



国外优秀科技著作出版专项基金资助

代谢工程的 途径分析与优化

Pathway Analysis and Optimization in
Metabolic Engineering

[西班牙] 内斯托尔 V. 托雷斯

Néstor V. Torres 著

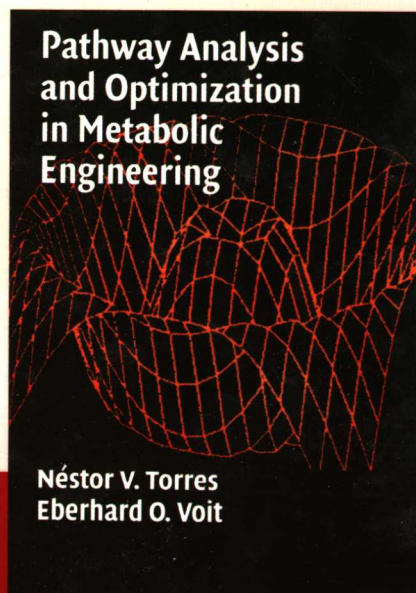
[英 国] 埃伯哈德 O. 沃伊特

Eberhard O. Voit

修志龙 滕 虎 等译

李晓晖 校审

Chemical Industry Press



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心



国外优秀科技著作出版专项基金资助

代谢工程的 途径分析与优化

[西班牙] 内斯托尔 V. 托雷斯

[英 国] 埃伯哈德 O. 沃伊特

修志龙 滕 虎 等译

李晓晖 校审



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

代谢工程的途径分析与优化/[西班牙]托雷斯(Torres, N. V.) [英国]沃伊特(Voit, E. O.)著;修志龙,腾虎等译. —北京:化学工业出版社, 2005. 5
书名原文: Pathway Analysis and Optimization in Metabolic Engineering
ISBN 7-5025-7002-0

I. 代… II. ①托…②沃…③修…④腾… III. 代谢-生物工程 IV. Q493

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 038354 号

Pathway Analysis and Optimization in Metabolic Engineering/Edited by Néstor V. Torres, Eberhard O. Voit

ISBN 0-521-80038-2

Copyright © 2002 by Cambridge University Press. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by Cambridge University Press

本书中文简体字版由 Cambridge University Press 授权化学工业出版社独家出版发行。
未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2004-0411

代谢工程的途径分析与优化

[西班牙] 内斯托尔 V. 托雷斯 著

[英国] 埃伯哈德 O. 沃伊特 著

修志龙 滕虎 等译

李晓晖 校审

责任编辑: 傅四周 孟嘉

责任校对: 李林

封面设计: 关飞

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市前程装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 19¼ 字数 359 千字

2005 年 7 月第 1 版 2005 年 7 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7002-0

定价: 55.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

译 者 的 话

代谢工程是伴随着生物技术和计算科学的发展而形成的, 20 世纪 80 年代逐渐形成了代谢工程的理论和方法, 其后随着基因组学和蛋白质组学的蓬勃发展, 代谢工程的研究进入了一个新的水平, 并逐渐成为系统生物学的重要组成部分。代谢工程是在全面了解细胞代谢网络的基础上, 优化胞内物质流、能量流和信息流的分布, 通过基因工程的手段改变限制细胞代谢的关键途径, 从而实现目标产品的最优化生产, 因此代谢工程在工业生物技术领域占有非常重要的地位。

《代谢工程的途径分析与优化》是一本介绍代谢工程理论与方法的入门性著作, 其内容包括模型建立、分析与优化方法、最大化生产等, 并以柠檬酸和乙醇生产为例加以说明。该书最大的特点是通俗易懂, 让读者尽快理解并掌握代谢工程的基本原理和方法。对于具备生物知识背景的读者来说, 本书不会让您对晦涩、枯燥、深奥的数学推理或者公式感到难堪, 因为它没有使用过多的数学术语, 用数学语言描述的生物现象不难理解, 所以比较容易掌握相关的内容。而对于非生物专业的读者来说, 比如数学专业的朋友, 大可不必为看不懂复杂的化学反应(代谢途径)和分子式而烦恼, 本书列举的代谢网络不是很多, 并且往往比较简单, 从中能体会到如何将熟悉的数学知识运用到生物领域。对代谢工程感兴趣的科技工作者、学生和工程技术人员都会从本书中受到启发, 对各自的工作有所帮助。

