som følger, idet man som hovedregel varierer koncentrationen af det ene substrat og holder det andet konstant.

Først bemærkes at hastighedsudtrykket 2.14 kan omskrives til følgende form;

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m^A + \frac{K_S^A K_m^B}{b}}{V_m} \cdot \frac{1}{a} + \frac{1 + \frac{K_m^B}{b}}{V_m} \quad (2.15)$$

hvilket er ligningen for en ret linie, hvis b holdes konstant og $\frac{1}{V}$ afbildes mod $\frac{1}{a}$.

Først måles samhørende værdier af $\frac{1}{V}$ og $\frac{1}{a}$ ved forskellige fastholdte koncentrationer af B. Dette vil give en serie rette linier (se figur 2.10). Hvis kinetikken kan beskrives med denne hastighedsligning vil alle linier skærer hinanden i netop et punkt, som svarer til en koncentration $\frac{K_m^B}{K_S^A K_m^B}$. Dernæst afbildes liniernes skæringspunkter med $\frac{1}{V}$ akse mod $\frac{1}{b}$ og man skulle gerne få en ret linie. I skema 1 ses værdier som kan findes ud fra skæringspunkter. Endelig kan hældningskoefficienter for de første linier afbildes mod $\frac{1}{b}$. Hældning og skæringspunkt med akserne kan så benyttes til at bestemme de kinetiske parametre jfr. skema 1. Til slut gentages ovenstående procedure blot ombyttes a og b . Denne metode er omstændig og tidskrævende og i praksis udfører man kun to målinger. En hvor a har en høj koncentrationsværdi, og en hvor b har en høj værdi. Fordele ved dette er at ligningen 2.14, hvis feks. b er stor reducerer til

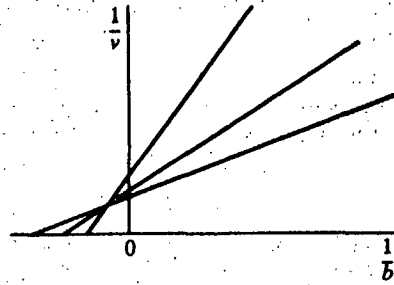
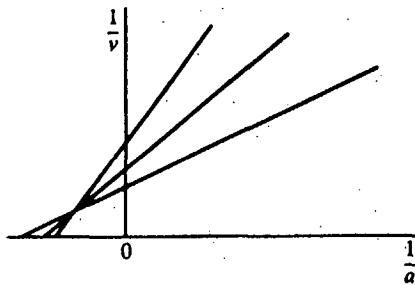
$$V = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m^A}{a}}$$

hvilket er identisk med MichaelisMenten ligningen. Ulempen er at man får bestemt en K_m^A værdi som afhænger af koncentrationen af B og K_S^A bestemmes ikke.

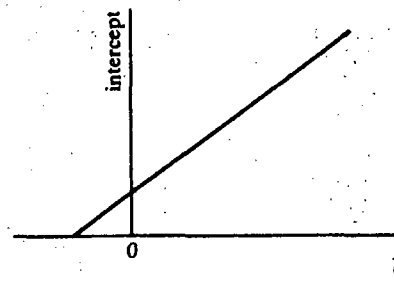
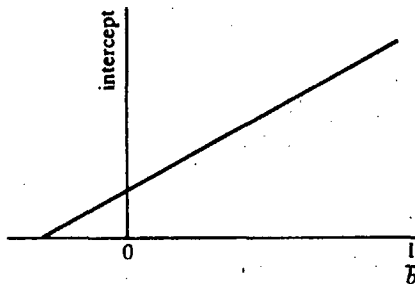
Plot	Slope	Intercept on 1/v axis	Intercept on 1/s axis	Intersection point
Primary plot: 1/v against 1/a	$\frac{K_m^2 + K_i^2 K_m^2}{V_m}$	$1 + \frac{K_m^2}{b}$	$1 + \frac{K_m^2}{b}$	$-\frac{1}{a} = \frac{1}{K_i^2}$
Secondary plots: intercept on 1/v axis against 1/b	$\frac{K_m^2}{V_m}$	$\frac{1}{V_m}$	$-\frac{1}{K_m^2}$	—
slope against 1/b	$\frac{K_i^2 K_m^2}{V_m}$	$\frac{K_m^2}{V_m}$	$-\frac{K_m^2}{K_i^2 K_m^2}$	—
Primary plot: 1/v against 1/b	$\frac{K_m^2 + K_i^2 K_m^2}{V_m}$	$1 + \frac{K_m^2}{a}$	$1 + \frac{K_m^2}{a}$	$-\frac{1}{b} = \frac{K_m^2}{K_i^2 K_m^2}$
Secondary plots: intercept on 1/v axis against 1/a	$\frac{K_m^2}{V_m}$	$\frac{1}{V_m}$	$-\frac{1}{K_m^2}$	—
slope against 1/a	$\frac{K_i^2 K_m^2}{V_m}$	$\frac{K_m^2}{V_m}$	$-\frac{1}{K_i^2}$	—

Figur 2.9: Skema 1 (ref.31 p.86)

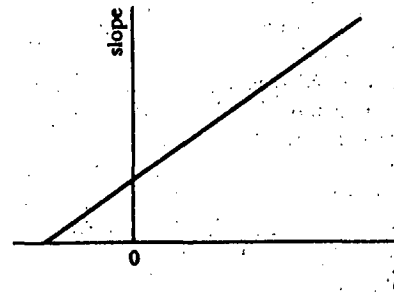
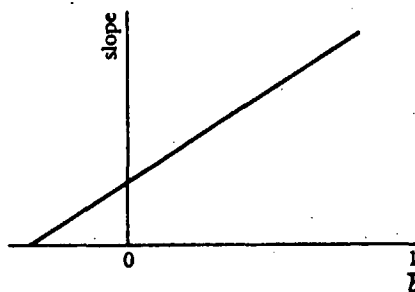
Primary plots



Secondary plots: intercepts



Secondary plots: slopes



Figur 2.10: Grafer til konstantbestemmelse (ref.31 p.85)

Hvis hvert substrat kun bindes til et specifikt site og der ikke er en effekt på nabosites, når et substrat først har bundet sig er

$$K_S^A = K_m^A \text{ og } K_S^B = K_m^B$$

ligning 2.14 bliver da

$$V = \frac{ke_0}{1 + \frac{K_m^A}{a} + \frac{K_m^B}{b} + \frac{K_m^A K_m^B}{ab}} \quad (2.16)$$

Det vides især at være enzymer, som tilhører grupper af transferaser, der har en kinetik, der kan beskrives ved denne ligning.

2.2.9 Kinetiske ligninger for enzymkatalyserede reaktioner med 3 substrater.

Den generelle kinetiske ligning for 3 substrat systemer kan vises (se feks. ref.39) at være givet ved

$$V = \frac{ke_0}{1 + \frac{K_m^A}{a} + \frac{K_m^B}{b} + \frac{K_m^C}{c} + \frac{K_m^A K_m^B}{ab} + \frac{K_m^A K_m^C}{ac} + \frac{K_m^B K_m^C}{bc} + \frac{K_m^A K_m^B K_m^C}{abc}} \quad (2.17)$$

hvor K_m^A, K_m^B og K_m^C svarer til MichaelisMenten konstanter. Konstanterne $K_m^A K_m^B, K_m^A K_m^C$ o.s.v. repræsenterer kombinationer af Michaelis konstanter og tilsyneladende dissociationskonstanter, som afhænger af den pågældende reaktionsmekanisme.

De indgående konstanter kan bestemmes eksperimentelt som for to substrater, blot kræves langt flere plot. For forskellige fastholdte værdier af B og C optegnes plot som beskrevet i tabel 2. Proceduren gentages for fastholdt A og B, og for fast A og C.

2.2.10 Kinetiske ligninger, hvis der er 4 substrater.

Dette kapitel afsluttes med at opskrive det generelle udtryk for reaktionshastigheden, hvis enzymet har 4 sites (ref.38):

$$V = \frac{ke_0}{1 + L_0 + L_1 + L_2 + L_3}$$

Plot	Slope	Intercept on 1/v axis
Primary plot: 1/v against 1/a	$\frac{K_m^A + \frac{K^{AB}}{b} + \frac{K^{AC}}{c} + \frac{K^{ABC}}{bc}}{V_m}$	$1 + \frac{K_m^B}{b} + \frac{K_m^C}{c} + \frac{K^{BC}}{bc}$
Secondary plots:		
(1) intercept against 1/b	$\frac{K_m^B + \frac{K^{BC}}{c}}{V_m}$	$1 + \frac{K_m^C}{c}$
(2) intercept against 1/c	$\frac{K_m^C + \frac{K^{BC}}{b}}{V_m}$	$1 + \frac{K_m^B}{b}$
(3) slope against 1/b	$\frac{K^{AB} + \frac{K^{ABC}}{c}}{V_m}$	$\frac{K^{AC}}{c}$
(4) slope against 1/c	$\frac{K^{AC} + \frac{K^{ABC}}{b}}{V_m}$	$\frac{K^{AB}}{b}$
Tertiary plots:		
intercept of (1) against 1/c	$\frac{K_m^C}{V_m}$	$\frac{1}{V_m}$
slope of (1) against 1/c	$\frac{K^{BC}}{V_m}$	$\frac{K_m^B}{V_m}$
intercept of (2) against 1/b	$\frac{K_m^B}{V_m}$	1
slope of (2) against 1/b	$\frac{K^{BC}}{V_m}$	$\frac{K_m^C}{V_m}$
intercept of (3) against 1/c	$\frac{K^{AC}}{V_m}$	$\frac{K_m^A}{V_m}$
slope of (3) against 1/c	$\frac{K^{ABC}}{V_m}$	$\frac{K^{AB}}{V_m}$
intercept of (4) against 1/b	$\frac{K^{AB}}{V_m}$	$\frac{K_m^A}{V_m}$
slope of (4) against 1/b	$\frac{K^{ABC}}{V_m}$	$\frac{K^{AC}}{V_m}$

Figur 2.11: Tabel 2 (ref.31 p.119)

hvor

$$L0 = \frac{K_m^A}{a} + \frac{K_m^B}{b} + \frac{K_m^C}{c} + \frac{K_m^D}{d}$$

$$L1 = \frac{K^{AB}}{ab} + \frac{K^{AC}}{ac} + \frac{K^{BC}}{bc}$$

$$L2 = \frac{K^{AD}}{ad} + \frac{K^{BD}}{bd} + \frac{K^{CD}}{cd} + \frac{K^{ABC}}{abc}$$

$$L3 = \frac{K^{ABD}}{abd} + \frac{K^{ACD}}{acd} + \frac{K^{BCD}}{bcd} + \frac{K^{ABCD}}{abcd}$$

For at bestemme de indgående konstanter kræves samme procedure som for tre substrater, blot fås 19 plot for hver gang 3 substrat niveauer holdes konstante. Dette sidste nærmer sig en uoverkommelig opgave, men i reglen bliver en lang række af de indgående konstanter nul afhængig af de antagelser man gør sig angående reaktionsmekanismen. Hvis reaktionsmekanismen antages at indeholde et irreversibelt trin mellem hver substratbinding fås den enkeltteste ligning, idet alle konstanter undtagen K_m 'erne bliver forsvindende.

2.3 Biosyntesen

I dette kapitel vil de enkelte trin i biosyntesen af penicillin blive gennemgået mere detaljeret end i oversigten. Men vi har valgt at fokusere på oplysninger som kan have relation til den matematiske model. Kapitlet er struktureret efter selve syntesevejen og de enkelte stoffer beskrives i den rækkefølge som de indgår i biosyntesen.

2.3.1 Aminoadipinsyre.

Aminoadipinsyre (A) er en af de tre aminosyre, der er udgangspunktet for biosyntesen af penicillin. Samtidig med at A indgår i syntesevejen til penicillin er den også en intermediær i lysinsyntesen (ref.3). Dette betyder at A poolen er en metabolsk skillevej, idet A er substrat for

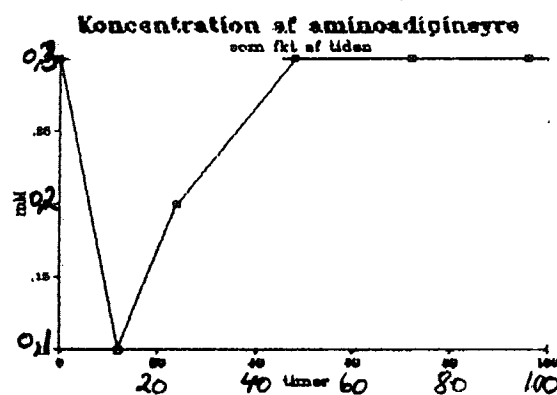
to forskellige enzymer; A reduktase (lysinsyntese) og ACV-syntetase (penicillin syntese) (ref.6). Umiddelbart indikerer dette at A poolen kan være en regulerende faktor. Hvis L-A (A i L-form, se evt oversigts afsnit) tilsættes gæringsmediet vil den blive optaget og inkorporeret i ACV (ref.1), dog først efter ca. 1 time (ref.4). Forsøg har da også vist, at penicillin produktionen stimuleres ved at tilsætte A til mediet og man har ligeledes fundet, at der er en signifikant korrelation mellem hastigheden af penicillin produktionen og den intracellulære koncentration af A (ref.6).

Imidlertid er A kostbar i ren form, hvorfor man har søgt andre veje til udbytteforbedringer, bl.a. ved at forbedre vækstmediet. Det er især kulstofkilden, der her er afgørende betydning. Hvis f.eks. glucose er tilsat mediet bliver A syntetiseret og nedbrudt med større hastighed med det nettoresultat, at A-poolen bliver kraftigt nedsat. Forklaringen herpå er, at glucose stimulerer fluxen gennem lysinvejen og forhindrer dermed at A ophobes. Ved brug af lactose som kulstofkilde sænkes strømmen gennem lysinvejen og der er forøget mulighed for dannelse af penicillin.

Iøvrigt frigives A når fex tilsættes mediet (ref.5), hvilket giver en tilgang til poolen af fri A (ref.8). Der har dog fra forskellige sider været rejst tvivl om det var den samme konfiguration af aminosyren (ref.1). A er derfor ikke med i selve penicillin V/G, idet den altså spaltes fra i trinnet hvor Pen V/G dannes.

En anden vigtig og bemærkelsesværdig faktor er at A i et vist omfang ophobes i mediet, det vil sige at den ikke er tilgængelig for den videre syntese (ref.8). På denne baggrund har man fundet at en af forskellene på højtydende og lavtydende stammer er de højtydendes evne til at opretholde A-poolen og ikke udskille den i mediet (ref.6).

Sammenfattende har (ref.6) opstillet to biokemiske egenskaber på baggrund af undersøgelser over 4 forskellige stammers kapacitet til at producere penicillin: 1) En evne til at opbygge en intracellulær pool af A stor nok til at få en høj reaktionshastighed for ACV-syntetase og



Figur 2.12: Koncentration af A som fkt. af tiden. Data er lånt fra (ref.8).

2) en evne til at danne store mængder af dette enzym og de følgende enzymer i biosyntesen af penicillin.

Ifølge ovenstående har man naturligvis været interesseret i at måle poolkoncentrationen som funktion af tiden. Figur 2.12 viser et forløb i ASP-78 (en højtydende stamme) (ref.8).

En anden forskningsgruppe (ref.6) har målt koncentrationer til tre tidspunkter. Deres resultater er optegnet i tabel 3.

Der ses en udmærket overensstemmelse mellem mellem de to gruppers målinger.

TID TIMER	24	48	72
KONC. mM	0,10	0,32	0,27

Figur 2.13: Tabel 3. Koncentration af A til 3 tidspunkter

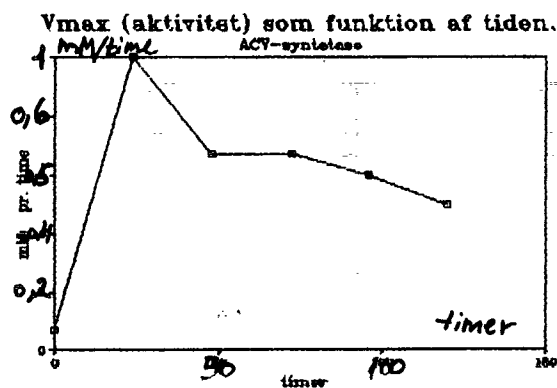
2.3.2 Cystein og Valin

Cystein og Valin udgør sammen med A de 3 aminosyrer, der er udgangsstofferne i syntesevejen til penicillin. Cystein og valin tilhører de mere almindelige aminosyrer og deres pools i *Penicillium chrysogenum* har ikke vist at give de helt store udsving (ref.1). Begge aminosyrer optræder i det færdige penicillin, imodsætning til A, der, som tidligere omtalt, spaltes fra.

2.3.3 ACV-syntetase.

ACV-syntetase er det første enzym, der indgår i penicillin- syntesen. Enzymet katalyserer reaktionen mellem A, C og V under forbrug af 3 ATP og slutproduktet bliver tripeptidet (ACV). Syntesen sker ud fra de 3 aminosyrer i L-formen, men ikke på ribosomerne (ref.1). Først kobles Aminoacidipinsyre og Cystein. På nuværende tidspunkt har man ikke fundet dette dipeptid (L-A-L-cys) i myceliet (ref.5). En af grundene til dette kan være at dipeptidet forbliver enzytbundet. Endelig sættes L-valin på (ref.1) og Valindelen omdannes til D-formen (ref.4) og der er dannet $\delta(L - \alpha - \text{aminoacidipin} - L - \text{cystenyl} - D - \text{valin})$. (ACV)

Enzymet er ikke oprenset (karakteriseret i ren form) fra *Penicillium chrysogenum* og den endelige reaktionsmekanisme med aminosyrene



Figur 2.14: Aktivitet af ACV-synthetase som funktion af tiden

ikke kendt (ref.1); men man kender dog rækkefølgen, idet det antages at først kobles A til enzymet dernæst C og til slut V. Imidlertid er ACV-synthetase blevet karakteriseret i en svamp der minder meget om *Penicillium chrysogenum*, *Acrimonium chrysogenum*. Man har i denne svamp fundet at aktiviteten har et forløb, der udviser de samme tendenser som cyklasen (ref.4), men på et andet niveau. Ligeledes mener man, at enzymet har 3 evt. 4 sites (ref.1).

Iøvrigt er det hos *Cephalosporin acrimonium* påvist at et lignende enzym katalyserer reaktionen mellem $\delta(L - \alpha - A - L - cys)$ og L-valin (ref.14).

På figur 2.14 ses en aktivitetsprofil for ACV-synthetase, som det antages at se ud i *Penicillium chrysogenum*, men altså med resultater fra en analog svamp.

Man har desuden fundet at glucose represserer (mindsker) syntese-hastigheden af dette enzym (ref.8), samt at høje koncentrationer af penicillin V/G kan bremse dets aktivitet (ref.1).

2.3.4 ACV

Produktet af første reaktion i syntesen til penicillin er ACV - et tripeptid, der senere omdannes til isopenicillin N. I en forsøgsgæring ses ACV

først efter 24 timer (ref.1) og det findes både inde i cellerne og i mediet. Der foregår åbenbart en vis transport over cellemembranen til vækstmediet. I lavtydende stammer findes lige store mængder intra- og ekstracellulært, mens højtydende stammer har relativt større ACV-pool, det vil sige mere ACV intracellulært. Poolen af ACV er øget i disse sidstnævnte og kan øges yderligere ved tilsætning af fenyl- eller fenoxycarbonsyre til mediet (ref.4).

Iøvrigt kan ACV-biosyntesen øges når Lysinsyntesen blokeres med cykloheximid (ref.8).

Mediesammensætningen har også indflydelse på ACV-biosyntesen, idet kulturer, der vokser på glucose har lavere syntese i forhold til kulturer, der vokser på laktose (ref.8).

2.3.5 Cyklase

Cyklase er et enzym, der katalyserer reaktionen mellem ilt og ACV (ref.10), og der dannes isopenicillin N. Reaktionen er irreversibel (ref.1) og represseres af glucose (ref.1). Cyklasen er ikke membranbundet og har en molekylvægt på 39.000.

Cyklasen findes i en forsøgsgæring af *Penicillium chrysogenum* 24 timer før det er muligt at detektere penicillin.

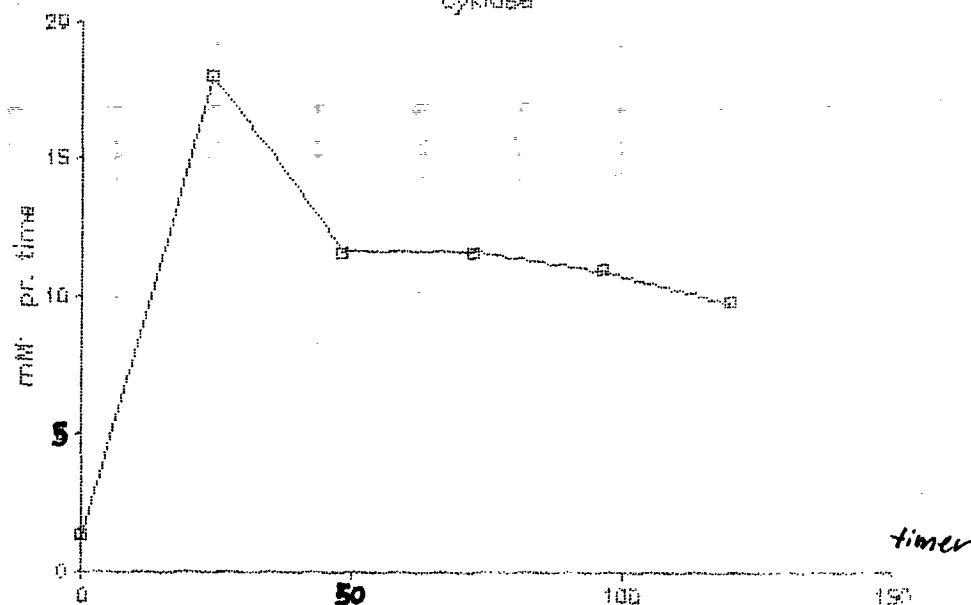
Det vides at højtydende stammer af *Penicillium chrysogenum* har øgede mængder af Cyklase. En sådan højtydende stamme er AS-P-78 og på figur 2.15 ses aktivitetsniveauet af Cyklase som funktion af tiden.

2.3.6 Ilt

Ilt er en vigtig faktor, dels fordi Cyklase kræver ilt, men også fordi de metabolske processer i reglen kræver ilt ved nedbrydning af organisk kulstof. Man har vist at høje ilt-koncentrationer stimulerer Cyklasen (ref.10).

Forsøg med små gæringstanke på 5 liter har vist at for at få en høj penicillinproduktion er det nødvendigt med en koncentration af opløst

Vmax (aktivitet) som funktion af tiden.
cyklase



Figur 2.15: Aktivitet af cyklase som fkt. af tiden. (ref.12)

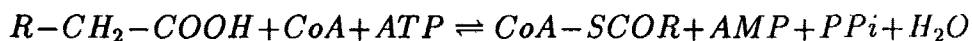
ilt på 25% og undgå for høje cellekoncentrationer (ref.11). Under optimale forhold er det specifikke iltoptag 1,6 mmol/g celler/time. Figur 2.16 viser en typisk koncentrationsprofil for ilt.

2.3.7 Isopenicillin N

Isopenicillin N er et intermediært produkt i syntesen, dvs en metabolit. Det skal nævnes, at der er en diskussion om reaktionen til penicillin V/G går via 6APA (6aminopenicillansyre) (ref.10). (jævnfør oversigtsafsnittet).

2.3.8 CoA + fex + ligase

Coenzym A-ligase katalyserer følgende reaktion:



hvor R er et fenyl- eller et fenoxylradikal. Enzymet er fundet i *Penicillium chrysogenum* (ref.15) og optræder efter 2 dage og stiger ved 3. dagen før fasen for hurtig penicillinproduktion.

CoA er en del af cellens biokemi, mens fex skal tilføres cellen i moderate mængder, da det kan have en vis toksisk virkning (ref.3). De optimale betingelser for penicillinproduktionen er 1,8 mg fenylacetat/g celler/time.

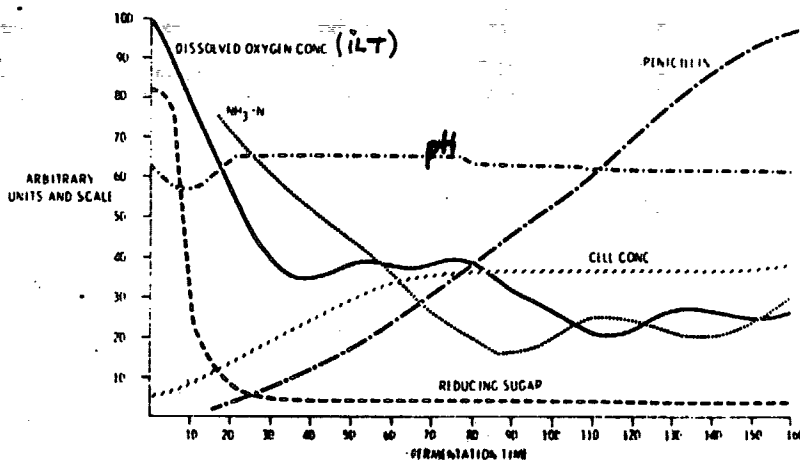
2.3.9 Acyltransferase

Acyltransferases maksimale aktivitet findes efter 40 timers gæring og falder langsomt efter 80 timer. Aktiviteten induceres ikke af fenylacetat, ligesom glucose ikke represserer enzymsyntesen.

Enzymet er oprenset og karakteriseret til en monomer med en molekylvægt på 30.000 u.

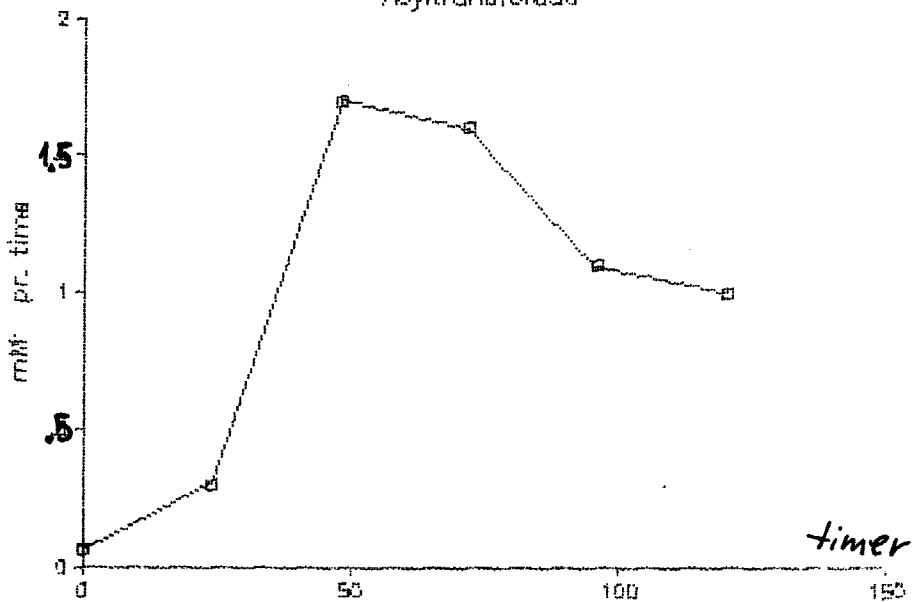
Enzymet omdanner isopenicillin N til penicillin ved tilstedeværelse af fenylacetylCoA eller fenoxycetylCoA (ref.9).

Tidsvariation for acyltransferaseaktivitet i kulturen AS-P-78 ses i figur 2.17 (ref.7 p.1680).



