

國立暨南國際大學資訊管理研究所

碩士論文

運用化學平衡解與酵素動力學於代謝網路模擬之效果分析

The Analysis of Applying Chemical Equilibrium and Enzyme
Dynamics in Metabolic Network Simulation

指導教授：俞旭昇 博士

研究生：陳智泉

中華民國九十七年六月

誌謝

專科是唸企管、二技是唸國貿，退伍後才發現自己原來比較喜歡電資方面的科系。現在仔細想想，認真的去寫好國小作文與思考題目本身其實是很重要的（我的願望、我的志向、我的未來……）。雖然有過猶豫，但最後還是決定投入研究所的考試，原本想考資工所，但在某些因素下，最後選擇了資管所，也如願的考進這一所美麗的學校。

由於自己之前不是本科系，加上研究的領域屬生物資訊，這對我而言更是一項大挑戰，所以一路走來始終辛苦，但收穫可是相當大。很感謝我的指導教授，俞旭昇老師，沒有老師您的指導，我不會有今天的成果，真的很謝謝老師。

最後要感謝 lab 的學長姐，劍霞、哲嘉、小玫、佑寧，也要感謝我的同學以及學弟妹，蒲泰、邵睿、洛豪、益民、書楠、明勳、克威，更要感謝家人以及所有關心我的朋友，謝謝你們的陪伴與支持。

陳智泉 謹誌
國立暨南國際大學 資訊管理研究所
中華民國 九十七 年 七月

論文名稱：運用化學平衡解與酵素動力學於代謝網路模擬之效果分析

校院系：國立暨南國際大學資訊管理學系

頁數：63

畢業時間：中華民國九十七年六月

學位別：碩士

研究生：陳智泉

指導教授：俞旭昇 博士

論文摘要

本研究利用離散型事件驅動方式模擬生化代謝反應，資料模型採修正後的 Petri Nets，將基質與產物視為 Place，將酵素視為 Transition，濃度視為 Token。Transition 為一計算物件，有關酵素催化的反應速率之計算方式或濃度轉換方法將寫於其中，藉此來動態計算轉置兩方位置內的濃度值。

定量研究酵素的催化性，稱為酵素動力學，亦即計算酵素的反應速率。影響酵素反應速率的因素很多，舉凡反應物濃度、酵素濃度或抑制劑等皆會影響，更增加計算反應速率的複雜性。通常生化模擬軟體在計算反應速率時，會把時間切成很多小等份，再來計算反應完成時會進行多少等份的時間，並從中觀察每個時間點上的濃度變化，但這樣會碰到一個問題，時間要切多細才夠精準？此種計算方式會耗用電腦大量的資源且模擬速度較慢。

在本研究中，提出一種化學平衡解計算方法，此方法不需計算酵素的反應速率，而是利用平衡常數直接去求得一個反應的平衡解，再透過所有相連反應的觸發與濃度振盪，當一組代謝網路中的所有反應都達到平衡時，即為 steady state。此法的優點是可以利用較少的參數即可模擬，且 CPU 的模擬時間會大幅降低。

本研究以 Java 物件導向程式語言實作，最後以厭氧糖解作用 (anaerobic glycolysis) 為例，代入相同的數據，分別以化學平衡解和 Michaelis-Menten 酵素動力學來求取最後各反應物達 steady state 時的濃度值，結果顯示兩者的數據是近似的，且兩方法的濃度-時間圖亦近似，此結果說明在某些需求下，使用者可以用化學平衡解來取代 Michaelis-Menten 酵素動力學。

關鍵字：離散型事件驅動、化學平衡解、酵素動力學、代謝網路、Petri Nets

Abstract

Enzyme dynamics and chemical equilibrium are two major concepts for metabolic pathway modeling and simulation. This thesis implements two algorithms for these concepts and plugs them into a Petri Nets based simulation software. Then we apply these algorithms to a same case and compare the simulation results. The pros and cons are also discussed to conclude the situations for which algorithm performs better.

Enzyme dynamics is a quantity method about catalysis of enzyme. There are many factors affect the catalysis of enzyme such as concentration of reactants, enzymes and inhibitors. Enzyme dynamics is a time-slice method and it has a problem that is how to determine the period of time-slice. The above-mentioned problems cause enzyme dynamics more complex.

The thesis implements an algorithm of chemical equilibrium that it doesn't compute the velocity of enzyme. It is an algorithm of binary cut and can use a equilibrium constant to complete compute directly. Then when all the adjacent reactions are fired lastingly, it will be steady state. The advantage of this algorithm is that it uses lesser parameters and reduces the simulation time of CPU.

Our implementation is based on Java language. After applying chemical equilibrium and Michaelis-Menten dynamics to simulate anaerobic glycolysis with the same data, we find the two solutions are similar. This information revealed that users can adopt chemical equilibrium to replace the Michaelis-Menten dynamics on some demands.

Keywords: chemical equilibrium, enzyme dynamics, metabolic pathway, Petri Nets

目錄

論文摘要	I
Abstract	II
目錄	III
圖目錄	V
表目錄	VI
第一章 緒論	1
1.1 研究背景、動機與範圍	1
1.2 研究目的	3
1.3 論文架構	3
第二章 文獻探討	4
2.1 酵素動力學	4
2.1.1 酵素的分類	4
2.1.2 Michaelis-Menten 酵素動力學	6
2.1.3 酵素的抑制作用	9
2.2 熱力學：自由能與化學平衡	10
2.2.1 熱力學第一定律	11
2.2.2 熱力學第二定律	11
2.2.3 自由能	12
2.2.4 標準自由能差與化學平衡	13
2.3 代謝網路	14
2.4 代謝模型的建模方法	18
2.4.1 連續型建模	18
2.4.2 離散型建模	20

2.5	資料模型-Petri Nets.....	20
2.5.1	Petri Nets 的組成元素	21
2.5.2	Petri Nets 的數學表示法	22
2.5.3	Petri Nets 的動態行為	23
2.5.4	Petri Nets 的性質	23
2.5.5	高階 Petri Nets	24
2.5.6	適用於生化模擬的 Petri Nets	24
2.6	生化資料庫.....	25
第三章 定量演算法.....		27
3.1	Transition 的計算	27
3.2	演算法分析.....	28
3.2.1	Michaelis-Menten 酵素動力學演算法	28
3.2.2	化學平衡解演算法.....	31
第四章 化學平衡解與 Michaelis-Menten 酵素動力學演算法的效果分析		36
4.1	厭氧糖解作用	36
4.2	兩定量演算法的效果分析與比較.....	41
4.2.1	模擬單一反應達 steady state 後的比較.....	43
4.2.2	模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後的比較.....	45
4.2.3	Michaelis-Menten 酵素動力學的 delay time 切得不夠細的結果 ..	52
第五章 結果與討論.....		58
參考文獻		60

圖目錄

圖 1-1	分子生物學的中心法則.....	1
圖 1-2	反應物濃度隨著時間的增加而改變.....	2
圖 2-1	Michaelis-Menten 酵素動力學的反應速率與受質濃度之關係..	7
圖 2-2	化學平衡.....	14
圖 2-3	人體主要的代謝網路圖.....	16
圖 2-4	KEGG 網站上的複雜代謝途徑	17
圖 2-5	反應前初始狀態的 Petri Nets.....	22
圖 2-6	反應後的 Petri Nets	22
圖 3-1	計算模型.....	27
圖 3-2	Michaelis-Menten 酵素動力學的演算法流程圖.....	29
圖 3-3	化學平衡解之演算法流程圖.....	33
圖 4-1	厭氧糖解作用的代謝 Petri Nets 圖.....	37
圖 4-2	單一反應比較：酵素 TPI 的反應物濃度-時間變化圖	44
圖 4-3	模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後的濃度-時間變化圖	48
圖 4-4	M-M 酵素動力學不同 delay time 下的濃度-時間變化圖.....	54

表目錄

表 2-1	酵素的分類系統.....	5
表 2-2	加入不同抑制劑形態對 V_{max} 與 K_m 的影響.....	10
表 2-3	Petri Nets 元素.....	21
表 2-4	常用的生物學線上資料庫.....	26
表 4-1	厭氧糖解作用的化學反應式.....	38
表 4-2	厭氧糖解作用所有的參與代謝物.....	39
表 4-3	厭氧糖解作用所有參與的酵素.....	40
表 4-4	模擬所需的各種參數值.....	42
表 4-5	酵素 TPI 反應達 steady state 時的執行效率比較.....	43
表 4-6	所有參與模擬的代謝物初始濃度.....	45
表 4-7	整組厭氧糖解作用達 steady state 時的執行效率比較.....	46
表 4-8	模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後之濃度值.....	47
表 4-9	M-M 的 delay time 設 1/200 秒能否達 steady state?.....	52

第一章 緒論

1.1 研究背景、動機與範圍

在西元 1953 年，DNA 的雙股螺旋結構被 James Watson 與 Francis Crick 提出，並且揭示了 DNA 所攜帶的遺傳訊息如何完成遺傳訊息的複製與表現的機制，即 DNA 經轉錄作用(transcription)成 RNA，再經轉譯作用(translation)成蛋白質的過程，這也是分子生物學的中心法則(Central dogma of molecular biology)[6][7]。

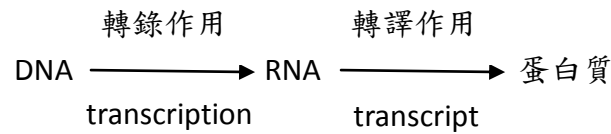


圖 1-1 分子生物學的中心法則

在此之後，生物化學、分子遺傳學與生物技術等皆快速成長，使生物學家可以針對不同的基因進行分子層面的解析與研究。人類基因體計劃就在這種時代背景下漸漸萌芽，並在 1990 年正式展開，最後在 2003 年完成人類基因體的解序，在此之後即為後基因體時代。

傳統生物學是以化約論的觀點，假設一個複雜的系統可以分割成許多不會互相干擾的子系統，只要將子系統研究清楚，就能瞭解複雜系統的行為。而系統生物學(systems biology) [8][9]是以合成的角度來看生物學，認為子系統存在不獨立的可能性，並試圖整合不同層次信息以理解生物系統，希望尋找新的方法來解決子系統間交互作用的問題，期望最終能夠建立整個系統的可理解模型。

在後基因體時代的研究重點將會是以系統生物學為主，強調的會是臨床醫學在細胞和器官系統層次的整合。並期望從基因所表現的功能和特性，來整合基因體學、蛋白質體學、生物資訊學、細胞生物學及分子生物學等，將之運用於生命科學中所有領

域，如序列比對與分析、基因預測、蛋白質結構預測、蛋白質與蛋白質的交互作用、及生化模擬等等。

本研究即是在系統生物學的願景下誕生，並聚焦於生化模擬中的細胞代謝領域，期望建立在細胞代謝中所需引用的機制，如酵素動力學，將這些機制寫成計算法則來模擬細胞代謝反應。

在定量法則方面，一般的生化模擬軟體，如[10][11~14]，通常都是以酵素動力學或微分方程等時間切片(time slice)的方式來計算反應速率，再來觀察反應物如何隨時間的改變而產生濃度上的變化。亦即會把時間切成很多小等份，再來計算反應完成時會進行多少等份的時間。這種計算方法的主要問題是，時間要切多細才能精準的呈現生化反應？並且可以預知的是時間切得越細就越精準，但所需的 CPU 計算時間也就越長。

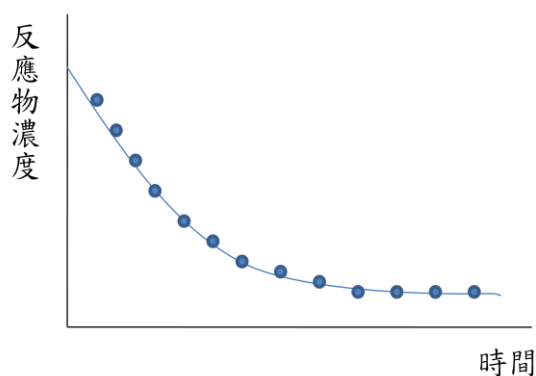


圖 1-2 反應物濃度隨著時間的增加而改變

在本研究中，我們假設使用者比較重視反應完成時的最終濃度值，且不需要精確的去了解中間的濃度變化過程。希望能研究出一種不需要牽涉到反應速率及時間切片的計算方式，而可以直接去求得一個最終解，省去找一堆計算反應速率所需的參數，並期望能讓 CPU 的模擬時間能大幅縮短。

1.2 研究目的

本研究在細胞代謝的領域裡，共實作出兩種不同的方法，一種是採修正後的 Michaelis-Menten 酵素動力學公式（時間切片方法）；另一種是本研究所提的化學平衡解（非時間切片方法），來定量計算並觀察所模擬的代謝網路中，所有的基質與產物之濃度會如何變化。而本研究的目的是去探討下列三項問題：

- 探討酵素動力學與化學平衡解在計算上的實作方法
- 比較兩者在模擬相同案例後所需的時間與效果
- 討論兩者適用的時機與參數之設定

1.3 論文架構

本文第二章是文獻探討，會先簡單說明酵素動力學與熱力學的基本觀念，再分別介紹代謝網路、代謝模型的建模方法、資料模型 Petri Nets 與常用的線上資料庫。

第三章是定量演算法的解析，會分別說明 Michaelis-Menten 酵素動力學和化學平衡解的實作方法。

第四章是此二種定量方法的比較與效果分析。

第五章是結果與討論，說明定量方法改採化學平衡解來計算有何優勢與兩者適用之時機。

第二章 文獻探討

2.1 酵素動力學

我們的細胞中有成千上萬種酵素，它們都是大型的分子，比它們所作用的分子還要大上幾百倍、幾千倍。大部份的酵素都是蛋白質，由簡單的胺基酸長鏈扭曲、折疊成各式各樣的形狀。

酵素是代謝反應中的催化劑，目的在加速反應的進行，若沒有酵素，則沒有辦法維持生命的持續運轉。每一個酵素的表面上都有若干個接合區，讓一些特定的分子恰好塞進去，一旦酵素抓穩這些特定的分子，即可迫使這些分子進行化學反應，將反應物轉化成產物。

定量研究酵素的催化性，稱為酵素動力學(enzyme kinetics)，即提供有關酵素反應速率之訊息。酵素動力學之研究，同時測定酵素對受質及抑制劑的親和性，並提供反應機制的詳細內容。酵素動力學有一些實際之應用，包括對代謝的調節力量和增進治療之設計[1]。

2.1.1 酵素的分類

最初酵素命名並無法定規則，但都附有 -in 或 -zyme 等字尾，例如 trypsin, renin 及 lysozyme 等。後來漸以該酵素催化的反應加上 -ase 字尾為名，再冠上此反應的反應物。例如尿素酶(urease)催化分解尿素(urea)。為消除困惑，國際生化學會(IUB)酵素的系統命名，是按照其催化的化學反應之型態來做分類與命名。

此酵素分類系統，把所有酵素依催化反應分成六大類，以四組數字命名，例如 histidine carboxylase 為 EC 4.1.1.22 。

表 2-1 酵素的分類系統[15]

Main Class	4	Lyases	分裂 C-C, C-O, C-N 鍵
Subclass	4.1	C-C lyase	分裂 C-C 鍵
Sub-subclass	4.1.1	Carboxylase	分裂 C-COO 鍵
序列號碼	22	第 22 個 4.1.1	分裂組胺酸的 C-COO 鍵

酵素主要的六大分類如下：

1. 氧化還原酶(oxidoreductase)：

這個群的副分類尚包括去氫酶、氧化酶、加氧酶、還原酶、過氧化酶和水解酶。

2. 移轉酶(transferase)：

移轉酶催化從一個分子移去一個基團至另一分子的反應。這些基團的例子包括胺基、羧基、羰基、甲基、磷酸基和乙醯基。通常移轉酶的一般名稱中有移轉的簡稱，包括有轉羧基酶、轉甲基酶和轉胺酶。

3. 水解酶(hydrolase)：

水解酶催化靠加入水來完成打斷鍵接的反應。水解酶包括酯解酶、磷酸水解酶和胜肽酶。

4. 裂解酶(lyase)：

裂解酶催化移去基團(如：水、二氧化碳、氫)形成一個雙鍵或加入一個雙鍵。裂解酶的例子包括有脫羧酶、脫水酶、脫胺酶和合成酶。

5. 異構酶(isomerase)：

異構酶是一個異質性群的酵素，催化一些型態內部分子的重排。表異構酶催化不對稱碳原子轉換。變位酶催化官能機內部分子的移轉。

6. 連接酶(ligase)：

連接酶催化兩個受質分子鍵接之連接。這些反應的能量通常是由 ATP 水解所供應。許多的連接酶名稱包含在合成酶(synthetase)中。一些其他的連接酶被稱為羧化酶(carboxylase)。

2.1.2 Michaelis-Menten 酵素動力學

酵素動力學的形成，是根基於『過渡狀態濃度恆定』的概念。早在 1913 年，Michaelis 及 Menten 就以轉化酶(invertase)系統為研究對象，發現有關酵素與基質反應的一些行為模式[15]，他們提出：