本书的翻译工作是由大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系的部分师生共同努力完成的, 下列硕士生和博士生参与了各章的翻译工作: 吴媛媛(第 1 章); 张杰(第 2 章); 李铮(第 3 章); 王冰(第 4 章); 秦海娜(第 5 章); 于沈晶(第 6 章); 王辉、高新亮(第 7 章); 牟英(第 8 章); 孙亚琴老师负责对全书的词汇索引、符号说明和图表的翻译整理工作, 在此对他们付出的辛勤劳动表示衷心的感谢!

由于译者水平有限、时间也比较仓促, 加之对其中部分内容缺乏科研和教学经验, 错误之处在所难免, 欢迎读者批评指正。希望本书的翻译和出版能够为我国代谢工程的科研和教学以及相关生物技术的发展提供有益的参考。

译者

2005 年 3 月于大连

前 言

如果说上世纪 90 年代是分子生物学时代的话,随着人类基因组计划的完成,21 世纪前 10 年就是将新知识用于解决医学、药学、农学领域以及生物技术产业中存在的紧迫问题的时代。随着生物功能基因组学以及对生物基因组有目的处理的研究取得进展,加上史无前例的计算机应用与普及,生物技术的一个新的分支——代谢工程产生了。代谢工程为我们描绘了一个不同的研究前景,提供了一种崭新的思维方式。它不仅侧重于有机体生物操纵的新工具研究上,而且强调用系统的、综合的方式深入理解代谢途径。

代谢工程是一门交叉学科,它植根于分子生物学、生物化学、遗传学、化学工程、生物技术、数学建模和系统分析等诸多学科之中,其研究对象通常是微生物中的代谢途径和基因网络,研究目标是优化目的代谢物的产率。在工业规模上调控培养微生物以生产能源(如酒精)、有机溶剂、胶质和色素。食品工业在很大程度上依赖于防腐剂,如柠檬酸,而目前微生物生产柠檬酸的产量已达每年几十万吨。医药工业利用微生物生产维生素、氨基酸、脂类、酶和抗生素的前体。

代谢工程由两部分组成:一是研究控制生物代谢途径的策略;二是将这些策略引入到实际的生物技术领域。本书侧重于策略部分,并未讨论分子生物学和生物技术的重大研究进展,但它们能使代谢途径的控制策略研究更有意义。关于专一性地改变生物基因或基因组的组成的许多新选择,现代生物学的无限可能性,发酵技术和化学过程控制等内容超出了我们在本书中所论述的范围。

本书的大部分内容将直接或间接地讨论应用于代谢网络的优化方法。当然,无论是优化方法的发展还是代谢网络研究都不是新事物,但是将一种特定的惯用方法应用于其他领域直到大约十年前还不多见。在发酵技术发展的初期,微生物发酵单位的提高是通过化学诱变筛选最适菌株来实现的,同时结合实验条件的优化和培养基的更新,诱变和筛选策略非常富有成效,经常会将原始母株的产率提高百倍以上。然而,近年来已研究成熟的系统,如乙醇和柠檬酸的生产开始出现停滞趋势,诱变-筛选的普通方式在许多方面已明显地陷于僵局。在逐步去掉代谢途径中的主要限制瓶颈方面,上述策略已暴

露出不足之处。

面对这种情况,一些有远见的代谢工程研究者将注意力转移到更深入地探究包含目标产物合成的生化过程的机理上。起初锁定了一些特定的生化步骤或运送步骤,它们似乎限制了微生物的生产过程,但不久便意识到对代谢途径应有全面的认识。这种认识应考虑到综合途径或下一步要走的步骤以及代谢网络,因为一个途径的改变经常会直接或间接影响到其他途径。如果一种微生物用高于正常量的 NAD^+ 生产乙醇, NAD^+ 的需求量增大,那 NAD^+ 就有可能由其他途径来满足。因而代谢工程的研究主题便成为人们如何使用合适的动力学信息来使物质流向终端目标产物,而不影响其他途径以及微生物的活力。