Figur 2.16: *Iltkoncentration som fkt. af tiden. (ref.12)*

V_{max} (aktivitet) som funktion af tiden.
Acytransferase



Figur 2.17: *Tidsvariation for Acyltransferase aktivitet*

Kapitel 3

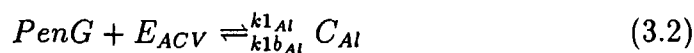
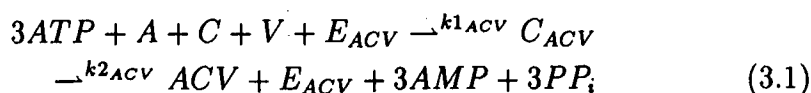
De første modeller

Gennem samtaler med Henrik Møllgaard nåede vi rimeligt hurtigt frem til forskellige muligheder for at afgrænse de elementer af biosyntesen, der kunne tillægges betydning.

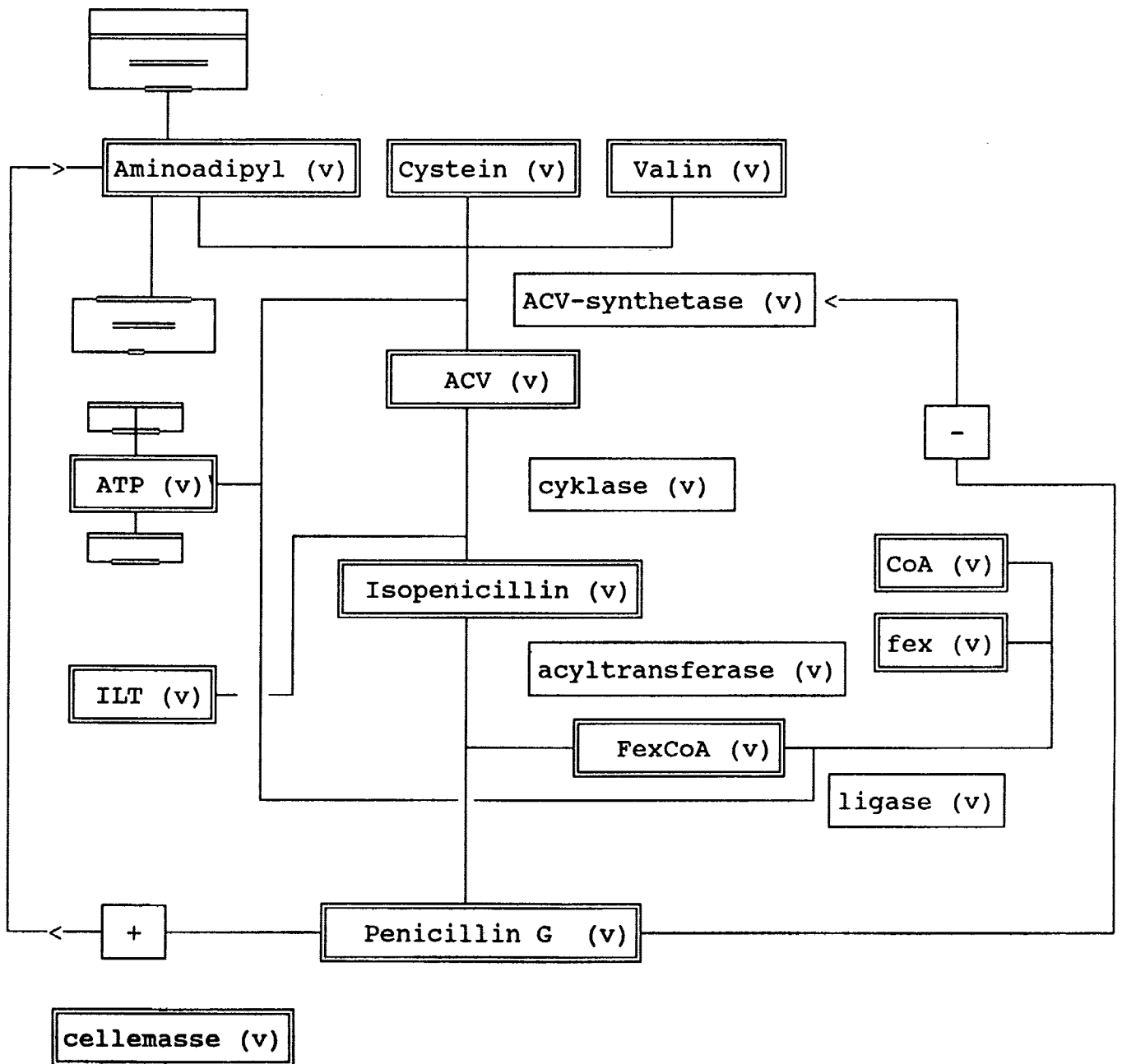
Dette system er skitseret på figur 3.1. I denne grafiske fremstilling af systemet angives varierende pools med (v). Substrat pools og pools, der indgår på substrat lignende måde angives med dobbelttoptrukne rammer, mens enzym-pools angives med enkelttoptrukne rammer. Forbindelseslinierne mellem de forskellige pools angiver processer, der styres af forskellige parametre. Disse processer er modelleret efter tilgængelig viden, rimelige skøn, gæt eller anvendes som justeringsredskab alene for at undersøge, hvilken virkning en given proces må antages at have på den samlede proces.

Systemet kan beskrives ved følgende sæt af reaktionsligninger:

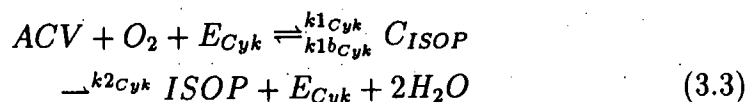
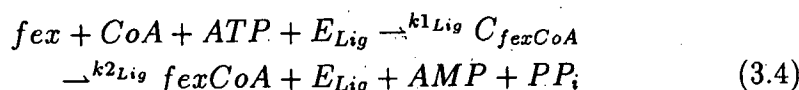
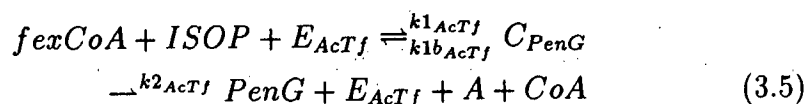
dannelsen af ACV



C_{Al} betyder allosterisk kompleks. PenG kan bremse hele syntesen ved at binde sig til første enzym.

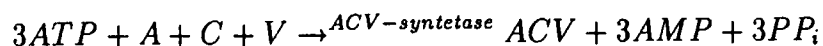


Figur 3.1: De indgående elementer i det afgrænsede system.

dannelsen af IsoPenicillin**dannelsen af FexCoA****dannelsen af Penicillin G**

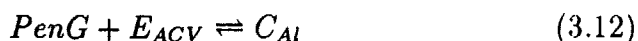
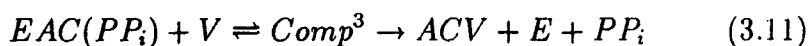
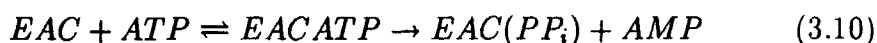
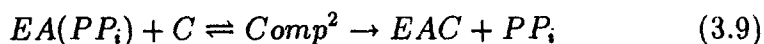
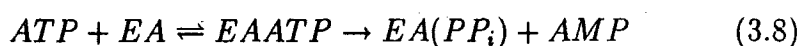
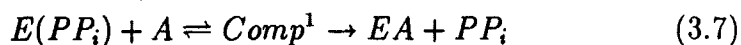
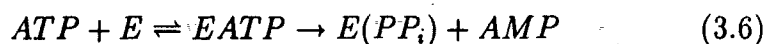
Ved disse ligninger angiver E_{iii} de forskellige indgående enzymer og C_{iii} angiver kompleksbindinger. De små bogstaver k_i angiver hastighedskonstanter knyttet til bestemte enzymer. Som det ses af disse reaktionsligninger sker processerne fra et substrat til et produkt via dannelsen af et kompleks. Processen styres af 3 hastighedskonstanter, k_1 , k_{1b} og k_2 . Disse reaktionsligninger kan ikke umiddelbart danne forlæg for opstillingen af differentiallyigninger, da der indgår flere substrater ved hvert enzym. Man vil derfor være nødsaget til at foretage en "vægtning" af substraternes affinitet til enzymet, og dermed af K_m værdierne. Alternativt kan de sammensatte reaktioner splittes op i en række delreaktioner, som vil blive gennemgået i det følgende.

3.1 Reaktionsligninger

Dannelsen af ACV

I denne reaktion indgår 5 faktorer, nemlig koncentrationerne af A, C, V og ATP samt enzymkoncentrationer. Man kan opstille en mere fin model for reaktionshastigheden, idet man kender rækkefølgen hvorefter de 3 aminosyrer kobles, og man regner med, at der kræves ATP til hver

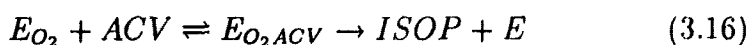
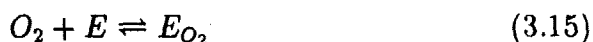
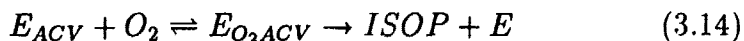
binding. Hvis antagelsen om at enzymet har 4 sites holder, kan man opskrive følgende reaktionsligninger:



Dannelsen af Isopenicillin N

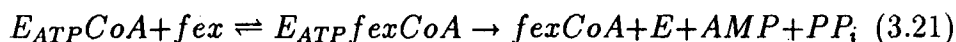
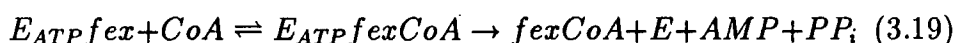
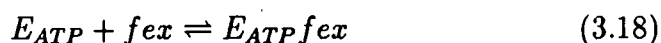
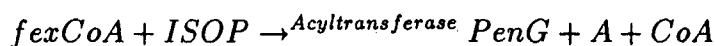


Det vides ikke om ACV eller O_2 først bindes til enzymet eller om dette kan ske i tilfældig orden. Idet det antages at kunne ske i tilfældig orden kan følgende reaktioner forekomme

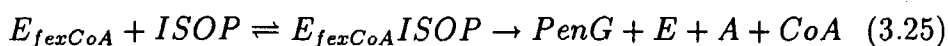
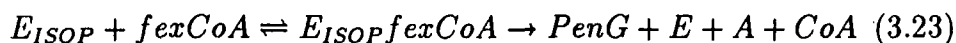
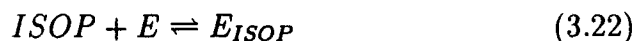


Dannelsen af FexCoA

Det antages at ATP først bindes til enzymet. Det vides ikke om fex eller CoA herefter bindes til enzymet eller om dette kan ske i tilfældig orden. Idet det antages at kunne ske i tilfældig orden kan følgende reaktioner forekomme

**Dannelsen af Penicillin G**

Det vides ikke om ISOP eller fexCoA først bindes til enzymet eller om dette kan ske i tilfældig orden. Idet det antages at kunne ske i tilfældig orden kan følgende reaktioner forekomme



Omdannelse til differentiallyigninger Systemet kan således mere detaljeret beskrives ved 20 reaktionsligninger. Disse kan igen omdannes til mellem 30 og 50 første ordens, sædvanlige differentiallyigninger afhængig af hvilke antagelser, der gøres om de indgående substrater¹.

Fordelen ved ovenstående system er at det ikke tager udgangspunkt i MichelisMenten kinetik. Modelleringen vil kunne beskrive udviklingen af de forskellige pools under transiente forhold. Der er således ikke indarbejdet forudsætninger om at systemet befinder sig i en steady-state tilstand. Imidlertid støder man på en række vanskeligheder. Normalt bestemmes K_m og V_{max} for enzymer, mens de i dette system indgående hastighedskonstanter, k_1 , k_{1b} og k_2 er vanskelige at bestemme. Numerisk vil de også volde problemer at løse et så stort system. Dels er et system med 30 til 50 differentiallyigninger i sig selv stort og tidskrævende at løse. Hertil kommer at hastigheden af de indgående processer i systemet er meget forskelligt, hvilket vil medføre et såkaldt stift differentiallyigningssystem².

Et sådant problem kan løses ved at identificere de hurtige, men kvantitativt små processer og isolere dem fra systemet (f.eks. ved at antage at de har en konstant værdi). Efter at have arbejdet med dette udgangspunkt i et godt stykke tid valgte vi imidlertid at opstille en model efter andre principper, hvor vi både kan takle flersubstrat problematikken uden at skulle skønne over usikre tidskonstanter og samtidig får isoleret de hurtige processer. Denne model bliver gennemgået i det kommende kapitel.

¹Hvis man ønsker at modellere substratkoncentrationerne som funktion af systemets udvikling afstedkommer det flere differentiallyigninger. Hvis substratkoncentrationerne antages at have et konstant niveau behøves ingen differentiallyigninger til at beskrive dem

²I en algoritme, der selv justerer længden af sit integrationsskridt (se kapitel 5), vil de hurtigste processer, (der vil være indstillingen af ligevægten mellem substrat/enzym og det kompleksbundne enzym) medføre meget små integrationsskridt. De kvantitativt større og langsommere processer, (der er omdannelsen fra substrat og enzym og til produkt og enzym) vil derfor blive beregnet med et meget lille tidsskridt. Resultatet er at tidsforbruget for den numeriske løsning vil vokse mod uacceptable højder.

Kapitel 4

Opstilling af model

For at løse problemet med at koble flere substrater sammen i den samme reaktion og at kunne anvende de opgivne størrelse V_m og K_m direkte har vi baseret vores endelige modelarbejde på den model, der beskrives i dette kapitel. I det følgende gennemgås de antagelser og forudsætninger, der benyttes til opstilling af flersubstratmodellen.

4.0.1 antagelser

Homogenitet: Vi antager, at der forefindes homogene forhold overalt i gæringskulturen. Dette rummer følgende antagelser.

- a. der er homogene forhold inden i cellen. Vi ser således bort fra kompartmentering og dermed forsinkelser som følge af transportproblemer.
- b. vi antager at alle celler er ens. Der hersker de samme forhold i unge og gamle celler. Altså en homogen cellemasse.
- c. vi antager at der er ens forhold i hele mediet. Dette fremmes ved en stadig omrøring i gæringstanken.

Talmateriale Det talmateriale, der indgår i modellen stammer fra målinger på forskellige stammer. Vi antager alligevel, at de kan bruges fælles for en typisk stamme (vores model stamme).

MichaelisMenten kinetik Specielt for modellen, der gennemgås i dette afsnit antager vi, at processerne i syntesevejen kan beskrives med MichaelisMenten kinetik.

I modsætning til den model der er beskrevet i foregående afsnit, er denne model mere enkel i sin opbygning og indeholder derfor også en række yderligere antagelser. Grundlaget for denne model er de kinetiske ligninger, der er omtalt i afsnittet om enzymkinetik og derfor følger de enzymkinetiske overvejelser, de antagelser, der lå til grund for disse hastighedsudtryk.

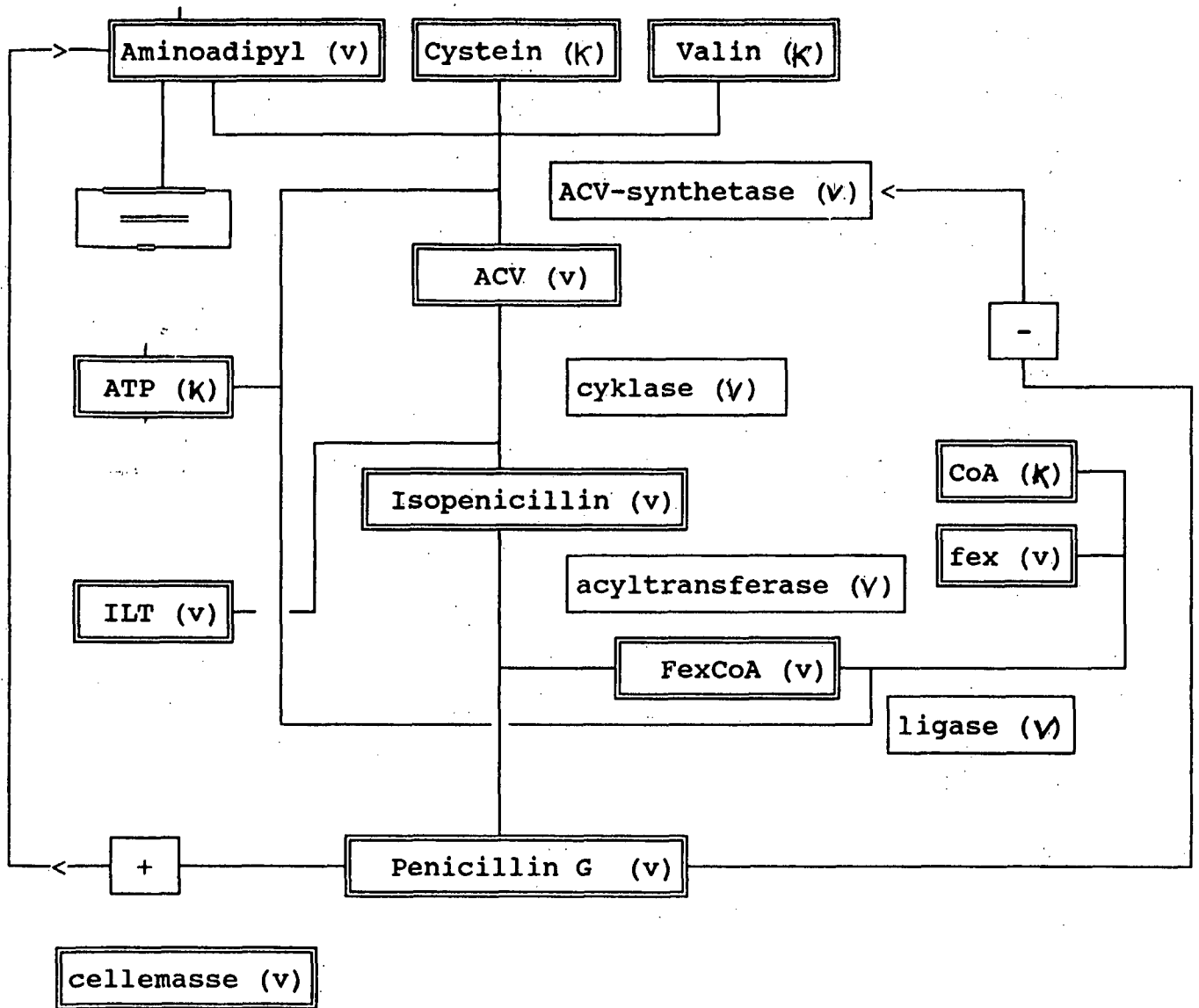
Fordelen ved denne model er bl.a., at hvis der fremkommer nye data eller der suppleres med nye målinger kan de tilsvarende gamle konstanter udskiftes med nye. Det havde selvfølgelig været det ideelle, hvis alle hastighedskonstanter var kendte og den gamle model kunne anvendes, uden at man skulle skønne over værdier i en grad, der lå uden for vores kompetance. Hvis disse hastighedskonstanter engang bestemmes, kan den gamle model benyttes, men indtil da synes modellen i dette afsnit at være på mere fast grund. Skematisk kan biosyntesen opskrives som på figur 4.1.

For at opstille hastighedsudtryk for de enkelte reaktioner er det nødvendigt at overveje hvor mange sites, de enkelte enzymer har og i hvilken rækkefølge substraterne bindes til disse sites, da det er afgørende for kinetikken.

Der er tidligere i rapporten argumenteret for, at det første enzym i syntesen, ACV syntetase kan betragtes som et enzym med 4 sites. Rækkefølgen for substraternes binding er kendt og før hver aminosyre bindes, findes en irreversibel reaktion, hvor ATP bindes. Det antages derfor at kinetikken kan beskrives ved ligning 4.1. Det svarer til, at den generelle ligning (se afs. om enzymkinetik), hvor led med produkter af substratkoncentrationer antages forsvindende. Dannelseshastigheden af ACV er da givet ved

$$V_{acu} = \frac{V_{max_1}}{1 + \frac{KM_{amin}}{[Amin]} + \frac{KM_{Cys}}{[Cys]} + \frac{KM_{Val}}{[Val]} + \frac{KM_{atp}}{[ATP]}} \quad (4.1)$$

hvor V_{max} angiver maksimalhastigheden. Denne maksimalhastighed er proportional med aktiviteten for det pågældende enzym og antages at afhænge af tiden. Kantede parenteser angiver koncentration.



Figur 4.1: Biosyntesen som den modelleres

Dannelsen af isopenicillin er katalyseret af cyklase, et enzym med formodentlig 2 sites. Det antages, at når først det ene substrat er bundet ændres bindingsevnen for det andet ikke. Hastighedsudtrykket bliver da

$$V_{isop} = \frac{Vmax_2}{1 + \frac{KM_{ilt}}{[Ilt]} + \frac{KM_{acv}}{[acv]} + \frac{KM_{ilt}KM_{acv}}{[ilt][acv]}} \quad (4.2)$$

Ligasen, der indgår i dannelsen af fexCoA har 2 evt. 3 sites, og hastighedsudtrykket antages givet ved

$$V_{fexcoa} = \frac{Vmax_3}{1 + \frac{KM_{coa}}{[Coa]} + \frac{KM_{fex}}{[Fex]} + \frac{KM_{ATP}}{[ATP]} + \frac{KM_{coa}KM_{fex}}{[Coa][Fex]}} \quad (4.3)$$

Endelig antages hastigheden for dannelsen af penicillin at være bestemt af følgende udtryk, der ved samme overvejelser som for cyklase giver

$$\frac{dpeng}{dt} = \frac{Vmax_4}{1 + \frac{KM_{fexcoa}}{[fexcoa]} + \frac{KM_{isop}}{[isop]} + \frac{KM_{fexcoa}KM_{isop}}{[fexcoa][isop]}} \quad (4.4)$$

Da ligning 4.1 kun udsiger noget om, hvor mange molekyler der dannes, og ikke hvormange der forbruges til at danne ISOP må der naturligvis være et fradrag fra ACV-poolen, og dette antages netop at være bestemt af hastigheden hvormed ISOP dannes - dvs

$$\frac{dacv}{dt} = \frac{Vmax_1}{1 + \frac{KM_{amin}}{[Amin]} + \frac{KM_{Cys}}{[Cys]} + \frac{KM_{Val}}{[Val]} + \frac{KM_{atp}}{[ATP]}} - \frac{Vmax_2}{1 + \frac{KM_{ilt}}{[ilt]} + \frac{KM_{acv}}{[acv]} + \frac{KM_{ilt}KM_{acv}}{[ilt][acv]}} \quad (4.5)$$

Poolen af ISOP kan bestemmes af:

$$\frac{disop}{dt} = \frac{Vmax_2}{1 + \frac{KM_{ilt}}{[ilt]} + \frac{KM_{acv}}{[acv]} + \frac{KM_{ilt}KM_{acv}}{[ilt][acv]}} - \frac{Vmax_4}{1 + \frac{KM_{fexcoa}}{[fexcoa]} + \frac{KM_{isop}}{[isop]} + \frac{KM_{fexcoa}KM_{isop}}{[fexcoa][isop]}} \quad (4.6)$$

Endelig er hastigheden for PenG

$$\frac{dpenG}{dt} = \frac{V_{max4}}{1 + \frac{KM_{fexcoa}}{[fexcoa]} + \frac{KM_{isop}}{[isop]} + \frac{KM_{fexcoa}KM_{isop}}{[fexcoa][isop]}} \quad (4.7)$$

Hvor $fexCoa$ bestemmes af

$$\frac{dfexcoa}{dt} = \frac{\frac{V_{max3}}{1 + \frac{KM_{coa}}{[Coa]} + \frac{KM_{fex}}{[Fex]} + \frac{KM_{coa}KM_{fex}}{[Coa][Fex]}}}{\frac{V_{max4}}{1 + \frac{KM_{fexcoa}}{[fexcoa]} + \frac{KM_{isop}}{[isop]} + \frac{KM_{fexcoa}KM_{isop}}{[fexcoa][isop]}}} \quad (4.8)$$

I ovenstående ligninger antages alle V_{max} værdier at afhænge af tiden, ligesom koncentrationen af *Aminoadipinsyre*, *ilt*, *Fex* og naturligvis de variable *ACV*, *isop*, *fexcoA* og *PenG*. For de nærmere overvejelser angående parametre og variable henvises til afsnittet om data til model.

4.1 Data til model

Data stammer fra (ref.8, ref.9, ref10).

4.1.1 ATP

Koncentrationen antages konstant i hele forløbet med værdien $[ATP] = 1mM$. For ATPs binding til E_{ACV} kendes skøn over $K_M ATP = 1mM$ (He.M.). Argumenter for at ATP kan betragtes som konstant er følgende: ATP indgår stort set i alle processer i cellen, hvorfor cellen sandsynligvis vil opretholde et konstant niveau. Det formodes iøvrigt (Dixon og Webb, 1979), at ATP bindes til enzymet umiddelbart før hver binding af aminosyrene. Der ses bort fra AMPs og PPi eventuelle indflydelse, når de først er spaltet fra.

4.1.2 Aminoadipinsyre

Koncentrationen af Aminoadipin ses på figur 2.12 på side 36. Jævnfør Henrik Møllgård viser denne kurve tendenser i koncentrations forløbet. De udleverede tal var en værdi for $t = 48 timer$ og Henrik Møllgaards (He.M) forslag går så på at "flytte" kurven op til dette niveau. En

begyndelseskoncentration omkring 0.3mM er derfor rimelig. Udfra den foreliggende kurve er det ikke muligt at afgøre, om trends skyldes stigning/fald i syntesen af aminoacidinsyre eller omdannelsen til andre stoffer. Husk også på at der i ligningen for dannelsen af PenG også dannes Aminoacidin. Iøvrigt haves en K_m overfor enzymet: $K_m = 100\mu M$.

4.1.3 Cystein

Koncentrationen af cystein antages konstant $[C] = 0.8mM$ (data He.M.), begrundelsen er at cystein indgår i så mange processer i cellen, at denne tilnærmelse må være realistisk. K_m overfor enzym $K_m = 100\mu M$

4.1.4 Valin

Koncentrationen sættes som for Cystein konstant med værdien $[V] = 0.3mM$ (data fra He.M.). K_m overfor enzym $K_m = 100\mu M$

4.1.5 Acvsynthetase

De følgende data er baseret på streptomyses, en organisme der skulle have analoge mekanismer og værdier for K_m og V_m . Ifølge He.M. er aktiviteten i crude til tiden $t = 24$ timer: $A = 0.7 \frac{nkcat}{g \text{ r\aa}t \text{ protein}}$. Aktiviteten kendes ikke til andre tidspunkter, men He.M. foreslår at denne aktivitet følger cyklasen, dvs. samme differentialekvotient, men naturligvis på et andet niveau. Da den benyttede enhed i modellen er $\frac{mM}{t}$ omregnes ovenstående aktivitet som følger.