1. Steady state 理論：

酵素催化時，基質先與酵素結合，生成過渡狀態，再轉變成產物。酵素與基質的結合是可逆的 ($E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$)，而當反應達穩定狀態 (steady state) 時，其中的 [ES] 濃度不變 (因為 ES 生成量等於其消失量)。

當反應達化學平衡時，正反應速率等於逆反應速率，並呈現動態平衡的情形，亦可稱為 steady state。

2. 酵素行為的數學描素：

反應速率(v)與酵素或基質的關係，可以數學式表示。在固定的酵素量下，反應速率 v 與基質濃度[S]成雙曲線關係(但只有雙曲線一股)，可用公式表示之，即 Michaelis-Menten 酵素動力學公式。如下圖所示，當受質濃度越大時，反應速率越快，濃度大到一定程度時，反應速率會逼近 V_{max} 。將 $V_{max}/2$ ，可以得到一 K_m 值， K_m 可視為是酵素和基質的親和力。

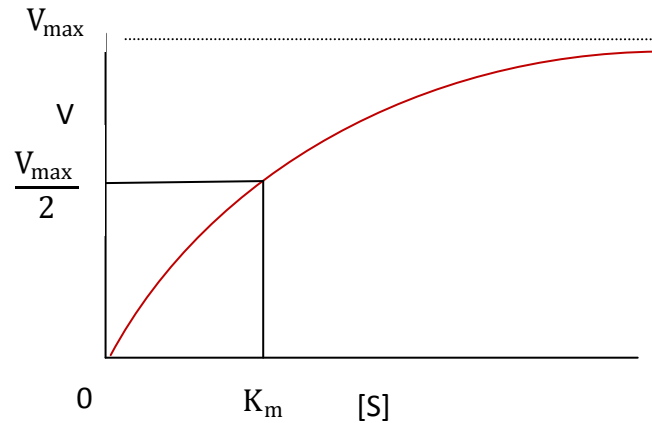
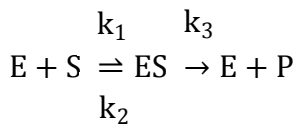


圖 2-1 Michaelis-Menten 動力學的反應速率與受質濃度之關係圖

Michaelis-Menten 酵素動力學(之後簡稱 M-M)是系統研究酵素反應速率最有用的模式之一。酵素和受質複合物之理論，在 1903 年首先由 Victor Henri 提出，是 M-M 酵素動力學之核心。當基質 S 和酵素 E 的活化位置接合時，中間複合產物 ES 被形成。在過渡狀態下，基質被轉換成產物。在短暫時間後，產物可從酵素解離。這過程可以做以下之結論：



k_1 為 ES 形成的速率常數， k_2 為 ES 解離之速率常數， k_3 為形成產物和離開活化位置之速率常數。ES 形成之速率等於 $k_1[E][S]$ ，而 ES 的解離速率等於 $(k_2 + k_3)[ES]$ 。在穩定狀態(steady state)下，這兩個速率會相等，即

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2+k_3)/k_1}$$

在 Michaelis-Menten 酵素動力學裡有一個常數， K_m ，稱為 Michaelis 常數：

$$K_m = \frac{k_2+k_3}{k_1}$$

最後經推導可得到一組 Michaelis-Menten 酵素動力學之反應速率計算公式如下：

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m} \quad (2-1)$$

V_{\max} 的定義是，在足夠的基質濃度下，一定量的酵素所能催化的最高反應速率。要讓一個酵素達到 V_{\max} ，就要把基質量調至最高濃度。而 K_m 是指酵素最高反應速率 (V_{\max}) 的一半時之基質濃度，見圖 2-1。 K_m 可視為酵素與基質間親和力的指標， K_m 越大親和力越小。若酵素的 K_m 越低，則表示它要接近 V_{\max} 所需的基質濃度越低，催化反應越容易進行。 K_m 與 $[S]$ 一樣是濃度單位 (mM)。

上述方程式中的 k_3 即 K_{cat} (turnover number, 酵素轉變數)，公式為：

$$K_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E_t]} \quad (2-2)$$

$[E_t]$ 為總酵素濃度。而 K_{cat} 的定義為，酵素分子在基質飽和情形下，在單位時間內基質分子被轉換為產物之數目 (單位為 S^{-1})。若將其取倒數 ($1/K_{\text{cat}}$)，即為在基質飽和的情形下，基質分子被轉換為產物所需要的時間。目前本研究的化學平衡解亦將此值定為反應的完成時間，即執行一個轉置所需的時間。

公式 (2-1) 只能用於單基質的反應，文獻 [16] 有將此公式修正，可以用於多基質和可逆反應，公式 (2-3) 用於可逆反應、公式 (2-4) 用於不可逆反應。公式如下：

$$V_{\max} = [E] \times K_{\text{cat}}$$

$$v = V_{\max} \times \left(1 - \frac{\prod [P] / \prod [S]}{K_{\text{eq}}}\right) \times \frac{\sum_i ([S] / K_{m,S})}{1 + \sum_i ([S] / K_{m,S}) + \sum_j ([P] / K_{m,P})} \quad (2-3)$$

$$v = V_{\max} \times \left(1 - \frac{\prod [P] / \prod [S]}{K_{\text{eq}}}\right) \times \frac{\sum_i ([S] / K_{m,S})}{1 + \sum_i ([S] / K_{m,S})} \quad (2-4)$$

$[S]$ 為基質濃度、 $[p]$ 為產物濃度、 $K_{m,S}$ 為酵素與基質間的 K_m 值、 $K_{m,P}$ 為酵素與產物間的 K_m 值。

2.1.3 酵素的抑制作用

酵素的活性可以被抑制。減少酵素活性之分子稱為抑制劑(inhibitors)，包括藥物、抗生素、食品防腐劑和毒藥。生化學家研究酵素抑制作用和抑制劑，有幾個重要的理由。首先且最要的是，在生命系統中酵素抑制作用是調節代謝的重要工具。無數的生化小分子經常被使用來調整生物適合性中所需要的特殊酵素反應之速率。其次，無數的醫療治療是以酵素抑制作用為基礎。例如，許多抗生素和藥物會減少或消除特殊酵素之活性。

抑制劑與酵素結合而導致的抑制作用可分為可逆型抑制與不可逆型抑制兩種：

1. 可逆型抑制：

可逆型抑制劑與酵素產生非共價性結合，然後可以阻礙基質進入酵素活性區。

依其性質又可分為三大類：

(1) 競爭型抑制劑(competitive inhibitors)：

此類抑制劑只會和自由的酵素[E]結合，且會與基質[S]共同競爭自由的酵素。增加基質濃度可克服此類抑制劑的抑制效果。競爭型抑制劑會使 K_m 值變大，但 V_{max} 不變。

(2) 非競爭型抑制劑(non-competitive inhibitors)：

此類抑制劑可和自由的酵素[E]結合，並且亦可與基質酵素複合物[ES]結合。增加基質濃度[S]無法克服此類抑制劑的抑制效果。非競爭型抑制劑會使 V_{max} 變小，但 K_m 值不變。

(3) 不競爭型抑制劑(un-competitive inhibitors)：

此類抑制劑只能與基質酵素複合物[ES]結合。增加基質濃度[S]反而有利於抑制劑的抑制。不競爭型抑制劑會使 V_{max} 及 K_m 值均變小。

表 2-2 加入不同抑制劑形態對 V_{\max} 及 K_m 的影響

	競爭型抑制劑	非競爭型抑制劑	不競爭型抑制劑
V_{\max}	不變	變小	變小
K_m	變大	不變	變小

2. 不可逆型抑制：

不可逆性抑制劑會對酵素活性區上的主要胺基酸做共價性修飾，因此酵素活性通常被嚴重破壞，便無上述三種動力學抑制方式。

由以上可知，可逆型抑制劑會改變 V_{\max} 與 K_m 值，亦即會改變酵素的反應速率，所以也會影響某個反應達平衡所需的時間，但卻不會影響反應達平衡時，基質與產物的濃度值。由於本研究的化學平衡解較在乎最後的 steady state 濃度值，因此不會納入抑制劑來做計算。

2.2 熱力學：自由能與化學平衡

能量的轉變伴隨著物質的物理與化學性質的改變，而研究此主題即稱為熱力學 (thermodynamics)，熱力學的原理可用來調查物質與能量之間的變換。熱力學中的一個分支，生物能量學 (bioenergetics)，則是將研究焦點擺在生物體中能量變換的情形，其特別有助於用來推斷特定的生化反應發生時之傾向與程度[1]。

這些生化反應受到三個因素的影響，其中的兩個因素，焓 (enthalpy，總熱含量) 與熵 (entropy，亂度)，分別與熱力學的第一定律及第二定律有關。第三個因素稱為自由能 (free energy，可用來做化學功的能量)，可由包含焓與熵的數學式導出。

自由能為一與熱力學第一及第二定律有關的狀態函數，代表從一反應中可獲得並利用的最多之功。會釋放能量的反應表示其自由能在過程中減少 ($\Delta G < 0$)，且此反應

為自發性的。若自由能差為正值($\Delta G > 0$)，則此反應稱之為需能反應。當自由能差為零時，表示該系統呈平衡狀態。

標準自由能(ΔG^0)的定義是反應在 25°C (298K)、一大氣壓力(1.0atm)下，以及溶質的濃度為 1M。在生物能量學中標準的 pH 值為 7。

2.2.1 熱力學第一定律

宇宙中的總能量守恆，能量無法被增添或消滅，但可轉變為不同的形式。第一定律可以下列式子表示：

$\Delta E = q + w$ ，其中 ΔE 為系統中改變的能量， q 為系統從環境中所獲取的熱， w 為環境對系統所做的功。

化學家將焓(H)定義為如下與內部能量有關的公式：

$H = E + PV$ ，其中 PV 為壓力-容積對應的功，意指一系統內的做功或系統所做的功，牽涉到壓力與體積的改變。

在生化系統中，壓力是維持不變的，故焓的變化(ΔH)就等於系統所獲得或損失的熱($\Delta H = q$)。當體積的變化很小，小到可以忽略時(如同活體細胞的情況)，焓的變化就會等於內部能量的改變：

($\Delta H = \Delta E$)，當 ΔH 為負值時($\Delta H < 0$)，代表該反應會釋出熱，而被稱之為放熱反應(exothermic reaction)。而當 ΔH 為正值時($\Delta H > 0$)，代表從其環境中吸取了熱，這類反應稱為吸熱反應(endothermic reaction)。另一種所謂的等溫反應(isothermic reaction) ($\Delta H = 0$)，代表熱並不會與環境進行交換。

2.2.2 熱力學第二定律

根據第二定律，所有自發性的反應，發生時會朝宇宙(即系統與其環境)中總亂度增加的方向進行，所以自發性反應的結果，是使物質與能量變得更為散亂。

一系統中的亂度是稱之為熵(entropy)(S)的狀態函數來做量化。系統中的亂度越大，則熵值越高。根據第二定律，每個自發性反應的熵變化皆為正值，其增加可發生在宇宙中的任一部份($\Delta S_{\text{系統}}$ 或 $\Delta S_{\text{環境}}$)：

$$\Delta S_{\text{宇宙}} = \Delta S_{\text{系統}} + \Delta S_{\text{環境}}$$

活體細胞在消耗或代謝營養物時並不會增加它們內在的亂度，而是其環境的熵值增加。例如人體攝取食物以獲得能量並製造維持複雜身體構造所需的物質，這些食物分子被轉變為大量凌亂的代謝物(如 CO_2 、 H_2O 及熱)而排放到環境中。

若反應的 $\Delta S_{\text{宇宙}}$ 為正值(代表此時整個宇宙的熵呈現增加)，則此反應為自發性的。若 $\Delta S_{\text{宇宙}}$ 為負值，則此反應不會發生，但該反應可逆向地進行，故此逆向的反應為自發性的。若 $\Delta S_{\text{宇宙}}$ 等於零，則反應不會往任何一端進行。生物體僅在死亡後才會與其環境呈現平衡狀態。

2.2.3 自由能

在自發性的反應中，雖然宇宙的熵總是增加，但要測量該熵值並不實際，因為必須 $\Delta S_{\text{系統}}$ 與 $\Delta S_{\text{環境}}$ 兩者皆為已知的。

自由能(free energy)是另一種熱力學函數，可較方便地用來預測反應的自發性，其可由 $\Delta S_{\text{宇宙}}$ 的公式來推導， $\Delta S_{\text{宇宙}} = \Delta S_{\text{環境}} + \Delta S_{\text{系統}}$ 。

其中 $\Delta S_{\text{環境}}$ 的定義為某一特定之化學或物理變化中熱的交換量除以溫度(以 K 為單位)。對一放熱反應來說，熱在反應過程中釋出， ΔH 為負值，因此

$$\Delta S_{\text{環境}} = -\Delta H / T$$

$$\Delta S_{\text{宇宙}} = (-\Delta H / T) + \Delta S_{\text{系統}} \quad , \text{在等號兩邊皆乘以}-T$$

$$-T\Delta S_{\text{宇宙}} = \Delta H - T\Delta S_{\text{系統}}$$

Josiah Gibbs 將 $-T\Delta S_{\text{宇宙}}$ 定義為狀態函數，並將其稱之為吉布斯自由能改變 (Gibbs free energy change) 或 ΔG ：

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S_{\text{系統}}$$

當 $\Delta S_{\text{宇宙}}$ 為正值，則自由能的改變 (ΔG) 為負值，代表一反應為自發性的，因其可放能 (exergonic)。若 ΔG 為正值，表示該反應進行需吸能 (endergonic) (非自發性的)。若 ΔG 等於零，則代表反應呈平衡狀態。不過， ΔG 以及其他的熱力學函數無法提供關於反應速率方面的資訊。

2.2.4 標準自由能差與化學平衡

計算自由能時傳統上會以標準狀態來作為統一的基礎。所謂標準自由能， ΔG^0 ，是為在特定條件下的反應而定義：25°C (298K)、一大氣壓力 (1.0 atm)，以及所有溶質的濃度皆為 1.0 M。

標準自由能差與反應的平衡常數 (K_{eq}) 有關， K_{eq} 是當一反應的兩端進行速率相等時所計算出來的值，亦即化學平衡。

化學反應可分為可逆反應與不可逆反應，當正反應速率等於逆反應速率時，代表兩邊物質的濃度變化極微小，小到幾乎不再改變，則稱為化學平衡。達到化學平衡時，亦可得到一平衡常數 (Equilibrium Constant, K_{eq})。

假設有一化學反應為 $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$ ，則此反應達到平衡時的平衡常數值 K_{eq} ，可由下列的公式計算：

$$K_{\text{eq}} = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (2-5)$$

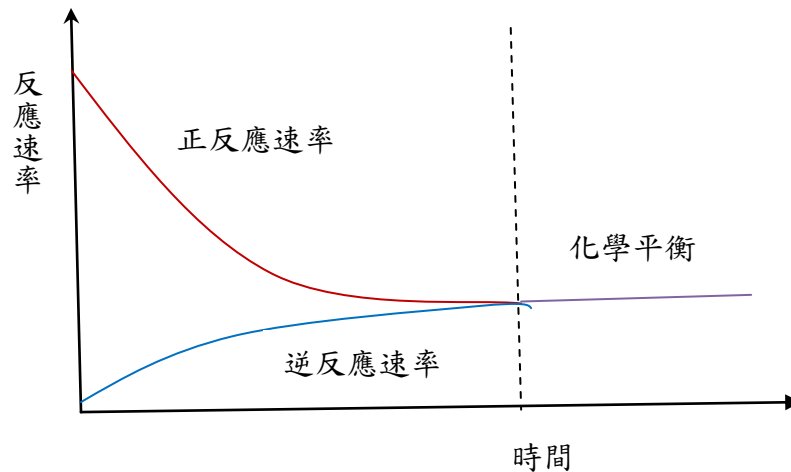


圖 2-2 化學平衡圖

根據觀察的結果可知一理想氣體的自由能取決於其壓力(濃度)，另換算函數 H 的方式可同樣套用到函數 G，於是可導出下列的公式：

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

若反應能達平衡狀態，則 $\Delta G = 0$ ，上述公式即可簡化為

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$$

$$K_{eq} = e^{-\Delta G/RT} \quad (2-6)$$

公式 2-6 中, R 是理想氣體常數, T 為絕對溫度, 所以從此可得知, 平衡常數(K_{eq}) 的計算有考量到溫度與壓力, 在 [10] 中是以 $K_{eq} = e^{-\Delta G/2.424}$ 來計算。

2.3 代謝網路

代謝途徑(Metabolic pathway)是一連串在細胞內發生的化學反應，並由酵素所催化，形成使用或儲存的代謝物、或是引發另一個代謝途徑，細胞內不同的代謝途徑組成了代謝網路。人體的主要代謝網路可見圖 2-3 [1]，而圖 2-4 是從 KEGG 上擷取下來的代謝途徑圖，KEGG 資料庫是研究代謝途徑很常用的線上資源[17][18]。