弄清酶促反应、单个途径和集成的代谢网络之间的复杂联系,需要使用数学和计算方法。数学使多成分系统的管理简易化,并能定量描述过程,这是单靠人脑无法实现的。有效的计算工具必须依赖于数学表达和数学分析理论方面的进步。就在几十年前,真实代谢体系的数学分析是不可行甚至不可能的,因为方程解不出来。虽然计算机的运算能力每 18 个月翻一番,但我们仍然没有把握在合理的时间内得到每一个数学问题的数值解,这就意味着选择“好”的数学表达和有效的分析方法是一个重要的问题。例如,理论上非线性回归和寻找非线性体系中的最大值是很清楚的,然而,大型计算机和最好的软件都不能给出迅速、满意的答案。

计算方面的这些挑战与代谢途径的分析和优化有着特殊的关系,因为代谢途径包括许多底物、中间代谢物、产物、酶、辅助因子和调节因子,而且酶促反应步骤具有非线性的特征,即排除了简单的缩放效应。例如,许多反应在底物浓度低时进行得很快,而在底物浓度高时趋于饱和。激活剂和抑制剂以非线性的方式影响反应,可能会导致衰减或增强式振荡、稳定的限制环或混沌状态。这些现象都已在生物体系中发现过,因此,代谢体系合理的数学描述应该可以解释这些问题。由此可见,如果我们的目标是在真实条件下优化一些通量或代谢物,那么显然我们将面对着非线性问题。

众所周知,非线性体系的优化是非常困难的,但是代谢工程研究者已经确定了一些方式来减小甚至避免非线性问题。经过上一段落简单的讨论后,有人可能认为这种尝试是无用的或是方向错误的。然而,这种推论是不完善的。通过关注代谢网络的特殊性质,并使用渐进的逼近方法,不同研究小组的成员已经建立了两种线性解决方案,每一种都有许多扩展及普适性。其中一种方案基于代谢网络的化学计量学,它研究的通量特征是单个代谢物的形

成及降解。在稳态下,即所有代谢物浓度恒定,进入的通量和输出的通量绝对平衡时,化学计量法可得到一个矩阵代数法易于分析的线性体系。除了纯粹的化学计量平衡外,化学计量法可以扩展到包括生理学、物理化学和热力学等在内的、生物体必须满足的约束条件;其他扩展包括研究代谢网络中假设途径的特征以及选择性地变更代谢路线和重新分配流量的可行性。非常重要的是,化学计量体系的线性特性允许将这种方法放大到任意尺度。

化学计量法或多或少地忽略了控制酶促反应步骤的非线性问题。一方面,可能会为线性和无限制性尺度等优点而付出代价;另一方面,必须搞清楚在何种程度上可以忽略途径的调节特征,显然这种特征是存在的,并且经常导致其他体系作出反映,而不是非调节体系。一种方案是基于一种所谓“生化系统理论 (Biochemical Systems Theory, BST)”的模型框架基础上,完全承认非线性,然而最终解决的是线性优化问题。这种理论的特点是速率法则与具有幂函数乘积特点的其他过程的逼近。数学上,这种类型的表达非常方便,并基于多项式近似函数的泰勒 (Taylor) 理论,进而在控制工程的 Bode 分析和生物学的异速生长法则 (the laws of allometry) 中也能找到理论支持。异速生长法则广泛存在于生物学领域,从生物化学和生理学水平到生物生长和种群生物学现象。幂定律也出现在基础化学动力学中,而且再次表明可以很好地表达完整的生物体内的细胞过程。

在这本书中,我们提出幂函数逼近法和 BST 法作为代谢工程中途径分析和优化的工具。用 BST 法进行途径分析始于 19 世纪 60 年代末,已成功地应用于包括生物学和生物技术在内的许多现象的分析。优化方面的成功应用就更近了,关于此方面的第一篇文章发表于 1992 年。如前所述,许多优化方面的工作带有理论或预测的性质,但是近年来在文献中已开始出现实验报道,来验证基于 BST 法优化的预期值。