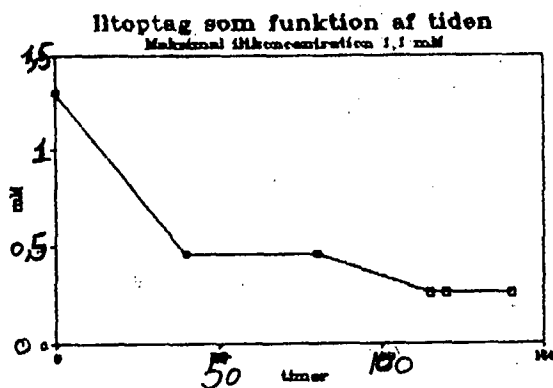
$$A = 0.7 \frac{nkcat}{g \text{ r\aa}t \text{ protein}} = 0.7 \frac{nmol}{s \cdot g \text{ protein}}$$

Jvf. He.M. er der 2.4 ml indre volumen pr. gram råt protein, dvs.

$$A = \frac{0.7 \cdot 10^{-9} mol/s}{2.4 \cdot 10^{-3} l}$$

$$A = 1.05 mM/t$$

Denne størrelse er så et udtryk for den maksimale hastighed. Ved at sammenligne med cyklasen fås et forløb som i figur 2.14 på side 38:

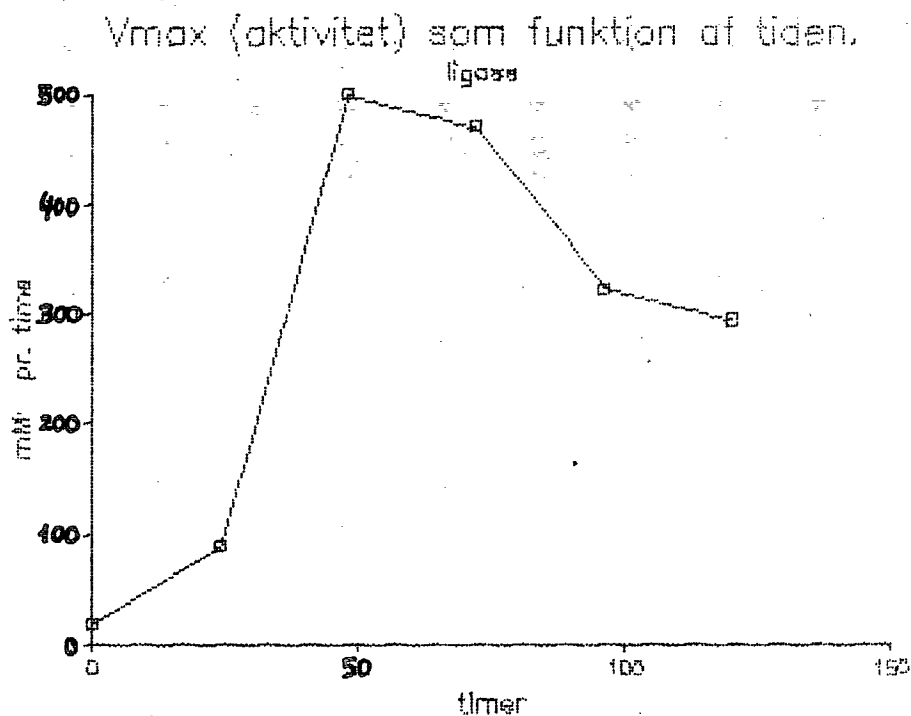


Figur 4.2: Koncentration af ilt som fkt. af fermenteringstid

Ved at indlæse disse data i modellen for V_m^1 fås et mere realistisk forløb, idet der tages hensyn til cellens vækst og evt. produktion af mere enzym.

4.1.6 Ilt.

Den maksimale iltkoncentration er i begyndelsen af fermenteringsforløbet 1.1mM i vækstmediet og denne værdi falder i løbet af fermenteringen. (ref.12) har målt iltkoncentrationen i forløbet og kurven er vist på figur 2.16 42. Vi benytter deres kurve, men med det maksimale niveau på 1.1 mM. Se figur 4.2



Figur 4.3: Aktivitet af ligase som fkt. af fermenteringstid

4.1.7 Fex

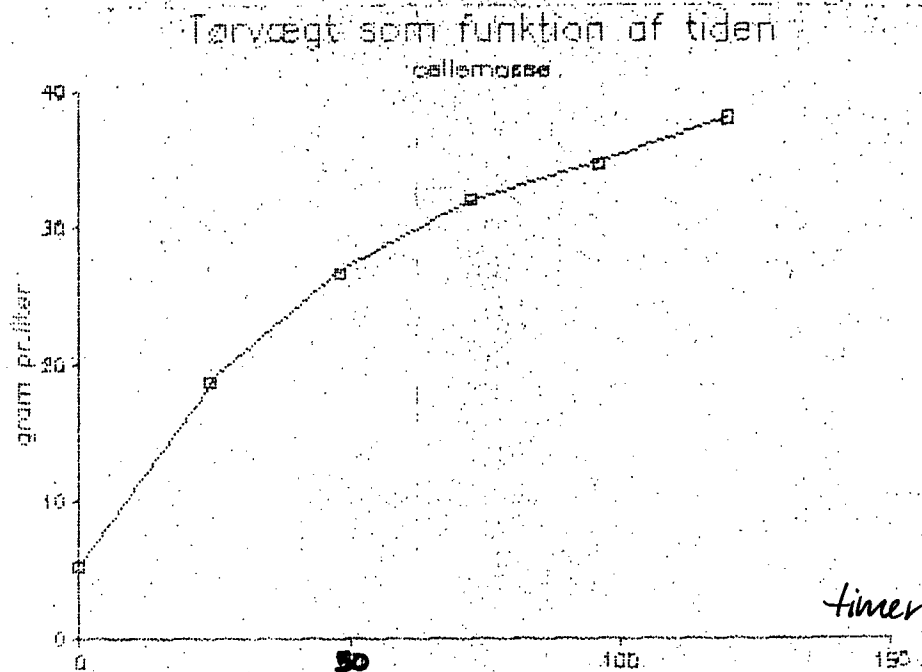
Fex tilsættes processen løbende. Denne tilsætning er modelleret som en tilsætning på 2 mM til tiden 0, herefter falder niveauet i løbet af de første 4 timer til 0.0167 mM. Dette niveau holdes konstant i resten af tidsforløbet.

4.1.8 Cyklase

Data stammer fra (ref.9) se figur 2.15 på side 40.

4.1.9 Ligase

Forløbet af ligasen antages (He.M.) at følge acyltransferasen og kurven på figur 4.3 viser forløbet, som vi lægger ind i modellen.



Figur 4.4: Cellemasse i tørvægt som fkt. af fermenteringstid

4.1.10 Acyltransferase.

Aktiviteten af acyltransferase er givet ved kurven på figur 2.17 på side 42, hvor måledata stammer fra (ref.8).

4.1.11 Cellemasse.

Cellemassen i tørvægt er optegnet i figur 4.4, hvor data stammer fra (ref.9).

De anvendte K_m værdier fremgår af medfølgende program. Se brugervejledningen.

Kapitel 5

Simulation af modellen

5.1 1.ordens, ikke-lineær, sædvanlig vektordifferentialligning

Resultatet af modelovervejelserne i de foregående kapitler er nedenstående system af differentialligninger.

$$\frac{dacv}{dt} = \frac{Vmax_1(t)}{1 + \frac{KM_{amin}}{[Amin(t)]} + \frac{KM_{Cys}}{[Cys]} + \frac{KM_{Val}}{[Val]} + \frac{KM_{atp}}{[ATP]}} - \frac{Vmax_2(t)}{1 + \frac{KM_{ilt}}{[Ilt]} + \frac{KM_{acv}}{[acv]} + \frac{KM_{ilt}KM_{acv}}{[ilt][acv]}} \quad (5.1)$$

$$\frac{disop}{dt} = \frac{Vmax_2(t)}{1 + \frac{KM_{ilt}}{[ilt]} + \frac{KM_{acv}}{[acv]} + \frac{KM_{ilt}KM_{acv}}{[ilt][acv]}} - \frac{Vmax_4}{1 + \frac{KM_{fexcoa}}{[fexcoa]} + \frac{KM_{isop}}{[isop]} + \frac{KM_{fexcoa}KM_{isop}}{[fexcoa][isop]}} \quad (5.2)$$

$$\frac{dfexcoa}{dt} = \frac{Vmax_3(t)}{1 + \frac{KM_{coa}}{[Coa]} + \frac{KM_{fex}}{[Fex(t)]} + \frac{KM_{atp}}{[ATP]} + \frac{KM_{coa}KM_{fex}}{[Coa][Fex(t)]}} - \frac{Vmax_4(t)}{1 + \frac{KM_{fexcoa}}{[fexcoa]} + \frac{KM_{isop}}{[isop]} + \frac{KM_{fexcoa}KM_{isop}}{[fexcoa][isop]}} \quad (5.3)$$

$$\frac{dpeng}{dt} = \frac{Vmax_4(t)}{1 + \frac{KM_{fexcoa}}{[fexcoa]} + \frac{KM_{isop}}{[isop]} + \frac{KM_{fexcoa}KM_{isop}}{[fexcoa][isop]}} \quad (5.4)$$

For bedre at kunne gennemskue dette system foretages omskrivninger til en mere generel form, der fremhæver de afhængige variable x_i . Michaelis-Menten konstanterne, KM, benævnes k_i , hastighedskonstanterne V_{max} ; benævnes V_i og de substratpools, der antages konstante benævnes p_i . Efter omskrivning ser systemet således ud:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{V_1}{1 + \frac{k_1}{p_1} + \frac{k_2}{p_2} + \frac{k_3}{p_3} + \frac{k_4}{p_4}} - \frac{V_2}{1 + \frac{k_5}{p_5} + \frac{k_6}{x_1} + \frac{k_5 k_6}{p_5 x_1}} \quad (5.5)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{V_2}{1 + \frac{k_5}{p_5} + \frac{k_6}{x_1} + \frac{k_5 k_6}{p_5 x_1}} - \frac{V_4}{1 + \frac{k_9}{x_3} + \frac{k_{10}}{x_2} + \frac{k_9 k_{10}}{x_3 x_2}} \quad (5.6)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = \frac{V_3}{1 + \frac{k_7}{p_7} + \frac{k_8}{p_8} + \frac{k_7 k_8}{p_7 p_8}} - \frac{V_4}{1 + \frac{k_9}{x_3} + \frac{k_{10}}{x_2} + \frac{k_9 k_{10}}{x_3 x_2}} \quad (5.7)$$

$$\frac{dx_4}{dt} = \frac{V_4}{1 + \frac{k_9}{x_3} + \frac{k_{10}}{x_2} + \frac{k_9 k_{10}}{x_3 x_2}} \quad (5.8)$$

Det her opskrevne system kan imidlertid gøres mere gennemskuelig ved at sammenstrække alle konstanterne (k_i ; V_i ; p_i), idet de alle indgår i systemet på samme måde (nemlig som konstanter). Resultatet bliver følgende, idet konstanterne benævnes K_i :

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{V_1(t)}{K_1} - \frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{x_1}} \quad (5.9)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{x_1}} - \frac{V_4}{1 + \frac{K_5}{x_3} + \frac{K_6}{x_2} + \frac{K_7}{x_3 x_2}} \quad (5.10)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = \frac{V_3}{K_4} - \frac{V_4}{1 + \frac{K_5}{x_3} + \frac{K_6}{x_2} + \frac{K_7}{x_3 x_2}} \quad (5.11)$$

$$\frac{dx_4}{dt} = \frac{V_4}{1 + \frac{K_5}{x_3} + \frac{K_6}{x_2} + \frac{K_7}{x_3 x_2}} \quad (5.12)$$

Lader vi nu $\underline{x} = (x_1, x_2, x_3, x_4)$, $\underline{x}' = (x'_1, x'_2, x'_3, x'_4)$ og \underline{f} betegne de fire funktioner på højresiderne af lighedstegnene kan systemet på kort form opskrives vektor differentialligningen:

$$\underline{x}' = \underline{f}(t, \underline{x})$$

Det ses at systemet er sædvanligt (eller ordinært), idet der kun indgår een uafhængig variabel t , mens resten \underline{x} er afhængige.

Endvidere at det er et 1.ordens system hvor der kun indgår den 1. afledede af funktionen i ligningerne. Systemet er ikke-lineært, da der i ligningerne indgår produkter, mellem de afhængige variable.

5.2 Eksistens og eentydighed

Til et system af ovennævnte type kendes, der ingen generel, analytisk løsningform. Vi må derfor løse systemet med numeriske metoder. Vi kender begyndelsestilstanden, (t_0, \underline{x}_0) , og vi har fastlagt en række regler (differentialligninger) for systemets videre udvikling. Men før vi kan gå igang med at løse systemet må vi overbevise os om, at der eksisterer løsninger til netop det sæt af differentialligninger vi er fremkommet med. I modsat fald vil de numeriske metoder, vi anvender returnere tal helt uden mening for vores problem. For uden eksistensen af løsninger har vi også brug for at fastlægge eksistensen af en entydig løsning når systemets begyndelsestilstand er kendt. Vi kan her hjælpes af sætningen for eksistens og eentydighed for sædvanlige differentialligninger af 1. orden.

Sætningen for eksistens og eentydighed

Når $\underline{f}(t, \underline{x}) : \Omega \rightarrow V$, ($V = (R^k/C^k)$) er kontinuert på en åben mængde Ω i $R \times V$ og lokalt opfylder en Lipschitz betingelse, da findes der for ethvert punkt $(t_0, \underline{x}_0) \in \Omega$ en og kun en maksimal løsning $\phi : J \rightarrow V$ til differentialligningen

$$\frac{d\underline{x}}{dt} = \underline{f}(t, \underline{x})$$

for hvilken, $t_0 \in J$ og $\phi(t_0) = \underline{x}_0$.

slut

Lipschitz-betingelse

En Lipschitz-betingelse kan nærmere karakteriseres ved

Lad Ω være en åben delmængde af $R \times V$. ($V = (R^k/C^k)$).

En funktion $\underline{f} : \Omega \rightarrow V$ siges at opfylde en Lipschitz-betingelse i en delmængde Ξ af Ω , hvis der findes et $C \geq 0$, så at

$$\|\underline{f}(t, \underline{x}_1) - \underline{f}(t, \underline{x}_2)\| \leq C\|\underline{x}_1 - \underline{x}_2\|, \forall (t, \underline{x}_1), (t, \underline{x}_2) \in \Xi$$

Funktionen \underline{f} siges at opfylde en lokal Lipschitz - betingelse i Ξ , hvis der for ethvert $(t_0, \underline{x}_0) \in \Xi$ findes en omegn, hvori \underline{f} opfylder en Lipschitz - betingelse.

En tilstrækkelig betingelse for at \underline{f} lokalt opfylder en Lipschitz - betingelse i Ω er at

1) \underline{f} er kontinuert

og 2) at \underline{f} har kontinuerte partielle afledede efter \underline{x} i Ω .

slut

Som det fremgår af de her to nævnte sætninger skal vi undersøge om vores system lokalt opfylder en Lipschitz betingelse før vi kan gå over til en numerisk løsningsmetode. Det er tilstrækkeligt at undersøge om 1). \underline{f} er kontinuert og om 2). \underline{f} har kontinuerte partielle afledede efter \underline{x} .

5.2.1 Kontinuitet

Som eksempel tages f_1 :

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{V_1}{K_1} - \frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{x_1}}$$

Det kritiske punkt for kontinuitet i ovenstående ligning er nævneren i det sidste led. Da alle de indgående konstanter er positive ses det at f_1

er kontinuert, hvis det kan godtgøres at nævneren ikke skifter fortegn ved varierende værdier af x_1 . Da alle de afhængige variable, \underline{x} , i dette system modellerer koncentrationer, der ikke kan være negative, kan vi tillade os at forudsætte udgangsbetingelsen, $(t_0, \underline{x}(t_0))$, hvor $x_i(t_0) \geq 0, i = 1, 2, 3, 4$.¹ Herefter ses det at x_1 , ikke kan blive negativ, da

$$\frac{V_1}{K_1} - \frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{x_1}} \rightarrow \frac{V_1}{K_1}, \text{ for } x_1 \rightarrow 0$$

Med andre ord vil ovenstående ligning sikre mod at x_1 bliver negativ. Samlet ses det at f_1 er kontinuert, under den rimelige forudsætning at $x_1(t_0) \geq 0$. De samme argumenter kan gennemføres for funktionerne f_2, f_3, f_4 .

5.2.2 Partielle afledede

Som eksempel på de kontinuerede partielle afledede anvendes her funktionen f_2 :

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{x_1}} - \frac{V_4}{1 + \frac{K_5}{x_3} + \frac{K_6}{x_2} + \frac{K_7}{x_3 x_2}}$$

Alle f_2 's partielle afledede efter \underline{x} skal være kontinuerede. Vi differentierer først efter x_1 . Herved holdes x_2, x_3, x_4 konstante hvorved det andet led i ovenstående udtryk forsvinder ved differentiationen. Tilbage bliver at differentiere det første led. Ved følgende substitutioner $a = V_2, b = 1 + K_2$ og $c = K_3$, fås udtrykket

$$\frac{a}{b + \frac{c}{x_1}}$$

Ved at differentiere dette udtryk fås resultatet:

$$\frac{\partial f_2}{\partial x_1} = \frac{ac}{(bx_1 + c)^2}$$

¹I de simuleringer af systemet, vi faktisk foretager er de afhængige variable, \underline{x} , alle lig 0, som udgangsbetingelse. I brøken $\frac{K_3}{x_1}$ er det naturligvis ikke tilladt at have x_1 lig med nul, derfor ganges ligningen igennem med x_1 ved den numeriske løsning af systemet. Det er imidlertid lettere i analysen at anvende det her anvendte udtryk.

Det ses at tælleren er en positiv konstant, mens nævneren altid vil være positiv. Derfor er den partielle afledede kontinuert.

Ved differentiation af f_2 efter henholdsvis x_2, x_3, x_4 vil første led af f_2 være en konstant, der forsvinder ved differentiation. Det andet led vil være af samme generelle form som ved differentiation efter x_1 . Alle f_2 's partielle afledede efter \underline{x} vil således være kontinuerte. Den samme argumentation kan fremføres for f_1, f_3 og f_4 . Det er således klart at vores system lokalt opfylder en Lipschitz betingelse under antagelse af at $x_i(t_0) \geq 0, i = 1, 2, 3, 4$.

5.3 Numerisk løsning

Den numeriske løsning til et differentiaalligningssystem er en tilnærmelse til den analytiske løsning. Vi anvender en 4. ordens Runge-Kutta metode til løsningen af vores system. Dette er en differens metode, hvor løsningen beregnes ved et antal diskrete punkter. Beregningen af punktet til tiden $t_i, (\underline{x}_i)$, sker på baggrund af den beregnede værdi af punktet til tiden $t_{i-1}, (\underline{x}_{i-1})$. Løsningen udvikles sekventielt med udgangspunkt i begyndelsesværdien til tiden $t_0, (\underline{x}_{t_0})$.² Afstanden mellem t_i og t_{i+1} kaldes integrationskridtet og benævnes med h . Integrationskridtet kan være af fast størrelse i hvilket tilfælde, der gælder at $t_{i+1} = t_i + h$, men kan også være at varierende størrelse i hvilket tilfælde, der gælder at $t_{i+1} = t_i + h_i$.

5.3.1 4.ordens Runge-Kutta

I en 4.ordens Runge-Kutta beregnes værdien i hvert nyt punkt som et vægtet gennemsnit mellem 4 beregninger, k_i . For fast integrationskridt, h , ser algoritmen således ud:

$$\underline{x}_{n+1} = \underline{x}_n + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)$$

hvor

$$k_1 = h\underline{f}(t_n, \underline{x}_n)$$

² $(\underline{x}_{t_0} = \underline{x}_0)$.

$$\mathbf{k}_2 = h\mathbf{f}(t_n + \frac{h}{2}, \mathbf{x}_n + \frac{1}{2}\mathbf{k}_1)$$

$$\mathbf{k}_3 = h\mathbf{f}(t_n + \frac{h}{2}, \mathbf{x}_n + \frac{1}{2}\mathbf{k}_2)$$

$$\mathbf{k}_4 = h\mathbf{f}(t_n + h, \mathbf{x}_n + \mathbf{k}_3)$$

5.3.2 Fejlkilder

Ved numeriske beregninger er den fremkomne løsning udsat for forskellige fejlkilder. Her skal nævnes 2.

Afrundingsfejlen (round off error), der skyldes at beregningerne foretages med en endelig nøjagtighed.

1 eksempel

Denne fejlkilde er maskinspecifik, men kan illustreres med et eksempel fra en lommeregner (HP 32s):

$$\left(\frac{1}{3} + \frac{1}{3}\right) - \frac{2}{3} = -10^{-12}$$

Programmet, der anvendes til at simulere vores model er skrevet i Turbo Pascal. Uden numerisk coprocessor arbejder programmet med 11 betydende cifre, mens programmet med numerisk coprocessor arbejder med 16 betydende cifre. Afrundingen foregår som bekendt på det sidste ciffer og fejlsens størrelsesorden på et konkret tal, x , er derfor henholdsvis $x * 10^{-11}$ og $x * 10^{-16}$.

Tilnærmelsesfejlen (truncation error), som skyldes at det egentlige problem, vi ønsker at løse, erstattes af et andet problem, hvis løsning ikke er nøjagtig den samme. Med vores system er vi ikke istand til at finde den analytiske løsning. Derfor vælger vi en anden metode, som giver os en tilnærmet løsning. Afvigelsen mellem den analytiske løsning og den numeriske løsning i et givet punkt er tilnærmelsesfejlen.³ Den benævnes også ofte som *diskretiseringsfejlen* for at understrege at den

³Når vi i dette tilfælde forudsætter løsningen beregnet på en maskine med uendelig nøjagtighed

ofte fremkommer ved at gøre et uendeligt problem endeligt (diskret). Tilnærmelsesfejls størrelse varierer fra metode til metode og er for en 4.ordens Runge-Kutta en funktion af integrationsskridtet, h . Fejlen for det enkelte integrationsskridt opgives til at være $O(h^5)$ (ref.34), hvilket er godt set i forhold til Eulers metode, der opgives til $O(h^2)$ eller 2. ordens Runge Kutta, der opgives til $O(h^3)$. Prisen for denne nøjagtighed er 4 beregninger pr. integrationsskridt, mod Eulers 1 beregning pr. skridt.

Begge de her nævnte fejlkilder kan synes at give udslag af så ringe en størrelse at man kan se bort fra dem. Dette er imidlertid ikke tilfældet. Ved differens metoder foretages mange successive beregninger, der som tidligere nævnt bygger på hinanden. Man kan derfor opleve at *fejlene ophober sig* (error propagation) og bliver til størrelser af betydeligt omfang. Det er derfor nødvendigt at foretage en konkret fejlvurdering ved anvendelsen af en bestemt metode til et bestemt problem.

2 eksempel

Hvis man med et Turbo Pascal program på en datamat uden numerisk coprocessor summerer tallet 0.1 120000 gange, skulle man vente at få resultatet, 12000. Resultatet bliver imidlertid 11999.999476, hvilket giver en fejl på 0.000524. Ved de fleste problemer (herunder vores) vil man kunne se bort fra fejl af denne størrelse. Men i nogle tilfælde kan det have betydning.

5.3.3 Konvergens

Ved numerisk analyse er det naturligvis af interesse at finde ud af hvor tæt på den analytiske løsning vi kan komme. Vi ønsker at vide om vores numerisk løsning konvergerer. Ved 4. ordens Runge Kutta afhænger dette forhold af problemets beskaffenhed og af valget af integrationsskridtets størrelse. *Ved konvergens vil vi forstå at en hvilken*

som helst ønsket nøjagtighed⁴ kan opnås for ethvert problem, der opfylder Lipschitz betingelsen ved at vælge et tilstrækkeligt lille integrationssskridt. (ref.33).

Ved løsningen af vores differentiaallignings model kan vi altså komme vilkårligt tæt på den analytiske løsning ved at anvende meget små integrationssskridt. Der er dog i praksis en nedre grænse for konvergens, som bestemmes af afrundingsfejlen. Mindre integrationssskridt medfører flere beregninger, som igen medfører flere afrundingsfejl, der kan ophobes og fjerne den numeriske løsning fra den analytiske løsning.

5.3.4 valg af skridtlængde

Vores model bygger på en lang række antagelser, der betyder at store krav til nøjagtigheden er uden reelt indhold. Modellen bliver anvendt på 2 måder.

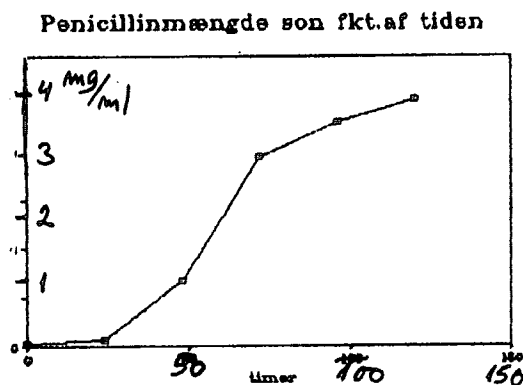
For det første giver den et skøn over hvilke værdier, der kan forventes at blive opnået for specielt dannelsen af Penicillin G ved et givet valg af parametrene. For disse absolutte talstørrelser er det tilstrækkeligt med en nøjagtighed på de 2 første cifre.

For det andet anvendes modellen til sensitivitets undersøgelser af de forskellige komponenters indbyrdes indflydelse. Disse undersøgelser sker ved hjælp af små perturbationer af talstørrelser (1 procent eller 1 promille), hvorefter de relative ændringer af koncentrationerne måles. Ved disse relative undersøgelser har vi brug for en større nøjagtighed, idet nogle af ændringerne kan være små. Vi ønsker en nøjagtighed her på 5. cifre.

Kravet om nøjagtighed motiverer til valg af små værdier for integrationssskridtet. Men ved den praktiske anvendelse af modellen, hvor virkningen af mange parametres indflydelse skal fastlægges gennem separate kørsler, er det vigtigt at opnå en hurtig afviklingshastighed. Dette er ensbetydende med færre beregninger og dermed med ønsket om et større integrationssskridt.

Imellem disse interesser skal integrationssskridtet fastlægges. I praksis gøres dette ved at begynde med et stort integrationssskridt og derefter afvikle kørsler med halveringer af skridtlængden indtil den ønskede

⁴Når vi forudsætter løsningen beregnet på en maskine med uendelig nøjagtighed

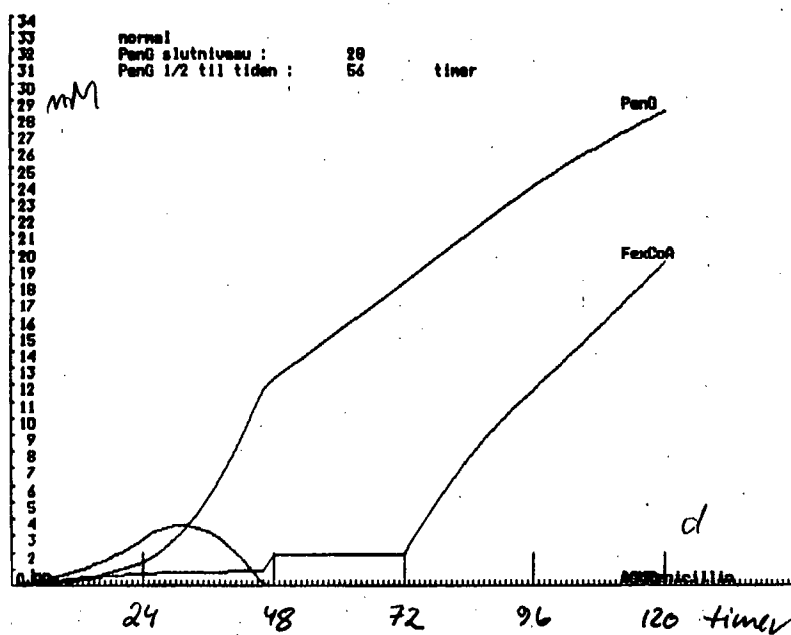


Figur 5.1: Koncentrationen af Penicillin G (ret 9)

nøjagtighed er opnået. Dette er tilfældet, når 2 på hinanden følgende kørsler med henholdsvis skridtlængden h og $\frac{h}{2}$ resulterer i de samme tal på de betydende cifres plads.

