乳酸菌 *Lactococcus lactis* IL1403 代謝網路之特徵探究

黃聖堯
國立陽明大學生物醫學資訊所
d49623005@ym.edu.tw
楊思韻
國立陽明大學生物醫學資訊所
q39428006@ym.edu.tw
鍾翊方
國立陽明大學生物醫學資訊所
ifchung@ym.edu.tw
王逢盛
國立中正大學化學工程所
chmfsw@ccu.edu.tw

摘要

在此研究中，我們以乳酸菌(*Lactococcus lactis* IL1403)為例，進行代謝網路特徵的探究。首先，我們應用反置通量分析方法，以獲得整體代謝網路內部通量的調控情況。此作法可讓我們以部分的已知通量而推算其他未知通量，並且可利用此一方式了解調變某一代謝體的通量時，其對整個代謝網路的影響。此外，我們使用基本通量模式找出構成代謝網路反應的基本路徑，並配合二項式規劃的最適化分析方式，找出代謝網路中具有顯著重要性的反應路徑。

關鍵詞：代謝網路，反置通量，基本通量模式，二項式規劃，乳酸菌

一、緒論

乳酸菌常存在於富含營養的環境中，例如牛乳、肉類、起司、正在分解的植物和哺乳類的腸道，他們屬於低 GC 含量、格蘭式陽性菌。乳酸菌通常被用在農產品工業，主要是因為他們能將環境週遭的醣類迅速轉為一種主要的發酵產品—乳酸，這個特性使得乳酸菌在工業應用上很重要，尤其被用作為發酵工業中的 starter cultures。乳酸菌近來被用在益生菌用途，提供人類食物及動物養分，而在最近的研究中報導，益生菌在多種腸胃道不適症的治療上做為媒介非常有效[1]。由於乳酸菌有潛力安全地、有效率地產生食物的營養成分，已成為這個領域學術上和工業上最重要的焦點。除此之外，乳酸菌也是在治療上扮演重要角色的異質性蛋白質和胜肽之生產及運輸的好的代表媒介。很多乳酸菌有抗酸性因而能在膽汁中生存，所以能夠作為疫苗 antigen 的運輸媒介[3]。

為深入探究乳酸菌，本研究採用乳酸菌(*Lactococcus lactis* IL1403)的糖解代謝網路，以檢視其在穩態下的特性。這邊我們採用兩種策略來進行此研究：(1) 利用反置通量分析(Inverse flux analysis)以瞭解整體代謝網路內部通量的調控情況。此處目的是希望可透過部分已知通量而推得其他未知通量，並可針對部份通量的擾動來觀察其他內部通量的變化。另外我們更可透過矩陣求解方程組的特性，得知如何改變已知通量及未知通量的組合，這將可進一步應用在實驗條件不同時，未知量測數據的求解。(2) 基本通量模式(Elementary flux modes, EFM) 配合二項式規劃(Quadratic programming) 的最適化分析方式，以找出代謝網路中具有顯著重要性的反應路徑。這邊每個 EFM 定義從初始參與的代謝體(metabolites)到最終產物(products)的反應途徑關係。而二項式規劃的最適化分析方式，則是基於現有通量分

佈條件下，賦予不同權重於每條 EFM，以顯示不同 EFM 所佔的重要性程度。藉此我們可找出跟乳酸菌主要產物相關的重要途徑，並可藉由對產物的通量擾動，瞭解不同組成路徑(EFM)重要性的變化。

二、分析方法

隨著科技的進步，生物系統反應路徑的建立也越來越完整，但由於完整正確地動力學參數的取得不易，很難進行完整的生物系統動態模擬，因此許多研究只基於系統穩態下進行代謝網路特性的探究，此種分析方法只需要提供以下資訊即可：

1. 完整正確的生物系統路徑(Pathway)。
2. 所有通量的化學反應方程式。
3. 每條化學反應是否為可逆。

反置通量分析

當我們獲得一個生物系統反應路徑時，我們以計量矩陣 S (Stoichiometric matrix)來描述其代謝體與所參與反應之間的關連性。這邊列矩陣表示代謝物，行矩陣表示生物系統的化學反應，整體反應表示式如下：

$$\frac{dx}{dt} = SV \qquad (1)$$

x表示m個代謝物濃度($m \times 1$向量)
V表示r個反應對應的通量($r \times 1$向量)
S表示$m \times r$的計量係數
t表示時間