作为一门高度交叉的前沿学科,代谢工程需要如下几种领域的基础知识:生物学、化学、数学、计算科学和工程学。这种广博的知识面对本书内容的恰当表述提出了挑战,我们希望没几个读者会发现本书的一些章节太简单或太难。和生物学家们的合作使我们决定以一个非常感兴趣的生物学家的心态来写这本书,而且这个生物学家应具备一些基本的计算能力,或至少不应害怕不熟悉的符号或术语。当然,我们也希望本书能吸引对代谢工程感兴趣的其他科学家和工程师。训练有素的读者可能会发现一些关于优化方法的材料,完整而不琐碎,然后便可以自己决定快速浏览或跳过这些章节。

我们按如下方式对本书进行了编排:第 1 章讨论了寻找实用模型。当我

们想分析和优化途径时要寻找什么？我们的选择是什么？如何区分一个有用模型和一个应用数学中的纯数学习题？本章描述了一些已建立的和最近正在建立的生化代谢网络的策略，并探讨了这些模型对完成代谢工程任务的适用程度。

第2章回顾了BST的主要特点和方法，概述模型设计的过程，讨论了应该包括哪些因素，简化假设到何种程度是合理和必要的。模型设计的第一步是建立象征性的模型，接下来从实验或文献中获取信息，给参数赋值。一旦数值化模型建立起来，接下来便开始系列化分析。或强调稳态下模型的性质，或评估模型的刚性和稳定性，或检验微扰或结构变化时其动力学响应。

第3章将模型设计和分析方法应用于相关的特定途径中，即用黑曲霉生产柠檬酸。本章从模型构建开始，但最终证实该模型并不令人满意。我们认为这种“失败的尝试”是有益的，因为它反映了模型的真实性和文献中很难见到。更进一步讲，即使最初的模型不符合实际应用，它所容纳的好的或坏的结果也可以为修正模型提供线索。好的结果告诉我们哪些信息和模型结构应被保留；坏的结果同样重要，它们指明了原始模型的问题所在，对原始模型的诊断结果可为改进模型的修正过程提供指导。实际上，建模过程是设计、分析、解释的多次反复，也难免发现所考察现象的某些方面没有引起足够的重视。第3章仅列举了两个模型，但它们应该足以说明修改或更新模型的过程。

第4章为后续章节要讨论的代谢网络的优化作准备。本章始于优化基础，讨论了单变量函数中最大值和最小值的确定。大部分读者都能想起这个题目在大学甚至高中数学课上讲授过，之所以在此提及是因为多变量函数的最大值和最小值的确定原则非常相似，因此大系统的优化问题应该是直接计算的延展。然而，理论研究表明，如何快速克服大网络实际优化问题的障碍是至关重要的。作为理论方法的一种选择，第4章介绍了大的非线性体系数值优化的概念。诠释这些概念的算法应在假设条件下解决任何尺度的问题，但是实践又一次显示了非线性系统的挑战性。

令人高兴的是，这些问题在第5章被简化。第4章列出了所有复杂因素后，本章解释了如何用线性方法优化代谢体系。最后，化学计量法和BST法都能归结为约束优化问题，也就是人们熟知的线性规划问题。线性规划问题可用数学软件解决，但讨论计算的细节并不是本章的目的。取而代之的是读者应该为线性规划的概念建立一种感觉，或者参考描述数学和计算详情的大量文献，或者信服有效的方法或软件，本章阐述了线性规划的内容，特别强

调了与代谢工程相关的目标函数和约束条件。

有了第2章的生化系统理论作基础,至少从第5章中得到了对线性规划的粗浅认识后,第6章描述了柠檬酸途径的整体优化,这在第3章已讨论过。本章源于合适的目标函数,详细讨论了代谢物和通量的约束条件以及代谢负担问题,并分析了不同条件下获得的各种结果,也涉及实验问题。