5.4 Vurdering af simuleringer fra modellen

I det følgende sammenholdes forskellige kørsler med simuleringssprogrammet med det, der foreligger i litteraturen for dannelse af penicillin. Kurven på figur 5.1 ses at have sigmoid form med et slutniveau på omkring 4 mg penicillin/ml fermenteringsvolumen. Dette svarer til ca. 12 mmol/l. I vores model ser vi imidlertid bort fra transport af penicillin over cellemembranen, dvs. vi antager reelt at volumen intracel-



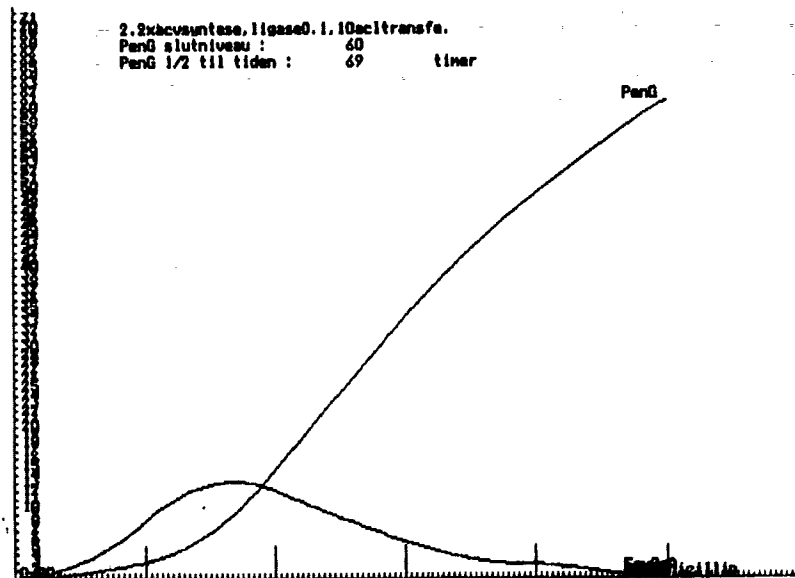
Figur 5.2: model kørsel

lulært er den samme som fermenteringsvolumen. Da cellemassen udgør 10 - 15 % af fermenteringsvolumen må vi regne med, et slutniveau på lidt under 100mM. Ved at betragte den kurve (figur 5.2), som simuleringen giver uden ændring ses at forløbet ikke helt passer med den sigmoide form og slutniveauet er lidt lavt. Hvis man f.eks. ganger acvsynthetasen med en faktor 2.2 eller 2.1 fås en sigmoid kurve med et passende slutniveau. Der henvises iøvrigt til disketten, idet læseren så selv kan afprøve resultatet af forskellige ændringer. Der skal dog knyttes følgende kommentarer til:

Niveauet af acvsynthetasen forekommer lidt lavt. Denne aktivitet er lånt fra en anden organisme og det kunne tyde på at den i *Penicillium chrysogenum* har en højere værdi.

Endelig bør det bemærkes, at der i litteraturen er en forskel på de data, der er målt på niveauet af acyltransferase. Den værdi der er medtaget i modellen er den laveste (ref.9). Ved at sætte faktoren (se brugervejledningen) til 10 på acyltransferase fås et forløb, der svarer til (ref.8).

Endelig mener Henrik Møllgaard, at niveauet på ligase er meget højt,



Figur 5.3: Koncentrationen af Penicillin G

hvorfor en faktor på 0.1 ikke vil være urealistisk. Ved at benytte ovenstående ændring fås et forløb med en sigmoid kurve med et slutniveau på $60mM$ (se figur 5.3).

Kapitel 6

Metabolsk kontrolteori

6.1 Kontrolteori

Kilder til dette afsnit er (ref.19,22,23,29). Biologiske organismer benyttes idag i stor stil til produktion af forskellige organiske stoffer. En sådan biologisk organisme kan f.eks. være en Penicillin svamp, der fermenteres med det formål at få dannet penicillin. Man er naturligvis interesseret i at øge udbyttet af denne metabolit og i forbindelse med forskellige gensplejsningsteknikker er man istand til at regulere svampens syntese af f.eks. et specielt enzym. Men før dette arbejde indledes vil det være værdifuldt med viden om de enkelte enzyms samspil i den metabolske syntesevej. Et redskab hertil er den metabolske kontrolteori, idet man ud fra denne kan give kvalificerede bud på hvilke faktorer, der er regulerende i den pågældende biosyntese. Nødvendigheden af en sådan teori beror på, at der i et biokemisk system er mange faktorer, der kan have indflydelse på dannelsen af det aktuelle produkt. Studiet af biokemiske reaktioner indeholder traditionelt et kvalitativt aspekt. Den kvalitative beskrivelse af biokemiske systemer indeholder oplysninger om den metabolske syntesevej - dvs. hvilke metabolitter der dannes, hvilke reaktioner der foregår, og hvilke enzymer der katalyserer disse reaktioner. Den kvantitative del kommer fra viden om de enkelte enzyms kinetik, eventuelle aktivatorer eller inhibitorer, samt koncentrationer af de indgående stoffer. Kontrolteorien forsøger så at kombinere de kvalitative træk med de kvantitative. Som tidligere nævnt i projektet er det et vigtigt punkt i undersøgelsen af biologiske systemer kun

at variere en faktor og holde alle andre konstante . På denne måde kan man slutte at andre ændringer i systemet må være afstedkommet af denne ene variation. F.eks. kan man variere koncentrationen af et enzym og undersøge hvilke ændringer der så sker i resten af systemet - hvor meget ændres f.eks. dannelseshastigheden af produktet. Systemet må antages at være i steady state - dvs. at koncentrationen af de intermediære metabolitter er konstant. Ligeledes må både det volumen, hvor reaktionen foregår, og enzymkoncentrationerne være konstant. For at undersøge et system er det vigtigt, at identificere parametre og variable. Parametre er konstanter så som Michaelis konstanter, hastighedskonstanter, enzymkoncentrationer (under forudsætning af at de er konstante) etc. De variable er koncentrationsniveauer af de indgående metabolitter, der dog når der er steady state må ligge på en konstant værdi. Det der binder systemet sammen er disse metabolit pools.

6.2 Generel definition af kontrolkoefficienter

Alle kontrolkoefficienter dannes på baggrund af at een parameter i systemet ændres, for at undersøge indflydelsen af denne ændring på en anden faktor i systemet. Denne faktor kan være fluxen eller hastigheden af et enzym. Parametren kan f.eks. være et enzym eller substratkoncentration.

Antag, at der ændres på en parameter p , som vil have indflydelse på en faktor A i systemet. p ændres til p' , dvs. ændringen er $\Delta p = p' - p$. Nu er det muligt at se en ændring på den ønskede faktor fra A til A' , dvs. $\Delta A = A' - A$. Ved at danne forholdet mellem de relative ændringer - dvs

$$\frac{\frac{\Delta A}{A}}{\frac{\Delta p}{p}}$$

fås et dimensionsløst forhold, som afspejler hvor stor ændring der er i den betragtede faktor, som følge af parameter ændringen. Ved at foretage en grænseovergang til differentialer fås udtrykket

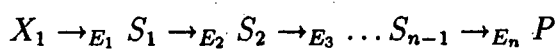
$$B = \frac{dA}{dp} \cdot \frac{p}{A}$$

hvor B defineres som en kontrolkoefficient. I praksis kan denne kontrolkoefficient ikke bestemmes som en differentialkvotient, hvorfor man må benytte små ændringer til at tilnærme den

$$\frac{dA}{dp} \approx \frac{\Delta A}{\Delta p}$$

6.3 Definition af de enkelte kontrolkoefficienter

Givet et metabolsk system, som består af n enzymer, $n-1$ metabolitter, et udgangsstof X_1 og et produkt P .



Det antages at processen foregår i et konstant volumen V uden nogen form for kompartmentering og med konstant enzym niveau. Koncentrationer af de indgående elementer i systemet er i det følgende angivet med små bogstaver. Systemets parametre er Michaelis konstanter, fastholdte enzymkoncentrationer, ydre effektorer etc. Systemets variable er koncentrationerne af metabolitter. Det antages at systemet er i steady state, der defineres som en tilstand hvor tilgang til en given pool er den samme som afgang. Fluxen gennem systemet defineres som:

$$F = \left(\frac{dP}{dt} \right)_{ss}$$

Hvor ss refererer til at det er fluxen i en steady state.

6.3.1 Systemkoefficienter

Systemkoefficienter, er koefficienter der kan sige noget om en parameters indflydelse på hele systemet, hvilket i praksis vil sige parametrens indflydelse på fluxen F gennem systemet.

Den kontrol som de enkelte parametre udøver på fluxen F kaldes fluxkontrolkoefficienten og betegnes Z_p , hvor index p angiver den pågældende parameter:

$$Z_p = \frac{P}{F} \cdot \left(\frac{dF}{dp} \right)_{ss}$$

hvor det forudsættes at alle andre parametre end p holdes konstant. Efter denne ændring af p vil systemet bevæge sig over i en ny steady state, hvor dF udtrykker denne ændring.

I det tilfælde, hvor p er en enzymkoncentration defineres Sensitivitetskoefficienten ved:

$$Z_i = \frac{e_i}{F} \left(\frac{dF}{de_i} \right)_{ss} \quad i = 1, \dots, n$$

Et enzym siges at have fuld kontrol eller være en flaskehals hvis

$$\frac{\frac{dF}{F}}{\frac{de}{e}} = Z \rightarrow 1 \quad (6.1)$$

hvilket svarer til 100% regulering.

For sensitivitetskoefficienter gælder følgende relation

$$\sum_{i=1}^n Z_i = 1 \quad (6.2)$$

Bevis: Hvis alle enzymkoncentrationer øges samtidig med en faktor γ , vil aktiviteten af enzymerne og dermed fluxen F gennem systemet øges med den samme faktor (det bemærkes at faktoren γ , af hensyn til tilnærmelsen til differentialet skal være lille) og der gælder:

$$\frac{\Delta F}{F} = \gamma \quad (6.3)$$

Hver enkelt ændring i en enzym koncentration vil afstedkomme en ændring i den totale flux dvs.

$$\frac{\Delta F}{F} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\Delta F}{F}\right)_i \quad (6.4)$$

For det i 'te enzym er sensitiviteten:

$$\left(\frac{\Delta F}{F}\right)_i = Z_i \quad i = 1, \dots, n \quad (6.5)$$

↓

$$\left(\frac{\Delta F}{F}\right)_i = Z_i \cdot \frac{\Delta e_i}{e_i} \quad i = 1, \dots, n \quad (6.6)$$

heraf fås

$$\gamma = Z_1 \cdot \frac{de_1}{e_1} + Z_2 \cdot \frac{de_2}{e_2} + \dots + Z_n \cdot \frac{de_n}{e_n}$$

hvilket, da $\frac{de_i}{e_i} = \gamma$, giver

$$\gamma = \gamma(Z_1 + Z_2 + \dots + Z_n)$$

hvoraf fås

$$(Z_1 + Z_2 + \dots + Z_n) = 1$$

eller

$$\sum_{i=1}^n Z_i = 1$$

6.3.2 Lokale koefficienter

I modsætning til systemkoefficienterne beskriver de lokale koefficienter egenskaberne ved de isolerede reaktioner - dvs. enkelte reaktioner, der er isoleret fra resten af systemet. I det følgende benyttes betegnelsen v_i som reaktionshastigheden af den i 'te reaktion, dvs. den reaktion hvor substrat S_i dannes.

Hvis en af de variable substratkoncentrationer ændres vil det umiddelbart give en ændring i den relative hastighed hvor det pågældende substrat indgår. Dette leder til følgende definition: elasticitet for enzym e_i mht substrat S defineres som

$$\epsilon_S^{v_i} = \frac{S}{v_i} \cdot \left(\frac{dv_i}{dS} \right)_{ss}$$

Man kan vise at der gælder følgende (ref.29)

$$\sum_{i=1}^n Z_i \cdot \epsilon_S^{v_i} = 0 \quad (6.7)$$

dvs.

$$Z_1 \cdot \epsilon_S^{v_1} + Z_2 \cdot \epsilon_S^{v_2} + \dots + Z_n \cdot \epsilon_S^{v_n} = 0$$

Hvis man står med et system med en lineær syntesevej med n reaktioner fås følgende ligninger, der kan undersøges eksperimentelt

$$\sum_{i=1}^n Z_i = 1 \quad (6.8)$$

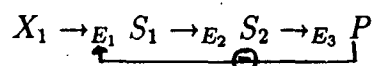
som udtrykker at summen af sensitivitetskoefficienterne er lig 1 og $n-1$ ligninger af typen

$$\sum_{i=1}^n Z_i \cdot \epsilon_S^{v_i} = 0 \quad (6.9)$$

Ved at løse de n lineært uafhængige ligninger vil man få et udtryk for hver fluxkontrol koefficient eller sensitivitets koefficient som funktion af alle elasticitetskoefficienter. Samtidig kan fluxkontrolkoefficienter give værdifulde oplysninger om systemet, ved at benytte dem på de i systemet indgående parametre.

6.4 Kontrolteori anvendt på penicilins biosyntese

Syntesevejen til penicillin kan, hvis man ser bort fra ligasens¹ indflydelse, opskrives som et lineært system



hvor der er indtegnet en feedbacksløjfe. Imidlertid findes der ingen data vedrørende denne mekanisme og vi har set os nødsaget til at se bort fra den her, så systemet bliver



hvor X er udgangsstofferne, S_1 er ACV, S_2 er Isopenicillin, og P er Penicillin. Og enzymerne: E_1 er ACVsynthetase, E_2 er Cyklase og E_3 er Acyltransferase. Det antages at systemet er i steady state, og enzymniveauerne holdes konstant.

6.5 Beregning af sensitivitetskoefficienter

Vi har valgt at beregne sensitivitetskoefficienter i tidsintervallet fra 50 til 52 timer, da der (tilnærmelsesvist) er steady state i dette område, hvilket kræves for at kunne beregne sensitivitets koefficienter. Først løses systemet, med de normale tal², fra 0 til 50 timer, og bagefter fra 50 til 52 timer. Herefter ændres een enzymkoncentration med en lille faktor og systemet køres igen fra 50 til 52 timer, med udgangspunkt i den første kørsel fra 0 til 50 timer. Da vi kan aflæse hældningen af pool ændringerne på skærmen, kan vi under kørslen kontrolere, at der indstiller sig ligevægt i løbet af de to timer. Det viste sig at ligevægten

¹vi har valgt at se bort fra ligasens indflydelse, under den antagelse at dannelsen af fexCoA kan styres ved tilsætning af fex, således at ligase ikke kan være en flaskehals.

²dvs. de tal der er indlagt i den nuværende model, bortset fra, at poolen af fexCoa og enzymniveauerne er sat konstant i det tidsinterval vi undersøger (graf findes i appendix B)

indstillede sig i løbet af ca. en halv time (systemtid), så det er rimeligt at stoppe efter 52 timer. Ligningen for sensitivitetskoefficienter er:

$$Z = \frac{E}{F} \cdot \frac{dF}{dE}$$

hvor der er tale om konstante enzymkoncentrationer, som i det område vi undersøger. Da E ændres ved at gange en lille faktor på V_{max} - vi har konsekvent valgt 1% - og E skal forstås som den oprindelige enzymaktivitet fås følgende:

$$\frac{E}{\Delta E} = \frac{1 \cdot V_{max}}{(1.01 - 1.00) \cdot V_{max}} = 100$$

F er den oprindelige flux gennem systemet og kan aflæses direkte af den første kørsel fra 50 til 52 timer, som differentialkvotienten til ændringen i PenG poolen til tiden 52 timer. ΔF er da lig med den nye flux minus F (hvor den nye flux aflæses som differentilkvotienten til ændringen i PenG poolen forkørslen med den ændrede enzymaktivitet). Dette giver følgende koefficienter³:

For acvsynthetasen : $Z = 0.9999$

for cyklase : $Z = 0$

for acyltransferase : $Z = 0,0001$

Dette viser meget klart at acvsynthetasen er en flaskehals i det system, vi har stillet op, med de gældende forudsætninger.

6.5.1 Beregning af fluxkontrolkoefficienter

Fluxkontrolkoefficienterne beregnes af formlen:

$$Z_p = \frac{P}{F} \cdot \left(\frac{dF}{dp}\right)_{ss} \quad (6.10)$$

hvor p er substratkoncentrationer og fluxen beregnes på samme måde, som for sensitivitetskoefficienter, hvilket giver følgende resultater⁴:

For aminoadipin: $Z = 0.118$

for cystin : $Z = 0.044$

³I appendix B ses de tal der ligger til grund for beregningerne

⁴I appendix B ses de tal der ligger til grund for beregningerne

for valin : $Z = 0.118$

for ATP : $Z = 0.356$

Da faktoren $\frac{P}{F}$ i udtrykket for sensitivitetskoefficienten er konstant for de fire beregninger er det dF der er bestemmende for størrelsen af sensitivitetskoefficienten. Heraf ses at en ændring i ATP koncentrationen giver størst indvirkning på fluxen.

6.5.2 Sammenhængen mellem sensitivitets og elasticitetskoefficienter

Fra afsnittet om lokale koefficienter fås tre sæt af ligninger, der kan løses for systemet:

$$Z_{e_1} \cdot \epsilon_{S_1}^{v_1} + Z_{e_2} \cdot \epsilon_{S_1}^{v_2} + Z_{e_3} \cdot \epsilon_{S_1}^{v_3} = 0$$

$$Z_{e_1} \cdot \epsilon_{S_2}^{v_1} + Z_{e_2} \cdot \epsilon_{S_2}^{v_2} + Z_{e_3} \cdot \epsilon_{S_2}^{v_3} = 0$$

$$Z_{e_1} \cdot \epsilon_{S_3}^{v_1} + Z_{e_2} \cdot \epsilon_{S_3}^{v_2} + Z_{e_3} \cdot \epsilon_{S_3}^{v_3} = 0$$

Sensivitetskoefficienterne er de som tidligere er bestemt. Elasticitetskoefficienterne fra 1. led i ovenstående ligninger kan findes ved hjælp af udtrykket:

$$\epsilon_{S_i}^{v_1} = \frac{S_i}{v_1} \cdot \left(\frac{dv_1}{dS_i} \right)_{ss} \quad (6.11)$$

og de kan ved følgende overvejelser vises at være 0. Små ændringer i S_1 giver ingen ændring i v_1 , da S_1 ikke indgår i hastighedsudtrykket. På samme måde ses det, at $\epsilon_{S_2}^{v_1}$ og $\epsilon_{S_3}^{v_1}$ er lig 0. Da Z_{e_1} er meget tæt på 1, og da hhv. Z_{e_2} og Z_{e_3} lig 0, kan således uden yderligere overvejelser siges at ligningen er opfyldt. De resterende elasticitetskoefficienter

$$\epsilon_{S_i}^{v_2} = \frac{S_i}{v_2} \cdot \left(\frac{dv_2}{dS_i} \right)_{ss}$$

og

$$\epsilon_{S_i}^{v_3} = \frac{S_i}{v_2} \cdot \left(\frac{dv_2}{dS_i} \right)_{ss}$$

findes ved at differentiere udtrykkene for v_1 , mht. S_1 .

6.6 Analyse

I forbindelse med anvendelsen af kontrolteorien vil vi undersøge, hvordan vores system af differentiallyigninger ændrer sig under de antagelser, som kontrolteorien bygger på. Disse antagelser er som nævnt, at systemet er i steady state og alle variable er steady state værdier. I afsnittet om simulation af modellen opstillede vi differentiallyigninger, hvor konstanterne var sammensat, vi fandt at:

$$\frac{dX_1}{dt} = \frac{V_1}{K_1} - \frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{X_1}}$$

$$\frac{dX_2}{dt} = \frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{X_1}} - \frac{V_4}{1 + K_5 + \frac{K_6}{X_2}}$$

$$\frac{dX_4}{dt} = \frac{V_4}{1 + K_5 + \frac{K_6}{X_2}}$$

hvor vi ser bort fra $\frac{dX_3}{dt}$ da vi i kontrolteorien kun betragter en lineær syntesevej. Koncentrationen af X_3 holdes da konstant. Steady state dvs. $\frac{dX_i}{dt} = 0$ anvendt på dette system giver, hvis V_1, V_2, V_3 antages konstante, $i = 1, 2$:

$$\frac{V_1}{K_1} = \frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{X_1}}$$

$$\frac{V_2}{1 + K_2 + \frac{K_3}{X_1}} = \frac{V_4}{1 + K_5 + \frac{K_6}{X_2}}$$

hvilket giver at:

$$\frac{dX_4}{dt} = \frac{V_1}{K_1}$$

Dette resultat stemmer godt overens med opfattelsen af steady state, idet indstrømningshastigheden er det samme, som udstrømningshastigheden. Ovenstående resultat viser klart, de eneste faktorer, der kan have

indflydelse på fluxen i steady state er V_1 og K_1 . Ved hjælp af kontrolteorien fandt vi, at det første enzym, hvis koncentration indgår i V_1 , var den regulerende faktor med 99.99%.

Samtidig ses, at hvis konstanten K_1 kan gøres mindre vil fluxen forøges. Denne analyse, viser altså, at kravet om steady state gør det første trin til en begrænsende faktor. En mere dybtgående analyse af systemet kræver altså at man undersøger systemet, når det ikke er i steady state. Dette indebærer imidlertid et problem, idet mange af de konstanter der anvendes i modellen er målt under en steady state antagelse. Kontrolteorien, som den er opstillet, med de anvendte antagelser, behøver dog ikke nødvendigvis at blive forkastet, idet det med den metaboliske kontrolteori oprindeligt var hensigten at man skulle måle de forskellige koefficienter direkte og ikke som nu anvende en matematisk model. Men hvis antagelsen om at systemet virkelig er i steady state gælder og der er tale om Michaelis Menten kinetik, er det første trin altså en flaskehals.

Kapitel 7

Sammenfatning

Vi har i dette projekt beskrevet arbejdet med en række problemstillinger i forbindelse med matematisk modelbygning for en biosyntese. Den model, vi opstiller er så detaljeret, som vi mener det er muligt ud fra foreliggende viden om syntesen. Modellen er sådan indrettet, at brugeren (NOVO v. Henrik Møllgaard) direkte kan ændre på forskellige værdier og se hvilken ændring de afstedkommer.

Om modellen er i overensstemmelse med virkeligheden, har vi ikke grundlag for at afgøre. På trods af dette mener vi, at det arbejde vi har gjort er en del af en afklaringsprocess omkring penicillins biosyntese, og kan bruges til en videre undersøgelse af denne. En videre undersøgelse må bygge på en vurdering af de antagelser, vi har gjort og alternativer til disse.

Der er foretaget en række antagelser, som er af afgørende betydning for resultaterne, og som det vil være relevant at tage op. Specielt vil vi nævne antagelsen om, at processerne kan beskrives ved Michaelis-Menten kinetik, og den afgrænsning af systemet, der benyttes i modellen. Hvis man vælger at tro på de forudsætninger og antagelser, der ligger bag modellens kvalitative sammensætning udpeges med stor sikkerhed det første trin, ACV-syntetase trinnet, som flaskehalsen i biosyntesen. Det vil da være oplagt at fortsætte den videre undersøgelse alene omkring dette trin.

En mere detaljeret undersøgelse af kinetikken vil måske give bedre værdier for de kinetiske konstanter. I forbindelse med litteraturstudier

og samtaler med Henrik Møllgaard er vi stødt på den metabolske kontrolteori. Ved at anvende den på vores matematiske model giver den resultater, som kunne findes ligeså let ved en simpel analyse. Imidlertid er den metabolske kontrolteori tænkt som et redskab i forbindelse med konkrete målinger på biokemiske systemer og ikke specielt i forbindelse med modelanalyse. Alligevel har kontrolteorien været et udmærket redskab til at strukturere undersøgelsen af systemet, når det antages i steady state.

Appendiks A

brugervejledning

Det tilhørende program er udviklet specielt til den i rapporten omtalte model. Det er muligt at undersøge denne model med valg af forskellige parametre; men det er ikke muligt at ændre i modellen selv. Ved udviklingen af programmet er der taget visse hensyn til dets brugervenlighed, men det skal understreges at programmets primære formål har været at opfylde de behov, vi har haft for udviklingen af og kørsler med modellen (eller rettere de mange modeller, som den foreliggende blot er sidste udgave af). Programmet er således ikke fuldstændigt fejlrettet og forberedt på alle de (u)tænkelige situationer, det vil kunne komme ud for. Med disse besværgelser vil vi i det følgende give en vejledning i brugen af programmet.

A.1 Opstart

Den medfølgende diskette er en almindelig $5\frac{1}{4}$ tomme, 360 kB diskette til IBM-kompatible PC'ere. På disketten ligger kildeteksten til programmet og en kørsel af modellen med 'normale' parametre fra 0 til 120 timer. Desuden ligger 2 køreklare programmer, model87.exe og model.exe, der er beregnet til maskiner med og uden en 80*87 matematisk coprocessor. Er maskinen med en coprocessor startes programmet ved at skrive: **model87**, ellers skrives **model**. Programmet returnerer herefter med:

angiv drev og bibliotek: _ default = a:\data\

På denne forespørgsel er det muligt at angive stien til det bibliotek, hvor datafilerne skal samles. Trykkes blot retur vil stien blive 'a:\ data \ '. Ønskes der ingen speciel sti, kan man nøjes med at angive det drev, der ønskes anvendt, f.eks. 'c: \ ', hvis der er et pladelager (harddisk) på maskinen. ¹

¹Vi har indført denne facilitet specielt for at have en let måde at skille en bestemt serie kørsler fra andre ved at identificere dem med samme begyndelsesbogstaver. F.eks. kan 'a: \ data \ ilt ' bruges til at identificere kørsler, der specielt undersøger iltets indflydelse på den samlede syntese.

A.2 Menu

Programmet er menustyret og vil efter angivelsen af stien fremvise følgende skærbillede:

```
***** MENU *****
                                tryk på
kør modellen                      1
videre                           2

udskriv data                     3
indlæs tidligere kørsel         4

pools til grafen                5
tegn graf(er)                  6

slut                             10

***** tryk en tast*****
nuværende interval:  0.0 -  0.0
*****
stien : a:\data\
lagerplads til rådighed 87776 bytes
```

Ved valg af 1. **Kør modellen** påbegyndes en simulering, der i alle tilfælde starter til tiden 0. Denne simulering kan afbrydes på et hvilket som helst tidspunkt. Efter et sådant stop skal man vælge 2. **videre**, der herefter giver mulighed for at fortsætte simuleringen fra den sidste hele time af den tidligere kørsel. Skærbilledet fremviser også oplysning om hvor stort et interval, der indtil nu er beregnet.

Under simuleringen bliver der hver hele simuleringstime gemt talværdier for henholdsvis ACV, Isopenicillin, FexCoA og Penicillin G. Disse tal kan ved valg af 3. **Udskriv data** udskrives enten til skærmen, til en

fil eller til printer. Hvis en sådan kørsel er gemt på en fil, kan den altid senere hentes ind til nærmere undersøgelse eller som grundlag for videre kørsel. Dette gøres ved valg af 4. **Indlæs tidligere kørsel.**

Når der er genereret data eller indhentes data fra en tidligere kørsel, kan disse vises grafisk ved valg af 6. **Tegn graf(er).** Det er alene de 4 pools (ACV, Isopenicillin, FexCoA og Penicillin G), der kan fremstilles som grafer. Som udgangspunkt vil alle 4 blive udtegnede. Men ønsker man specielt at se en enkelt eller et udvalg af de 4 kan dette vælges ved 5. **Pools til grafen.** De udtegnede grafer skaleres automatisk, dog vil max værdien på y-aksen være 1. Hvis der vælges manuel skalering, kan ymax sættes til en valgfri størrelse. Dette anbefales specielt, hvis det ønskes at undersøge ACV eller Isopenicillin N.