多細胞有機體維持生命的過程是複雜的，對多數有機體來說，有主要的代謝途徑是常見的，且有機體的生活，會在同化作用(anabolic)與異化作用(catabolic)的過程之中去求得精確平衡。同化作用又稱為合成代謝，是指生物體利用能量將小分子合成為大分子的一系列代謝途徑。異化作用是指生物的分解代謝，將體內的大分子轉化為小分子並釋放出能量的過程。

當年輕的動物生長和成熟時，同化合成過程的速率比異化分解過程還大。隨著長成健康的成年，同化過程變慢並且基本的成長停止。且成年之後(除了在疾病或懷孕外)，動物的組織新陳代謝狀態一直是穩定的，即同化過程的速率大約等於異化過程的速率。因此，動物一天又一天的外貌和功能很少出現變化，僅在長時期後，才會不可避免地出現衰老的特徵。然而，動物(或者其他的多細胞有機體)如何能反應和適應他們的環境變化，並在同化過程與異化過程之間保持平衡，目前為止對這個問題的答案仍無法徹底理解。

關於代謝網路的研究，又可分為定性與定量研究兩種。定性(qualitative)研究著重整體網路結構的建立，以能正確表達整個代謝網路的各種狀態為目標。定量(quantitative)研究牽涉到反應速率的計算，藉由計算來觀察整個代謝網路中所有反應物或代謝物的濃度變化。

關於代謝網路的定性研究，如[19][20]，[19]將馬鈴薯儲存能量、製造澱粉的反應路徑以 Petri Nets 建立定性模型，並提供結構上的驗證。[20]用三種 Petri Nets 的 Transition 來區分代謝反應中的不可逆反應、可逆反應與平衡反應，缺點是沒有提出定量的數據要如何計算。

定量研究方面，如[10][21]，[10]使用 colored Petri Nets，在模型裡依據反應速率是單位時間的濃度變化量($\Delta c/\Delta t$)為基礎，結合修正後的 Michaelis-Menten 酵素動力學公式和熱力學變數來計算反應速率。[21]使用 hybrid Petri Nets 提出代謝調控網路的模型，近似於[10]的形式，但最大的問題仍在於反應速率的取得。上述提到的 Petri Nets 將會在 2.5 節討論。

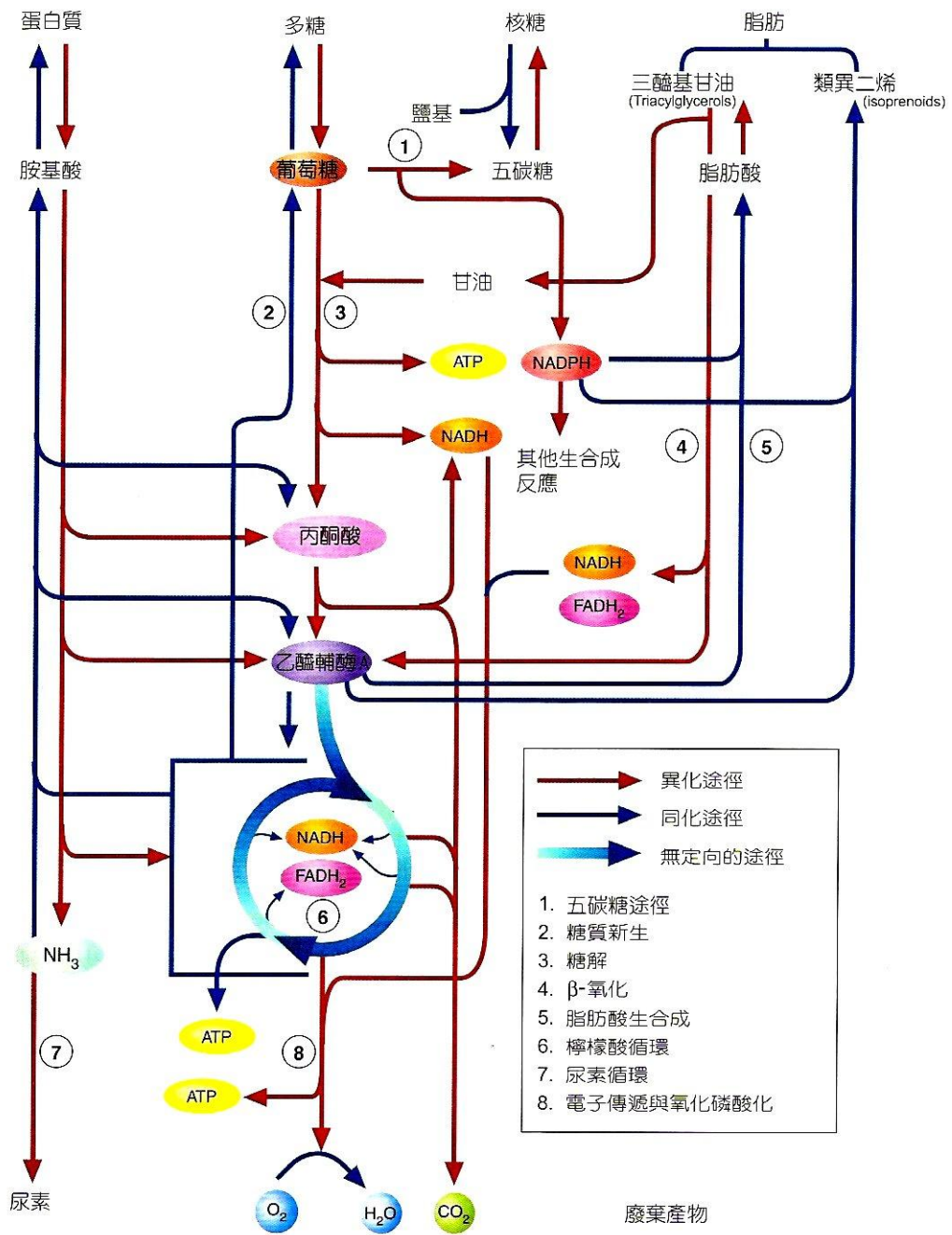


圖 2-3 人體主要的代謝網路圖

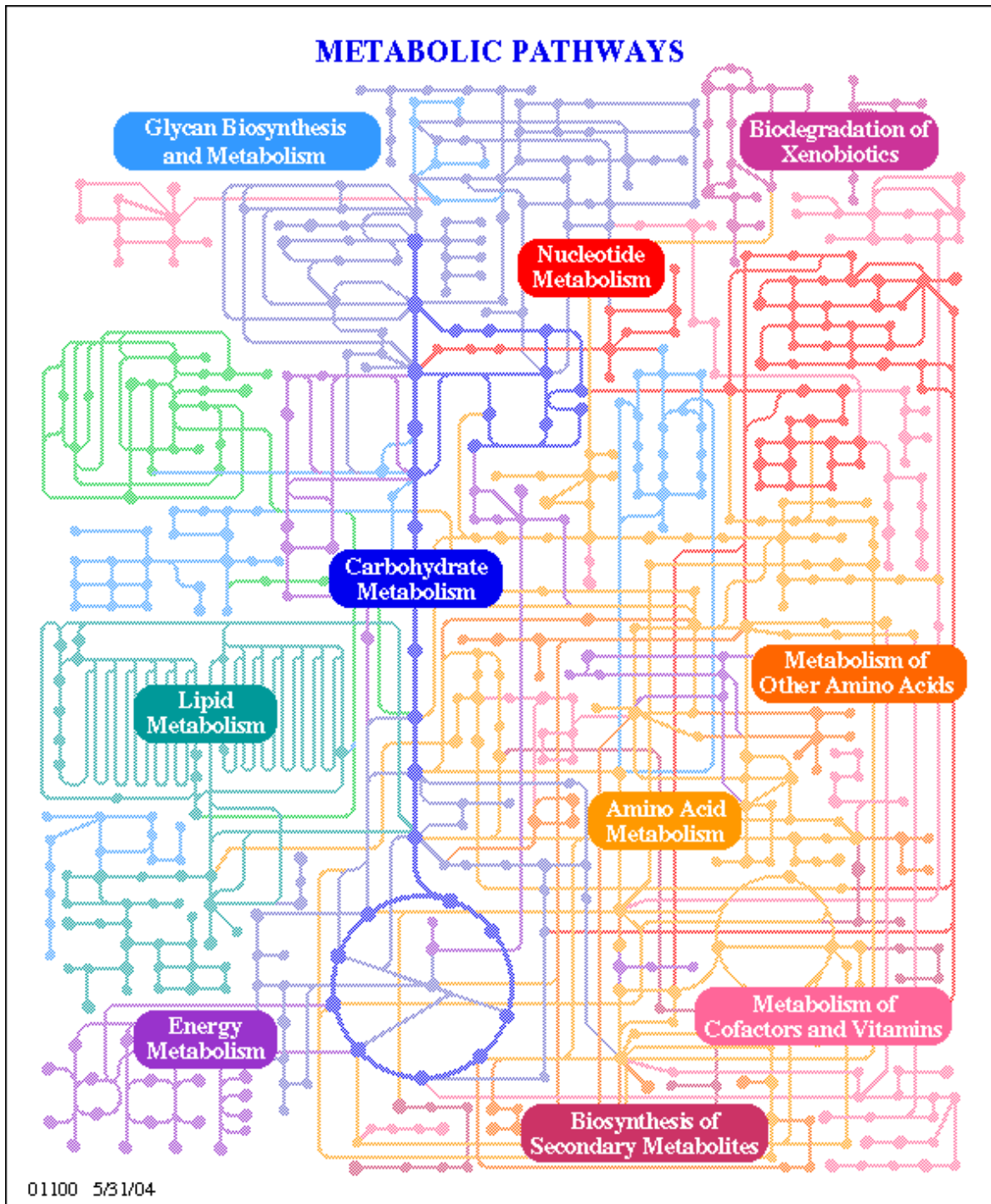


圖 2-4 KEGG 網站上的複雜代謝途徑

2.4 代謝模型的建模方法

代謝模型所敘述的是，在代謝途徑中各化學成分的濃度，以及影響濃度變化的反應與流向，而濃度的變化可以用不同的速率方程式來表達。在代謝模擬的研究中，可以把許多相關的反應一起建立模型，並觀測這些反應如何影響某特定化學成份的濃度，最後可根據實驗的結果來對模型進行細部調整，讓模型更精確。

代謝模型的建模方法可分為連續型建模與離散型建模：

2.4.1 連續型建模

在連續型建模中，每種反應物皆用常微分方程(Ordinary Differential Equations, ODE)或代數方程的方式計算其生成速率或分解速率，再隨著時間的增加來同步計算各反應物的濃度變化，藉此可觀察每個時間點上的濃度變化量。此方法的優點為較精確；缺點為建模困難。生化網路是非線性系統，若在非線性的系統裡加入一個新的節點，就有可能改變整個網路的特性，最後會造成整個模型都要重新修正。

此種方式會運用到相當多的參數，部份參數值尚需透過實驗才能決定，故顯得曠日費時，且某些參數通常對生化學家而言並無意義，此種方式較適合用來模擬所有參數都已知的代謝網路。採用此方式的模擬軟體如[11~14]、E-Cell[22]、Gepasi3[23]與[24]等。

[11~14]是一系列研究紅血球細胞代謝的文獻，其將紅血球細胞代謝分成糖解作用(Glycolysis)、Rapoport-Leubering bypass(2,3DPG bypass)、五碳糖磷酸途徑(pentose phosphate pathway)與腺嘌呤核苷酸代謝(adenosine nucleotide metabolism)，並用矩陣方程的方式將整個代謝網路建構起來，再分別計算每個反應物的生成速率或分解速率。以 G6P 為例，G6P 是酵素 HK 反應中的產物、是酵素 PGI 反應中的基質、亦是酵素 G6PD 反應中的基質，故其生成速率或分解速率的計算即為

$$\frac{d}{dt}(G6P) = V_{HK} - V_{PGI} - V_{G6PD} \text{。}$$

其他較著名的連續型建模方式如 S-System 與代謝控制分析(metabolic control analysis, MCA)[25]。

在 S-System 中，每個單獨的代謝物濃度都用變量 X_i 來表示，從 X_i 到 X_j 的通量被表示為 V_{ij} ，所有對 X_i 合成有作用的通量被表示為 V_i^+ ，而所有對 X_i 分解有作用的通量被表示為 V_i^- 。

$$X_i = V_i^+(X_1, X_2, \dots, X_n, X_{n+1}, X_{n+2}, \dots, X_{n+m}) - V_i^-(X_1, X_2, \dots, X_n, X_{n+1}, X_{n+2}, \dots, X_{n+m})$$

$$i=1, 2, \dots, n$$

上式中，最初的 n 個變量 X_1, X_2, \dots, X_n 是相關的，而隨後的 m 個變量 $X_{n+1}, X_{n+2}, \dots, X_{n+m}$ 是獨立的。利用生成表達式減去分解表達式就可以得到 X_i 完整的 S-System 方程： α_i 與 β_i 是速率常數、 g_{ij} 與 h_{ij} 是動力學級數。

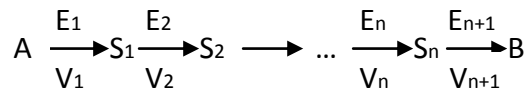
$$X_i = \alpha_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{g_{ij}} - \beta_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{h_{ij}} \quad i=1, 2, \dots, n$$

以 V_2^- 為例，若僅有 X_1 、 X_3 和 X_6 會影響 V_2^- ，則 V_2^- 的表達式為：

$$V_2^- = \beta_2 X_1^{h_{21}} X_3^{h_{23}} X_6^{h_{26}}$$

關於 S-System 更詳細的介紹與其應用的評述可以在 Voit[26][27][28] 找到。

在代謝控制分析(MCA)方面，Ricard[29]提供了關於 MCA 一個簡單的評述並做出總結，”它不是真正的理論，而是一種形式模型，它允許以定量形式來描述酵素系統整體行為的參數表達”



上式是 MCA 的基本原理。初始的基質 A 和最終的產物 B 被認為是恆定的， S_1, \dots, S_n 是中間代謝物， V_i 是指酵素的反應速率。在 MCA 裡，所有特徵和定理都強調系統是處於 steady state，這種情況下的重要結論是所有代謝物的流量必須相同。幾乎所有 MCA 的結論都基於三個概念：流量控制係數、濃度控制係數和彈性。E-Cell 和 Gepasi 都是以此法來建立代謝模型。

更多關於 MCA 的詳細描述可見 Westerhoff 和 van Dam[30]、Heinrich 和 Schuster[31]及 Fell[32]。

2.4.2 離散型建模

離散型建模採事件驅動的方法，將生化反應儲存於佇列 (Queue) 中，再根據某種條件依序取出執行。這種方法通常會利用較少且普遍的參數來進行模擬，如 Michaelis-Menten 酵素動力學。此方法的優點是建模容易，缺點是會喪失一定的精準度。此類的軟體如[10]、DiMSim[16]、及本研究的模擬系統[2]等。

2.5 資料模型-Petri Nets

本研究的資料模型是採修正後的 Petri Nets。

Petri Nets 是由 C. A. Petri 於 1962 年的博士論文中首先提出，後來再經由多位 MIT 的研究人員在 1968 年至 1976 年的研究，才形成理論的基礎。是一個同時具有圖形化及數學化的正規模擬工具。[3]

以一個圖形化的模擬工具而言，它利用代幣(token)來模擬系統的動態及同步行為，具有如 flow charts 及 networks 等可以被用來當作視覺化的模擬方法。

以一個數學化的模擬工具而言，它以建立狀態方程式(state equation)、代數方程式及其他數學模式的方式來處理與分析系統的行為。

派屈網路可應用於許多的系統模擬，例如工廠自動化、效能評估、通訊協定驗證、分散式軟體系統規格與設計、辦公室資訊系統與可程式化邏輯系統等，但傳統的 Petri Nets 需要做點修正，才能適合用於生化的代謝網路模擬，所做的修正會於 2.2.6 節提到。

2.5.1 Petri Nets 的組成元素

Petri Nets 由兩種基本元素所組成，即位置 (place) 與轉置 (transition)，並存在射線(arc)，射線可由位置連向轉置或轉置連向位置，而形成一個網路。若以圖形表示，則位置畫成圓圈、轉置畫成條狀而射線以箭頭來表示。位置裡面有代幣，以黑點表示，而射線具方向性且具有權重。如下表所示：

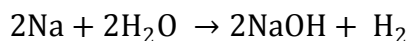
表 2-3 Petri Nets 元素

Place	Transition	arc	Token
○	□	→	●

一個 Petri Nets 具有五個要素， $PN=(P, T, F, W, M_0)$

1. $P = \{p_1, p_2, \dots, p_m\}$ 是一個有限個數位置的集合。
2. $T = \{t_1, t_2, \dots, t_n\}$ 是一個有限個數轉置的集合。
3. $F \subseteq (P \times T) \cup (T \times P)$ 是一個射線的集合。
4. $W : F \rightarrow \{1, 2, 3, \dots\}$ 是一個權重方程式。
5. $M_0 = \{M(p_1), M(p_2), \dots, M(p_m)\} : P \rightarrow \{0, 1, 2, \dots\}$ 是一個初始標記，其中 $M(p_i)$ 代表在位置 p_i 內代幣的數目。