第7章论述了第二个详细的例子——糖酵解途径,并为此提出了不同的优化任务。首先,乙醇得率为优化目标,但接下来,同样的体系被用来进行甘油和糖生产的优化。本章进一步讨论了同时完成多种经常对立的任务的优化方法。起初,两个任务以一定的方式重新组合,仍然允许包含两个任务的单独目标的优化,这种策略及其结果将同一个真正的多目标优化进行比较。

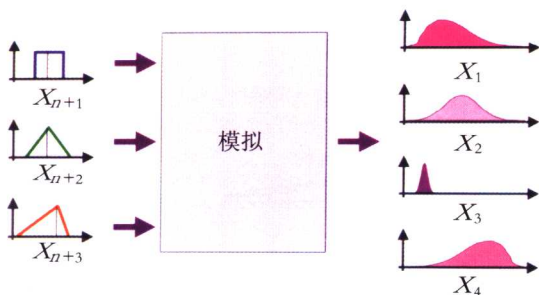
最后一章试图预测代谢工程中途径分析与优化的前景。现代基因组分析技术似乎很明显会对代谢工程产生巨大影响。本章从途径分析和优化的角度指出这些技术将如何发挥作用。

许多人帮助我们完成了这本书,如果忽略了那些直接给予我们极大帮助的人,那我们就是不负责任的。下列人士为我们提供了很有价值的反馈和评论,在此对他们表示诚挚的谢意: Fernando Alvarez-Vasquez, Julio Avila, Julio Banga, Agnieszka Bronowska, Carlos M. González-Alcón, W. Chip Hood, Alberto Marín-Sanguino, Kellie Sims 和 Julio Vera。

其他许多人也为我们提供了全力支持,他们开阔了我们的思维,激发着我们的创作热情,进而形成了本书的观点。谢谢!

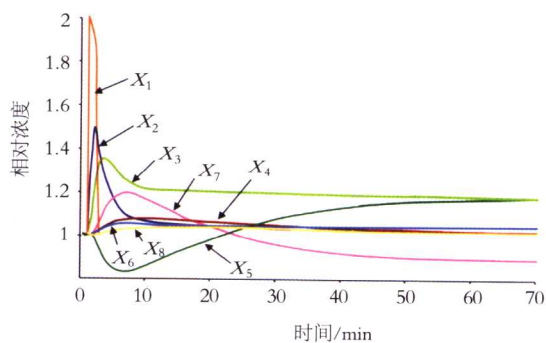
内斯托尔 V. 托雷斯
Néstor V. Torres
La Laguna, Tenerife

埃伯哈德 O. 沃伊特
Eberhard O. Voit
Charleston, SC

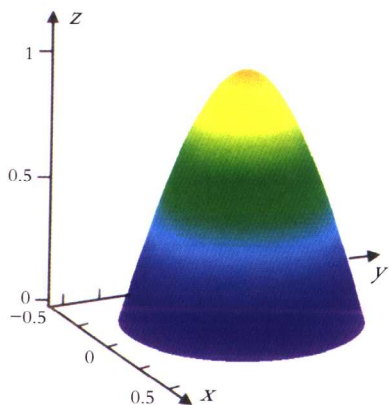
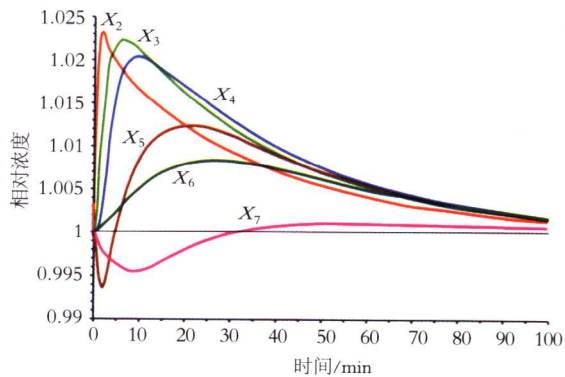


彩图2.6 蒙特卡罗模拟示意图
(文见第59页)