Endelig kan programmet afbrydes ved valg af 10. **Slut.**

Foruden de her nævnte muligheder oplyses på skærbilledet om den sti, der er valgt og om den mængde internt arbejdslager, der er ledigt efter at programmet har taget den plads, det skal bruge. Programmet her kræver omkring 150 kB Ram for at kunne fungere. Tallet kan svinge noget i løbet af kørslerne.

A.3 1. Kør modellen

Ved valg af 1. **Kør modellen** skal en række spørgsmål besvares. Følgende viser disse spørgsmål med et muligt svar angivet. Tidsangivelser er altid i timer.

Integrationen begynder ved 0

Hvor skal den slutte? : 2

Juster modellens parametre ? (j/n) : n

med løbende udskrift af tallene ? (j/n) : j

skriv størrelsen af integrationsskridtet : 0.01

Svaret på første spørgsmål er ikke afgørende da kørsler, som nævnt kan stoppes på et vilkårligt tidspunkt. Der kan ikke i denne model simuleres til mere end 500 timer.

Størrelsen af integrationsskridtet afhænger af kravet til nøjagtighed og tidsforbrug på kørslen. Se særligt afsnit herom.

Ved dette eksempel justeres modellens parametre ikke, men vi vælger løbende udskrift af tallene. Skærbilledet vil herefter se således ud:

```
start 12 29 13
slut 12 30 03
fra 0.00 til 2.00 med skridt = 0.01
```

```
**modelkommentar*****
normal
```

```
**** substrat *** koncentration ***** hastighed ****
```

ACV	8.9989171506E-03	2.1524306164E-03
Isop	7.0760941092E-02	4.7518783472E-02
Fexcoa	7.2130175967E-02	4.1631044373E-02
PenG	3.3594084980E-03	4.6346114205E-03

Aminniveau	0.2649
Fexniveau	0.9584
Iltniveau	1.2559

```
Tiden 2.100000 Integrationen er slut.
```

```
*****
Tryk på s for at stoppe integrationen.
```

I øverste venstre hjørne angives simuleringens starttidspunkt og når kørslen er færdig skrives sluttidspunktet. I den mellemliggende tid vil tallene på skærmen angive simuleringens aktuelle tilstand. Hvis vi havde svaret 'n' til spørgsmålet om løbende udskrift af tallene, ville de 4 pools og de 3 niveauer (Aminniveau, Fexniveau og Iltniveau) ikke blive vist på skærmen. For en datamaskine er det tidskrævende at skrive tallene ud. Det tager ca. dobbelt så lang tid med løbende udskrift af tallene.

Simuleringen kan nu stoppe at 3 årsager. Den angivne sluttid kan være nået. Der er blevet trykket på 's' eller en af koncentrationerne har

været negativ. Dette sidste kan forekomme, hvis integrationskridtet har været for stort. I dette tilfælde vil tilnærmelsesfejlen bevirke at at en eller flere af de 4 pools er blevet negativ. Hverken modellen eller naturen er defineret for negative koncentrationer. Hvis integrationen er stoppet af denne årsag behøver dette ikke nødvendigvis at betyde at alle tallene i den pågældende simulering er forkerte. Modellens følsomhed over for integrationskridtets størrelse er forskellig afhængig af hvor på tidsaksen, man er og hvilke parametre, der er valgt. Programmet vil skære simuleringen af de 2 sidste timer væk og dermed gøre det muligt at fortsætte simuleringen med et mindre tidsskridt. Man bør dog i denne situation være særlig opmærksom på om kravene til nøjagtighed overholdes.

A.3.1 Videre

Fortsat kørsel med udgangspunkt i de indtil nu genererede talværdier opnås ved at vælge **2. videre**. Programmet vil her forespørge om de samme ting som beskrevet ovenfor med en enkelt undtagelse. Begyndelsestidspunktet er ikke 0, men den sidste hele (og godkendte) time fra en tidligere kørsel. Ved angivelse af et timetal større end begyndelsestidspunktet vil simuleringen fortsætte som før. Man kan imidlertid også angive et timetal mindre en begyndelsestidspunktet. Virkningen heraf er at bortsmide de opsamlede værdier fra det angivne tidspunkt og frem til 'begyndelsestidspunktet'. Denne facilitet kan med fordel anvendes, hvis der opstår tvivl om nøjagtigheden af integrationen i et bestemt tidsinterval og det derfor ønskes at foretage kørsler i dette interval med mindre integrationskridt. Eller hvis virkningen af en ændring i en parameter ønskes undersøgt på et bestemt tidspunkt i modelforløbet.

A.4 Juster modellens parametre (j/n) ?:

Modelkommentaren 'normal' i ovenstående udskrift af skærbilledet under en kørsel viser, at modellens parametre ikke har været justeret under pågældende kørsel.

Der gives mange muligheder for justering af parametrene og fælles for dem alle gælder, at det kan ske til et hvert tidspunkt af simuleringen. For at give et bedre indtryk af hvorledes den enkelte faktor eller konstant indgår i beregningerne vises først modellen, som den er indbygget i programmet. Nedenfor vises hvorledes hastigheden af processerne i de 4 pools beregnes.

De 4 modellerede pools ² er angivet med **fede** bogstaver, mens de pools³, der holdes konstante skrives almindeligt. De pools⁴, som ikke er konstante, men som varierer på en fastlagt måde afhængigt af tiden er markeret med indeks _t. Det samme gælder enzymaktiviteten V_{max_t} for de forskellige enzymer. ⁵

$$\frac{d_{acv}}{dt} = \frac{V_{max1_t} \text{Amin}_t}{\text{Amin}_t + KM_{\text{Amin}} + \frac{KM_{\text{Cys}} \text{Amin}_t}{\text{Cys}} + \frac{KM_{\text{Val}} \text{Amin}_t}{\text{Val}} + \frac{KM_{\text{ATP}} \text{Amin}_t}{\text{ATP}}} - \frac{V_{max2_t} \text{acv}}{\text{acv} + \frac{KM_{\text{Ilt}} \text{acv}}{\text{Ilt}_t} + KM_{\text{acv}} + \frac{KM_{\text{Ilt}} KM_{\text{acv}}}{\text{Ilt}_t}}$$

$$\frac{d_{isop}}{dt} = \frac{V_{max2_t} \text{acv}}{\text{acv} + \frac{KM_{\text{Ilt}} \text{acv}}{\text{Ilt}_t} + KM_{\text{acv}} + \frac{KM_{\text{Ilt}} KM_{\text{acv}}}{\text{Ilt}_t}}$$

² ACV, IsoP, FexCoA, PenG

³ Cystein, Valin, ATP, CoA

⁴ Aminoadipin, Ilt, Fex

⁵ V_{max1} = ACV-syntetase. V_{max2} = Cyklase. V_{max3} = Ligase. V_{max4} = Acyltransferase. fca = FexCoA.

$$\frac{V_{max4, fca isop}}{fca isop + KM_{fca} isop + KM_{isop} fca + KM_{fca} KM_{isop}}$$

$$\frac{dfca}{dt} = \frac{V_{max3_t} Fex_t}{Fex_t + \frac{KM_{Coa} Fex_t}{Coa} + KM_{Fex} + \frac{KM_{Coa} KM_{Fex}}{Coa} + \frac{KM_{ATP} Fex_t}{ATP}}$$

$$\frac{V_{max4, fca isop}}{fca isop + KM_{fca} isop + KM_{isop} fca + KM_{fca} KM_{isop}}$$

$$\frac{dpeng}{dt} = \frac{V_{max4, fca isop}}{fca isop + KM_{fca} isop + KM_{isop} fca + KM_{fca} KM_{isop}}$$

A.4.1 Justeringer

Vmax for de 4 enzymer er fastlagt i sit forløb, som skildret i afsnit (4.1). Dette forløb kan justeres op eller ned med en faktor, der ganges på. Hvis der f.eks. ønskes en 10 procent højere aktivitet af Cyklasen, sættes denne faktor til 1.1. 10 procent lavere aktivitet opnås ved at sætte faktoren til 0.9

Niveauet for Fex, Aminoadipin og Ilt kan varieres lige som Vmax med en procentvis regulering. Herudover kan der til disse pools adderes en fast mængde, således at det resulterende niveau til en bestemt tid fremkommer af udtrykket:

$$(niveau_t * faktor) + tilsaetning$$

Specielt for Aminniveauet er det herudover muligt at simulere et konkurrerende dræn fra cellens produktion af lysin. Dette dræn modelleres

som et konstant fradrag fra den tilstedeværende mængde af Amin. Udtrykket for aminniveauet er således:

$$(\text{aminniveau}_t * \text{faktor}_{\text{amin}}) + \text{tilsaetning}_{\text{amin}} - \text{lysindtraen}$$

KM værdierne og mængderne af Cystein, Valin, ATP og CoA indgår direkte i modellen som konstanter, hvis placering kan ses i ovenstående fremstilling af modellen.

Endelig er det muligt at ændre de modellerede pools værdier til et bestemt ønsket niveau.

Nedenfor følger de 3 skærbilleder, med hvilke man kan ændre modellens parametre. Disse skærbilleder viser samtidigt de talværdier, der anvendes ved de kørsler, der betegnes 'normal'.

1. skærm:

justeringer	værdi	
1 1.00000	faktor på ACV-synthetase	
2 1.00000	faktor på Cyklase	
3 0.10000	faktor på Ligase	
4 1.00000	faktor på AcetylTransferase	
5 1.00000	faktor på allosterisk	
6 1.00000	faktor på aminniveaut	
7 1.00000	faktor på iltniveaut	
8 1.00000	faktor på fexniveaut	

tryk tal for emne. Tryk -1 for afslut

2. skærm:

konstanter	værdi	
1 0.00000	Aminoacidipin	
2 0.80000	Cystin	
3 0.30000	Valin	

4	1.00000	atp
5	0.00000	Ilt
6	0.00000	FEX
7	0.01000	COA
8	0.00000	fradrag til lysindræn
9	1.00000	KM for ATP
10	0.10000	KM for amin
11	0.10000	KM for cystein
12	0.10000	KM for valin
13	1.00000	KM for ilt
14	0.13000	KM for acv
15	0.50000	KM for coa
16	0.00300	KM for fex
17	0.90000	KM for fexcoA
18	0.02100	KM for isopen

tryk tal for emne. Tryk -1 for afslut

3. skærm

varierende pools

1	ACV	0.0000
2	IsoPenicillin	0.0000
3	FexCoA	0.0000
4	PenG	0.0000

tryk tal for emne. Tryk -1 for afslut.

Når disse 3 skærbilleder er blevet afviklet spørges efter en modelkommentar, der tjener til at beskrives karakteren af de ændringer, der er foretaget. Det er således muligt på grafer og skærbilleder at aflæse, hvilke afvigelse fra normal kørsel, der er gældende.

skriv modelkommentar : -

Appendiks B

Kørsler

Kurven på figur B.1 viser forløbet af en normal kørsel, hvor fexCoA niveauet er sat konstant i tidsrummet 48 til 60 timer.

De efterfølgende "skærbilleder" viser de kørsler, som henholdsvis sensitivitetskoefficienter og fluxkontrolkoefficienter er beregnet efter.

Figur B.1: *Koncentrationen af Penicillin G*

Fluxkontrolkoefficienter:

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.005

****modelkommentar:*******

normal

****** substrat *** koncentration **** hastighed ******

ACV 9.1367137355E-03 -9.2712838274E-17

Isop 5.5438573103E-02 1.6563065106E-05

Fexcoa 1.9046006856E+00 000000000000E+00

PenG 1.3311409400E+01 2.3998343693E-01

Aminniveau 0.3000

Fexniveau 0.4600

Iltniveau 0.0167

Tiden 52.000000 Integrationen er slut.

Tryk på s for at stoppe integrationen.

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.005

****modelkommentar:*******

aminoadipin*1.01

****** substrat *** koncentration **** hastighed ******

ACV 9.1482890308E-03 1.4289784633E-16

Isop 5.5521536055E-03 1.6593033297E-05

Fexcoa 1.9046006856E+00 000000000000E+00

PenG 1.3311957660E+01 2.4026747265E-01

Aminniveau 0.3030

Fexniveau 0.4600

Iltniveau 0.0167

Tiden 52.000000 Integrationen er slut.

Tryk på s for at stoppe integrationen.

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.005

modelkommentar:***

valin*1.01

**** substrat *** koncentration ***** hastighed ****

ACV	9.1482890308E-03	1.7329616474E-16
-----	------------------	------------------

Isop	5.5521536055E-03	1.6593033297E-05
------	------------------	------------------

Fexcoa	1.9046006856E+00	000000000000E+00
--------	------------------	------------------

PenG	1.3311957660E+01	2.4026747265E-01
------	------------------	------------------

Aminniveau	0.3000
------------	--------

Fexniveau	0.4600
-----------	--------

Iltniveau	0.0167
-----------	--------

Tiden 52.000000 Integrationen er slut.

Tryk på s for at stoppe integrationen.

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.005

modelkommentar:***

cystein*1.01

**** substrat *** koncentration ***** hastighed ****

ACV	9.1105103698E-03	1.3145951341E-16
-----	------------------	------------------

Isop	5.5469655139E-03	1.6574290863E-05
------	------------------	------------------

Fexcoa	1.9046006856E+00	000000000000E+00
--------	------------------	------------------

PenG	1.3311614847E+01	2.4008987159E-01
------	------------------	------------------

Aminniveau	0.3000
------------	--------

Fexniveau	0.4600
-----------	--------

Iltniveau	0.0167
-----------	--------

Tiden 52.000000 Integrationen er slut.

Tryk på s for at stoppe integrationen.

```

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.005
**modelkommentar:*****
ATP * 1.01
**** substrat *** koncentration ***** hastighed *****
ACV          9.1715278331E-03    1.4047194397E-16
Isop         5.5688209102E-03    1.6653286363E-05
Fexcoa      1.9046006856E+00    000000000000E+00
PenG        1.3313058061E+01    2.4083756590E-01
                Aminniveau      0.3000
                Fexniveau      0.4600
                Iltniveau     0.0167
Tiden 52.000000 Integrationen er slut.
*****

```

Sensitivitetskoefficienter: (det bemærkes at normalkørslen er med et andet tidsskridt end for fluxkontrolkoefficienter)

```

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.001
**modelkommentar:*****
normal
**** substrat *** koncentration ***** hastighed *****
ACV          9.1367137355E-03    -9.2712838274E-17
Isop         5.5438738735E-03    1.6563162133E-05
Fexcoa      1.9046006856E+00    000000000000E+00
PenG        1.3311649384E+01    2.3998343683E-01
                Aminniveau      0.3000
                Fexniveau      0.4600
                Iltniveau     0.0167
Tiden 52.000000 Integrationen er slut.
*****

```

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.001

modelkommentar:***

Acvsynthetase*1.01

**** substrat *** koncentration **** hastighed ****

ACV 9.2345711523E-03 8.5283342887E-16

Isop 5.6141309856E-03 1.6817437989E-05

Fexcoa 1.9046006856E+00 000000000000E+00

PenG 1.3316283669E+01 2.4238318256E-01

Aminniveau 0.3000

Fexniveau 0.4600

Iltniveau 0.0167

Tiden 52.000000 Integrationen er slut.

Tryk på s for at stoppe integrationen.

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.001

modelkommentar:***

Cyklase *1.01

**** substrat *** koncentration **** hastighed ****

ACV 9.0399606268E-03 -8.4612492793E-16

Isop 5.5438738735E-03 1.6563162133E-05

Fexcoa 1.9046006856E+00 000000000000E+00

PenG 1.3311746137E+01 2.3998343683E-01

Aminniveau 0.3000

Fexniveau 0.4600

Iltniveau 0.0167

Tiden 52.000000 Integrationen er slut.

Tryk på s for at stoppe integrationen.

fra 50.00 til 52.00 med skridt = 0.001

modelkommentar:***

acyltransferase*1.01

**** substrat *** koncentration ***** hastighed ****

ACV 9.1367137355E-03 -9.2712838274E-16

Isop 5.4746814890E-03 1.6313852927E-05

Fexcoa 1.9046006856E+00 000000000000E+00

PenG 1.3311718576E+01 2.3998368614E-01

Aminniveau 0.3000

Fexniveau 0.4600

Iltniveau 0.0167

Tiden 52.000000 Integrationen er slut.

Tryk på s for at stoppe integrationen.

Liste over figurer

1.1	Modelopbygningsprocessen	10
2.1	Et penicillin molekyle.(ref.13)	12
2.2	Syntesevejen til penicillin. (ref.3)	15
2.3	Oversigt over biosyntesen af penicillin	17
2.4	Enzymaktivitet som funktion af temperatur. (ref.30) . .	18
2.5	Enzymaktivitet som funktion af pH. (ref.30)	19
2.6	Reaktionshastighed som fkt. af substratkoncentration. . .	22
2.7	Lineweaver-Burke plot	26
2.8	Reaktion i tilfældig orden	27
2.9	Skema 1 (ref.31 p.86)	30
2.10	Grafer til konstantbestemmelse (ref.31 p.85)	31
2.11	Tabel 2 (ref.31 p.119)	33
2.12	Koncentration af A som fkt. af tiden. Data er lånt fra (ref.8).	36
2.13	Tabel 3. Koncentration af A til 3 tidspunkter	37
2.14	Aktivitet af ACV-syntetase som funktion af tiden	38
2.15	Aktivitet af cyklase som fkt. af tiden. (ref.12)	40
2.16	Iltkoncentration som fkt. af tiden. (ref.12)	42
2.17	Tidsvariation for Acyltransferase aktivitet	42
3.1	De indgående elementer i det afgrænsede system.	44
4.1	Biosyntesen som den modelleres	51
4.2	Koncentration af ilt som fkt. af fermenteringstid	55
4.3	Aktivitet af ligase som fkt. af fermenteringstid	56
4.4	Cellemasse i tør vægt som fkt. af fermenteringstid	57
5.1	Koncentrationen af Penicillin G	67

5.2	model kørsel	68
5.3	Koncentrationen af Penicillin G	69
B.1	Koncentrationen af Penicillin G	95

Appendiks C

Litteraturfortegnelse

- / 1. Henrik Møllgaard
Ved møder på Novo

- /2. Samme som /1

- /3. J.O Sullivan og E.P. Abraham/
Biosynthesis of β lactan antibiotics
i Antibiotics IV ,1981, Springer Verlag.

- /4. Loepez-Nieto, M.J. ; Ramos, F.R. ; Luengo,J.M. og Martin, J.F.
1985./ Characterization of the biosynthesis in vivo of α
aminoadipyl-cysteinyvalin in *Penicillium chrysogenum*
i Appl. Micro. Biotech. 22: 343-351

- /5. Vandamme, Erick J. - Editor/
"Biotechnology of Industrial Antibiotics"
Marcel Dekker, Inc. - New York and Basel

- /6. Jaklitsch, W.M. ; Hampel, W. ; Røhr,M og Kubicek,C.P. 1986/
 α aminoadipat pool concentration and penicillin
biosynthesis in strains of *Penicillium chrysogenum*.
Can.J. Microbiol. Vol 32

- /7. Fawcett,P. A.; Usher, J.J. ; Huddesto, R.C.; Nisbet, J.J. og Abra-

- ham, E.P. 1976/
Synthesis of delta- α -aminoadipylcysteinylvalin and its role in Penicillin biosynthesis.
Biochen.J. 157 : 651-660
- /8. Revilla,G.; Ramos,M.J.; Lopez-Nieto, M.J.; Alvarez,E. og Martin, J.F. 1986./
Glucose represses formation of delta α aminoadipyl-L-Cysteinyl-D-Valin and Isopenicillin N synthetase but not Penicillin Acyltransferase in Penicillin Chrysogenum.
Journal of Bacteriology, Nov 1986 : 947-952.
- /9. Alvarez,E ; Cantoral,J.M.; Barredo,J.L. ; Diez,B og Martin,J.F. 1987./
Purification to homogeneity and Characterization of Acyl Coenzyme
A : 6 APA Acyltransferase of penicillium chrysogenum
Antimicrob.Agents Chemother. Nov 1987: 1675-1682.
- /10. Ramos, F.R. and Lopez-Nieto,M.J. and Martin, J.F./
"Isopenicillin N Synthetase of Penicillinium chrysogenum, an Enzyme That Converts delta-(L- α -Aminoadipyl)-L- Cysteinyl-D-Valine to Isopenicillin N."
Antimicrobial Agents And Chemotherapy. Mar. 1985,Vol. 27,pp. 380-387.
- /11. Calam,C.T. og Ismail,B.A.K. 1980./
Investigations of factors in the optimisation of penicillin production.
J.Chem.Tech.Biotechnol. 30:249-262.
- /12. Ryo,D.Y. og Hospodka 1980./
Quantitative Physiology of Penicillin chrysogenum in Penicillin Fermentation.
Biotech.and bioeng. vol 12: 289-298.

-
- /13 Demain, A.L. 1983/
Biosynthesis of β -lactam antibiotics
Antibiotics containing the Betalactam Structure
Springer Verlag vol 67 : 189-228
- /14 Fawcett, P og Abraham, E.P. 1975./
Delta(alfa-aminoadipyl)cysteinyvalin synthetase
Meth.Enz. vol XLIII:471-473.
- /15 Brunner, R og Røhr, M 1975
Phenacyl: Coenzyme A ligase
Meth.Enz.vol XLIII:476-481.
- /17 Calam, C.T. and Ismail, Basil A.K./
"Investigation of factors in the optimisation of
Penicillin Production"
J.Chem.Tech.Biotechnol. 1980,30,249-262
- /18 Ryu, Dewey D.Y. and Hospodka/
"Quantitative Physiology of Penicillium chrysogenum
in Penicillin Fermentation."
Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXII, Pp. 289-298
(1980)
- /19 Westerhoff, Hans.V. and Kell, Douglas B. /
"Matrix Method for Determining Steps Most Rate-Limiting
to Metabolic Fluxes in Biotechnological Processes."
Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXX, Pp.
101-107 (1987)
- /20 Udgået
- /21 Udgået
- /22 Westerhoff, Hans.V. and Kell, Douglas B. /
"Metabolic Control Theory:
Its Role in microbiology and biotechnology."
FEMS Microbiology Reviews 39 (1986) Pp.305-320

- /23 Westerhoff, Hans.V. and Kell, Douglas B. /
"Towards a Rational Approach to the Optimization of Flux
in Microbial Biotransformations."
TIBTECH - June 1986 137-142
- /24 Udgået
- /25 Christiansen, Peder Voetmann /
"Simulation i Kontinuert Tid."
Tekst nr. 121 1986, IMFUFA, Roskilde Universitetscenter
Postbox 260,4000 Roskilde
- /26 Heefelt, Mogens Bruun /
"Numeriske algoritmer."
Tekst nr. 173 1989, IMFUFA, Roskilde Universitetscenter
Postbox 260,4000 Roskilde
- /27 Andersen et al /
"Odin. "
Tekst nr. 29 1980, IMFUFA, Roskilde Universitetscenter
Postbox 260,4000 Roskilde
- /28 Højgaard Jensen et al. /
"Om matematiske modeller." Tekst nr. 26 1980, IMFUFA, Roskilde
Universitetscenter
Postbox 260,4000 Roskilde
- /29 H. Kacser and J.A.Burns / 1973
"The control of flux."
in "Rate control of biological processes"
Symposia of the society for experimental biology.
Number XXVII. Pp. 65-104
- /30 Starr and Taggart /
"Biology. The unity and diversity of life."
Fourth edition (1987)

-
- /31 Dixon and Webb /
"Enzymes."
Third edition (1979)
- /32 Udgået
- /33 Gear, C. William /
"Numerical initial value problems
in ordinary differential equations"
Prentice Hall
First edition (1971)
- /34 Conte and de Boor /
"Elementary Numerical analysis
an algorithmic approach"
- /35 Turbo Pascal/
"Numerical Toolbox"
Borland International
- /36 Dansk Matematisk Forening /
"Rapport fra Landsmødet om Matematikken i Danmark."
1981
- /37 Gustav Kerszman og Birgitte Munch-Petersen /
Biologisk energitik og enzymkinetik
RUC 1988
- /38 Elliot & Tipton 1974
Biochem.J. 141 Pp.789
- /39 Dalziel 1969
Biochem.J. 114 Pp.547
- /40 Rubinow.S.I. 1975
Introduction to mathematical biology

New York

Appendiks D

Kildetekst

Generelle bemærkninger

På de følgende sider er kildeteksten til centrale dele af det udviklede program trykt. I kildeteksten er der visse forklarende kommentarer, men det skal understreges at forståelsen af programkoden forudsætter kendskab til programmering i almindelighed og specielt til programmeringssproget **Pascal**. Programmet er skrevet i **Turbo Pascal version 5.0** og kendskab til dette sprog vil også være en fordel.

Spæcielt for **Turbo Pascal** (fra version 4.0 og efterfølgende) er indført muligheden for opbygningen af programmer med separat kompilerede moduler. Disse benævnes **Units**. Hermed bliver det i højere grad muligt at opfatte et program som sammensat af en række afgrænsede enheder, der hver især opfylder sit formål. Disse enheder kan også betrages som værktøjskasser. Nærværende program anvender følgende units: **Dos, Crt, Graph, Common, RungeKu4** og **Koordinat**.

Dos, Crt, Graph og **Common** er units, der følger med Turbo Pascal. Disse værktøjskasser stiller en række faciliteter til rådighed i forhold til kald af operativsystemet, skærmhåndtering, grafik og håndtering af ind og uddata. Der kan læses nærmere herom i en Turbo Pascal manual.

RungeKu4 er en kraftig omarbejdning af en unit: **Initval**, fra **Turbo Pascals Numerical Toolbox** og **Koordinat** er en unit, der er skrevet for at kunne håndtere en passende skalering og udtegning af kurver i et selvdefineret koordinatsystem.

Alle disse units bliver anvendt af programmet, hvis kode er samlet i filen **Model.pas**. I det følgende bringes kildeteksten alene for **model.pas, RungeKu4.pas** og **Koordinat.pas**.