以一化學反應為例，將鈉片丟入水中，瞬間產生爆鳴聲並同時起火燃燒，這是一種氧化還原反應，其反應方程式如下：



此時我們可以根據此反應方程式來建立一個反應前 Petri Nets 圖，並可推測此反應是否能被觸發。

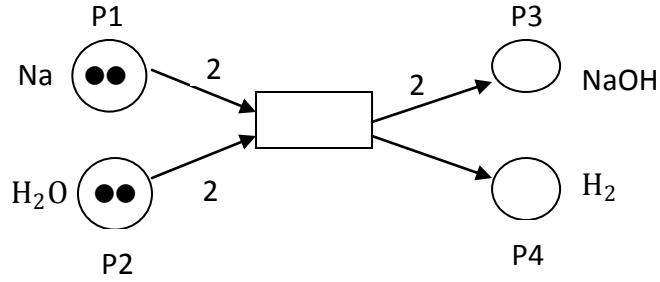


圖 2-5 反應前初始狀態的 Petri Nets 圖

經過檢驗後，得知 Na 與 H₂O 的 token 數，皆符合 arc 上所標示的權重，從此可知此反應能被觸發，觸發後的結果如下圖：

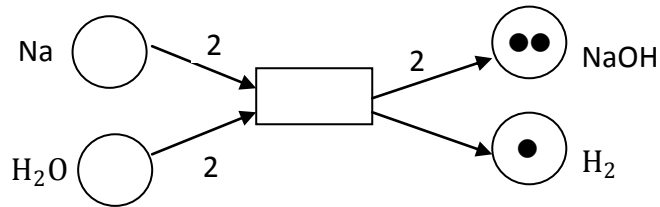


圖 2-6 反應後的 Petri Nets 圖

2.5.2 Petri Nets 的數學表示法

一個 Petri Nets 的圖形結構，亦可以數學的模式來表示：乃是利用關聯矩陣 (incidence matrix) 來表示圖形結構，以標記 (marking) 來表示圖形結構的狀態 (即各位置內含有 token 的數目)。

假設一個 Petri Nets 具有 n 個轉置與 m 個位置，則定義其關聯矩陣 $A=[a_{ij}]$ 為一 $n \times m$ 的矩陣，其中之元素 a_{ij} 為整數，定義如下

$$a_{ij} = a_{ij}^+ - a_{ij}^-$$

其中 $a_{ij}^+ = w(t_i, p_j)$ 表示從轉置 t_i 到位置 p_j 的射線上之權重值， $a_{ij}^- = w(p_j, t_i)$ 表示從位置 p_j 到轉置 t_i 的射線上之權重值。若以圖 2-1 為例，其關聯矩陣 A 應為下式：

$$\begin{array}{cccc}
 & p_1 & p_2 & p_3 & p_4 \\
 A = & [& -2 & -2 & 2 & 0 &]t
 \end{array}$$

透過此關聯矩陣，就能完全表示 Petri Nets 的圖形結構，而其狀態則需透過標記來表示之。圖 2-1 與 2-2 為一個反應的完整反應過程，若先以圖 2-1 來表示，則可知此為反應前狀態，亦即初始狀態，其標記為 $M_0 = [2 \ 2 \ 0 \ 0]$ ，而圖 2-2 為反應後狀態，標記為 $M_1 = [0 \ 0 \ 2 \ 1]$ 。

2.5.3 Petri Nets 的動態行為

一般而言，系統的動態行為可以系統的狀態及其狀態的改變來描述。為了模擬一個系統的動態行為，在 Petri Nets 內的狀態或標記是依據以下的引發規則來改變：

1. 假如一個轉置 t 的每個輸入位置 $p \in \text{Input}(t)$ 皆含至少 $w(p, t)$ 個代幣，則轉置 t 稱為待發的(enabled)。 $W(p, t)$ 表示從位置 p 到轉置 t 的射線上之權重值。
2. 一個待發的轉置不一定會引發(fire)，會依據需求設定條件來決定事件是否發生。
3. 當一個待發的轉置 t 引發時，將會從轉置 t 的每個輸入位置 p 移走 $w(p, t)$ 個代幣，並加入 $w(t, p)$ 個代幣至轉置 t 的每個輸出位置 $p \in \text{Output}(t)$ 。 $w(t, p)$ 表示從位置 p 到轉置 t 的射線上之權重值。

2.5.4 Petri Nets 的性質

Petri Nets 是網路性質的模擬工具，認識其性質對建構合宜的生化代謝網路模型甚為重要。

1. 可及性(reachability)：

假設存在一組引發序列，使 Petri Nets 可由標記 M_i 推進至 M_j ，則稱標記 M_j 為標記 M_i 可及的。

2. 有界性(boundedness)：

可及性組內每一標記內的代幣為有限個數時，該 Petri Nets 稱為有界的。

3. 活轉性(liveness)：

在有初始標記的 Petri Nets，從任一標記皆可找到引發序列，使某一轉置被引發，則稱此 Petri Nets 具活轉性，活轉性意在避免死結(deadlock)的發生。

4. 可逆性(reversibility)：每個可及性標記都能逆推回初始標記，可逆性能幫助推論循環性質的系統。

2.5.5 高階 Petri Nets

經過改良的高階 Petri Nets 更適宜用在不同的模擬上，其中廣泛用於生化模擬的有：

1. Time Petri Nets：其位置或轉置可被指定延遲時間，如[33]。
2. Colored Petri Nets：用顏色和註記表現代幣間的不同，使轉置有更複雜的引發規則，如[34]、[35]。
3. Hybrid Petri Nets：其位置可以有連續數值的代幣數，如[36]、[37]、[38]。

由於基質或產物的濃度具有連續數值的特性，且基質或產物的轉換需經過一定的時間，故本研究可視為 Hybrid Petri Nets 與 Time Petri Nets 的整合。

2.5.6 適用於生化模擬的 Petri Nets

傳統的 Petri Nets 無法完全套用在生化網路的模擬，故本研究採用了部份[4]所提的對 Petri Nets 的修正，使其更符合實際環境的生化模擬。修正如下：

1. arc 從單向變雙向：

生化反應通常都是可逆性的，但傳統的 Petri Nets 是單向的，故將 Petri Nets 之射線由單向變成雙向。在程式的設計中，可將每個反應設定一個是否可逆的參數，若此反應是可逆，則允許產物的分子濃度往基質的方向移動，即進行

逆反應。

2. 轉置不再是黑箱作業：

傳統 Petri Nets 視轉置(transition)為黑箱作業，只要代幣符合條件，即可觸發轉置。而本研究將轉置視為計算物件，所有會影響反應速率的參數及其計算方法將寫入其中，藉此可以動態計算轉置兩方位置內的代幣值。

3. Place 可以連接一個以上的 Transition：

傳統的 Petri Nets，一個 place 只能接一個 Transition，避免觸發上的矛盾。而生化網路是由多組反應路徑所構成，一個基質可能會參與眾多反應，所以修正 Place 可以連接一個以上的 Transition。但修正後將牽涉到反應路徑的選擇，即哪個轉置要先觸發的問題，本研究是利用觸發規則或 delay time 來決定執行的順序。

2.6 生化資料庫

在後基因體時代，已累計了相當龐大的資料並儲存於不同的資料庫中。對生命科學的研究來說，從線上資料庫去擷取所需的資訊，已是一項必備的技能，以下列舉了一些常用的線上資料庫[39]。

表 2-4 常用的生物學線上資料庫

分類	內容	資料庫名稱	網址
Pathway databases	Metabolic and/or signaling pathways, reaction participants, relations between genes, enzymes and reactions.	KEGG	http://www.genome.ad.jp/kegg.html
		WIT	http://wit.mcs.anl.gov/WIT2
		EcoCyc/MetaCyc	http://ecocyc.pangeasystems.com/ecocyc
		ExPASy-Biochemical Pathways	http://expasy.proteome.org.au/cgi-bin/search-biochem-index
		UM-BBD	http://www.labmed.umn.edu/umbbd/index.html
		SPAD	http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad
Genome databases	Nucleotide sequences, functional annotations	GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
		EMBL Database	http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html
		DataBank of Japan	http://www.ddbj.nig.ac.jp
		TIGR	http://www.tigr.org/tdb
		MGDB	http://mbgd.genome.ad.jp
Protein and protein-related databases	Protein sequences and their characteristics, functional annotations	SWISS-PROT/TrEMBL	http://www.ebi.ac.uk/swissprot/index.html
		PROSITE	http://www.expasy.ch/prosite
		PDB	http://www.rcsb.org/pdb
		PIR	http://www-nbrf.georgetown.edu/pirwww
Enzyme databases	Enzymatic properties of proteins	ExPASy-ENZYME	http://www.expasy.ch/enzyme
		BRENDA	http://www.brenda-enzymes.info
Chemical databases	Chemical properties of compounds	Beilstein	http://www.beilstein.com
		ChemBioFinder	http://chembiofinder.cambridgesoft.com/
Literature database	Abstracts of scientific literature	Medline/PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed

第三章 定量演算法

3.1 Transition 的計算

本研究的 Transition 為一計算物件，相關的定量方法將寫於其中，藉此來動態計算轉置兩方位置內的濃度值。本研究針對代謝方面，共實作出兩種定量演算法，一種是本研究所提的化學平衡解，另一種是參考文獻 [16] 裡所修正之 Michaelis-Menten 酵素動力學公式。

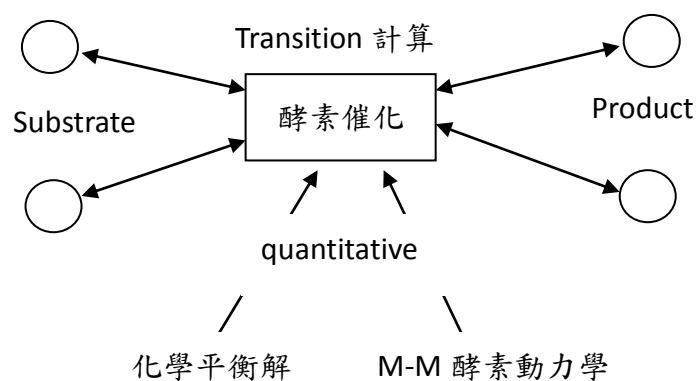


圖 3-1 計算模型

本研究的化學平衡解與所採用的 M-M 酵素動力學公式，皆奠基於化學平衡的理論基礎上。方法是若平衡常數介於 $[K_{eq} - a, K_{eq} + a]$ 的範圍內，則視為達到平衡 (a 為一常數值，可自設一合理值)。 K_{eq} 可從公式 2-5 或 2-6 來計算。

由公式 (2-5) 所計算後的值若未達到所設定的範圍時，在可逆反應下，若此值 $< K_{eq}$ ，則向右反應 (正反應，基質往產物的方向移動)，若此值 $> K_{eq}$ 則向左反應 (逆反應，產物往基質的方向移動)，直到此值介於 $[K_{eq} - a, K_{eq} + a]$ 的範圍內而止。在不可逆反應下，將持續向右進行到此值 $> K_{eq}$ 或介於 $[K_{eq} - a, K_{eq} + a]$ 的範圍內才停止。

3.2 演算法分析

3.2.1 Michaelis-Menten 酵素動力學演算法

經過修正的 Michaelis-Menten 酵素動力學公式 (公式 2-3、2-4)。

$$V_{\max} = [E] \times K_{\text{cat}}$$

$$v = V_{\max} \times \left(1 - \frac{\prod[P]/\prod[S]}{K_{\text{eq}}}\right) \times \frac{\sum_i ([S]/K_{m,S})}{1 + \sum_i ([S]/K_{m,S}) + \sum_j ([P]/K_{m,P})} \quad \text{可逆反應}$$

$$v = V_{\max} \times \left(1 - \frac{\prod[P]/\prod[S]}{K_{\text{eq}}}\right) \times \frac{\sum_i ([S]/K_{m,S})}{1 + \sum_i ([S]/K_{m,S})} \quad \text{不可逆反應}$$

酵素動力學是一種時間切片 (time slice) 的計算，需考量到時間要切多細的問題。在我們的演算法裡，使用者一開始需設定時間單位的大小，作為執行一個轉置的 delay time。利用公式所計算出來的每秒反應速率需再乘上 delay time，作為該次執行 Transition 的濃度轉換值。

每個 Transition 的計算只會進行一次的濃度轉換，每執行一次轉置即累加一次 delay time。若反應未達平衡，則持續的進行是否觸發其他反應或自我觸發的排程，直到反應達平衡時才停止。

濃度的轉換採 $\min(\min(\text{反應物濃度}/\text{其係數}), \text{反應速率} \times \text{delaytime})$ ，取兩者中的最小值為轉換濃度。由此計算方式可看出，若時間切得不夠細，造成利用反應速率 \times delaytime 所得到的轉換濃度比反應物濃度大，此時就會將反應物濃度完全轉換成 0，使得平衡常數無法去逼近，故時間單位的拿捏會影響最後的計算結果。

用此演算法時，亦需設定一個系統的模擬總時間或使用者欲觀察某點濃度的時間點上。有時若時間切得不夠細，會有無法求得平衡解的情況發生，所以需設一個系統的模擬總時間讓系統停止。而使用者若想觀察某個時間點上的濃度時，亦可設一個時間點讓系統停止，藉此來觀察此時間點上的濃度。流程圖與演算法如下：

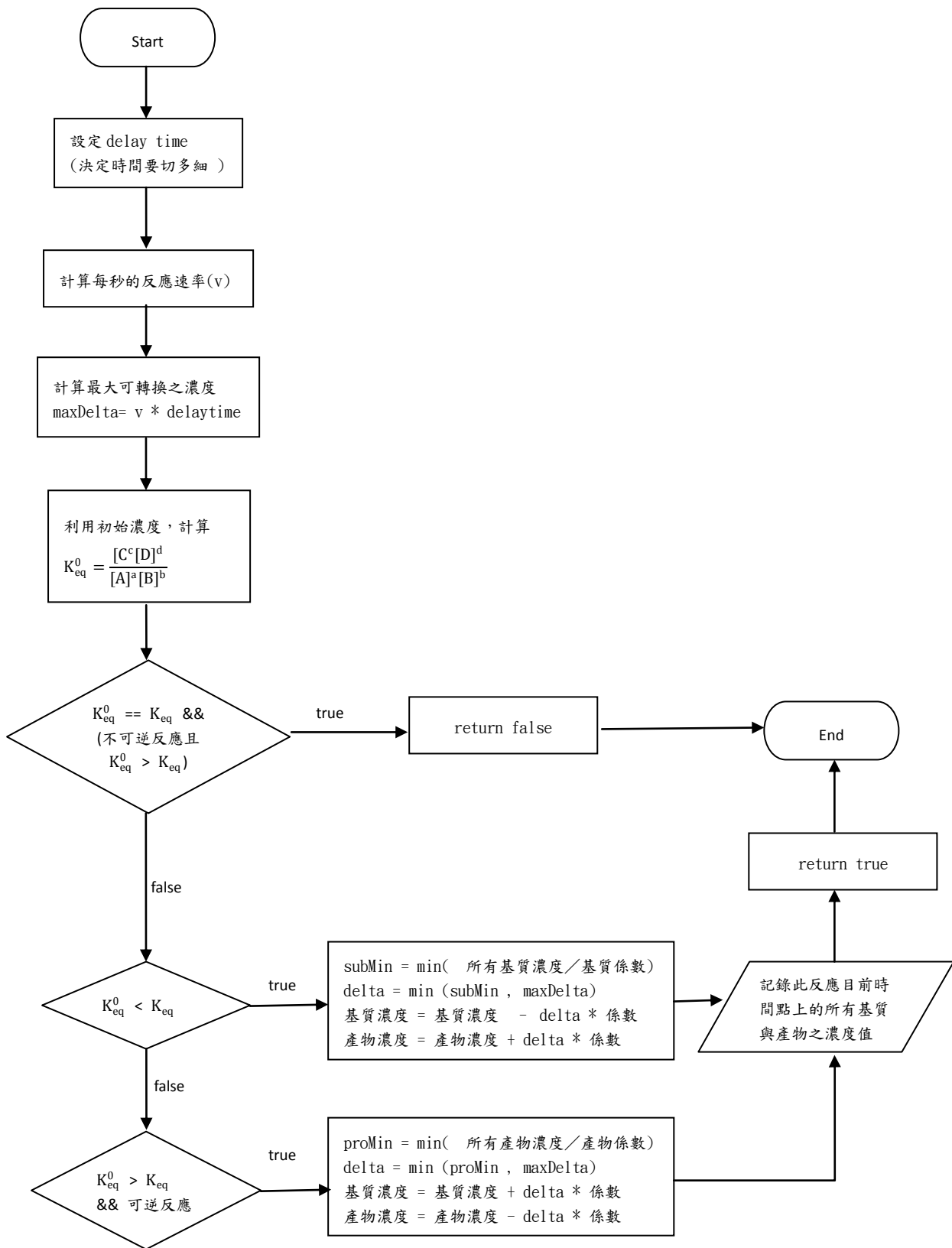


圖 3-2 Michaelis-Menten 酵素動力學的演算法流程圖

M-M 酵素動力學演算法：

```
boolean mmDynamics( ){  
    設定 delay time; //決定時間單位要切多細，作為一個轉置的 delay time  
  
     $V_{\max} = \text{酵素濃度} * K_{\text{cat}}$  ;  
  
    計算  $v = V_{\max} \times \left(1 - \frac{\Pi[P]/\Pi[S]}{K_{\text{eq}}}\right) \times \frac{\sum_i([S]/K_{m,S})}{1 + \sum_i([S]/K_{m,S}) + \sum_j([P]/K_{m,P})}$  ;  
  
    若為不可逆反應，則  $v = V_{\max} \times \left(1 - \frac{\Pi[P]/\Pi[S]}{K_{\text{eq}}}\right) \times \frac{\sum_i([S]/K_{m,S})}{1 + \sum_i([S]/K_{m,S})}$  ;  
  
    maxDelta = v * delay time ; //最大可轉換的濃度  
  
    利用初始濃度值計算  $K_{\text{eq}}^0 = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}$  ; //決定一開始的反應方向  
  
    //若已達平衡或  $K_{\text{eq}}^0 > K_{\text{eq}}$  且為不可逆反應時，不再觸發反應  
    if((  $K_{\text{eq}}^0 == [K_{\text{eq}} - a, K_{\text{eq}} + a]$  ) || (  $K_{\text{eq}}^0 > K_{\text{eq}}$  && !reversible)) {  
        return false;  
    }  
  
    if(  $K_{\text{eq}}^0 < K_{\text{eq}}$  ) { //正向反應  
        for 找尋所有 基質濃度/基質係數 的最小值為 subMin ;  
        delta = min( subMin , maxDelta ) ;  
        for 計算所有新的基質濃度值 ; //原本的基質濃度 - delta * 係數  
        for 計算所有新的產物濃度值 ; //原本的產物濃度 + delta * 係數  
    } else if(  $K_{\text{eq}}^0 > K_{\text{eq}}$  && reversible==true) { //逆向反應  
        for 找尋所有 產物濃度/產物係數 的最小值為 proMin ;  
        delta = min( proMin , maxDelta ) ;  
        for 計算所有新的基質濃度值 ; //原本的基質濃度 + delta * 係數  
        for 計算所有新的產物濃度值 ; //原本的產物濃度 - delta * 係數  
    }  
  
    for 記錄目前時間點上的所有基質與產物之濃度值 ;  
    return true;  
}
```