假設為在穩態下，則方程式(1)可進一步表示成：

$$SV = 0 \qquad (2)$$

在方程式(2)中，V 為在穩態下的通量向量，再將上述方程式(2)中的 S 矩陣做重新調整可表示成以下形式：

$$\begin{bmatrix} S_u & S_m \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} J_u \\ J_m \end{bmatrix} = 0 \qquad (3)$$

J_m 表示可被量測的通量向量
J_u 表示未知(unknown)的通量向量
S_m 表示對應可量測通量的計量係數矩陣
S_u 表示對應未知通量的計量係數矩陣

接下來只要藉由已知的 J_m、S_m 及 S_u 的資訊，我們便可透過以下方程式得到未知 J_u 的解：

$$J_u = -\left(S_u{}^T S_u\right)^{-1} S_u{}^T S_m J_m \qquad (4)$$

這邊因 S_u 不見得是方陣，故以矩陣 psudo inverse 求解表示之。而上述所呈現的即為反置通量分析理論的基本精神[2]，以實驗上可獲得的量測資料觀點而言，其意義為研究者可以從實驗量測的少數通量資訊，通常為基質(Substrates)或者是產物(Products)等，來預測多數生物系統內部未知通量。藉此我們可建立生物系統的完整代謝通量模式，而克服實驗上數據不容易量測的困擾。另外由於方程式(2)裡每條反應式係數彼此間含有線性相依或線性獨立的狀況，因此我們在利用矩陣解方程組的方式來求得未知通量前，將先偵測係數向量間的相依狀況，得知如何改變已知通量及未知通量的組合，這可進一步應用在實驗條件不同時，未知量測數據的求解。

靈敏度分析

在反置通量分析的延伸應用上，Liao 引進了靈敏度的觀念[5]，此處定義一個控制係數 F (Control coefficient)，來量化生物代謝系統中通量相互間的影響。由於在控制係數求解過程中，$\frac{\partial J_{u,i}}{\partial J_{m,j}}$ 會與矩陣 S_u 特性息息相關，因此這邊在進行靈敏度分析

前，亦需先偵測S_u矩陣的係數向量間的相依狀況。

$$F_j^i = \left(\frac{J_{m,j}}{J_{u,i}}\right)\left(\frac{\partial J_{u,i}}{\partial_{m,j}}\right)$$

$$\begin{cases} \dfrac{\partial J_{u,i}}{\partial J_{m,j}} = -\left(S_u{}^T S_u\right)^{-1} S_u{}^T S_m \\ J_{u,i}：為J_u中任何一通量 \\ J_{m,j}：為J_m中任何一通量 \end{cases} \quad (5)$$

基本通量模式與二項式規劃最適化的分析方式

基本通量模式(EFM)為 Schuster 與 Hilgetag 提出[8]，用來定義從初始參與的代謝體(metabolites)到最終產物(products)的反應途徑關係。進一步而言，基本通量模式所找出的路徑，就是可在系統穩態條件下操作的最少酵素集合所形成的路徑，也就是說使用通量空間中線性獨立的基底向量，藉著彼此之間的組合來得到所有可能的通量分布。而在數學上基於給定某個在系統穩態狀況的通量V，其可表示成所有 EFM 非負的線性組合：

$$V = w_1 e_1 + w_2 e_2 + w_3 e_3 + ... + w_n e_n$$

$$\begin{cases} e_i：為每個找出的基本通量模式 \\ w_i：為對應每條EFM非負的實數值 \end{cases} \quad (6)$$

這邊藉由EFM，我們可進一步觀察到以下現象[6]：

(a) 可找到從消耗某代謝體到最終產物合成之最佳代謝路徑：如盼找到消耗最少營養源而得到最多生成物產量的代謝途徑。

(b) 進行代謝途徑之強健度(robustness)、多餘度(redundancy)分析：藉此我們可判定所找到的基本代謝路徑中，當所參與的部分內部反應式喪失了作用，則生物體是否能採取不一樣的途徑而達到最終產物，因此這些不足以影響代謝途徑的反應便可以刪除。