Program Differentialligningssystem;

```

-----
- Runge Kutta 4. ordens med fast skridtlængde -
-----

{$I-}      { Disable I/O error trapping  }
{$R+}      { Enable range checking      }

uses
  RungeKu4, Dos, Crt, Graph, Koordinat, Common;

type tegnset = set of char;

var
  starttid : Float;      { nedre grænse for intervallet }
  sluttid  : Float;      { øvre grænse for intervallet }
  InitialValues : TNvector; { Begyndelsesværdier ved starttid }
  endValues  : TNvector; { Resultat værdier ved sluttid }
  skridt    : real;      { Integrationsskridtets størrelse }
  NumReturn : integer;   { Antal returnerede talværdier (timer) }
                                     { for den enkelte pool }
  SolutionValues : TNmatrix; { Værdier for alle pools opsamlet hver }
                                     { hele time (numreturn) }
  Error : byte;          { Flag }
  Vector : FuncVect;    { Pegepinde til brugerdefinerede
                                     funktioner }
  sti : string;          { hjælpevariable }
  svar : char;           { - }
  bogstaver,cifre : tegnset; { - }
  time,minut,sek,sek100 : word; { - }

{*****}
{*** ovenfor erklæres diverse globale variable ****}
{*** ----- ****}
{*** Der er i programmet afsat plads til ****}
{*** 10 brugerdefinerede differentiaalligninger ****}
{*** der alle kan beregnes over et forløb på 250 timer ****}
{*****}

```

```
{*****}
{** nedenfor følger de erklæringer, der er specifikke *****}
{** for den aktuelle model *****}
{*****}

const { følgende konstanter anvendes til }
      { at indeksere variable i diverse tabeller }

{modellerede pools / indeks til initialvalues[], endvalues[],}
      { solutionvalues[], poolnavn[] og V[i] }
    acv = 1;
    iso = 2;
    fca = 3;
    peng = 4;
    pool5 = 5;
    pool6 = 6;
    pool7 = 7;
    pool8 = 8;
    pool9 = 9;
    pool10 = 10;
{konstanter / indeks til tabellerne kon[] og konstantnavn[] }
    konamin = 1;
    koncys = 2;
    konval = 3;
    konatp = 4;
    konilt = 5;
    konfex = 6;
    koncoa = 7;
    lysd = 8;
    KMatp = 9;
    KMamin = 10;
    KMcys = 11;
    KMval = 12;
    KMilt = 13;
    kmacv = 14;
    KMcoa = 15;
    KMfex = 16;
    KMfca = 17;
    KMiso = 18;

{faktorer \ indeks til tabellerne faktor[] og faktornavn[] }
    eacv = 1;
    ecyk = 2;
    elig = 3;
    eactf = 4;
    eallo = 5;
    aminniv = 6;
    iltniv = 7;
    fexniv = 8;

    max_antal_pools = 10; {angiver højst tilladte antal_pools}
```

```
var poolnavn : array[0..max_antal_pools] of string[30];
    udvalgt : array[1..max_antal_pools] of integer;
    antal_udvalgte,xaksenr : integer;
    tal : string[20];
    res : float;
    udskriv : boolean;
    kon : array[0..20] of real;
    konstantnavn : array[0..20] of string[30];
    faktor : array[0..20] of real;
    faktornavn : array[0..20] of string[30];
    modelkommentar : string;
    antal_pools, antal_konstanter, antal_faktorer : integer;

procedure init_konstanter;
var x : integer;
{** Her fastlægges udgangsværdier for **}
{** konstanter og faktorer ****}
begin
    antal_konstanter := 18;
    antal_faktorer := 8;
    for x := 0 to 20 do
        begin
            kon[x] := 0; konstantnavn[x] := '';
            faktor[x] := 0; faktornavn[x] := '';
        end;

    faktor[eacv] := 1;
        faktornavn[eacv] := 'faktor på ACV-synthetase';
    faktor[ecyk] := 1;
        faktornavn[ecyk] := 'faktor på Cyklase';
    faktor[eallo] := 0;
        faktornavn[eallo] := 'faktor på allosterisk';
    faktor[elig] := 0.1;
        faktornavn[elig] := 'faktor på Ligase';
    faktor[eactf] := 1;
        faktornavn[eactf] := 'faktor på AcetylTransferase';
    faktor[aminniv] := 1;
        faktornavn[aminniv] := 'faktor på Aminniveau';
    faktor[iltniv] := 1;
        faktornavn[iltniv] := 'faktor på Iltniveau';
    faktor[fexniv] := 1;
        faktornavn[fexniv] := 'faktor på Fexniveau';

    kon[konATP] := 1;
        konstantnavn[konatp] := 'ATP';
    kon[konVal] := 0.3;
        konstantnavn[konval] := 'Valin';
    kon[koncys] := 0.8;
        konstantnavn[koncys] := 'Cystin';
    kon[konFEX] := 0;
        konstantnavn[konfex] := 'FEX';
    kon[konCOA] := 0.01;
        konstantnavn[koncoa] := 'COA';
    kon[konamin] := 0;
        konstantnavn[konamin] := 'Aminoacidipin';
    kon[konilt] := 0;
        konstantnavn[konilt] := 'Ilt';
    kon[lysd] := 0.0;
        konstantnavn[lysd] := 'fradrag til Lysindræn';
```

```
kon[KMamin] := 0.1; konstantnavn[KMamin] := 'KM for Amin';
kon[KMcys] := 0.1; konstantnavn[KMcys] := 'KM for Cystein';
kon[KMval] := 0.1; konstantnavn[KMval] := 'KM for Valin';
kon[KMilt] := 1; konstantnavn[KMilt] := 'KM for Ilt';
kon[KMacv] := 0.13; konstantnavn[KMacv] := 'KM for ACV';
kon[KMcoa] := 0.5; konstantnavn[KMcoa] := 'KM for CoA';
kon[KMfex] := 0.003; konstantnavn[KMfex] := 'KM for Fex';
kon[KMfca] := 0.9; konstantnavn[KMfca] := 'KM for FexCoA';
kon[KMiso] := 0.021; konstantnavn[KMiso] := 'KM for IsoPen';
kon[KMatp] := 1; konstantnavn[KMatp] := 'KM for ATP';
end { init _ konstanter };

procedure init_pools;
var x,y : integer;
{*** Her fastlægges udgangsværdier for pools ***}
{*** og antallet af modelerede pools angives ***}

begin
  antal_pools := 4;
  for x := 1 to antal_pools do
    begin
      for y := 1 to 250 do solutionvalues[y,x] := 0;
    end;
    initialvalues[0] := 0; Poolnavn[0] := 'Tiden';
    InitialValues[acv] := 0; Poolnavn[acv] := 'ACV';
    InitialValues[iso] := 0; Poolnavn[iso] := 'IsoPenicillin';
    InitialValues[fca] := 0; Poolnavn[fca] := 'FexCoA';
    InitialValues[penG] := 0; Poolnavn[penG] := 'PenG';
    InitialValues[pool5] := 0; Poolnavn[pool5] := 'pool5';
    InitialValues[pool6] := 0; Poolnavn[pool6] := 'pool6';
    InitialValues[pool7] := 0; Poolnavn[pool7] := 'pool7';
    InitialValues[pool8] := 0; Poolnavn[pool8] := 'pool8';
    InitialValues[pool9] := 0; Poolnavn[pool9] := 'pool9';
    InitialValues[pool10] := 0; Poolnavn[pool10] := 'pool10';

    for x := 0 to antal_pools do endvalues[x] := initialvalues[x];
    for x := 1 to antal_pools do
      begin
        { Pools til graf fastlægges }
        udvalgt[x] := x; { alle vælges som udgangspunkt }
      end;
      solutionvalues[0] := initialvalues;
      antal_udvalgte := antal_pools;
    end; {procedure init_pools}
```

```
{SF+}
{*****}
{*** nedenfor fastlægges diverse hjælpefunktioner ****}
{*** De fleste indgår i modellen som tabelfunktioner ****}
{*****}

function vmax1(tid : float): float;
var a : float;
begin {ACV syntetase }
  if (tid > 0) and (tid <=24) then a := 0.04*tid+0.07
  else if tid <= 48 then a := -0.0138*tid + 1.33
  else if tid <= 72 then a := 0.67
  else if tid <= 96 then a := 0.67
  else if tid <= 120 then a := -0.007*tid +1.272
  else a := 0.5;
  vmax1 := a * faktor[eacv];
end {function vmax1};

function vmax2(tid : float): float;
var a : float;
begin {cyklase}
  if (tid > 0) and (tid <=24) then a := 0.7*tid + 1.3
  else if tid <= 48 then a := -0.27*tid + 24.56
  else if tid <= 72 then a := 11.6
  else if tid <= 96 then a := -0.025*tid + 13.4
  else a := -0.05*tid + 15.8;
  vmax2 := a * faktor[ecyk];
end {function vmax2};

function vmax3(tid : float): float;
var a : float;
begin {ligase}
  if (tid > 0) and (tid <=24) then a := (2.92*tid + 18)
  else if tid <= 48 then a := (17.16*tid - 324)
  else if tid <= 72 then a := (-1.25*tid + 560)
  else if tid <= 96 then a := (-6.13*tid + 911)
  else a := (-1.21*tid + 439);
  vmax3 := a * faktor[elig];
end {function vmax3};

function vmax4(tid : float): float;
var a : float;
begin {acyltransferase}
  if (tid > 0) and (tid <=24) then a := 0.01*tid + 0.06
  else if tid <= 48 then a := 0.06*tid - 1.1
  else if tid <= 72 then a := -0.004*tid + 1.9
  else if tid <= 96 then a := -0.02*tid + 3.1
  else a := -0.004*tid + 1.5;
  vmax4 := a * faktor[eactf];
end {function vmax4};
```

```
function aminniveau(tid : float): float;
var a : float;
begin {amin niveau}
  if (tid > 0) and (tid <=12) then a := (-0.0167)*tid + 0.3
  else if tid <= 24 then a := (0.00833*tid)
  else if tid <= 48 then a := 0.00417*tid+0.1
  else a := 0.3;
  a := (a*faktor[aminniv]) - kon[lysd] + kon[konamin];
  if udskriv then
  begin
    gotoxy(30,16);write('Aminniveau   ',a:10:4);
  end;
aminniveau := a;
end {function aminniveau};

function iltniveau(tid : float): float;
var a : float;
begin {ilt niveau}
  if (tid > 0) and (tid <=40) then a := (-0.021)*tid + 1.3
  else if tid <= 80 then a := (0.46)
  else if tid <= 115 then a := -0.006*tid+0.92
  else a := 0.26;
  a := (a*faktor[iltniv]) + kon[konilt];
  if udskriv then
  begin
    gotoxy(30,17);write('Iltniveau   ',a:10:4);
  end;
iltniveau := a;
end {function iltniveau};

function fexniveau(tid : float): float;
var a : float;
begin {fex niveau}
  if (tid > 0) and (tid <=4) then a := (-0.496)*tid + 2
  else a := 0.0167;
  a := (a*faktor[fexniv]) + kon[konfex];
  if udskriv then
  begin
    gotoxy(30,18);write('fexniveau   ',a:10:4);
  end;
fexniveau := a;
end {function fexniveau};

function cellevaekst(tid : float) : float;
var a : float;
begin
  a := 5.28 * exp(ln(tid+1) * 0.414);
  gotoxy(30,19); write('cellevaekst : ',a:10:4);
end { function cellevaekst };
```



```

{*****}
{*** nedenfor fastlægges differentiallyigningerne, *****}
{*** Der skal være overensstemmelse mellem det valgte ****}
{*** antal_pools og antallet af definerede differen- *****}
{*** ti ligninger. *****}
{*****}
{-----}
{- Differentialigningerne angives på følgende form-}
{-      dx[i]          -}
{-      ----- = TNTargetFi(T, X[1], X[2], ... X[m]) -}
{-      dt              -}
{-      -              -}
{- Vektoren V rummer de værdier, der løbende -}
{- bliver beregnet for de enkelte pools. -}
{- Vektoren X er synonym med den vektor, der -}
{- rummer initialværdierne for de enkelte pools. -}
{- Sammenhængen fremgår af nedenstående skema. -}
{-      -              -}
{-      V[0] = T      -}
{- Substrat Pools   -}
{-      V[1]..V[antal_pools]=X[1]..X[antal_pools] -}
{-      -              -}
{-----}
{*****}

function TNTargetF1(V : TNvector) : float;
begin {ACV}
  res := (((Vmax1(V[0]) * exp(-V[peng]*faktor[eallo]))
    * aminniveau(v[0]))
    / (aminniveau(v[0]) + kon[kmamin]
      + ((kon[kmcys]*aminniveau(v[0]))/kon[koncys])
      + ((kon[kmval]*aminniveau(v[0]))/kon[konval])
      + ((kon[KMatp]*aminniveau(v[0]))/kon[konatp])))
    - (vmax2(V[0])*V[acv]/(V[acv]
      + (kon[KMilt]*V[acv])/iltniveau(V[0])
      + kon[KMacv]
      + (kon[KMilt] * kon[KMacv])/iltniveau(V[0]))));
  TNTargetF1 := res;
  gotoxy(10,19);write(poolnavn[0],V[0]:12:6);
  if udskriv then
    begin
      gotoxy(10,11);write('ACV      ',V[acv]:20, res:20);
    end;
end; { function TNTargetF1 }

```

```

function TNTargetF2(V : TNvector) : float;
begin {Isopenicillin}
  res := (vmax2(V[0])*V[acv]/(V[acv]
    + (kon[KMilt]*V[acv])/iltniveau(V[0])
    + kon[KMacv]
    + (kon[KMilt] * kon[KMacv])/iltniveau(V[0])))
    - ((vmax4(V[0])*V[fca]*V[iso])/(V[fca]*V[iso]
    + (kon[KMfca]*V[iso])
    + (kon[KMiso]*V[fca])
    + ((kon[KMfca]*kon[KMiso]))));
  TNTargetF2 := res;
  if udskriv then
  begin
    gotoxy(10,12);write('Isop      ',V[iso]:20,res:20);
  end;
end; { function TNTargetF2 }

function TNTargetF3(V : TNvector) : float;
begin {fexCoA}
  res := (vmax3(V[0])*fexniveau(V[0])/(fexniveau(V[0]) +
(kon[KMcoa]/kon[koncoa])*fexniveau(V[0])
    + (kon[KMfex])
    + ((kon[KMcoa]*kon[KMfex])/kon[koncoa]))
    + ((kon[KMatp]*fexniveau(V[0]))/kon[konatp]))
    - ((vmax4(V[0])*V[fca]*V[iso])/(V[fca]*V[iso]
    + (kon[KMfca]*V[iso])
    + (kon[KMiso]*V[fca])
    + ((kon[KMfca]*kon[KMiso]))));
  TNTargetF3 := res;
  if udskriv then
  begin
    gotoxy(10,13);write('fexcoa  ',V[fca]:20,res:20);
  end;
end; { function TNTargetF3 }

function TNTargetF4(V : TNvector) : float;
begin {Penicillin G}
  res := ((vmax4(V[0])*V[fca]*V[iso])/(V[fca]*V[iso]
    + (kon[KMfca]*V[iso])
    + (kon[KMiso]*V[fca])
    + ((kon[KMfca]*kon[KMiso]))));
  TNTargetF4 := res;
  if udskriv then
  begin
    gotoxy(10,14);write('PenG    ',V[peng]:20,res:20);
  end;
end; { function TNTargetF4 }

```

```
{*****}
{*** De følgende funktioner er tomme for øjeblikket ****}
{*** De kan udfyldes med passende kode, hvis antallet af *}
{*** modellerede pools skal være større. ****}
{*****}
```

```
function TNTargetF5(V : TNvector) : float;
begin {pool5}
end; { function TNTargetF5 }
```

```
function TNTargetF6(V : TNvector) : float;
begin {pool6}
end; { function TNTargetF6 }
```

```
function TNTargetF7(V : TNvector) : float;
begin {pool7}
end; { function TNTargetF7 }
```

```
function TNTargetF8(V : TNvector) : float;
begin {pool8}
end; { function TNTargetF8 }
```

```
function TNTargetF9(V : TNvector) : float;
begin {pool9}
end; { function TNTargetF9 }
```

```
function TNTargetF10(V : TNvector) : float;
begin {pool10}
end; { function TNTargetF10 }
```

```
{SF-}
```

```
{*****}
{*** De følgende procedurer og funktioner tjener *****}
{*** dels til at initialisere systemet og *****}
{*** til at afvikle ind- og uddata faciliteterne *****}
{*****}

procedure initialiser(var InitialValue : TNvector;
                     var Error       : byte);

{-----}
{- Output: initialvalues, Error                -}
{-                                             -}
{- Denne procedure initialiserer ovenstående variable til 0. -}
{- Og knytter de brugerspecificerede funktioner til vektoren V[] --}
{-----}

begin
  FillChar(InitialValue, SizeOf(InitialValue), 0);
  Error := 0;
  Vector[1] := @TNTargetF1;
  Vector[2] := @TNTargetF2;
  Vector[3] := @TNTargetF3;
  Vector[4] := @TNTargetF4;
  Vector[5] := @TNTargetF5;
  Vector[6] := @TNTargetF6;
  Vector[7] := @TNTargetF7;
  Vector[8] := @TNTargetF8;
  Vector[9] := @TNTargetF9;
  Vector[10] := @TNTargetF10;
end; { procedure initialiser }
```

```

procedure resultater(antal_pools   : integer;
                    starttid      : Float;
                    sluttid       : Float;
                    InitialValues : TNvector;
                    NumReturn      : integer;
                    var SolutionValues : TNmatrix;
                    Error          : byte);
{-----}
{- Denne procedure udskriver resultater til uddataenheden -}
{-----}
var term, index : integer;
    a : text;
begin
  getoutputfile(outfile);
  Writeln(OutFile, 'resultater');
  Writeln(OutFile);
  Writeln(OutFile, starttid);
  Writeln(OutFile, sluttid);
  Writeln(outfile, numreturn);
  writeln(outFile, antal_pools);
  writeln(outFile, antal_konstanter);
  writeln(outFile, antal_faktorer);
  writeln(outFile, modelkommentar);
  Writeln(OutFile, skridt);
  Writeln(OutFile, 'initialværdier');
  for Term := 0 to antal_pools do
    Writeln(OutFile, InitialValues[Term]);
  Writeln(OutFile);
  Writeln(outfile, 'Slutværdier');
  for Term := 0 to antal_pools do
    Writeln(OutFile, endvalues[Term]);
  Writeln(OutFile);
  Writeln(OutFile, 'konstanter');
  for Term := 1 to antal_konstanter do
    Writeln(OutFile, kon[Term]);
  Writeln(OutFile);
  Writeln(OutFile, 'faktorer');
  for Term := 1 to antal_faktorer do
    Writeln(OutFile, faktor[Term]);
  Writeln(OutFile);
  if Error >= 1 then
    DisplayError;
  case Error of
    0 : begin
        for Term := 0 to antal_pools do
          begin
            Writeln(OutFile, poolnavn[term]);
            for Index := 1 to NumReturn do
              begin
                Writeln(OutFile, SolutionValues[Index, Term]);
              end;
            Writeln(OutFile);
          end;
        end;
    1 : Writeln(OutFile,
        'The number of values to return must be greater than zero. ');
    2 : begin
        Writeln(OutFile, 'The number of intervals must be greater than');
        Writeln(OutFile, 'or equal to the number of values to return. ');
      end;
  end;
end;

```

```

3 : Writeln(OutFile,
           'The number of equations must be greater than zero.');
```

```

4 : Writeln(OutFile, 'The lower limit must be different ',
           'from the upper limit.');
```

```

end; { case }
writeln(outfile);
writeln(outfile, 'slut');
close(outfile);
readln;
end; { procedure resultatater }
```

```

procedure indlaes_fra_fil;
{-----}
{- Denne procedure indlaeser resultatater fra en fil -}
{-----}
var term, index : integer;
    ch : char;
    ok : boolean;
    infile : text;
    filename, streng : string;
begin
    repeat
        clrscr;
        gotoxy(5,5); write('Afbryd ved tryk på s');
        ok := true;
        Ch := 'Y';
        Writeln;
        Write('Enter file name ');
        Readln(FileName);
        if FileName <> '' then
            begin
                filename := sti + filename;
                Assign(inFile, FileName);
                Reset(inFile);
                iocheck;
            end;
        if FileName = (sti + 's') then ok := false;
    until ((Ch = 'Y') and not(IOerr)) or not ok;
    if ok then
        begin
            readln(infile, streng); writeln(streng);
            readln(inFile, streng); writeln(streng);
            readln(inFile, starttid); writeln(starttid);
            readln(inFile, sluttid); writeln(sluttid);
            readln(infile, numreturn); writeln(numreturn);
            readln(inFile, antal_pools); writeln(antal_pools);
            readln(inFile, antal_konstanter); writeln(antal_konstanter);
            readln(inFile, antal_faktorer); writeln(antal_faktorer);
            readln(inFile, modelkommentar); writeln(modelkommentar);
            readln(inFile, skridt); writeln(skridt);
            readln(inFile, streng); writeln(streng);
            for Term := 0 to antal_pools do
                begin
                    readln(inFile, InitialValues[Term]);
                    writeln(initialvalues[term]);
                end;
            readln(inFile, streng); writeln(streng);
            readln(infile, streng); writeln(streng);
            for Term := 0 to antal_pools do
                begin
```

```
    readln(inFile, endvalues[Term]);
    writeln(endvalues[Term]);
end;
readln(inFile, streng); writeln(streng);
readln(infile, streng); writeln(streng);
for Term := 1 to antal_konstanter do
begin
    readln(inFile, kon[Term]);
    writeln(kon[Term]);
end;
readln(inFile, streng); writeln(streng);
readln(infile, streng); writeln(streng);
for Term := 1 to antal_faktorer do
begin
    readln(inFile, faktor[Term]);
    writeln(faktor[Term]);
end;
readln(inFile, streng); writeln(streng);
for Term := 0 to antal_pools do
begin
    readln(inFile, poolnavn[term]); writeln(poolnavn[term]);
    for Index := 1 to NumReturn do
begin
        readln(inFile, SolutionValues[Index, Term]);
        writeln(solutionvalues[index, term]);
    end;
    readln(inFile, streng); writeln(streng);
end;
close(infile);
end;
end; { procedure indlaes_fra_fil }

procedure udskriv_data;
begin
    {udskrivning af data}
    resultater(antal_pools, starttid, sluttid, InitialValues,
        NumReturn, SolutionValues, Error);
end {procedure udskriv_data};
```

```
{*****}
{*** De følgende procedurer og funktioner tjener *****}
{*** til at give brugeren mulighed for *****}
{*** at rette på de faktorer, konstanter og pools, der *****}
{*** indgår i systemet. *****}
{*****}
```

```
procedure ret_faktor(nr : integer);
var x : integer;
begin
  repeat
    clrscr;
    gotoxy(10,20); write(faktornavn[nr]);
    gotoxy(35,20);write(faktor[nr]);
    gotoxy(10,21); write(' skriv den nye værdi : ');
    readln(faktor[nr]);
    ioccheck;
  until not ioerr;
end {procedure ret faktor};
```

```
procedure ret_pool(nr : integer);
var x : integer;
begin
  repeat
    clrscr;
    gotoxy(10,20); write(poolnavn[nr]);
    gotoxy(35,20);write(initialvalues[nr]);
    gotoxy(10,21); write(' skriv den nye værdi : ');
    readln(initialvalues[nr]);
    ioccheck;
  until not ioerr;
end {procedure ret pool};
```

```
procedure ret_konstant(nr : integer);
var x : integer;
begin
  repeat
    clrscr;
    gotoxy(10,20); write(konstantnavn[nr]);
    gotoxy(35,20);write(kon[nr]);
    gotoxy(10,21); write(' skriv den nye værdi : ');
    readln(kon[nr]);
    ioccheck;
  until not ioerr;
end {procedure ret konstant};
```

```
procedure faktorer;
var x,y :integer;
begin
  gotoxy(10,3); write('justeringer ');
  gotoxy(40,3); write('værdi');
  for x := 1 to antal_faktorer do
  begin
    gotoxy(3,x+4);write(x:2);
    gotoxy(10,x+4);write(faktor[x]:9:5);
    write(' ',faktornavn[x]);
  end;
end {procedure faktorer};
```



```
procedure konstanter;
var x,y :integer;
begin
  gotoxy(10,3); write('konstanter ');
  gotoxy(40,3); write('værdi');
  for x := 1 to antal_konstanter do
  begin
    gotoxy(3,x+4);write(x:2);
    gotoxy(10,x+4);write(kon[x]:9:5);
    write(' ',konstantnavn[x]);
  end;
end {procedure konstanter };

procedure pools;
var x : integer;
begin
  gotoxy(5,2); write('varierende pools ');
  for x := 0 to antal_pools do
  begin
    gotoxy(5,x+3);
    write(x,' ',poolnavn[x]);
    gotoxy(25,x+3); write(initialvalues[x]:8:4);
  end;
end; {pools}

procedure ret_faktorer;
var x,svar,nr : integer;
begin
  svar := 1;
  while (svar > 0) do
  begin
    clrscr;
    faktorer;
    repeat
      gotoxy(10,24);write('tryk tal for emne. Tryk -1 for afslut');
      readln(svar);
      if (svar <= antal_faktorer) and (svar > 0) then
      begin
        ret_faktor(svar);
      end;
      iocheck;
    until not ioerr;
  end {while};
  clrscr;
end; {ret faktorer}

procedure ret_pools;
var x,svar,nr : integer;
begin
  repeat
    svar := 1;
    while (svar > 0) do
    begin
      clrscr;
      pools;
      gotoxy(10,24);write('tryk tal for emne. Tryk -1 for afslut');
      readln(svar);
      if (svar <= antal_pools) and (svar > 0) then
      begin
        ret_pool(svar);
      end;
    end;
  until svar <= 0;
end;
```

```
        end;
    end {while};
    clrscr;
    iocheck;
    until not ioerr;
end; {ret pools}

procedure ret_konstanter;
var x, svar, nr : integer;
begin
    repeat
        svar := 1;
        while (svar > 0) do
            begin
                clrscr;
                konstanter;
                gotoxy(10,24);write('tryk tal for emne. Tryk -1 for afslut');
                readln(svar);
                if (svar <= antal_konstanter) and (svar > 0) then
                    begin
                        ret_konstant(svar);
                    end;
            end {while};
            clrscr;
            iocheck;
            until not ioerr
end; {ret konstanter}

procedure parameter_justering;
begin
    ret_faktorer;
    ret_konstanter;
    ret_pools;
    gotoxy(1,20);write('skriv modelkommentar : ');
    readln(modelkommentar);
end; {procedure parameter justering}
```

```

{*****}
{*** De følgende procedurer og funktioner tjener *****}
{*** til at afvikle udtegningen af graferne *****}
{*** og sikre udskrivningen af de oplysninger, der *****}
{*** er på grafikbilledet. *****}
{*****}

```

```

function halvtniveau(x : integer) : real;
var y, z : real;
    i, j : integer;
begin
  y := abs(solutionvalues[numreturn,x]/2);
  i := 1;
  while solutionvalues[i,x] < y do
  begin
    i := i + 1;
  end;
  halvtniveau := solutionvalues[i,0];
end {function halvtniveau};

```

```

procedure udtegn_graf;

```

```

var
  Term, x : integer;
  Index : integer;
  max, may, miy : real;
  tegn : char;

```

```

function maxy : real;
var max : real;
    ind1, ind2 : integer;

```

```

begin
  max := - maxlongint;
  for ind2 := 1 to antal_udvalgte do
  for ind1 := 1 to numreturn do
  if SolutionValues[ind1,udvalgt[ind2]] > max
  then max := SolutionValues[ind1,udvalgt[ind2]];
  if max > maxlongint
  then maxy := maxlongint - 100
  else maxy := max;
  end {function maxy};

```

```

function miny : real;
var min : real;
    ind1, ind2 : integer;

```

```

begin
  min := maxint;
  for ind2 := 1 to antal_udvalgte do
  for ind1 := 1 to numreturn do
  if SolutionValues[ind1,udvalgt[ind2]] < min
  then min := SolutionValues[ind1,udvalgt[ind2]];
  miny := (min);
  end {function miny};

```

```

begin

```

```

  if xaksenr <= 0 then
    virtmaxx := ((solutionvalues[numreturn,0] -
                  solutionvalues[0,0])*1.2)