3.2.2 化學平衡解演算法

本研究的化學平衡解是一種二分逼近演算法，目的在找尋一個可讓此反應達平衡的變化量(delta)，透過此變化量，即可計算出此反應平衡時所有的基質和產物濃度值。計算式子如下(for 是指迴圈，一一進行所有基質和產物的計算)：

$$\text{for 此反應所有初始基質濃度} - \text{delta} * \text{其係數}; \quad (3-1)$$

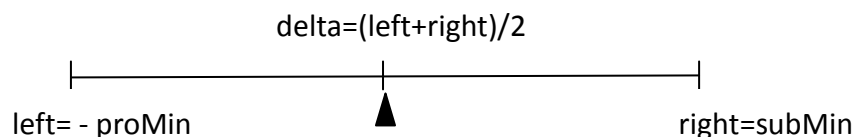
$$\text{for 此反應所有初始產物濃度} + \text{delta} * \text{其係數}; \quad (3-2)$$

由這兩個算式可得知，若 delta 為正，會造成基質濃度的減少、產物濃度的增加，即進行正反應；若 delta 為負，會造成基質濃度的增加、產物濃度的減少，即進行逆反應。

以下為演算法的執行流程（之後將變化量 delta 改稱轉換濃度）：

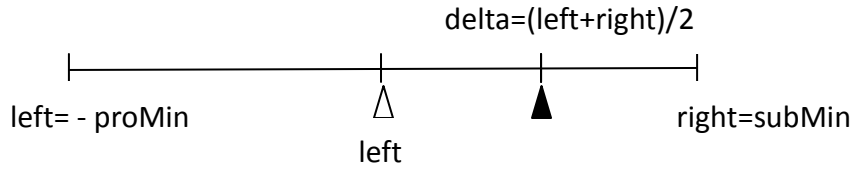
1. 找尋初始的轉換濃度：

首先去找尋某反應所有基質濃度除以其係數的最小值為 subMin，設為 right；再求該反應所有產物濃度除以其係數的最小值為 proMin，設為 left，並給予 proMin 一個負值。再將兩者相加除以 2，做為初始轉換濃度(delta)。若此值為正，代表此反應的基質濃度大於產物濃度；若為負值，並非代表濃度為負，而是指產物的濃度大於基質濃度。

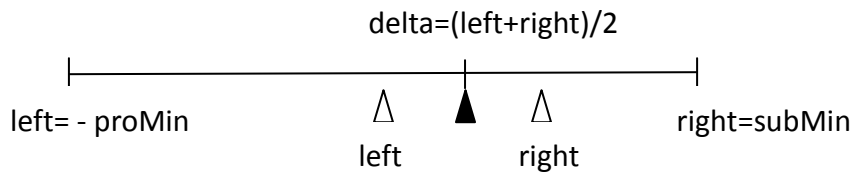


2. 執行逼近平衡常數的迴圈：

先利用之前求得的初始轉換濃度，代入公式 $K_{\text{eq}}^0 = \frac{[\text{C} + \text{delta}]^c [\text{D} + \text{delta}]^d}{[\text{A} - \text{delta}]^a [\text{B} - \text{delta}]^b}$ ，若此值 $< K_{\text{eq}}$ ，代表基質濃度過大，需增加 delta 來讓基質濃度減少、產物濃度增加。作法是將原本的 delta 設為 left，再和 right 相加除以 2，藉此來增加 delta 值。



將增加後的 delta 再代入公式 $K_{eq}^0 = \frac{[C+\delta]^c [D+\delta]^d}{[A-\delta]^a [B-\delta]^b}$ 計算，若發現此值變成 $> K_{eq}$ ，則代表此時的產物濃度過大，需減少 delta 來降低產物的濃度並且增加基質的濃度。作法是將原本的 delta 設為 right，再和 left 相加除以 2，藉此來減少 delta 值。



採用相同的方法，持續逼近 K_{eq} 的結果，最後將求得的 delta 代入公式所計算出來的 K_{eq}^0 ，會介於 $[K_{eq} - a, K_{eq} + a]$ 的範圍內 (a 為常數值，可自設)，此 delta 即達平衡時所需的轉換之濃度。達平衡時，若發現此反應為不可逆反應且 $\delta < 0$ ，則 return false，不再進行相連反應的觸發之排程。因為 delta 若 < 0 會造成產物濃度的減少，亦即執行逆反應，這不符合不可逆反應的濃度轉換規則。若此反應為可逆反應或 $\delta > 0$ ，則利用此 delta 值，帶入式子 3-1、3-2 計算出此反應所有的基質和產物達平衡時的濃度值，並顯示於系統的時間—濃度圖上。

最後，達平衡時所需的 delta 值若為正，即執行正反應，此時和初始的基質濃度 (subMin) 相比，若 delta 超過 subMin 的萬分之一時 (萬分之一為常數，可自設一合理的數值)，則會觸發其他與之相連的反應。反之，若達平衡時所需的 delta 值為負，即執行逆反應，此時需和初始的產物濃度 (proMin) 相比，若 delta 超過 proMin 的萬分之一，則會觸發其他與之相連的反應。

透過相連反應的觸發與濃度振盪，整個代謝網路中的所有反應皆會達到平衡，亦即 steady state。化學平衡解的程式流程圖與演算法如下：

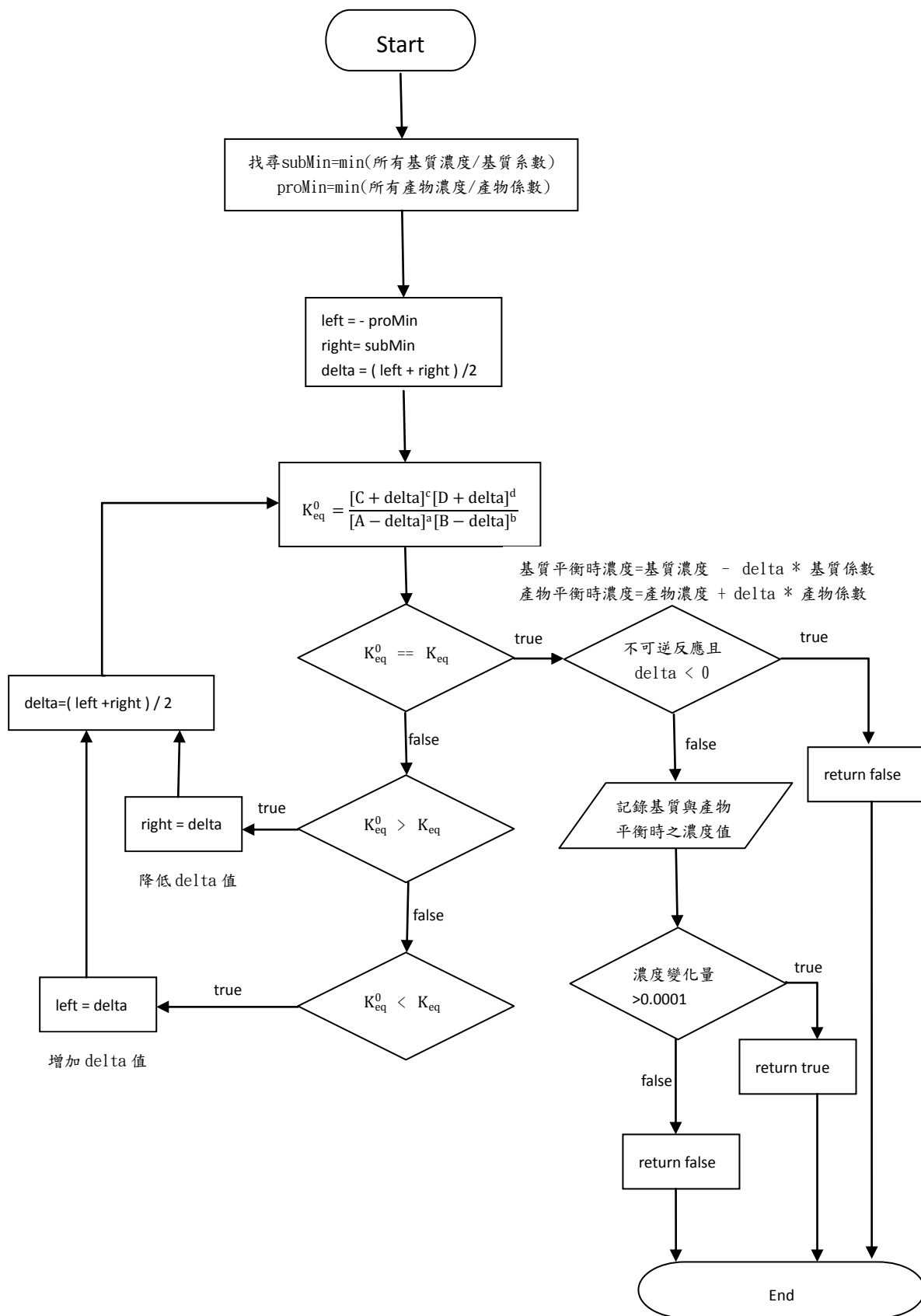
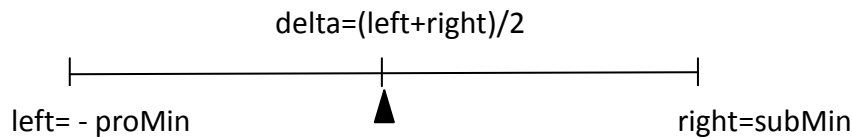


圖 3-3 化學平衡解之演算法流程圖

化學平衡解演算法：

```
boolean Equilibrium ( ) { //若會觸發其他反應則 return true
for 找尋某反應所有 (基質濃度/基質係數) 中的最小值為 subMin ;
for 找尋某反應所有 (產物濃度/產物係數) 中的最小值為 proMin ;
if (subMin == 0 && proMin == 0) return false; //此反應無法進行
left = - proMin ; //將 proMin 設為負
right = subMin ;
delta = (left + right) / 2 ;
/*****
```



delta 為初始的轉換濃度，

若 delta 為正，代表基質濃度較大，

若 delta 為負，代表產物濃度較大

```
*****/
```

```
do {
```

```
for 計算平衡常數值  $K_{\text{eq}}^0 = \frac{[\text{C} + \text{delta}]^c [\text{D} + \text{delta}]^d}{[\text{A} - \text{delta}]^a [\text{B} - \text{delta}]^b}$  ;
```

```
/**/視為平衡/**/
```

```
if (  $K_{\text{eq}}^0 == [\text{K}_{\text{eq}} - a, \text{K}_{\text{eq}} + a]$  ){
```

```
if (!reversible && delta < 0) return false; //不可逆反應
```

```
for 記錄 此反應所有基質濃度 - delta * 其係數 ;
```

```
for 記錄 此反應所有產物濃度 + delta * 其係數 ;
```

```

    /***濃度變化量>萬分之一時，會觸發其他反應***/
    if (delta > 0) {
        if (delta/subMin > 0.0001) return true;
    } else if (delta < 0) {
        if (-delta/proMin > 0.0001) return true;
    }
    return false ; //不會觸發其他反應
}
if (Keq0 > Keq){ //產物濃度過多，要降低 delta，讓產物濃度減少
    right = delta ;
}else{ //基質濃度過多，要增加 delta，讓基質濃度減少
    left = delta ;
}
delta = (left + right) / 2 ;
}while(true);
}

```

第四章 化學平衡解與 Michaelis-Menten 酵素動力學演算法的

效果分析

本章以[11~14]中，紅血球細胞的厭氧糖解作用(anaerobic glycolysis)為例，代入相同的數據，轉置的計算分別採用化學平衡解與 Michaelis-Menten 酵素動力學公式，最後再比較兩方法間的效果分析。

由於本研究的反應完成條件是設為達到平衡，即平衡常數(K_{eq})介於一個範圍內。但在此系列的文獻中，並沒有提供所有反應的 K_{eq} 值，且紅細胞代謝是由糖解作用、Rapoport-Leubering bypass、五碳糖磷酸途徑與腺嘌呤核苷酸代謝組成，若只模擬其中一個代謝網路，相信模擬出來的結果不會是正確的，故本研究不會去和此文獻所提供的實驗數據做比對。

4.1 厭氧糖解作用

紅血球細胞[5]約佔血液體積之 40~45%，不論就結構或代謝而言，紅血球都是屬於體內最簡單的細胞，它是骨髓網狀血球(reticulocytes)的終產物。在熟成過程，紅血球會流失次細胞級的胞器。缺乏細胞核，所以喪失合成 DNA 或 RNA 的功能。無核糖體(ribosomes)或內質網(endoplasmic reticulum)，所以無法合成或分泌蛋白質。無粒線體所以無法進行脂質氧化。因此紅血球完全依賴血中的葡萄糖來合成 ATP，作為能量的來源。在紅血球中葡萄糖的代謝作用完全是厭氧的，並不需消耗氧氣，這與紅血球是負責氧分子傳輸及運送之角色是相符合的。

葡萄糖是地球上主要的碳水化合物，是組成纖維素及澱粉之骨架及單體，糖解作用更是無所不在，是生物圈中代謝葡萄糖之中央代謝途徑，不僅哺乳類細胞、酵母菌及細菌也都進行糖解作用。

糖解作用是一個相當沒有效率的生物能產生途徑，與發生在含粒線體之細胞內葡萄糖的氧化代謝途徑比起來，糖解作用僅產生了約 5%的能量而已。儘管如此，在帶有粒線體之有氧細胞，如腦、肝及肌肉細胞，如果要進行葡萄糖氧化代謝，得先經過

糖解作用。一分子的葡萄糖可產生兩分子的三碳丙酮酸鹽(pyruvate)，再進入粒線體進行氧化作用產生二氧化碳及水，由於此糖解作用是在有氧的環境中發生，因此也稱為有氧糖解作用 (aerobic glycolysis)。相對於紅血球，因其缺乏粒線體及氧化代謝作用，因此丙酮酸鹽被還原轉變成乳酸鹽(lactate)，這是厭氧糖解作用(anaerobic glycolysis)的終產物，每莫耳的葡萄糖可產生兩莫耳的乳酸鹽。而本研究接下來就以厭氧糖解作用來模擬。

厭氧糖解作用由 11 組代謝反應組成，圖 4-1 是其代謝的 Petri Nets 圖，而表 4-1~表 4-3 是其每組的化學反應式和其所有參與的酵素及代謝物之相關資料。