(c) 找到重要代謝反應：相對於強健度與多餘度分析，我們亦可找到在基本代謝途徑中，不可缺少的代謝反應。

(d) 找到共同參與基本反應途徑所需之酵素集合：在基本代謝路徑中，當某個反應被採用時，另個反應亦會同時發生，則此時表示參與此兩個反應的酵素需同時存在此反應途徑。

(e) 基本代謝途徑長度：可進一步分析所參與反應式(酵素)的多寡。

另外Schwartz與Kanehisa把基本通量模式的作法運用二項式規劃最適化分析於路徑分析上[7]，他們定義以下所述之目標函數(參考方程式(6))及限制函數，藉此所找到之最小權重組合表示實際最靠近生物系統的通量分佈狀況，且可判別出哪些EFM具有重要性(貢獻較大通量)。

目標函數　$\text{Minimize} \sum_{i=1}^{m} w_i^2$

限制函數　$V = \sum_{i=1}^{m} w_i e_i \quad (7)$

若是求解出來的w_i越大，則代表此條路徑模式在生物系統中扮演極為重要的角色。再者我們可藉此找出跟乳酸菌主要產物相關的重要途徑，並可透過對產物的通量擾動，瞭解不同組成路徑(EFM)重要性的變化。

三、實例應用

本研究所採用乳酸菌的代謝路徑是取自 detailed glycolytic model of *Lactococcus lactis* IL1403 (JWS, http://www.jjj.bio.vu.nl/) 所提供的代謝網路。此一系統中包含了 23 個代謝體及 29 條化學反應。

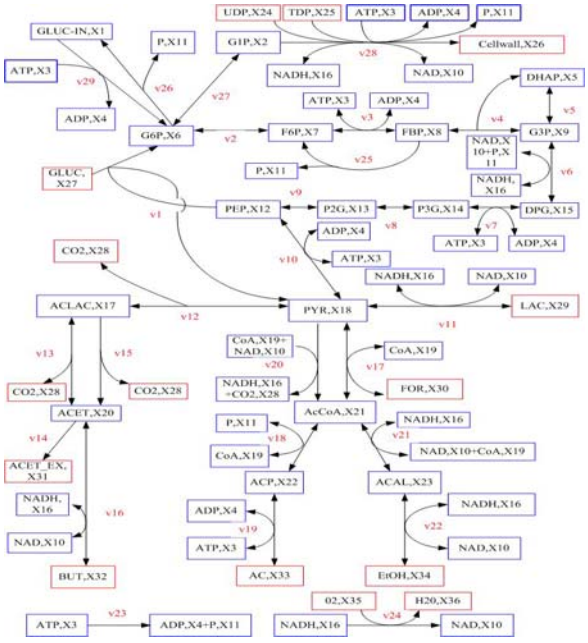


圖 1：The detailed glycolytic model of *Lactococcus lactis* IL1403。

反置通量的應用

在 S_u 的挑選方式是藉由JWS的計量係數矩陣，經由MATLAB的程式運算，在基於矩陣運算的條件下，發現有19條的線性方程組為線性獨立的現象。換句話說，我們利用反置通量所導出的公式(5)，把JWS的整個係數矩陣藉由矩陣求解的一個計算方式，把反應係數矩陣分解成兩個係數矩陣 S_u 、 S_m ，把 S_m 中的反應通量當做是可量測的通量，S_u 中的反應通量當做是無法測得的通量。JWS網站所提供的實驗值來當作 S_m 的通量。

在表1藉由這樣一個實驗的數據，來當做一個模擬的對照，用來判斷模擬的數據是否與實驗數據雷同。做法是先以JWS網站上的部份實驗數據來當做已知，經過反置通量的方式，求出其它未知的數值，再經過與網站上所提供的實驗數據比對後，可以發現我們所推算的數值與真正的實驗數值相當的接近。