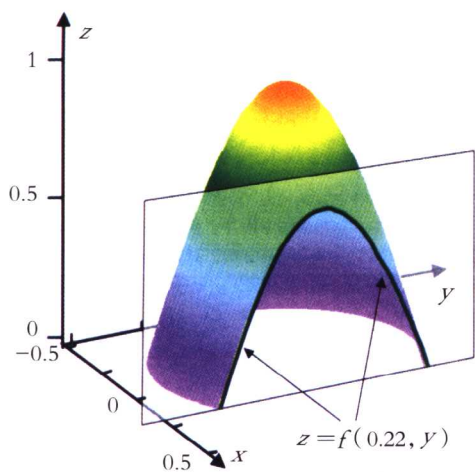
彩图3.10
6-磷酸葡萄糖 (X_1) 增加两倍时的
系统动态响应
(文见第99页)



彩图3.18
细胞质中的葡萄糖 (X_1) 增加两倍时
系统的动态响应
(文见第119页)



彩图4.6 二维变量函数 $z = 3 - 2 \times \sqrt{1 + 6.25(x^2 + y^2)}$
的曲线图
(文见第136页)



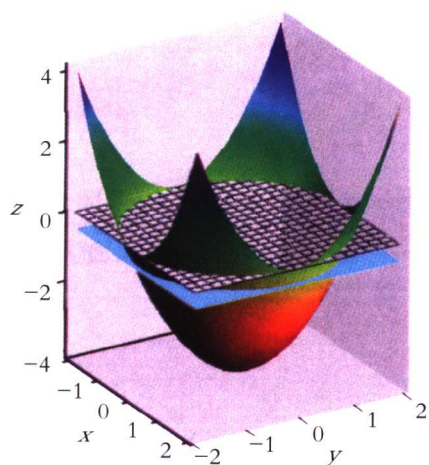
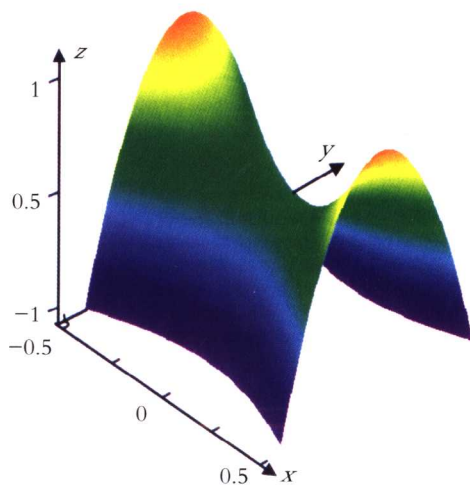
彩图4.7

图4.6中图形与平面 $x=0.22$ 相交
体现了函数 $z=f(0.22, y)$ 的投影

(文见第136页)

彩图4.8 鞍点

(文见第138页)

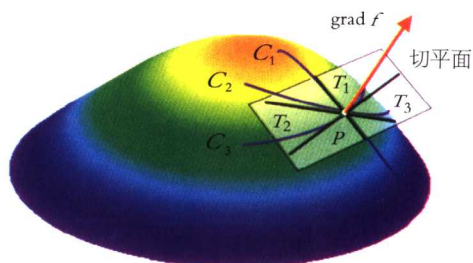


彩图4.9 式(4.7)描述的抛物面

(文见第144页)

彩图4.12 由函数 f 定义的路线 C_1 、 C_2 、 C_3
沿着三维曲面运动

(文见第148页)



目 录

1 目标——实用模型	1
1.1 模型选择的标准	3
1.2 生物化学过程模型	7
1.2.1 热力学	8
1.2.2 动力学	11
1.2.3 Michaelis-Menten 速度定律	13
1.2.4 化学计量系统	19
1.2.5 简化的表达	21
1.2.6 波德分析	22
1.2.7 幂定律近似法	23
1.2.8 S 系统	27
1.2.9 综合质量作用系统	28
1.2.10 代谢控制分析	29
1.2.11 丰富的结构	32
1.3 总结	33
1.4 参考文献	34
2 生化系统理论方法	41
2.1 模型设计	43
2.2 生化系统理论中的方程设计	46
2.3 参数估计	49
2.3.1 基于流量的估计	49
2.3.2 根据动态数据估算	53
2.4 动态分析	55
2.4.1 系统特征的变化	56
2.4.2 蒙特卡罗模拟	57
2.5 稳态分析	59
2.6 稳定性分析	63
2.7 评价和说明	68