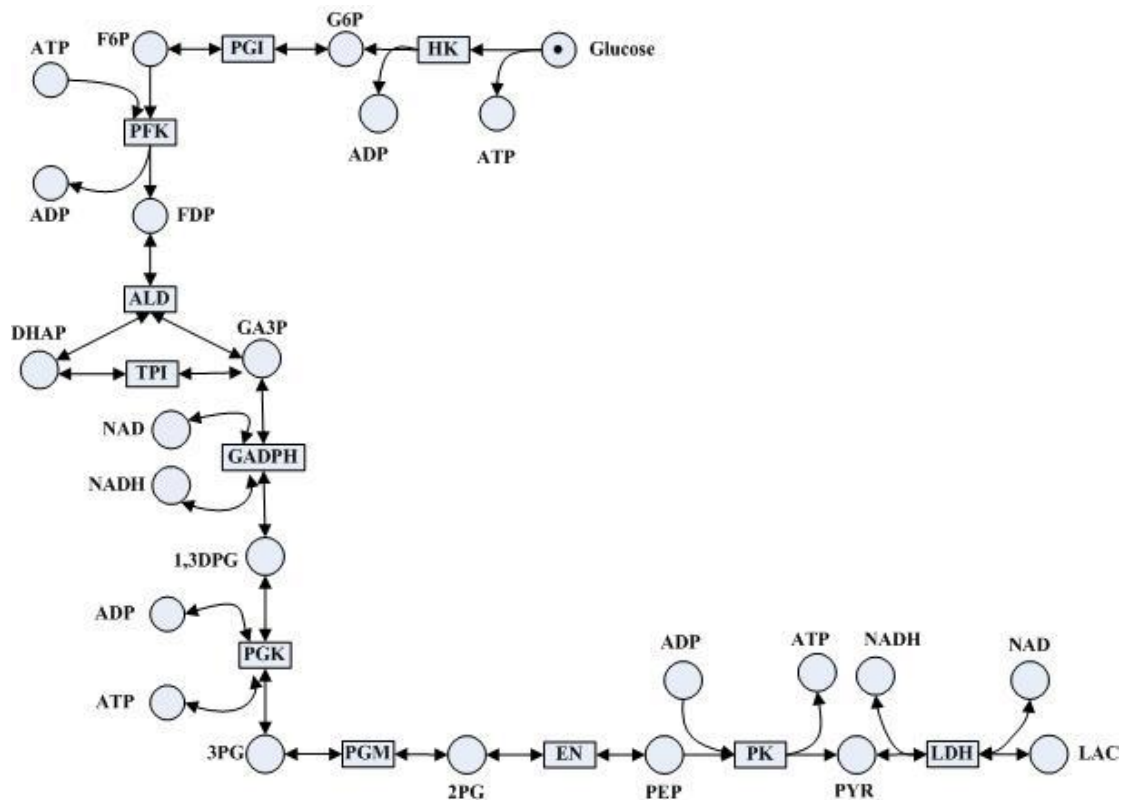


圖 4-1 厭氧糖解作用的代謝 Petri Nets 圖

表 4-1 厭氧糖解作用的化學反應式

酵素名稱	EC Number	反應式
HK	EC 2.7.1.1	$\text{Glu} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{G6P}$
PGI	EC 5.3.1.9	$\text{G6P} \rightleftharpoons \text{F6P}$
PFK	EC 2.7.1.11	$\text{ATP} + \text{F6P} \rightarrow \text{ADP} + \text{FDP}$
ALD	EC 4.1.2.13	$\text{FDP} \rightleftharpoons \text{DHAP} + \text{GA3P}$
TPI	EC 5.3.1.1	$\text{DHAP} \rightleftharpoons \text{GA3P}$
GADPH	EC 1.2.1.12	$\text{GA3P} + \text{NAD} \rightleftharpoons \text{NADH} + \text{1, 3DPG}$
PGK	EC 2.7.2.3	$\text{1, 3DPG} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{3PG}$
PGM	EC 5.4.2.1	$\text{3PG} \rightleftharpoons \text{2PG}$
EN	EC 4.2.1.11	$\text{2PG} \rightleftharpoons \text{PEP}$
PK	EC 2.7.1.40	$\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{PYR}$
LDH	EC 1.1.1.27	$\text{PYR} + \text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD} + \text{LAC}$

表 4-2 厭氧糖解作用所有的參與代謝物

縮寫	英文全名	中文譯名
Glu	Glucose	葡萄糖
G6P	Glucose 6-phosphate	葡萄糖 -6-磷酸
F6P	Fructose 6-phosphate	果糖 -6-磷酸
FDP	Fructose 1,6-diphosphate	果糖-1,6-二磷酸
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate	二羥丙酮磷酸酯
GA3P	Glyceraldehyde 3-phosphate	甘油醛 3-磷酸
1,3DPG	1,3-Diphosphoglycerate	甘油酸-1,3-二磷酸
3PG	3-Phosphoglycerate	3-磷酸甘油酸
2PG	2- Phosphoglycerate	2-磷酸甘油酸
PEP	Phosphoenol pyruvate	磷酸烯醇丙酮酸
PYR	Pyruvate	丙酮酸
NAD/NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	烟醯胺腺嘌呤二核苷酸
ADP	Adenosine di-phosphate	腺苷二磷酸
ATP	Adenosine tri-phosphate	腺苷三磷酸
LAC	Lactate	乳酸鹽

表 4-3 厭氧糖解作用所有參與的酵素

酵素縮寫	英文全名	中文譯名
HK	Hexokinase	六碳糖激酶
PGI	Phosphoglycoisomerase	磷酸葡萄糖異構酶
PFK	Phosphofructokinase	磷酸果糖激酶
ALD	Aldolase	醛醇酶
TPI	Triose phosphate isomerase	三碳糖磷酸異構酶
GADPH	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸去氫酶
PGK	Phosphoglycerate kinase	磷酸甘油酸激酶
PGM	Phosphoglyceromutase	磷酸甘油酸變位酶
EN	Enolase	烯醇酶
PK	Pyruvate kinase	丙酮酸激酶
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脫氫酶

4.2 兩定量演算法的效果分析與比較

在此節中，將分別採化學平衡解與 Michaelis-Menten 酵素動力學來計算，並針對三個項目做比較與分析。首先，先以酵素 TPI 為例，做單一反應達 steady state 時的比較；第二，模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後的比較；最後，說明當酵素動力學的 delay time 切得不夠細時，會有何情形發生。

本實驗並非比對實驗數據，故所有的模擬初始濃度與最後的 Steady State 濃度值皆僅供參考。平衡常數值(K_{eq}) 取自[13]與[16]， K_{cat} 與 K_m 值取自 Brenda 資料庫[40][41]，但其中有一些 K_m 值無法取得(表 4-4 空白處)，則自設為 1 mM。

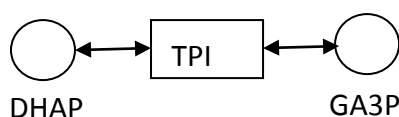
所有實驗皆以 Pentium4 2.4G 的 CPU 及 2GB 的 RAM 來模擬。

表 4-4 模擬所需的各種參數值

酵素		代謝物	Km	是否可逆	Kcat	Keq
HK	基質	Glucose	0.032	否	4	850
		ATP	0.3			
	產物	ADP	-			
		G6P	-			
PGI	基質	G6P	221	是	3330	0.41
	產物	F6P	169			
PFK	基質	F6P	0.047	否	185	310
		ATP	0.12			
	產物	ADP	-			
		FDP	0.0016			
ALD	基質	FDP	-	是	14	0.081
	產物	DHAP	-			
		GA3P	0.057			
TPI	基質	DHAP	0.6	是	9000	17.5
	產物	GA3P	0.25			
GADPH	基質	GA3P	0.07	是	65	0.0179
		NAD	0.01			
	產物	NADH	0.01			
		1,3DPG	0.01			
PGK	基質	1,3DPG	-	是	354	1800
		ADP	0.19			
	產物	ATP	0.5			
		3PG	0.59			
PGM	基質	3PG	0.4	是	384	6.8
	產物	2PG	0.37			
EN	基質	2PG	0.22	是	69.6	0.59
	產物	PEP	0.11			
PK	基質	PEP	0.17	否	4000	363000
		ADP	0.24			
	產物	ATP	-			
		PYR	0.48			
LDH	基質	PYR	0.03	是	643	0.0224
	基質	NADH	0.016			
	產物	NAD	0.015			
	產物	LAC	0.515			

4.2.1 模擬單一反應達 steady state 後的比較

以厭氧糖解作用裡的酵素 TPI 為例，酵素 TPI 將 DHAP 轉換成 GA3P，如下圖所示，相關的模擬所需參數值，請見表 4-4，假設初始 DHAP 濃度設 0.14mM、GA3P 設 0、酵素濃度設 1mM、M-M delay time 設十萬分之一秒、反應完成條件設 $[K_{eq}-0.00001, K_{eq}+0.00001]$ 。



實驗結果與討論：

化學平衡解只要執行一次轉置，就可以直接求得該反應達平衡時的基質與產物濃度值，所以在反應物的濃度—時間圖上，只會記錄出一點，最後會將此點和初始濃度的點相連。從此結果可以預知，若用化學平衡解模擬更大型的代謝網路時，由於相連反應的持續觸發與濃度振盪，會在各反應物的濃度—時間圖上記錄出更多點，將這些點相連，將可更精確的呈現出各反應物的濃度變化趨勢，至於會不會和 M-M 所描繪出的圖形近似？此結果將會在下小節裡比較。

M-M 酵素動力學的部分，在此例中，酵素 TPI 反應會經過 131 次的濃度轉換（轉置計算），每次累加十萬分之一秒後達到平衡。

表 4-5 酵素 TPI 反應達 steady state 時的執行效率比較

	化學平衡解	M-M 酵素動力學
CPU time	小於 1 ms	15 ms
執行轉置次數	1 次	131 次

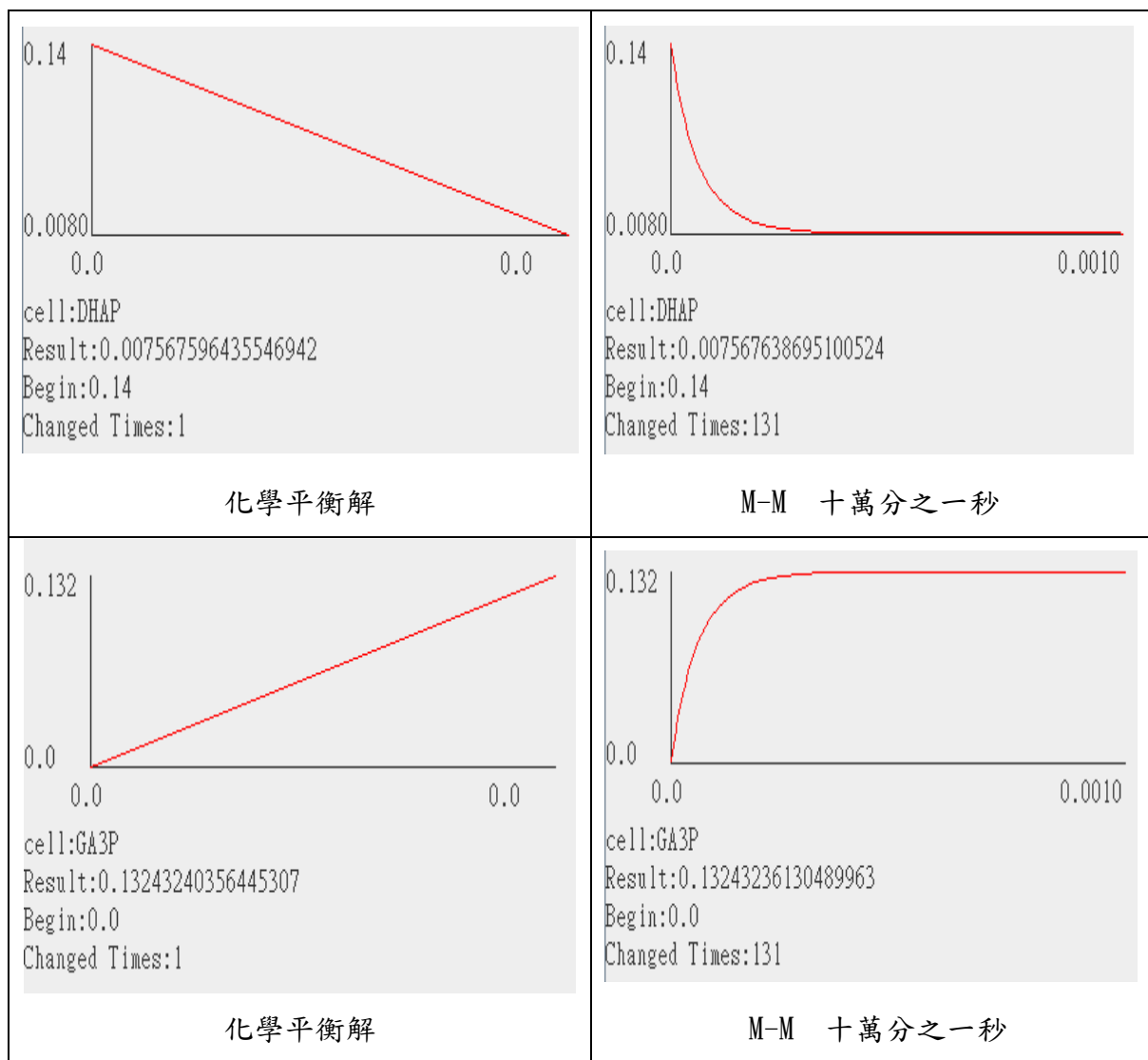


圖 4-2 單一反應比較：酵素 TPI 的反應物濃度—時間變化圖

4.2.2 模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後的比較

在此小節中，將以整組的厭氧糖解作用來模擬。在 M-M 酵素動力學方面，delay time 分別以萬分之一與十萬分之一秒來計算。酵素濃度皆設為 1mM。最大的模擬總時間設為 100 秒。兩方法的平衡條件皆設[Keq-0.00001,Keq+0.00001]。

初始濃度如下表，相關參數見表 4-4。

表 4-6 所有參與模擬的代謝物初始濃度

代謝物	濃度(mM)	代謝物	濃度(mM)
FDP	0.0076	ATP	1.54
2PG	0.014	GA3P	0.0067
F6P	0.016	NADH	0.301
ADP	0.27	3PG	0.045
Glu	0.0004	1,3DPG	0.4
LAC	1.1	G6P	0.038
PYR	0.077	PEP	0.017
NAD	1	DHAP	0.14

實驗結果與討論：

M-M 酵素動力學的 delay time 採萬分之一和十萬分之一秒的計算，皆有達到一最終 Steady State 的平衡解。

由表 4-8 及圖 4-3 可看出，兩種方法達到最終 Steady State 平衡解時，最終的各種代謝物濃度值是近似的，且化學平衡解在經過一連串的相連反應觸發與濃度振盪後，亦可以描繪出一個和採 M-M 計算相類似的圖形。至於 Glu 的部份，由於 Glu 所設定的初始濃度較小，加上 Glu 是不可逆反應中的基質，故在 M-M 酵素動力學的計算下，會將 Glu 完全消耗掉。

執行效率的部份，由表 4-7 可看出，化學平衡解的 CPU 執行時間會比採 M-M 酵素動力學的計算來得快很多。M-M 酵素動力學若 delay time 設得越細，則模擬所需的 CPU 時間亦會越長，但若切得較大時，並不代表 CPU 的模擬時間就會越短，因為有時會有無法求得平衡解的情況發生。此種情形會在下一小節討論。

在圖 4-3，由於 delay time 設萬分之一秒和十萬分之一秒的 M-M 酵素動力學之時間—濃度變化圖皆近似，故在此僅比對化學平衡解與 delay time 設十萬分之一秒的 M-M 酵素動力學。

表 4-7 整組厭氧糖解作用達 steady state 時的執行效率比較

	化學平衡解	M-M 萬分之一	M-M 十萬分之一
CPU time	78 ms	3,765 ms	31,844 ms
執行轉置次數	2,713 次	201,112 次	1,922,830 次

表 4-8 模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後之濃度值

代謝物	化學平衡解	M-M 萬分之一	M-M 十萬分之一
Glu	1.8075531865157808E-13	0	0
LAC	0.1068794436347122	0.10644561246244513	0.10682933477905246
PYR	1.2605881270787296	1.2629410817941387	1.260854950618422
NAD	0.271888639012285	0.27316512564346696	0.2720322062044117
ATP	1.809020071522215	1.8092150935318612	1.8090417053935348
GA3P	0.34651251687722273	0.3473425207538197	0.3465974594302926
NADH	1.0291113609877143	1.0278348743565229	1.0289677937955521
3PG	0.0015982799095487982	0.0012903484880966841	0.001563908716072754
FDP	0.08469845192188034	0.0851140370593651	0.08474934646691783
2PG	0.010871820172622691	0.008774282640866321	0.010634473209506685
F6P	1.1920539613268025E-7	8.58967495637209E-8	1.3846296163603988E-7
ADP	9.799284777845033E-4	7.849064681353553E-4	9.582946064586549E-4
1,3DPG	0.0016387137657270622	0.0016523829468005288	0.0016401847594517264
G6P	2.9074631803053614E-7	2.09506352940255E-7	3.3771791607342504E-7
PEP	0.0064144200610887344	0.005176778486623237	0.006274276492111612
DHAP	0.01979895475280009	0.01984832750226318	0.019805766699478276