另外，若是方程組內部有線性相依的關係，當線性相依的方程組互換時，所求的解將不會改變。藉由此一特性，我們可以將可以互換其相依的不同變數，來驗證我們所模擬出的數值，並且可藉由互換其值不變的條件，讓我們對想觀察的反應通量有更多空間，而不會只限於某部份的反應通量上，讓我們在實驗中減少量測的困難。如表 2 與表 3，將已知與未知的通量互換後，所得假設未知的通量仍未有改變。

表 1：利用反置通量求得的數值與 JWS 實驗數值對照表。

Jm	V13	v15	v16	v17	v19	v22	v23	v24	v25	v29
JWS	0.004	0	0.0037	1.0183	4.2374	0.0647	186.30	5.3965	0.0072	0.0115

Ju	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	V10	v19
JWS	101.36	96.2021	96.230	96.202	96.202	192.41	192.41	192.41	91.042	4.2374
Inverse	101.36	96.2024	96.230	96.202	96.202	192.41	192.41	192.41	91.042	4.2374

Ju	v11	v12	v14	v18	v20	v21	v26	v27	v28
JWS	188.10	0.00402	0.0030	4.2374	3.2838	0.0647	0.0115	5.1606	1.0322
Inverse	188.10	0.00402	0.0030	4.2374	3.2838	0.0647	0.0115	5.1606	1.0322

表 2：交換已知通量 v13 與未知通量 v9。

Jm	***V9***	v15	v16	v17	v19	v22	v23	v24	v25	v29
JWS	192.41	0	0.0037	1.0183	4.2374	0.0647	186.30	5.3965	0.0072	0.0115

Ju	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	V10	***v13***
JWS	101.36	96.2021	96.230	96.202	96.202	192.41	192.41	192.41	91.042	0.004
Inverse	101.36	96.2024	96.230	96.202	96.202	192.41	192.41	192.41	91.042	0.004

Ju	v11	v12	v14	v18	v20	v21	v26	v27	v28
JWS	188.10	0.00402	0.0030	4.2374	3.2838	0.0647	0.0115	5.1606	1.0322
Inverse	188.10	0.00402	0.0030	4.2374	3.2838	0.0647	0.0115	5.1606	1.0322

表 3：交換已知通量 v13、v19 與未知通量 v1、v10。

Jm	***v1***	v15	v16	v17	***v10***	v22	v23	v24	v25	v29
JWS	101.36	0	0.0037	1.0183	91.042	0.0647	186.30	5.3965	0.0072	0.0115

Ju	***v13***	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	***v19***
JWS	0.004	96.2021	96.230	96.202	96.202	192.41	192.41	192.41	192.41	4.2374
Inverse	0.004	96.2024	96.230	96.202	96.202	192.41	192.41	192.41	192.41	4.2378

Ju	v11	v12	v14	v18	v20	v21	v26	v27	v28
JWS	188.10	0.00402	0.0030	4.2374	3.2838	0.0647	0.0115	5.1606	1.0322
Inverse	188.10	0.00402	0.0030	4.2374	3.2838	0.0647	0.0115	5.1606	1.0322

靈敏度分析的應用

針對我先要觀察的產物Lac,做一靈敏度的分析。從圖3與圖4的相比較下，沒有差異性很大，因此藉由這樣一個方式，我們可以與擾動的狀態相互驗證，觀察出在代謝通量上的相互影響關係，幫助我們可以更了解代謝網路中，有那些代謝反應的交互作用較大。這樣的一個結果可以幫助我們無須在每一個通量上做一耗時的功夫，也加速我們對反應通量了解。所以針對目前此乳酸菌的代謝圖譜下的29條反應通量，在我們想觀察的第11條反應通量下，看出主要影響此一反應通量的有v1、v2、v3、v4、v5、v6、v7、v8、v9、v10這幾條影響變化較為明顯，另外再配合基本通量的路徑分析方式，不難看出相互對照的結果，讓我們對於反應通量的調控有清楚的了解。