2.8 参考文献	69
3 黑曲霉生产柠檬酸模型	73
3.1 引言	75
3.2 柠檬酸基本的化学及生物化学性质	76
3.3 基础数学模型	79
3.3.1 质量平衡和 S 系统方程	79
3.3.2 参数估计和 S 系统表示法	81
3.3.3 基础数学模型	89
3.3.4 稳态	89
3.3.5 局部稳定性	90
3.3.6 鲁棒性	90
3.3.7 动态行为	99
3.3.8 最初模型的局限性和缺点	99
3.4 修订模型	101
3.4.1 新的过程和生化数据	101
3.4.2 质量平衡和 S 系统方程	103
3.4.3 局部稳定性和稳态的描述	109
3.4.4 鲁棒性	109
3.5 修订模型的性能评价	119
3.6 附录——修订模型中约束条件的数学表达式	120
3.7 参考文献	122
4 优化方法	127
4.1 解析方法	130
4.1.1 单变量函数的极值点	130
4.1.2 单变量非线性函数极值点的解析计算	132
4.1.3 多变量非线性函数极值点的解析计算	135
4.1.4 约束非线性函数的优化	139
4.2 搜索算法	145
4.2.1 单变量函数	145
4.2.2 多变量非线性函数的搜索	148
4.2.3 遗传算法	151
4.3 参考文献	152
5 生化系统的优化	153

5.1	引言	155
5.2	非线性优化的必要性	159
5.3	搜索多变量线性函数的极值	161
5.4	化学计量学网络的优化	167
5.5	S 系统的优化	169
5.6	GMA 系统的优化	171
5.7	多目标优化	173
5.7.1	向量优化	177
5.7.2	目标规划	178
5.8	结构优化	179
5.9	参考文献	181
6	黑曲霉生产柠檬酸的优化	187
6.1	引言	189
6.2	用黑曲霉进行柠檬酸生产的最优线性规划	190
6.2.1	目标函数	191
6.2.2	约束条件	191
6.3	最优解	197
6.4	系统搜索最优解的最佳步骤序列	200
6.5	操作过程中的误差影响分析	205
6.5.1	输出分布的形态	206
6.5.2	柠檬酸的生产	207
6.5.3	约束违例	208
6.6	结论	210
6.7	参考文献	212
7	用酿酒酵母生产乙醇的最大化	215
7.1	概述	217
7.2	研究背景	218
7.3	Galazzo 和 Bailey 模型	220
7.3.1	物料平衡方程	220
7.3.2	动力学模型	221
7.4	S 系统模型	223
7.5	模型的质量评估	224
7.5.1	稳态的局部稳定性	225

7.5.2	模型的刚性	225
7.5.3	动力学行为	227
7.6	优化——间接优化方法	227
7.6.1	直接的 S 系统优化	228
7.6.2	目标函数	229
7.6.3	约束条件	230
7.7	结果	232
7.7.1	乙醇生产的最大化	232
7.7.2	甘油及糖生产的最大化	235
7.8	间接优化方法的品质评价	239
7.8.1	直接优化方法的简洁陈述	240
7.8.2	乙醇生产的直接优化方法实施	242
7.8.3	乙醇生产的非直接优化和直接优化解	242
7.9	多目标优化	245
7.9.1	间接多目标优化方法	246
7.9.2	单目标优化	247
7.9.3	多目标优化	248
7.9.4	与糖酵解酶同时过量表达的观测值的比较	250
7.10	讨论	253
7.11	参考文献	254
8	结论	259
8.1	大肠杆菌高密度培养生产 L-肉碱	262
8.2	大肠杆菌中色氨酸的生物合成	264
8.3	途径分析的趨勢及基因技术和基因组学的作用	266
8.3.1	代谢流分析	268
8.3.2	基因组信息和生化系统理论	269
8.4	展望	273
8.5	参考文献	274
人名索引		277
主题索引		285

1

目标——实用模型