```

```

  else
  begin

```

```
    max := - maxint;
    for x := 1 to numreturn do
        if solutionvalues[x,xaksenr] > max then
            max := solutionvalues[x,xaksenr];
        virtmaxx := (max * 1.1);
    end;
    if virtmaxx < 1 then virtmaxx := 1;
    xforskydning := (- starttid);
    may := maxy; miy := miny;
    virtmaxy := ((may - miy) * 1.2);
    if virtmaxy < 1 then virtmaxy := 1;
    yforskydning := 0;
    clrscr;
    gotoxy(10,10);write('Manuel skalering (j/n) ?: ');
    readln(svar);
    if svar = 'j' then
        begin
            gotoxy(10,12);write('Skriv ymax : ');
            readln(virtmaxy);
        end;
    startgrafik;
    akser;
    outtextxy(570,340,streng(sluttid));
    outtextxy(5,340,streng(starttid));
    outtextxy(100,10,modelkommentar);
    outtextxy(100,20,'PenG slutniveau : ');
    outtextxy(300,20,streng(solutionvalues[numreturn,peng]));
    outtextxy(100,30,'PenG 1/2 til tiden : ');
    outtextxy(300,30,streng(halvtniveau(peng)));
    outtextxy(380,30,' timer');

    for Term := 1 to antal_udvalgte do
        begin
            flyttil(SolutionValues[0, xaksenr],
                SolutionValues[0, udvalgt[Term]]);
            SetColor(term + 1);
            for Index := 1 to NumReturn do
                begin
                    tegntil(SolutionValues[Index, xaksenr],
                        SolutionValues[Index, udvalgt[Term]]);
                end;
            outtextxy(560,gety - 8,poolnavn[udvalgt[Term]]);
        end;
        readln;
        RestoreCrtMode;
    end; {udtegn_graf}

procedure pools_til_graf;
var x,svar,nr : integer;
begin
    clrscr;
    gotoxy(10,2); write('          pools          ');
    for x := 0 to antal_pools do
        begin
            gotoxy(10,x+3);write(x, ' ',poolnavn[x]);
        end;
    repeat
        gotoxy(10,2); write('vælg de pools, der skal udtegnes');
        svar := 0;
        nr := 0;
```

```
while svar >= 0 do
begin
  gotoxy(10,24);write('tryk tal for Pools. Tryk -1 for afslut');
  readln(svar);
  if (svar <= antal_pools) and (svar >= 0) then
  begin
    nr := nr + 1;
    udvalgt[nr] := svar;
    antal_udvalgte := nr;
  end;
end {while};
iocheck;
until not ioerr
end; {pools til graf}

procedure vaelgXakse;
var svar : integer;
begin
  clrscr;
  pools;
  gotoxy(10,2); write('XAKSE pools ');
  svar := -1;
  while not ((svar >= 0) and (svar <= antal_pools)) do
  begin
    gotoxy(10,24);write('tryk tal for ønsket Xakse');
    readln(svar);
    XAKSENR := svar;
  end {while};
end; {vaelegXakse}
```

```

{*****}
{*** De følgende procedurer tjener *****}
{*** til at afvikle den numeriske analyse *****}
{*** af systemet. *****}
{*****}

procedure loesSystemet(bund : float);
var hl,hmin,tolerance : real;
    svar : char;
    i : integer;
begin
  clrscr;
  gotoxy(10,3);
  write('Juster modellens parametre ? (j/n) : ');
  readln(svar);
  if svar = 'j' then parameter_justering;
  gotoxy(10,5);
  write('med løbende udskrift af tallene ? (j/n) : ');
  readln(svar);
  if svar = 'j' then udskriv := true else udskriv := false;
  repeat
    gotoxy(10,7);
    write('skriv størrelsen af integrations skridtet : ');
    readln(skridt);
    iocheck;
  until not ioerr;
  clrscr;
  gettime(time, minut, sek, sek100);
  gotoxy(5,1);writel('start ',time:3,minut:3,sek:3);
  gotoxy(5,3);
  writeln('fra ',bund:6:2,' til ',sluttid:6:2,' med skridt =
    ',skridt:6:5);
  gotoxy(5,7);writel(modelkommentar);
  gotoxy(5,6);
  write('*** modelkommentar*****');
  gotoxy(5,9);
  write('*** substrat *** koncentration *** hastighed*****');
  gotoxy(5,20);
  write('*****');
  gotoxy(5,21);
  write('Tryk på s for at stoppe integrationen. ');
  InitialConditionSystem(antal_pools, bund, sluttid, InitialValues,
    NumReturn, skridt, SolutionValues, Error,
    Vector);
  for i := 0 to antal_pools do
  begin
    endvalues[i] := solutionvalues[numreturn,i];
  end;
  gotoxy(40,19);
  writeln('Integrationen er slut. ');
  gettime(time, minut, sek, sek100);
  gotoxy(5,2);writel('slut ',time:3,minut:3,sek:3);
  writeln(#7);
  readln;
end {procedure loesSystemet};

procedure videre;
var x : integer;
    bund : float;
begin

```

```
bund := sluttid;
repeat
  clrscr;
  write('fra ',bund);
  write(' til ');
  readln(sluttid);
  iocheck;
until not ioerr;
if sluttid <= bund then error := 4;
InitialValues[0] := bund;
for x := 1 to antal_pools do
  initialvalues[x] := solutionvalues[numreturn,x];
numreturn := round(sluttid - starttid);
loessystemet(bund);
end; {procedure videre}
```

```

{*****}
{*** De følgende procedurer tjener *****}
{*** til at afvikle menustyringen og *****}
{*** initialiseringen af programmet. *****}
{*****}

procedure menu;
var svar: integer;
    slut: boolean;
begin
    slut := false;
    repeat
        clrscr;
        gotoxy(5,5);
        write('***** MENU *****');
            gotoxy(48,7);write('tryk på');
        gotoxy(10,8);write('kør modellen ');
            gotoxy(50,8);write('1');
        gotoxy(10,9);write('videre ');
            gotoxy(50,9);write('2');
        gotoxy(10,11);write('udskriv data ');
            gotoxy(50,11);write('3');
        gotoxy(10,12);write('indlæs tidligere kørsel ');
            gotoxy(50,12);write('4');
        gotoxy(10,14);write('pools til grafen');
            gotoxy(50,14);write('5');
        gotoxy(10,15);write('tegn graf(er)');
            gotoxy(50,15);write('6');
        gotoxy(10,17);write('slut');
            gotoxy(49,17);write('10');
        gotoxy(5,19);
        write('***** tryk en tast *****');
        gotoxy(5,20);write('nuværende interval: ',starttid:5:1,'
            - ',sluttid:5:1);

        gotoxy(5,21);
        write('*****');
        gotoxy(5,22);write('stien : ',sti);
        gotoxy(5,23);write('lagerplads til rådighed ',memavail,' bytes');
        gotoxy(50,16);
        readln(svar);
        case svar of
            1 : begin
                initialiser(InitialValues,Error);
                init_pools;
                gotoxy(10,10);writeln('Integrationen begynder ved 0 ');
                gotoxy(10,11);write('Hvor skal den slutte? : ');
                readln(sluttid);
                starttid := 0;
                InitialValues[0] := starttid;
                solutionvalues[0] := initialvalues;
                numreturn := round(sluttid-starttid);
                {antallet af outputs styres i inithan2.inc}
                loessystemet(starttid);
            end;
            2 : begin
                videre;
            end;
            3 : udskriv_data;
            4 : indlaes_fra_fil;
        end;
    until slut;
end;

```



```
5 : begin pools_til_graf; end;
6 : udtegn_graf;
10 : begin
    slut := true;
    clrscr;
    end;
else
    svar := -1;
end {case};
iocheck;
until (slut) and (not ioerr);
end {procedure menu};

procedure begynd;
begin
    ioerr := false;
    bogstaver := ['A'..'Z', 'E', '»', 'À', 'a' ..'z', 'æ', 'ø', 'å'];
    cifre := ['0'..'9'];
    ClrScr;
    initialiser(InitialValues, Error);
    init_pools;
    init_konstanter;
    starttid := 0;
    sluttid := 0;
    modelkommentar := 'normal';
    xaksenr := 0;
end {procedure begynd};

begin { program Differentialligningssystem }
    clrscr;
    gotoxy(45,4);
    gotoxy(5,5);write('angiv drev og bibliotek for datafiler ? :');
    readln(sti);
    begynd;
    menu;
    Close(OutFile);
end. { program Differentialligningssystem }
```

KILDETEKSTEN TIL RungeKu4.pas

```
unit RungeKu4;
```

```
{-----}
{-      -}
{-      Denne unit varetager afviklingen af      -}
{-      4. ordens Runge Kutta algoritmen med fast skridtlængde.      -}
{-      -}
{-      For en sædvanlig vektordifferentialligning af 1. orden.      -}
{-      -}
{-      Programkoden er en kraftig omarbejdning af initvall.inc      -}
{-      og initval2.inc, som er inkluderet i Numerical Toolbox      -}
{-      fra Borland.      -}
{-      -}
{-      -}
{-----}
```

```
($N-)
```

```
interface
```

```
uses crt;
```

```
($IFOPT N+)
```

```
type
```

```
Float = Double; { 8 byte real, requires 8087 math chip }
```

```
const
```

```
TNNearlyZero = 1E-015;
```

```
($ELSE)
```

```
type
```

```
Float = real; { 6 byte real, no math chip required }
```

```
const
```

```
TNNearlyZero = 1E-07;
```

```
($ENDIF)
```

```
TNArraySize = 10;
```

```
MaxFuncs = 10;
```

```
type
```

```
TNvector = array[0..TNArraySize] of Float;
```

```
TNmatrix = array[0..250] of TNvector;
```

```
FuncVect = array[1..MaxFuncs] of Pointer;
```

```

procedure InitialConditionSystem(antal_pools    : integer;
                                bund            : Float;
                                var sluttid     : Float;
                                InitialValues   : TNvector;
                                var NumReturn    : integer;
                                skridt          : float;
                                var SolutionValues : TNmatrix;
                                var Error       : byte;
                                Vector          : FuncVect);
{-----}
{-                                     -}
{-   Input:  antal_pools, bund, sluttid, InitialValues,   -}
{-           NumReturn, skridt                             -}
{-   Output: SolutionValues, Error                       -}
{-                                     -}
{-                                     -}
{-           Errors:  0: No errors                         -}
{-                   1: NumReturn < 1                    -}
{-                   2:                                     -}
{-                   3: antal_pools < 1                  -}
{-                   4: bund = sluttid                    -}
{-                                     -}
{------}

```

implementation

```
{$L Initval.OBJ}
```

```
{$F+}
```

```

function UserFunction1(T, X : Float; ProcAddr : Pointer)
                        : Float; external;
function UserFunction2(T, X, XPrime : Float; ProcAddr : Pointer)
                        : Float; external;
function UserFunction3(V : TNvector; ProcAddr : Pointer)
                        : Float; external;
function UserFunction4(V : TNvector; ProcAddr : Pointer)
                        : Float; external;

```

```
{$F-}
```

```

procedure InitialConditionSystem(antal_pools : integer;
                                bund         : Float;
                                var sluttid  : Float;
                                InitialValues : TNvector;
                                var NumReturn : integer;
                                skridt       : float;
                                var SolutionValues : TNmatrix;
                                var Error     : byte;
                                Vector        : FuncVect);

```

```
var
```

```

spacing, HalfSpacing : Float; { Size of each subinterval }
Index : integer;
Term : integer;
F1 : TNvector;
F2 : TNvector;
F3 : TNvector;
F4 : TNvector;
CurrentValues : TNvector;
TempValues : TNvector;

```

```

procedure TestAndInitialize(antal_pools : integer;
                            bund         : Float;
                            sluttid     : Float;
                            var skridt   : float;
                            NumReturn    : integer;

```

```

var Spacing      : Float;
var Error        : byte);

```

```

-----}
{- Input: antal_pools, bund, sluttid,      -}
{-      spacing, NumReturn                 -}
{- Output: spacing, Error                  -}
{-                                         -}
{- This procedure initializes the above variables. -}
{- antal_pools, spacing, and NumReturn are checked for -}
{- errors. They must be greater than zero.         -}
-----}

```

```
begin
```

```

  Error := 0;
  if NumReturn <= 0 then
    Error := 1;
  if skridt <= 0 then
    error := 2;
  if antal_pools < 1 then
    Error := 3;
  if bund = sluttid then
    Error := 4;
  if Error = 0 then
    begin

```

```

      spacing := skridt;
    end;

```

```
end; { procedure TestAndInitialize }
```

```

procedure Step(Spacing      : float;
               var CurrentValues : TNvector;
               var F         : TNvector);

```

```

-----}
{- Input: Spacing, CurrentValues          -}
{- Output: F                              -}
{-                                         -}
{- This procedure performs one step in the Runge-Kutta -}
{- four-step algorithm. By varying CurrentValues, this -}
{- procedure can be used at all steps in the Runge- -}
{- Kutta algorithm.                               -}
{-                                         -}
{- This procedure assumes that there are no more than -}
{- ten coupled 1st-order equations. The F's record -}
{- information about the 10 (or fewer) independent -}
{- variables.                                       -}
-----}

```

```
var index : integer;
```

```
begin
```

```

  for index := 1 to antal_pools do
    begin

```

```

      F[index] := Spacing * UserFunction3(CurrentValues, Vector[index]);
    end;

```

```
end; { procedure Step }
```

```
var stop : boolean ;
```

```
begin { procedure InitialConditionSystem }
```

```

  TestAndInitialize(antal_pools, bund, sluttid,
                    skridt, NumReturn, Spacing, Error);

```

```
  if Error = 0 then
```

```
    begin
```

```

      CurrentValues := InitialValues;
    end;

```

```

currentvalues[0] := bund;
HalfSpacing := Spacing / 2;

stop := false;
while ((currentvalues[0] + spacing) <= sluttid) and (not stop) do
begin
  { First step - calculate F1 }
  Step(Spacing, CurrentValues, F1);
  TempValues[0] := CurrentValues[0] + HalfSpacing;
  for Term := 1 to antal_pools do
    TempValues[Term] := CurrentValues[Term] + 0.5 * F1[Term];
  { 2nd step - calculate F2 }
  Step(Spacing, TempValues, F2);
  for Term := 1 to antal_pools do
    TempValues[Term] := CurrentValues[Term] + 0.5 * F2[Term];

  { Third step - calculate F3 }
  Step(Spacing, TempValues, F3);
  TempValues[0] := CurrentValues[0] + Spacing;
  for Term := 1 to antal_pools do
    TempValues[Term] := CurrentValues[Term] + F3[Term];

  { Fourth step - calculate F4[1]; first equation }
  Step(Spacing, TempValues, F4);

  { Combine F1, F2, F3, and F4 to get }
  { the solution at this mesh point }
  CurrentValues[0] := CurrentValues[0] + Spacing;
  for Term := 1 to antal_pools do
    CurrentValues[Term] := CurrentValues[Term]
      + (F1[Term] + 2 * F2[Term]
        + 2 * F3[Term] + F4[Term]) / 6;

  solutionvalues[trunc(CurrentValues[0] + 1)] := currentvalues;
  if keypressed then
    begin
      if readkey = 's' then
        begin
          stop := true;
          numreturn := trunc(CurrentValues[0]);
          sluttid := numreturn;
        end;
    end;
  if (currentvalues[0] > 0.9)
    and ((currentvalues[1] < 0)
      or (currentvalues[2] < 0)
      or (currentvalues[3] < 0)
      or (currentvalues[4] < 0))
  then
    begin
      stop := true;
      numreturn := trunc(CurrentValues[0] + 1) - 2;
      sluttid := numreturn;
      gotoxy(5,21);
      write('Negative koncentrationer! ');
      gotoxy(5,22);
      write('Integrationssskridtet er for stort.
        Juster og fortsæt.');
```

end;

```

    end;
  end;
end; { procedure InitialConditionSystem }

```

end. { RungeKu4 }

KILDETEKSTEN TIL Koordina.pas


```
unit koordinat;
```

```
{ $n- }
```

```
interface
```

```
uses graph;
```

```
var grafikdriver, grafiktilstand, fejlkode : integer;  
    virtmaxX, virtmaxY, yforskydning, xforskydning : real;  
procedure startgrafik;  
procedure initialisergrafik;  
procedure tegntil(x,y:real);  
procedure flyttil(x,y:real);  
procedure akser;  
function streng(tal : real) : string;
```

```
implementation
```

```
procedure startgrafik;  
begin  
    grafikdriver := detect;  
    initgraph(grafikdriver,grafiktilstand, '');  
    fejlkode := graphresult;  
    if fejlkode <> grok then  
    begin  
        writeln('Grafik fejl ',grapherrormsg(fejlkode));  
        halt;  
    end;  
end;  
  
procedure initialisergrafik;  
begin  
    write('skriv virtmaxX -> '); readln(virtmaxx);  
    write('skriv virtmaxY -> '); readln(virtmaxy);  
    write('skriv xforskydning -> '); readln(xforskydning);  
    write('skriv yforskydning -> '); readln(yforskydning);  
end;  
  
function transX(x : real) : integer;  
begin  
    transX := round(x * (getmaxX/virtmaxX));  
end;  
  
function transY(y : real) : integer;  
begin  
    transY := getmaxY - round(y * (getmaxY/virtmaxY));  
end;  
  
procedure tegntil(x,y : real);  
begin  
    lineto(transX(x+xforskydning),transY(y + yforskydning));  
end;  
  
procedure flyttil(x,y : real);  
begin  
    moveto(transX(x+xforskydning),transY(y + yforskydning));  
end;  
  
procedure akser;  
    procedure xakse;  
        var a,b,c,d : real;  
        procedure hak;
```

```
begin
  linerel(0,3);
  linerel(0,-6);
end;
begin
  a := (virtmaxx - xforskydning);
  c := 1;
  b := 0;
  while (c * b) < a do
  begin
    b := b + 1;
    flyttil(c*b,0);
    d := (round(c*b) MOD 24);
    if d = 0 then linerel(0,-20) else hak;
  end;
end; {procedure xakse}

procedure yakse;
var a,b,c : real;
    i : integer;
    tal : string[10];
procedure hak;
begin
  linerel(3,0);
  linerel(-6,0);
end;
begin
  a := virtmaxy - yforskydning;
  if a > 5 then begin c := 1; i := 0; end
    else if a > 2 then begin c := 0.5; i := 1; end
    else if a > 0.2 then begin c := 0.1; i := 1; end
    else begin c := 0.01; i := 2; end;
  b := 0;
  while c*b < a do
  begin
    b := b + 1;
    flyttil(0,c*b);
    str((c*b):3:i,tal);
    outtext(tal);
    flyttil(0,c*b);
    hak;
  end;
end; {procedure yakse}

var x,y : integer;
begin
  flyttil(-xforskydning,0);
  tegntil(virtmaxX - xforskydning,0);
  flyttil(0,-yforskydning);
  tegntil(0,virtmaxY - yforskydning);
  xakse;
  yakse;
end {procedure akser};

function streng(tal : real) : string;
var samlet : string;
begin
  if tal > 10 then str(tal : 3 : 0,samlet)
    else str(tal : 4 : 2,samlet);
  streng := samlet;
end; {function streng(tal)}

begin end.
```

- 1/78 "TANKER OM EN PRAKSIS" - et matematikprojekt.
 Projekt rapport af: Anne Jensen, Løna Lindenskov, Marianne Kesselhahn og Nicolai Lomholt.
 Vejleder: Anders Madsen
- 2/78 "OPTIMERING" - Menneskets forøgede beherskelsesmuligheder af natur og samfund.
 Projekt rapport af: Tom J. Andersen, Tommy R. Andersen, Gert Krenøe og Peter H. Lassen
 Vejleder: Bernhelm Boss.
- 3/78 "OPCAVESAMLING", breddekursus i fysik.
 Af: Lasse Rasmussen, Aage Bonde Kræmmer og Jens Højgaard Jensen.
- 4/78 "TRE ESSAYS" - om matematikundervisning, matematiklæreruddannelsen og videnskabsrindalismen.
 Af: Mogens Niss
 Nr. 4 er p.t. udgået.
- 5/78 "BIBLIOGRAFISK VEJLEDNING til studiet af DEN MODERNE FYSIKS HISTORIE".
 Af: Helge Kragh.
 Nr. 5 er p.t. udgået.
- 6/78 "NOGLE ARTIKLER OG DEBATINDLÆG OM - læreruddannelse og undervisning i fysik, og - de naturvidenskabelige fags situation efter studenteroprøret".
 Af: Karin Beyer, Jens Højgaard Jensen og Bent C. Jørgensen.
- 7/78 "MATEMATIKKENS FORHOLD TIL SAMFUNDSØKONOMIEN".
 Af: B.V. Gnedenko.
 Nr. 7 er udgået.
- 8/78 "DYNAMIK OG DIAGRAMMER". Introduktion til energy-bond-graph formalismen.
 Af: Peder Voetmann Christiansen.
- 9/78 "OM PRAKSIS' INDFLYDELSE PÅ MATEMATIKKENS UDVIKLING". - Motiver til Kepler's: "Nova Stereometria Doliorum Vinarium".
 Projekt rapport af: Lasse Rasmussen.
 Vejleder: Anders Madsen.
-
- 10/79 "TERMODYNAMIK I GYMNASIET".
 Projekt rapport af: Jan Christensen og Jeanne Mortensen,
 Vejledere: Karin Beyer og Peder Voetmann Christiansen.
- 11/79 "STATISTISKE MATERIALER".
 Af: Jørgen Larsen.
- 12/79 "LINEÆRE DIFFERENTIALLIGNINGER OG DIFFERENTIALLIGNINGSSYSTEMER".
 Af: Mogens Brun Heefelt,
 Nr. 12 er udgået.
- 13/79 "CAVENDISH'S FORSØG I GYMNASIET".
 Projekt rapport af: Gert Kreinøe.
 Vejleder: Albert Chr. Paulsen.
- 14/79 "BOOKS ABOUT MATHEMATICS: History, Philosophy, Education, Models, System Theory, and Works of".
 Af: Else Høyrup.
 Nr. 14 er p.t. udgået.
- 15/79 "STRUKTUREL STABILITET OG KATASTROFER i systemer i og udenfor termodynamisk ligevægt".
 Specialeopgave af: Leif S. Striegler.
 Vejleder: Peder Voetmann Christiansen.
- 16/79 "STATISTIK I KRÆFTFORSKNINGEN".
 Projekt rapport af: Michael Olsen og Jørn Jensen.
 Vejleder: Jørgen Larsen.
- 17/79 "AT SPØRGE OG AT SVARE i fysikundervisningen".
 Af: Albert Christian Paulsen.
- 18/79 "MATHEMATICS AND THE REAL WORLD", Proceedings of an International Workshop, Roskilde University Centre, Denmark, 1978.
 Preprint.
 Af: Bernhelm Booss og Mogens Niss (eds.)
- 19/79 "GEOMETRI, SKOLE OG VIRKELIGHED".
 Projekt rapport af: Tom J. Andersen, Tommy R. Andersen og Per H.H. Larsen.
 Vejleder: Mogens Niss.
- 20/79 "STATISTISKE MODELLER TIL BESTEMMELSE AF SIKRE DOSER FOR CARCINOGENE STOFFER".
 Projekt rapport af: Michael Olsen og Jørn Jensen.
 Vejleder: Jørgen Larsen
- 21/79 "KONTROL I GYMNASIET-FORMÅL OG KONSEKVENSER".
 Projekt rapport af: Crilles Bacher, Per S. Jensen, Preben Jensen og Torben Nysteen.
- 22/79 "SEMIOTIK OG SYSTEMEGENSKABER (1)".
 1-port lineært response og støj i fysikken.
 Af: Peder Voetmann Christiansen.
- 23/79 "ON THE HISTORY OF EARLY WAVE MECHANICS - with special emphasis on the role of reality".
 Af: Helge Kragh.
-
- 24/80 "MATEMATIKOPFATTELSE HOS 2.G'ERE".
 a+b 1. En analyse. 2. Interviewmateriale.
 Projekt rapport af: Jan Christensen og Knud Lindhardt Rasmussen.
 Vejleder: Mogens Niss.
- 25/80 "EKSAMENSOPGAVER", Dybdemodulet/fysik 1974-79.
- 26/80 "OM MATEMATISKE MODELLER".
 En projekt rapport og to artikler.
 Af: Jens Højgaard Jensen m.fl.
- 27/80 "METHODOLOGY AND PHILOSOPHY OF SCIENCE IN PAUL DIRAC'S PHYSICS".
 Af: Helge Kragh.
- 28/80 "DILEMTRISK RELAXATION - et forslag til en ny model bygget på væskernes viscoelastiske egenskaber".
 Projekt rapport af: Gert Kreinøe.
 Vejleder: Niels Boye Olsen.
- 29/80 "ODIN - undervisningsmateriale til et kursus i differentiaalligningsmodeller".
 Projekt rapport af: Tommy R. Andersen, Per H.H. Larsen og Peter H. Lassen.
 Vejleder: Mogens Brun Heefelt.
- 30/80 "FUSIONSENERGIEN - - - ATOMSAMFUNDETS ENDESTATION".
 Af: Oluf Danielsen.
 Nr. 30 er udgået.
- 31/80 "VIDENSKABSTEORETISKE PROBLEMER VED UNDERVISNINGSSYSTEMER BASERET PÅ MÆNGDELÆRE".
 Projekt rapport af: Troels Lange og Jørgen Karrebæk.
 Vejleder: Stig Andur Pedersen.
 Nr. 31 er p.t. udgået.
- 32/80 "POLYMERE STOFFERS VISCOELASTISKE EGENSKABER - BELYST VED HJÆLP AF MEKANISKE IMPEDANSMÅLINGER - GER MOSSBAUEREFFEKTIVITÄT".
 Projekt rapport af: Crilles Bacher og Preben Jensen.
 Vejledere: Niels Boye Olsen og Peder Voetmann Christiansen.
- 33/80 "KONSTITUERING AF FAG INDEN FOR TEKNISK - NATURVIDENSKABELIGE UDDANNELSER. I-II".
 Af: Arne Jakobsen.
- 34/80 "ENVIRONMENTAL IMPACT OF WIND ENERGY UTILIZATION".
 ENERGY SERIES NO. 1.
 Af: Bent Sørensen
 Nr. 34 er udgået.