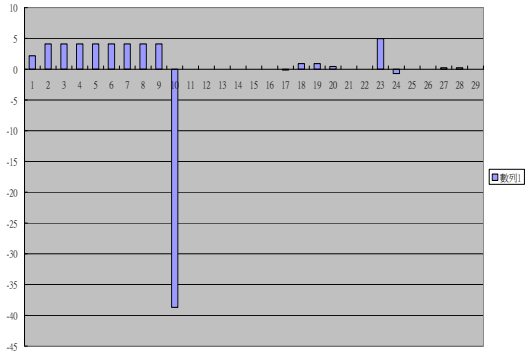


圖3：分別對所有通量做-5%的擾動對Lac的影響關係圖。

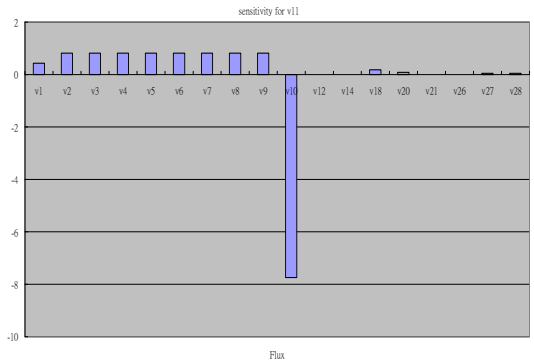


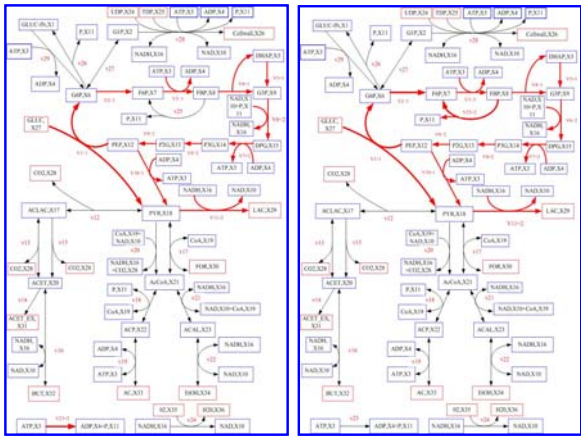
圖 4：針對 v11 做一靈敏度分析圖。

基本通量模式及二項式規劃最適化分析方式的應用

採用類似數學上凸基底空間的概念，把相關的反應通量做一線性的組合，找尋代謝網路中有可能的行為路徑。而此軟體metatool,提供了一簡單化找尋基本通量路徑的方式，因此我們便開始著手於找出有可能的路徑分析,這邊圖5我們展示兩條從Gluc到Lac的可能路徑狀況。

它的作法上是以加權向量求解為基本架構下，讓其目標函數下的 w 的矩陣長度最小，換言之，就是希望能使最接近真實生物代謝系統模式的使用最大化。藉由這樣一個方式，讓我們可以看出哪些基本通量在乳酸菌的代謝系統中所扮演不同角色的重要性。但是，由於隨著代謝網路的反應通量的多寡，基本通量模組的條數也會相對的增加，並且我們是採用所有通量模組的所有係數做一計量矩陣的分析，在這樣的條件下，相對的隨著計量係數矩陣的變大，分析與運算的困難度也會增加。因此，藉由矩陣的線性關係的特性，先以高斯消去法找出此一矩陣的Rank值，再利用程式的語法加速我們找到線性獨立的條數與標記，把這幾條線性獨立的方程組替代原有的計量係數矩陣，我們依然可以做一最佳化的應用。

在分析方式是採取找出生物所有可能的行為總合，來闡述乳酸菌整體的代謝路徑的通量分佈情形，根據這樣一個方法，找出了204條的基本通量組合。藉由這樣一個路徑的呈現，再者加入了二項式最佳化的觀念，找出了幾條生成Lac的重要路徑，如表4。藉由這幾條路徑weight值的不同看出其對Lac的影響也有所不同，再者Lac經過擾動後，weight的值也相對產生一些變化，這也告訴我們，每一條路徑針對代謝物的不同與量的多寡,路徑將會隨之改變。