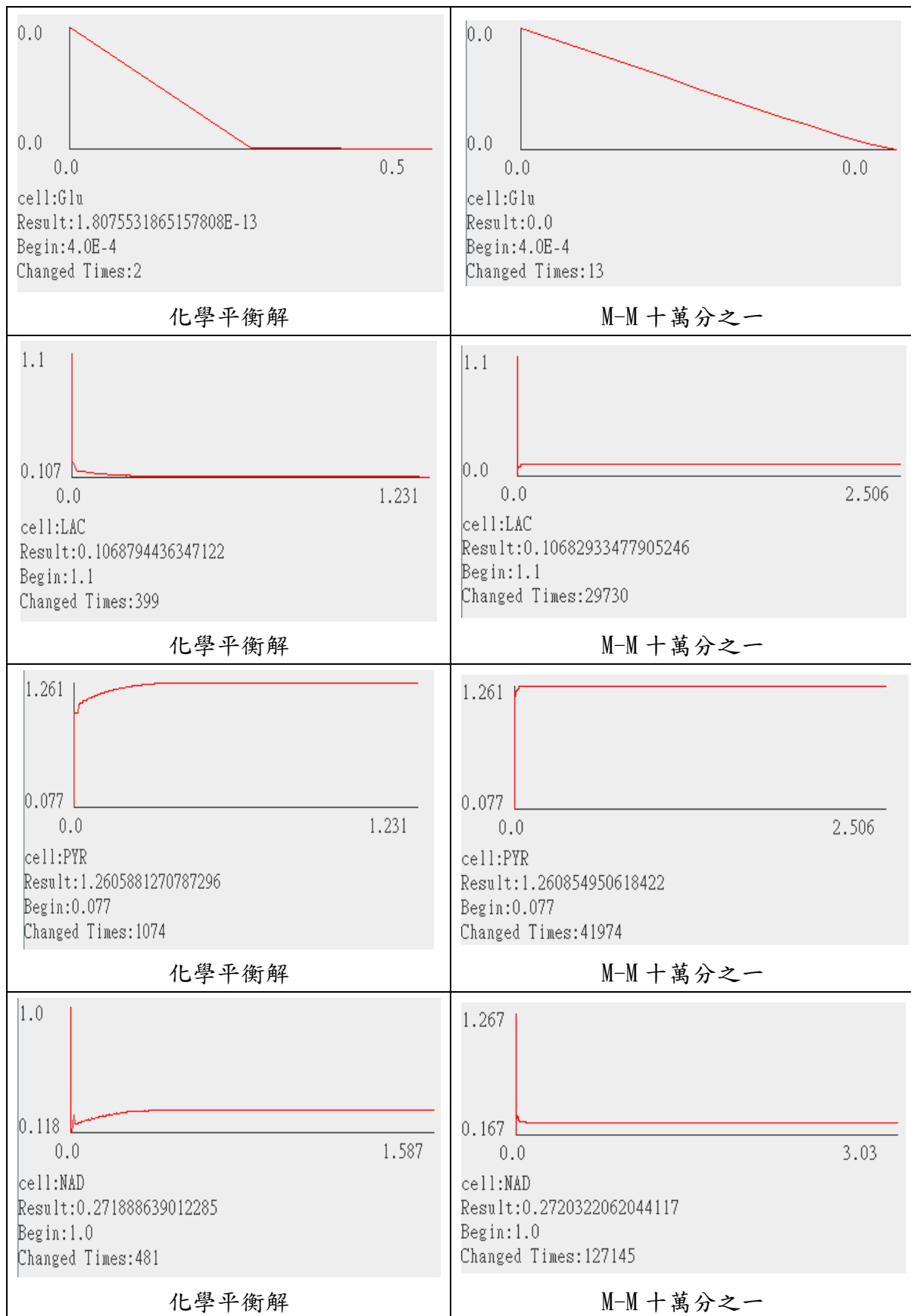


圖 4-3 模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後的濃度-時間變化圖 (一)

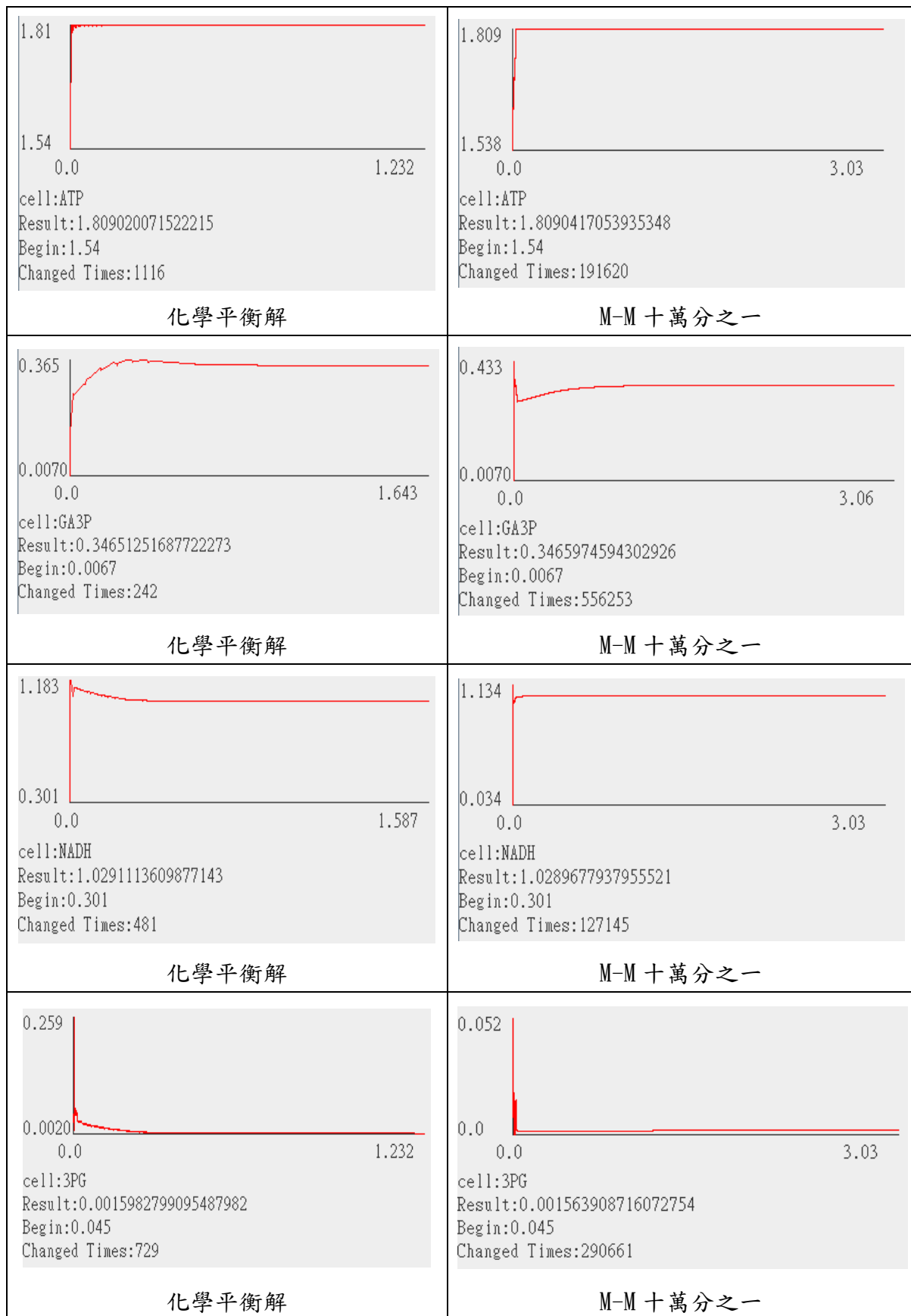


圖 4-3 模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後的濃度-時間變化圖 (二)

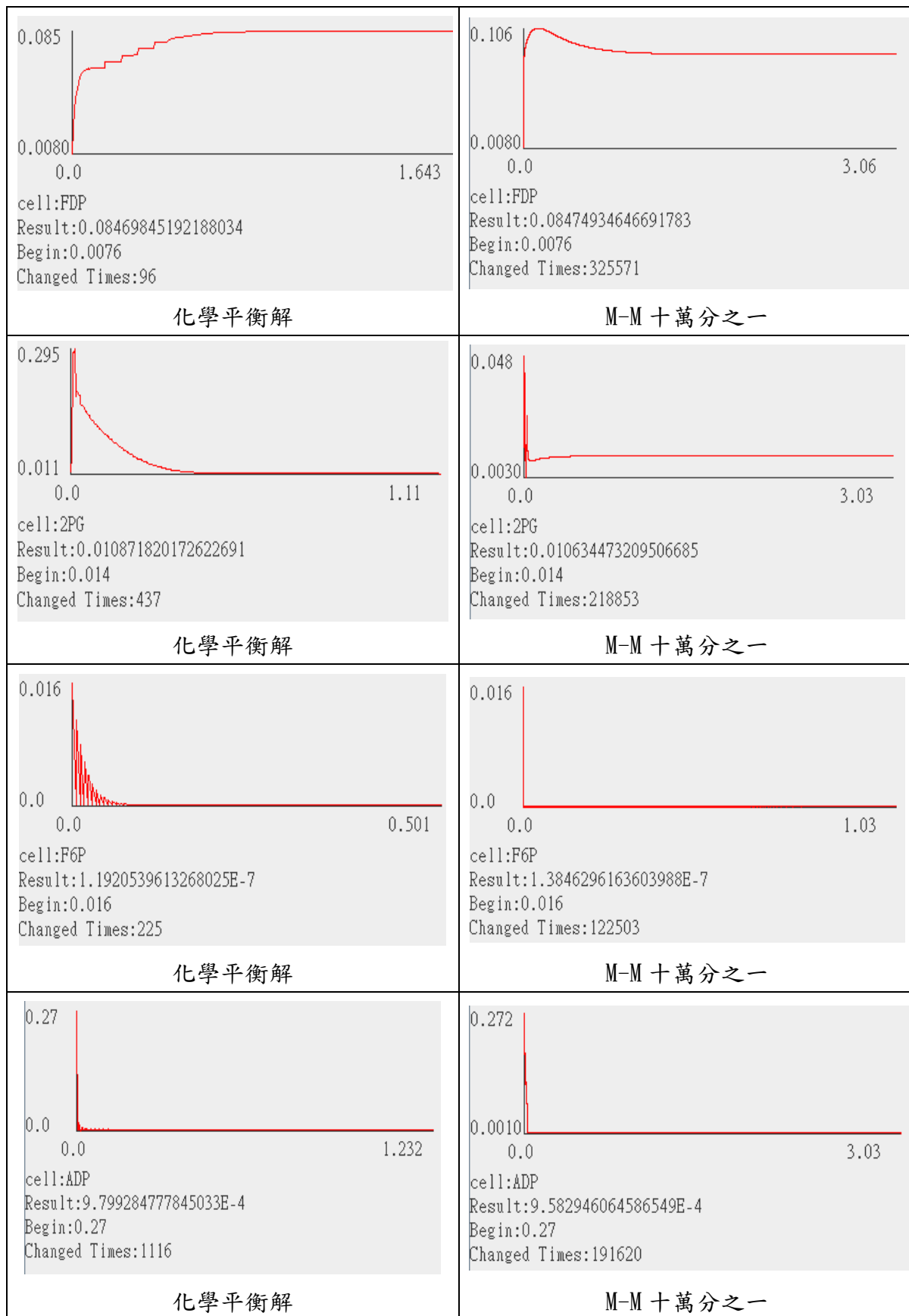


圖 4-3 模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後的濃度-時間變化圖 (三)

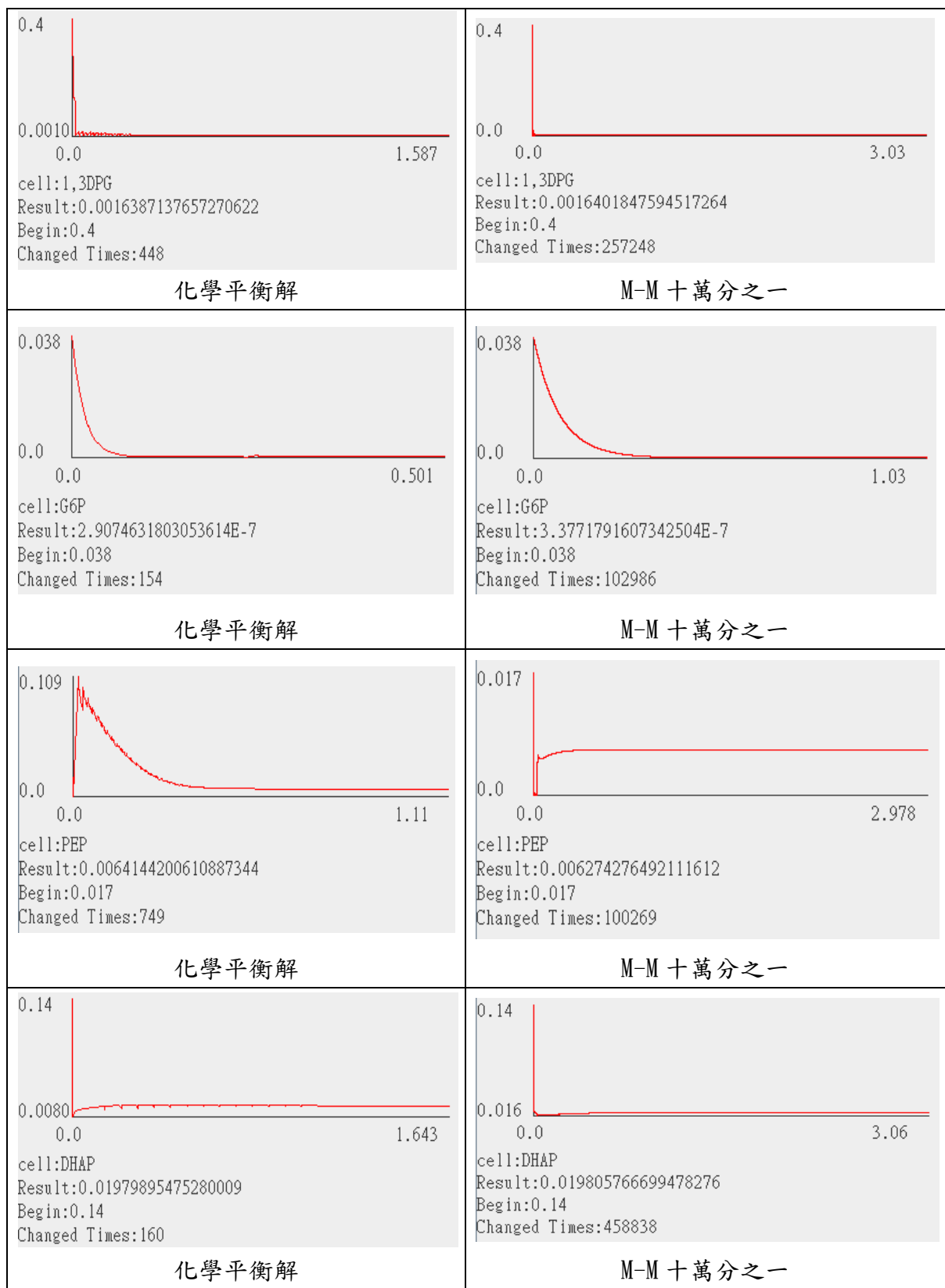


圖 4-3 模擬整組厭氧糖解作用達 steady state 後的濃度-時間變化圖 (四)

4.2.3 Michaelis-Menten 酵素動力學的 delay time 切得不夠細的結果

我們可以從表 4-7 的表中，大約的推出，如果 M-M 酵素動力學的 delay time 設在 1/200 秒時，或許 CPU 的執行時間就可以控制在 78 ms（和化學平衡解所花的 CPU time 相同）即可求得一平衡解？但實驗的結果並非如此。

接下來分別將 delay time 設 1/200 秒與 1/7000 秒來模擬，並將結果與達 steady state 的 M-M 相比較(delay time 設 1/100000 秒)。

表 4-9 M-M 的 delay time 設 1/200 秒能否達 steady state ?