- 35/80 "HISTORISKE STUDIER I DEN NYERE ATOMFYSIKS UDVIKLING".
Af: Helge Kragh.
- 36/80 "HVAD ER MENINGEN MED MATEMATIKUNDERVISNINGEN?".
Fire artikler.
Af: Mogens Niss.
- 37/80 "RENEWABLE ENERGY AND ENERGY STORAGE".
ENERGY SERIES NO. 2.
Af: Bent Sørensen.
-
- 38/81 "TIL EN HISTORIETEORI OM NATURERKENDELSE, TEKNOLOGI OG SAMFUND".
Projektrapport af: Erik Gade, Hans Heddal, Henrik Lau og Finn Physant.
Vejledere: Stig Andur Pedersen, Helge Kragh og Ib Thiersen.
Nr. 38 er p.t. udgået.
- 39/81 "TIL KRITIKKEN AF VEKSTØKONOMIEN".
Af: Jens Højgaard Jensen.
- 40/81 "TELEKOMMUNIKATION I DANMARK - oplæg til en teknologivurdering".
Projektrapport af: Arne Jørgensen, Bruno Petersen og Jan Vedde.
Vejleder: Per Nørregaard.
- 41/81 "PLANNING AND POLICY CONSIDERATIONS RELATED TO THE INTRODUCTION OF RENEWABLE ENERGY SOURCES INTO ENERGY SUPPLY SYSTEMS".
ENERGY SERIES NO. 3.
Af: Bent Sørensen.
- 42/81 "VIDENSKAB TEORI SAMFUND - En introduktion til materialistiske videnskabsopfattelser".
Af: Helge Kragh og Stig Andur Pedersen.
- 43/81 1. "COMPARATIVE RISK ASSESSMENT OF TOTAL ENERGY SYSTEMS".
2. "ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF DECENTRALIZATION".
ENERGY SERIES NO. 4.
Af: Bent Sørensen.
- 44/81 "HISTORISKE UNDERSØGELSER AF DE EKSPERIMENTELLE FORUDSÆTNINGER FOR RUTHERFORDS ATOMMODEL".
Projektrapport af: Niels Thor Nielsen.
Vejleder: Bent C. Jørgensen.
-
- 45/82 Er aldrig udkommet.
- 46/82 "EKSEMPLARISK UNDERVISNING OG FYSISK ERKENDELSE-1+1 ILLUSTRERET VED TO EKSEMPLER".
Projektrapport af: Torben O. Olsen, Lasse Rasmussen og Niels Dreyer Sørensen.
Vejleder: Bent C. Jørgensen.
- 47/82 "BARSEBÄCK OG DET VÆRST OFFICIELT-TÆNKELIGE UHELD".
ENERGY SERIES NO. 5.
Af: Bent Sørensen.
- 48/82 "EN UNDERSØGELSE AF MATEMATIKUNDERVISNINGEN PÅ ADGANGSKURSUS TIL KØBENHAVNS TEKNIKUM".
Projektrapport af: Lis Eilertzen, Jørgen Karrebæk, Troels Lange, Preben Nørregaard, Lissi Pedersen, Laust Rishøj, Lill Røn og Isac Showiki.
Vejleder: Mogens Niss.
- 49/82 "ANALYSE AF MULTISPEKTRALE SATELLITBILLEDER".
Projektrapport af: Preben Nørregaard.
Vejledere: Jørgen Larsen og Rasmus Ole Rasmussen.
- 50/82 "HERSLEV - MULIGHEDER FOR VEDVARENDE ENERGI I EN LANDSBY".
ENERGY SERIES NO. 6.
Rapport af: Bent Christensen, Bent Hove Jensen, Dennis B. Møller, Bjarne Laursen, Bjarne Lillethorup og Jacob Mørch Pedersen.
Vejleder: Bent Sørensen.
- 51/82 "HVAD KAN DER Gøres FOR AT AETHJÆLPE PICERS BLOKERING OVERFOR MATEMATIK ?"
Projektrapport af: Lis Eilertzen, Lissi Pedersen, Lill Røn og Susanne Stender.
- 52/82 "DESUSPENSION OF SPLITTING ELLIPTIC SYMBOLS".
Af: Bernhelm Booss og Krzysztof Wojciechowski.
- 53/82 "THE CONSTITUTION OF SUBJECTS IN ENGINEERING EDUCATION".
Af: Arne Jacobsen og Stig Andur Pedersen.
- 54/82 "FUTURES RESEARCH" - A Philosophical Analysis of Its Subject-Matter and Methods.
Af: Stig Andur Pedersen og Johannes Witt-Hansen.
- 55/82 "MATEMATISKE MODELLER" - Litteratur på Roskilde Universitetsbibliotek.
En biografi.
Af: Else Højrup.
Vedr. tekst nr. 55/82 se også tekst nr. 62/83.
- 56/82 "EN - TO - MANGE" -
En undersøgelse af matematisk økologi.
Projektrapport af: Troels Lange.
Vejleder: Anders Madsen.
-
- 57/83 "ASPECT EKSPERIMENTET" -
Skjulte variable i kvantemekanikken?
Projektrapport af: Tom Juul Andersen.
Vejleder: Peder Voetmann Christiansen.
Nr. 57 er udgået.
- 58/83 "MATEMATISKE VANDRINGER" - Modelbetragtninger over spredning af dyr mellem småbiotoper i agerlandet.
Projektrapport af: Per Hammershøj Jensen og Lene Vagn Rasmussen.
Vejleder: Jørgen Larsen.
- 59/83 "THE METHODOLOGY OF ENERGY PLANNING".
ENERGY SERIES NO. 7.
Af: Bent Sørensen.
- 60/83 "MATEMATISK MODEKSPERTISE" - et eksempel.
Projektrapport af: Erik O. Gade, Jørgen Karrebæk og Preben Nørregaard.
Vejleder: Anders Madsen.
- 61/83 "FYSIKS IDEOLOGISKE FUNKTION, SOM ET EKSEMPEL PÅ EN NATURVIDENSKAB - HISTORISK SET".
Projektrapport af: Annette Post Nielsen.
Vejledere: Jens Højrup, Jens Højgaard Jensen og Jørgen Vogelius.
- 62/83 "MATEMATISKE MODELLER" - Litteratur på Roskilde Universitetsbibliotek.
En biografi 2. rev. udgave.
Af: Else Højrup.
- 63/83 "CREATING ENERGY FUTURES: A SHORT GUIDE TO ENERGY PLANNING".
ENERGY SERIES NO. 8.
Af: David Crossley og Bent Sørensen.
- 64/83 "VON MATEMATIK UND KRIEG".
Af: Bernhelm Booss og Jens Højrup.
- 65/83 "ANVENDT MATEMATIK - TEORI ELLER PRAKSIS".
Projektrapport af: Per Hedegård Andersen, Kirsten Habekost, Christen Holst-Jensen, Annelise von Moos, Else Marie Pedersen og Erling Møller Pedersen.
Vejledere: Bernhelm Booss og Klaus Grünbaum.
- 66/83 "MATEMATISKE MODELLER FOR PERIODISK SELEKTION I ESCHERICHIA COLI".
Projektrapport af: Hanne Lisbet Andersen, Ole Richard Jensen og Klavs Frisdahl.
Vejledere: Jørgen Larsen og Anders Hede Madsen.
- 67/83 "ELEPSOIDE METODEN - EN NY METODE TIL LINEÆR PROGRAMMERING?".
Projektrapport af: Lone Billmann og Lars Boye.
Vejleder: Mogens Brun Heefelt.
- 68/83 "STOKASTISKE MODELLER I POPULATIONSGENETIK" - til kritikken af teoriladede modeller.
Projektrapport af: Lise Odgaard Gade, Susanne Hansen, Michael Hvild og Frank Mølgaard Olsen.
Vejleder: Jørgen Larsen.

- 69/83 "ELEVFORUDSÆNINGER I FYSIK"
- en test i l.g med kommentarer.
Af: Albert C. Paulsen.
- 70/83 "INDLÆRINGS- OG FORMIDLINGSPROBLEMER I MATEMATIK PÅ VOKSENUNDERVISNINGSNIVEAU".
Projekt rapport af: Hanne Lisbet Andersen, Torben J. Andreasen, Svend Åge Houmann, Helle Glerup Jensen, Keld Fl. Nielsen, Lene Vagn Rasmussen.
Vejleder: Klaus Grünbaum og Anders Hede Madsen.
- 71/83 "PIGER OG FYSIK"
- et problem og en udfordring for skolen?
Af: Karin Beyer, Sussanne Blegaa, Birthe Olsen, Jette Reich og Mette Vedelsby.
- 72/83 "VERDEN IFØLGE PEIRCE" - to metafysiske essays, om og af C.S Peirce.
Af: Peder Voetmann Christiansen.
- 73/83 "'EN ENERGIANALYSE AF LANDBRUG"
- økologisk contra traditionelt.
ENERGY SERIES NO. 9
Specialeopgave i fysik af: Bent Hove Jensen.
Vejleder: Bent Sørensen.
-
- 74/84 "MINIATURISERING AF MIKROELEKTRONIK" - om videnskabeliggjort teknologi og nytten af at lære fysik.
Projekt rapport af: Bodil Harder og Linda Szkotak Jensen.
Vejledere: Jens Højgaard Jensen og Bent C. Jørgensen.
- 75/84 "MATEMATIKUNDERVISNINGEN I FREMTIDENS GYMNASIUM"
- Case: Lineær programmering.
Projekt rapport af: Morten Blomhøj, Klavs Frisdahl og Frank Mølgaard Olsen.
Vejledere: Mogens Brun Hæfelt og Jens Bjørneboe.
- 76/84 "KERNEKRAFT I DANMARK?" - Et høringssvar indkaldt af miljøministeriet, med kritik af miljøstyrelsens rapporter af 15. marts 1984.
ENERGY SERIES No. 10
Af: Niels Boye Olsen og Bent Sørensen.
- 77/84 "POLITISKE INDEKS - FUP ELLER FAKTA?"
Opinionsundersøgelser belyst ved statistiske modeller.
Projekt rapport af: Svend Åge Houmann, Keld Nielsen og Susanne Stender.
Vejledere: Jørgen Larsen og Jens Bjørneboe.
- 78/84 "JÆVNSTRØMSLEDNINGSEVNE OG GITTERSTRUKTUR I AMORFT GERMANIUM".
Specialrapport af: Hans Heddal, Frank C. Ludvigsen og Finn C. Physant.
Vejleder: Niels Boye Olsen.
- 79/84 "MATEMATIK OG ALMENDANNELSE".
Projekt rapport af: Henrik Coster, Mikael Wennerberg Johansen, Povl Kattler, Birgitte Lydholm og Morten Overgaard Nielsen.
Vejleder: Bernhelm Booss.
- 80/84 "KURSUSMATERIALE TIL MATEMATIK B".
Af: Mogens Brun Hæfelt.
- 81/84 "FREKVENSafhængig ledningsevne i amorft germanium".
Specialrapport af: Jørgen Wind Petersen og Jan Christensen.
Vejleder: Niels Boye Olsen.
- 82/84 "MATEMATIK - OG FYSIKUNDERVISNINGEN I DET AUTO - MATISEREDE SAMFUND".
Rapport fra et seminar afholdt i Hvidovre 25-27 april 1983.
Red.: Jens Højgaard Jensen, Bent C. Jørgensen og Mogens Niss.
- 83/84 "ON THE QUANTIFICATION OF SECURITY":
PEACE RESEARCH SERIES NO. 1
Af: Bent Sørensen
nr. 83 er p.t. udgået
- 84/84 "NOGLE ARTIKLER OM MATEMATIK, FYSIK OG ALMENDANNELSE".
Af: Jens Højgaard Jensen, Mogens Niss m. fl.
- 85/84 "CENTRIFUGALREGULATORER OG MATEMATIK".
Specialrapport af: Per Hedegård Andersen, Carsten Holst-Jensen, Else Marie Pedersen og Erling Møller Pedersen.
Vejleder: Stig Andur Pedersen.
- 86/84 "SECURITY IMPLICATIONS OF ALTERNATIVE DEFENSE OPTIONS FOR WESTERN EUROPE".
PEACE RESEARCH SERIES NO. 2
Af: Bent Sørensen.
- 87/84 "A SIMPLE MODEL OF AC HOPPING CONDUCTIVITY IN DISORDERED SOLIDS".
Af: Jeppe C. Dyre.
- 88/84 "RISE, FALL AND RESURRECTION OF INFINITESIMALS".
Af: Detlef Laugwitz.
- 89/84 "FJERNVARMEOPTIMERING".
Af: Bjarne Lillethorup og Jacob Mørch Pedersen.
- 90/84 "ENERGI I L.G - EN TEORI FOR TILRETTELÆGGELSE".
Af: Albert Chr. Paulsen.
-
- 91/85 "KVANTETEORI FOR GYMNASIET".
1. Lærervejledning
Projekt rapport af: Biger Lundgren, Henning Sten Hansen og John Johansson.
Vejleder: Torsten Meyer.
- 92/85 "KVANTETEORI FOR GYMNASIET".
2. Materiale
Projekt rapport af: Biger Lundgren, Henning Sten Hansen og John Johansson.
Vejleder: Torsten Meyer.
- 93/85 "THE SEMIOTICS OF QUANTUM - NON - LOCALITY".
Af: Peder Voetmann Christiansen.
- 94/85 "TREENIGHEDEN BOURBAKI - generalen, matematikeren og ånden".
Projekt rapport af: Morten Blomhøj, Klavs Frisdahl og Frank M. Olsen.
Vejleder: Mogens Niss.
- 95/85 "AN ALTERNATIV DEFENSE PLAN FOR WESTERN EUROPE".
PEACE RESEARCH SERIES NO. 3
Af: Bent Sørensen.
- 96/85 "ASPEKTER VED KRAFTVARMEFORSYNING".
Af: Bjarne Lillethorup.
Vejleder: Bent Sørensen.
- 97/85 "ON THE PHYSICS OF A.C. HOPPING CONDUCTIVITY".
Af: Jeppe C. Dyre.
- 98/85 "VALGMULIGHEDER I INFORMATIONSSALDEREN".
Af: Bent Sørensen.
- 99/85 "Der er langt fra Q til R".
Projekt rapport af: Niels Jørgensen og Mikael Klinton.
Vejleder: Stig Andur Pedersen.
- 100/85 "TALSISTEMETS OPBYGNING".
Af: Mogens Niss.
- 101/85 "EXTENDED MOMENTUM THEORY FOR WINDMILLS IN PERTURBATIVE FORM".
Af: Ganesh Sengupta.
- 102/85 OPSTILLING OG ANALYSE AF MATEMATISKE MODELLER, BELYST VED MODELLER OVER KØERS FODEROPTAGELSE OG - OMSÆTNING".
Projekt rapport af: Lis Ellektsen, Kirsten Habekost, Lilli Røn og Susanne Stender.
Vejleder: Klaus Grünbaum.

- 103/85 "ØDSLE KOLDKRIGERE OG VIDENSKABENS LYSE IDEER".
 Projekt rapport af: Niels Ole Dam og Kurt Jensen.
 Vejleder: Bent Sørensen.
- 104/85 "ANALOGREGNEMASKINEN OG LORENZLIGNINGER".
 Af: Jens Jøger.
- 105/85 "THE FREQUENCY DEPENDENCE OF THE SPECIFIC HEAT OF THE GLASS TRANSITION".
 Af: Tage Christensen.
- "A SIMPLE MODEL OF AC HOPPING CONDUCTIVITY".
 Af: Jeppe C. Dyre.
- Contributions to the Third International Conference on the Structure of Non - Crystalline Materials held in Grenoble July 1985.
- 106/85 "QUANTUM THEORY OF EXTENDED PARTICLES".
 Af: Bent Sørensen.
- 107/85 "EN MYG GØR INGEN EPIDEMI".
 - flodblindhed som eksempel på matematisk modellering af et epidemiologisk problem.
 Projekt rapport af: Per Hødegård Andersen, Lars Boye, Carsten Holst Jensen, Else Marie Pedersen og Erling Møller Pedersen.
 Vejleder: Jesper Larsen.
- 108/85 "APPLICATIONS AND MODELLING IN THE MATHEMATICS CURRICULUM" - state and trends -
 Af: Mogens Niss.
- 109/85 "COX I STUDIETIDEN" - Cox's regressionsmodel anvendt på studenteroplysninger fra RUC.
 Projekt rapport af: Mikael Wennerberg Johansen, Poul Kattler og Torben J. Andreassen.
 Vejleder: Jørgen Larsen.
- 110/85 "PLANNING FOR SECURITY".
 Af: Bent Sørensen
- 111/85 "JORDEN RUNDT PÅ FLADE KORT".
 Projekt rapport af: Birgit Andresen, Beatriz Quinones og Jimmy Staal.
 Vejleder: Mogens Niss.
- 112/85 "VIDENSKABELIGGØRELSE AF DANSK TEKNOLOGISK INNOVATION FREM TIL 1950 - BELYST VED EKSEMPLER".
 Projekt rapport af: Erik Odgaard Gade, Hans Hedal, Frank C. Ludvigsen, Annette Post Nielsen og Finn Physant.
 Vejleder: Claus Bryld og Bent C. Jørgensen.
- 113/85 "DESUSPENSION OF SPLITTING ELLIPTIC SYMBOLS II".
 Af: Bernhelm Booss og Krzysztof Wojciechowski.
- 114/85 "ANVENDELSE AF GRAFISKE METODER TIL ANALYSE AF KONFIGURATIONSTABELLER".
 Projekt rapport af: Lone Billmann, Ole R. Jensen og Arne-Lise von Moos.
 Vejleder: Jørgen Larsen.
- 115/85 "MATEMATIKKENS UDVIKLING OP TIL RENESSANCEN".
 Af: Mogens Niss.
- 116/85 "A PHENOMENOLOGICAL MODEL FOR THE MEYER-NELDEL RULE".
 Af: Jeppe C. Dyre.
- 117/85 "KRAFT & FJERNVARMEOPTIMERING".
 Af: Jacob Mørch Pedersen.
 Vejleder: Bent Sørensen
- 118/85 "TILFÆLDIGHEDEN OG NØDVENDIGHEDEN IFØLGE PEIRCE OG FYSIKKEN".
 Af: Peder Voetmann Christiansen
-
- 119/86 "DET ER GANSKE VIST - - EUKLIDS FEMTE POSTULAT KUNNE NOK SKABE RØRE I ANDEDAMMEN".
 Af: Iben Maj Christiansen
 Vejleder: Mogens Niss.
- 120/86 "ET ANTAL STATISTISKE STANDARDMODELLER".
 Af: Jørgen Larsen
- 121/86 "SIMULATION I KONTINUERT TID".
 Af: Peder Voetmann Christiansen.
- 122/86 "ON THE MECHANISM OF GLASS IONIC CONDUCTIVITY".
 Af: Jeppe C. Dyre.
- 123/86 "GYMNASIEFYSIKKEN OG DEN STORE VERDEN".
 Fysiklærerforeningen, IMFUFA, RUC.
- 124/86 "OPGAVESAMLING I MATEMATIK".
 Samtlige opgaver stillet i tiden 1974-jan. 1986.
- 125/86 "UVBYG - systemet - en effektiv fotometrisk spektral-klassifikation af B-, A- og F-stjerner".
 Projekt rapport af: Birger Lundgren.
- 126/86 "OM UDVIKLINGEN AF DEN SPECIELLE RELATIVITETSTEORI".
 Projekt rapport af: Lise Odgaard & Linda Szkotak Jensen
 Vejledere: Karin Beyer & Stig Andur Pedersen.
- 127/86 "GALOIS' BIDRAG TIL UDVIKLINGEN AF DEN ABSTRAKTE ALGEBRA".
 Projekt rapport af: Pernille Sand, Heine Larsen & Lars Frandsen.
 Vejleder: Mogens Niss.
- 128/86 "SMÅKRYB" - om ikke-standard analyse.
 Projekt rapport af: Niels Jørgensen & Mikael Klintorp.
 Vejleder: Jeppe Dyre.
- 129/86 "PHYSICS IN SOCIETY"
 Lecture Notes 1983 (1986)
 Af: Bent Sørensen
- 130/86 "Studies in Wind Power"
 Af: Bent Sørensen
- 131/86 "FYSIK OG SAMFUND" - Et integreret fysik/historie-projekt om naturanskuelsens historiske udvikling og dens samfundsmæssige betingethed.
 Projekt rapport af: Jakob Heckscher, Søren Brønd, Andy Wierød.
 Vejledere: Jens Høyrup, Jørgen Vogelius, Jens Højgaard Jensen.
- 132/86 "FYSIK OG DANNEELSE"
 Projekt rapport af: Søren Brønd, Andy Wierød.
 Vejledere: Karin Beyer, Jørgen Vogelius.
- 133/86 "CHERNOBYL ACCIDENT: ASSESSING THE DATA. ENERGY SERIES NO. 15."
 Af: Bent Sørensen.
-
- 134/87 "THE D.C. AND THE A.C. ELECTRICAL TRANSPORT IN As₂Se₃ SYSTEM"
 Authors: M.B.El-Den, N.B.Olsen, Ib Høst Pedersen, Petr Visčor
- 135/87 "INTUITIONISTISK MATEMATIKS METODER OG ERKENDELSESTEORETISKE FORUDSÆTNINGER"
 MATEMATIKSPECIALE: Claus Larsen
 Vejledere: Anton Jensen og Stig Andur Pedersen
- 136/87 "Mystisk og naturlig filosofi: En skitse af kristendomens første og andet møde med græsk filosofi"
 Projekt rapport af Frank Colding Ludvigsen
 Vejledere: Historie: Ib Thiersen
 Fysik: Jens Højgaard Jensen
- 137/87 "HOPMODELLER FOR ELEKTRISK LEDNING I UORDNEDE FASTE STOFFER" - Resume af licentiatforhandling
 Af: Jeppe Dyre
 Vejledere: Niels Boye Olsen og Peder Voetmann Christiansen.

- 138/87 "JOSEPHSON EFFECT AND CIRCLE MAP."
Paper presented at The International Workshop on Teaching Nonlinear Phenomena at Universities and Schools, "Chaos in Education". Balaton, Hungary, 26 April-2 May 1987.
By: Peder Voetmann Christiansen
- 139/87 "Machbarkeit nichtbeherrschbarer Technik durch Fortschritte in der Erkennbarkeit der Natur"
Af: Bernhelm Booss-Bavnbek
Martin Bohle-Carbonell
- 140/87 "ON THE TOPOLOGY OF SPACES OF HOLOMORPHIC MAPS"
By: Jens Gravesen
- 141/87 "RADIOMETERS UDVIKLING AF BLODGASAPPARATUR - ET TEKNOLOGIHISTORISK PROJEKT"
Projektrapport af Finn C. Physant
Vejleder: Ib Thiersen
- 142/87 "The Calderón Projektor for Operators With Splitting Elliptic Symbols"
by: Bernhelm Booss-Bavnbek og
Krzysztof P. Wojciechowski
- 143/87 "Kursusmateriale til Matematik på NAT-BAS"
af: Mogens Brun Heefelt
- 144/87 "Context and Non-Locality - A Peircan Approach
Paper presented at the Symposium on the Foundations of Modern Physics The Copenhagen Interpretation 60 Years after the Como Lecture. Joensuu, Finland, 6 - 8 august 1987.
By: Peder Voetmann Christiansen
- 145/87 "AIMS AND SCOPE OF APPLICATIONS AND MODELLING IN MATHEMATICS CURRICULA"
Manuscript of a plenary lecture delivered at ICMTA 3, Kassel, FRG 8.-11.9.1987
By: Mogens Niss
- 146/87 "BESTEMMELSE AF BULKRESISTIVITETEN I SILICIUM"
- en ny frekvensbaseret målemetode.
Fysikspeciale af Jan Vedde
Vejledere: Niels Boye Olsen & Petr Višćor
- 147/87 "Rapport om BIS på NAT-BAS"
redigeret af: Mogens Brun Heefelt
- 148/87 "Naturvidenskabsundervisning med Samfundsperspektiv"
af: Peter Colding-Jørgensen DLH
Albert Chr. Paulsen
- 149/87 "In-Situ Measurements of the density of amorphous germanium prepared in ultra high vacuum"
by: Petr Višćor
- 150/87 "Structure and the Existence of the first sharp diffraction peak in amorphous germanium prepared in UHV and measured in-situ"
by: Petr Višćor
- 151/87 "DYNAMISK PROGRAMMERING"
Matematikprojekt af:
Birgit Andresen, Keld Nielsen og Jimmy Staal
Vejleder: Mogens Niss
- 152/87 "PSEUDO-DIFFERENTIAL PROJECTIONS AND THE TOPOLOGY OF CERTAIN SPACES OF ELLIPTIC BOUNDARY VALUE PROBLEMS"
by: Bernhelm Booss-Bavnbek
Krzysztof P. Wojciechowski
- 153/88 "HALVLEDERTEKNOLOGIENS UDVIKLING MELLEM MILITÆRE OG CIVILE KREFTER"
Et eksempel på humanistisk teknologihistorie
Historiespeciale
Af: Hans Hedal
Vejleder: Ib Thiersen
- 154/88 "MASTER EQUATION APPROACH TO VISCOUS LIQUIDS AND THE GLASS TRANSITION"
By: Jeppe Dyre
- 155/88 "A NOTE ON THE ACTION OF THE POISSON SOLUTION OPERATOR TO THE DIRICHLET PROBLEM FOR A FORMALLY SELFADJOINT DIFFERENTIAL OPERATOR"
by: Michael Pedersen
- 156/88 "THE RANDOM FREE ENERGY BARRIER MODEL FOR AC CONDUCTION IN DISORDERED SOLIDS"
by: Jeppe C. Dyre
- 157/88 "STABILIZATION OF PARTIAL DIFFERENTIAL EQUATIONS BY FINITE DIMENSIONAL BOUNDARY FEEDBACK CONTROL: A pseudo-differential approach."
by: Michael Pedersen
- 158/88 "UNIFIED FORMALISM FOR EXCESS CURRENT NOISE IN RANDOM WALK MODELS"
by: Jeppe Dyre
- 159/88 "STUDIES IN SOLAR ENERGY"
by: Bent Sørensen
- 160/88 "LOOP GROUPS AND INSTANTONS IN DIMENSION TWO"
by: Jens Gravesen
- 161/88 "PSEUDO-DIFFERENTIAL PERTURBATIONS AND STABILIZATION OF DISTRIBUTED PARAMETER SYSTEMS: Dirichlet feedback control problems"
by: Michael Pedersen
- 162/88 "PIGER & FYSIK - OG MEGET MERE"
AF: Karin Beyer, Sussanne Blegaa, Birthe Olsen, Jette Reich, Mette Vedelsby
- 163/88 "EN MATEMATISK MODEL TIL BESTEMMELSE AF PERMEABILITETEN FOR BLOD-NETHINDE-BARRIEREN"
Af: Finn Langberg, Michael Jarden, Lars Frellesen
Vejleder: Jesper Larsen
- 164/88 "Vurdering af matematisk teknologi
Technology Assessment
Technikfolgenabschätzung"
Af: Bernhelm Booss-Bavnbek, Glen Pate med
Martin Bohle-Carbonell og Jens Højgaard Jensen
- 165/88 "COMPLEX STRUCTURES IN THE NASH-MOSER CATEGORY"
by: Jens Gravesen

166/88 "Grundbegreber i Sandsynligheds-
regningen"

Af: Jørgen Larsen

167a/88 "BASISSTATISTIK 1. Diskrete modeller"

Af: Jørgen Larsen

167b/88 "BASISSTATISTIK 2. Kontinuerte
modeller"

Af: Jørgen Larsen

168/88 "OVERFLADEN AF PLANETEN MARS"
Laboratorie-simulering og MARS-analoger
undersøgt ved Møssbauerspektroskopi.

Fysikspeciale af:

Birger Lundgren

Vejleder: Jens Martin Knudsen
Fys.Lab./HCØ

169/88 "CHARLES S. PEIRCE: MURSTEN OG MØRTEL
TIL EN METAFYSIK."

Fem artikler fra tidsskriftet "The Monist"
1891-93.

Introduktion og oversættelse:

Peder Voetmann Christéansen

170/88 "OPGAVESAMLING I MATEMATIK"

Samtlige opgaver stillet i tiden
1974 - juni 1988

171/88 "The Dirac Equation with Light-Cone Data"

af: Johnny Tom Ottesen

172/88 "FYSIK OG VIRKELIGHED"

Kvantemekanikkens grundlagsproblem
i gymnasiet.

Fysikprojekt af:

Erik Lund og Kurt Jensen

Vejledere: Albert Chr. Paulsen og
Peder Voetmann Christiansen

173/89 "NUMERISKE ALGORITMER"

af: Mogens Brun Heefelt

174/89 " GRAFISK FREMSTILLING AF

FRAKTALER OG KAOS"

af: Peder Voetmann Christiansen

175/89 " AN ELEMENTARY ANALYSIS OF THE TIME
DEPENDENT SPECTRUM OF THE NON-STATONARY
SOLUTION TO THE OPERATOR RICCATI EQUATION

af: Michael Pedersen

176/89 " A MAXIUM ENTROPY ANSATZ FOR NONLINEAR
RESPONSE THEORY"

af : Jeppe Dyre

177/89 "HVAD SKAL ADAM STÅ MODEL TIL"

af: Morten Andersen, Ulla Engström,
Thomas Gravesen, Nanna Lund, Pia
Madsen, Dina Rawat, Peter Torstensen

Vejleder: Mogens Brun Heefelt