Gluc → LAC

圖 5：利用 EFM 找出從 Gluc 到 Lac 的兩條可能路徑狀況。

表 4：針對從 Gluc 到 Lac 相關的基本通量路徑，檢視改變 v11 時的影響狀況。

No. of EFM	Weight	v11*1.05 Weight	Difference (%)	Overall reaction
15	0.25747	0.25047	2.7188	GLUC = 2 LAC
178	0.09434	0.08036	14.8187	GLUC + 4 BUT + 2 H2O + 6 CO2 = 8 LAC + 2 AC
36	0.05511	0.04791	13.065	GLUC + 2 BUT + 2 CO2 + 2 FOR = 6 LAC
21	0.01588	0.01546	2.6448	GLUC + 2 AC + 4 FOR = 4 LAC + 2 H2O + 2 CO2
128	0.06901	0.06892	0.13187	2 BUT + H2O + 2 CO2 = 2 LAC + AC + ETOH

四、結論

應用反置通量的分析方式，可以不需要完整動力學參數的特性，從各資料庫收集乳酸菌代謝圖譜及其化學反應方程式，建構完整計量係數矩陣 S，利用能夠量測的外部通量來推估乳酸菌系統內部未知的通量。接著，我們使用反置通量分析法，來模擬在某一個通量的微小擾動(+5%)下，對於生成目標產物的影響程度，並且以控制係數來表示其影響程度，其結果與文獻中的實驗數據相符，這証明對真實系統的預測有一定的準確性與參考價值。

之後，應用基本通量模組的二項式規劃的最適化分析(Quadratic Programming Approach)理論，利用最適化方法使 w 的向量長度最小(the length of the weight vector)，換言之，就是希望能使最接近真實生物代謝系統模式的使用最大化，並將此一模式突顯出來。並且得到唯一(unique)的加權(weighting)向量，來探討乳酸菌系統在內部通量分佈行為有何改變，並且如何快速且有效的挑選出重要基本通量路徑來進行分析，配合對通量的擾動與調控來對照可以看出每個基本通量模式其必須通過的必需路徑(Essential route)。

在這樣的一個研究過程中，有幾個環結是我們所要去突破的，例如：代謝通量的測量、代謝圖譜的建立、相關的動力反應方程式等，在無法確認的條件下，引用他人所做過的數據或部份的假設，讓此研究得以繼續，但是，限制的條件越多的情況下，越無法真正接近真實情況。因此，在這些可靠性較高的代謝通量數值上，大多採用前人所引用過的實驗數據或是網站上所提供的實驗數據，再者也可運用模擬數據的方式與實驗數據做一相互印證。另外，試著學習或了解實驗的技術，而代謝的路徑又存在彼此互相影響，唯有在研究的過程中，增加我們對於圖譜認知的廣度與深度，更能幫助我們去對網路的延伸。

五、參考文獻

[1] W.M. De Vos and J. Hugenholtz, “Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria”, *Trends in Biotechnology*, 22(2), 72-79, 2004.

[2] J. Delgado and J.C. Liao, “Inverse flux analysis for reduction 77 of acetate excretion in *Escherichia coli*”, *Biotchnology Progress*, 13,361-367, 1997.

[3] S. Hanniffy, U. Wiedermann, A. Repa, A. Mercenier, C. Daniel, J. Fioramonti,

H. Tlaskolova, H. Kozakova, H. Israelsen, S. Madsen, A. Vrang, P. Hols, J. Delcour, P. Bron, M. Kleerebezem and J. Wells, “Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health”, *Advances in Applied Microbiology*, 56, 1-64, 2004.

[4] H. Kitano, “Computational systems biology”, *Nature*, 420, 206-210, 2002.

[5] H. Kacser and J.A.Burns, “The control of flux In Rate Control of Biological Processes”, S*ymposia of the Society for Experimental Biology*, 27, 65-104, 1973.

[6] S. Klamt and J. Stelling, “Two approaches for metabolic pathway analysis”, Trends in Biotechnology, 21(2), 64-69, 2003.

[7] J.M. Schwartz and M. Kanehisa, “Aquadratic programming approach for decomposing steady-state metabolic flux distributions onto elementary modes”, *Bioinformatics*, Suppl 2:ii204-ii205, 2005.

[8] S. Schuster and C. Hilgetag “On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state”, *J. Biol. Syst.*, 2, 165–182, 1994.