	化學平衡解	M-M 二百分之一秒	M-M 萬分之一秒	M-M 十萬分之一秒
CPU time	78 ms	78 ms ?	3,765 ms	31,844 ms
執行轉置次數	2,713 次	?	201,112 次	1,922,830 次

實驗結果與討論：

M-M 酵素動力學的 delay time 設二百分之一秒執行時，其計算持續進行到所設定的最大模擬時間(100 秒)才停止，並無達到最終的平衡解。原因是時間切得不夠細，導致某些反應會有無法逼進平衡常數的情形。

在 M-M 的演算法中，若反應物的係數皆為 1，則轉換的濃度(Δ)= $\min(\text{反應物濃度}, v \cdot \text{delay time})$ ，所以若 delay time 設得太大，造成 $v \cdot \text{delay time}$ 的值大於反應物濃度，而直接將反應物濃度轉換成 0，此時就無法利用平衡常數的計算公式去逼近平衡常數，並會持續執行到所設定的模擬總時間才會停止，從圖 4-4 中，可發現一些反應物的濃度會出現 0 和某值的來回振盪，造成畫出的圖形和求得的濃度值無法提供可靠的資料。

而 delay time 設 1/7000 秒的結果，雖然部份反應物濃度已接近平衡，但對整個代謝網路而言，仍然無法求得一個最終的平衡解。

在此例中，至少需設 1/8000 秒才能達成平衡解。最佳的 delay time 選擇與反

應速率有關，但生化反應是非線性的系統，無法利用反應速率去推測出一個適當的 delay time，所以需設一個很細的 delay time 才能避免無法平衡的情況發生，但時間切太細就須耗用電腦大量的資源，故時間單位的拿捏，將很難去決定。



圖 4-4 M-M 酵素動力學不同 delay time 下的濃度-時間變化圖(一)



圖 4-4 M-M 酵素動力學不同 delay time 下的濃度-時間變化圖(二)

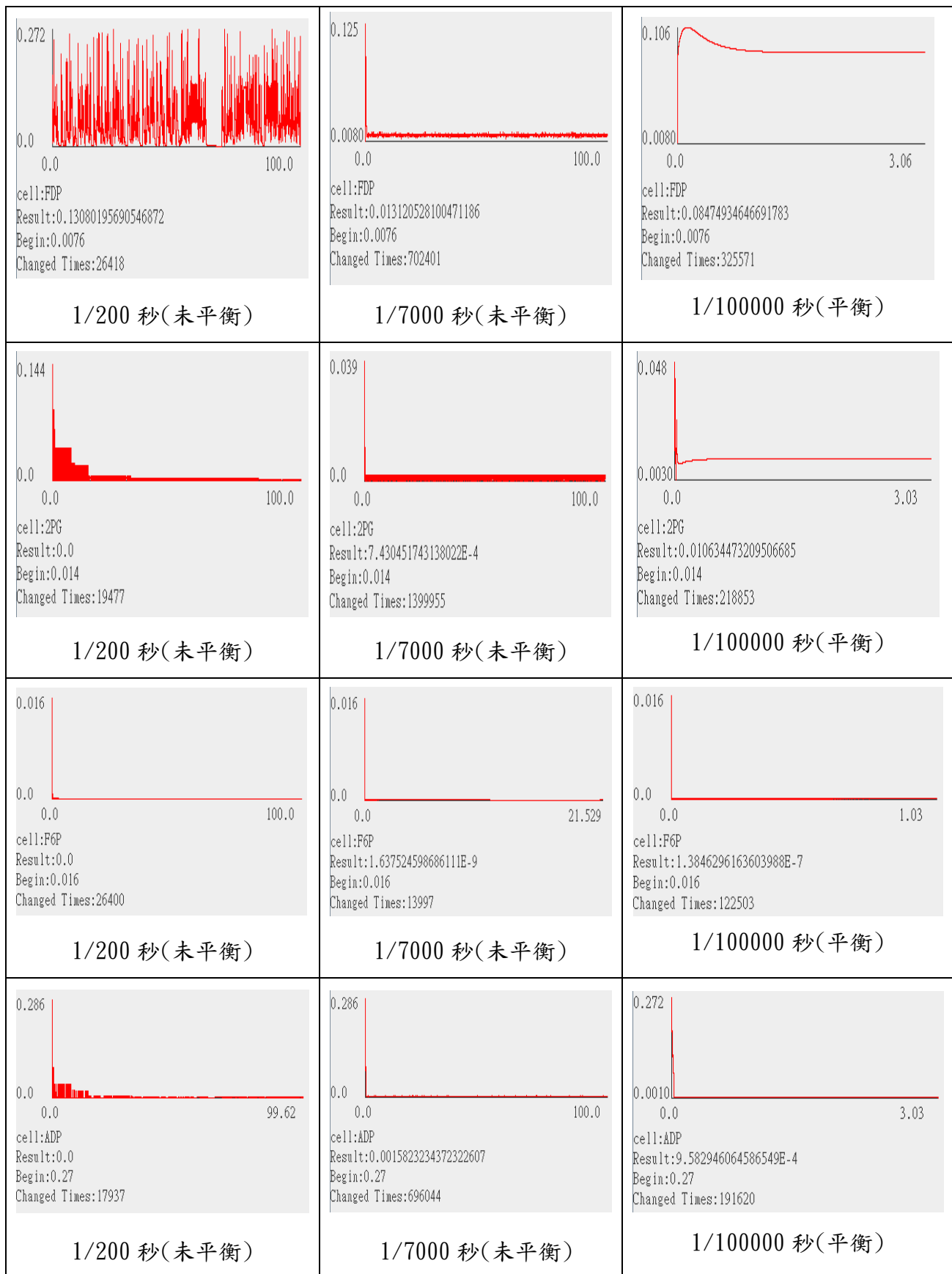


圖 4-4 M-M 酵素動力學不同 delay time 下的濃度-時間變化圖(三)

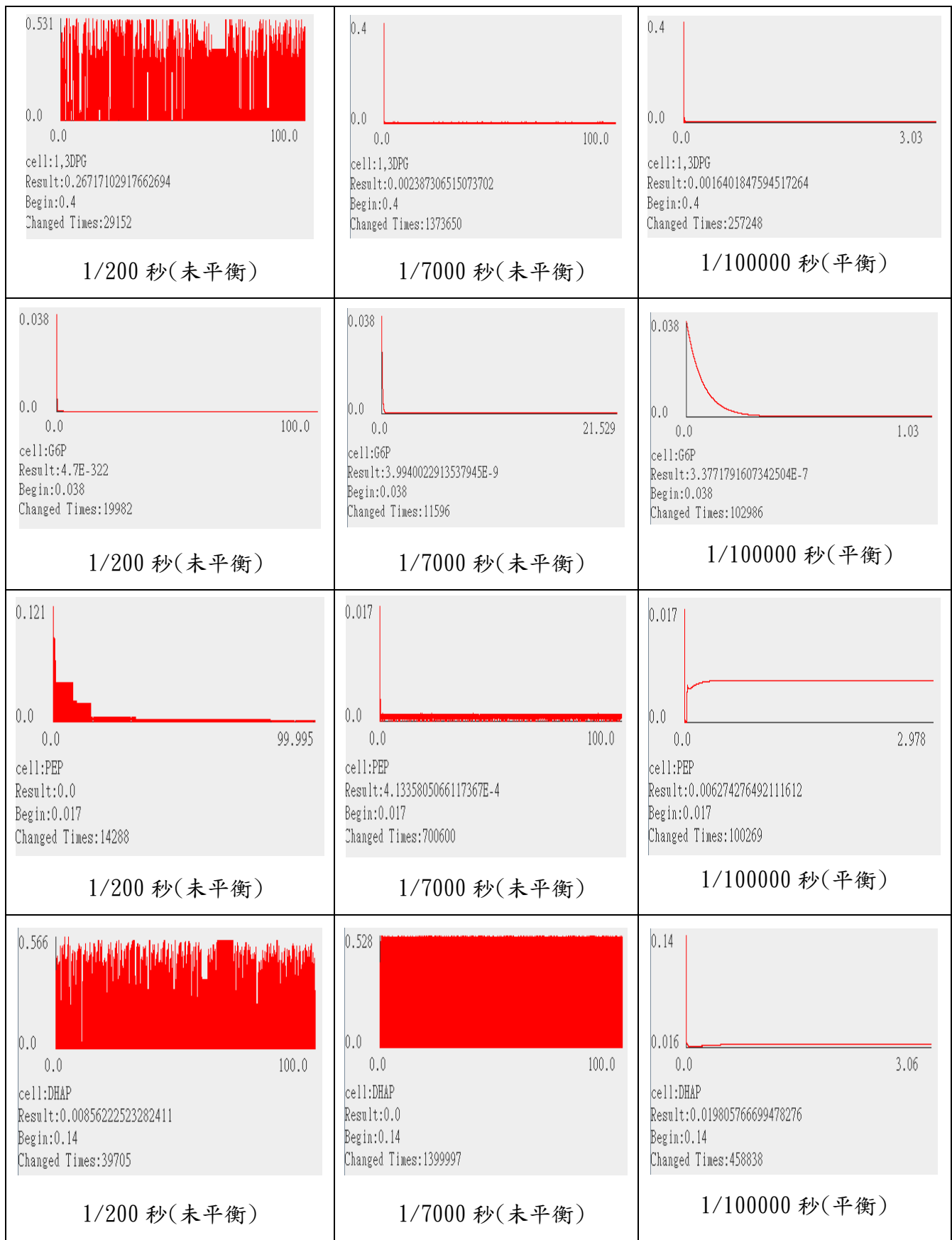


圖 4-4 M-M 酵素動力學不同 delay time 下的濃度-時間變化圖(四)

第五章 結果與討論

本研究目前共實作兩種定量演算法，一種是本研究所提的化學平衡解，另一種是參考文獻所修正的 Michaelis-Menten 酵素動力學公式，此兩種方法相比較後，可以得知採 M-M 酵素動力學來計算會有以下的問題：

- 如何決定一個適當的時間，時間要切多細？

時間切越細，CPU 的計算時間就越長。切得不夠細，又會有無法求得平衡解的情況發生。

- 需使用較大的電腦資源
- 使用較多的參數： K_{eq} , K_{cat} , K_m

需使用 K_{eq} 、 K_{cat} 與 K_m 來模擬。和化學平衡解相比，多了一個 K_m 值， K_m 值只會影響反應速率的大小，亦即只會影響反應進行中的濃度變化情形，而不會影響反應達 steady state 時的濃度值。

若改採化學平衡解來計算，會有以下的優勢：

- 執行速度較快，且在具有可逆反應的代謝網路中，透過相連反應的持續觸發與振盪後，其畫出的圖形會和 M-M 所產生的圖形類似。
- 不須考慮時間切多細的問題

化學平衡解可以直接利用 K_{eq} 來求得反應的最終解，而且不會有無法求得平衡解的情況發生。

- 使用較少的參數： K_{eq} 、 K_{cat}

只需 K_{eq} 和 K_{cat} 即可進行模擬，且 K_{cat} 在化學平衡解的計算上，主要是用於排程和計算反應的完成時間，故並不會影響最終的 steady state 濃度值。

兩方法的適用時機如下：

化學平衡解的適用時機：

- 使用者較重視反應完成後的濃度值時，或具有可逆反應的代謝網路。
- M-M 酵素動力學牽涉到 K_m 值的找尋，若此參數無法取得時，可以考慮採化學平衡解來計算。

酵素動力學的適用時機：

- 使用者需要精確的濃度變化來做決策，且可接受較長的模擬時間。

參考文獻

- [1] 李仁愛、李貽琳譯，2005，「生物化學-生命的分子基礎」，滄海。
- [2] 蒲泰宏，民 97，模擬平台之設計與實作，暨南大學資訊管理研究所碩士論文。
- [3] 李允中、王小璠、蘇木春，2003，「模糊理論及其應用」，全華。
- [4] 蔡劍霞，民 94，以系統生物學修正 Petri Nets 於代謝網路之應用，暨南大學資訊管理研究所碩士論文。
- [5] 潘淑芬譯，2003，「醫學生物化學」，藝軒。
- [6] Crick, F." On Protein Synthesis" in Symp. Soc. Exp. Biol. 1958, XII, pp. 139-163.
- [7] Crick, F." Central Dogma of Molecular Biology" Nature, 1970, 227, pp. 561-563.
- [8] Kitano, H." Systems Biology:A Brief Overview" Science, 2002, 295, pp. 1662-1664.
- [9] Butcher, E.C. ,Berg, E.L. and Kunkel, E." Systems biology in drug discovery" Biotechnology, 2004, 22, pp. 1253-1259.
- [10] Genrich, H., Kiiffner, R. and Voss, K. "Executable Petri net models for the analysis of metabolic pathways" Int. J. STTT , 2000, 3, pp. 394-404.
- [11] Joshi, A. and Palsson, B.O. "Metabolic Dynamics in the Human Red Cell. Part I —A Comprehensive Kinetic Model" J. theor. Biol. 1989, 141, pp. 515-528.
- [12] Joshi, A. and Palsson B.O. "Metabolic Dynamics in the Human Red Cell. Part II —Interactions with the Environmentl" J. theor. Biol. 1989, 141, pp. 529-545.

- [13]Joshi, A. and Palsson, B.O. “Metabolic Dynamics in the Human Red Cell.PartIII—Metabolic Reaction Rates” J. theor. Biol. 1990, 142, pp. 41-68.
- [14]Joshi, A. and Palsson, B.O. “Metabolic Dynamics in the Human Red Cell.PartIV—Data Prediction and Some Model Computations” J. theor. Biol. 1990, 142, pp. 69-85.
- [15]<http://juang.bst.ntu.edu.tw/BCbasics/index.htm>
- [16]Xia, X.Q. and Wise, M.J. “DiMSim: A Discrete-Event Simulator of Metabolic Networks” J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2003, 43, pp.1011-1019.
- [17]KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>
- [18]Kanehisa, M. and Goto, S. ” KEGG:Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” Nucleic Acids Research, 2000, 28, pp. 27-30.
- [19]Koch, I. , Junker, B. and Heiner, M.” Application of petri net theory for modeling and validation of the sucrose breakdown pathway in the potato tuber” Bioinformatics, 2005, 21, pp. 1219-1226.
- [20]Runge, T.” Qualitative path analysis of metabolic pathways using petri nets for generic modeling” technique report, 2004.
- [21]Chen, M. and Hofestaedt, R.” Quantitative petri net model of gene regulated metabolic networks in the cell” In Silico Biology 3, 0030, 2003.
- [22]Tomita, M. , Hashimoto, K. and Takahashi, K. “E-CELL: Software environment for whole-cell simulation.” Bioinformatics 1999, 15, pp. 72-84.
- [23]Mendes, P. “Simulation of biochemical pathways with gepasi3.” Trends Biochem. Sci 1997, 22, pp. 223-252.

- [24]Lee, I.D. and Palsson, B.O. "A Macintosh software package for simulation of human red blood cell metabolism" *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 1992, 38, pp.195-226.
- [25]Torres, N.V. and Voit, E.O." *Pathway Analysis and Optimization in Metabolic Engineering*" 2002.
- [26]Voit, E.O." *Canonical Nonlinear Modeling:S-System Approach to Understanding Complexity*" ,1991.
- [27]Voit, E.O." *Computational Analysis of Biochemical Systems :A Practical Guide for Biochemists and Molecular Biologists*" ,2000.
- [28]Voit, E.O." *Canonical modeling:A review of concepts with emphasis on environmental health*" *Environmental Health Perspectives*,2000, 108, pp895-909.
- [29]Ricard, J." *Biological Complexity and the Dynamics of Life Processes*" Elsevier, Amsterdam, 1999.
- [30]Westerhoff, H.V. and Dam, K.V." *Thermodynamics and Control of Biological Free-Energy Transduction*" Elsevier, Amsterdam, 1987.
- [31]Heinrich, R. and Schuster, S." *The Regulation of Cellular Systems*" Chapman and Hall, New York, 1996.
- [32]Fell, D.A." *Understanding the Control of Metabolism*" Portland Press, London, 1997.
- [33]Louchka, P.Z. , Monika, H. and Ina, K. "Time Petri Nets for Modelling and Analysis of Biochemical Networks" *Fundamenta Informaticae*,2005, 67, pp. 149-162.

- [34]Lee, D.Y., Zimmer, R., Lee, S.Y. and Park, S. "Colored Petri net modeling and simulation of signal transduction pathways" *Metabolic Engineering*, 2006, 8, pp.112-122.
- [35]Thomas, R." Application of colored petri nets in systems biology" workshop CPN, University of Arthus, 2004, pp. 77-95.
- [36]Hiroshi, M. Atsus, D. Masao, N. and Satoru, M." Hybrid Petri net representation of gene regulatory network" *Pacific Symposium on Biocomputing*, 5, pp. 338-349.
- [37]Hiroshi, M. Hitoshi, A. Atsushi D. Yukiko, T. Mika, M. and Satorn, M." Biopathways Representation and Simulation on Hybrid Functional Petri Net" *In Silico Biology*, 2003.
- [38] Atsushi, D. Sachie, F. Hiroshi, M. Masao, N. and Satoru, M." Constructing biological pathway models with hybrid functional Petri nets" *In Silico Biology*, 4, 2004.
- [39]Ulrike, W. and Ann, D.B." Analysis and comparison of metabolic pathway databases" *Briefings in Bioinformatics*, 2001, 2, pp. 126-142.
- [40]BRENDA, [http:// www.brenda-enzymes.info/](http://www.brenda-enzymes.info/)
- [41]Schomburg, I., Chang, A. and Schomburg, D." BRENDA, enzyme data and metabolic information" *Nucleic Acids Research*, 2002, 30, pp. 47-49.