

بيولوجيا الأنظمة الصناعية

INDUSTRIAL SYSTEMS BIOLOGY

خوزي مانويل أوتيرو و ينس نيلسين

José Manuel Otero and Jens Nielsen

Introduction المقدمة (٢, ١)

تمر الصناعة الكيميائية في الوقت الحالي بتغيير جذري يقوده الطلب على أكثر العمليات استدامة لإنتاج الوقود، والكيماويات والمواد، ويعد هذا نتيجة للقيود المالية والبيئية على حدٍ سواء. ولذلك فإن الصناعة تتطلع إلى استخدام عمليات التقنية الحيوية حيث تكون المواد الخام مواد نباتية متجددة، وذلك كبديل للعمليات الكيميائية التقليدية التي تعتمد على المواد الأولية النفطية. ويمكن استغلال الكائنات الدقيقة المختلفة في عمليات التقنية الحيوية، ولا سيما أن التنوع الكبير للتفاعلات الأيضية يمثل مصدراً غنياً لتصميم عمليات التحويل الكيميائية التي تؤدي إلى الإنتاج الكفء للمنتجات المرغوب فيها. ومع ذلك، كثيراً ما وجد أن الكائنات الدقيقة التي تنتج منتجاً مرغوباً فيه، إما بشكلٍ طبيعي وإما بسبب أنه تم هندستها وتصميمها من خلال إدخال مسارات مغايرة، تكون منخفضة العائد والإنتاجية، وبغية إرساء عملية مناسبة اقتصادياً فمن الضروري تحسين الأداء الإنتاجي للكائنات الدقيقة.

تعرف هندسة العمليات الأيضية بأنها تقنية التمكين. ويتم هندسة الشكل الأيضي للكائنات الدقيقة من خلال هندسة العمليات الأيضية بحيث يكون هناك تحويل فعال للمواد الأولية الخام، عادةً الجلوكوز، إلى المنتج المطلوب. وقد تشمل هذه العملية إدخال نشاطات إنزيمية جديدة أو حذف نشاطات إنزيمية حالية، ولكن في كثير من الأحيان أيضاً تغيير الهياكل التنظيمية القائمة التي تعمل في الخلية.

من أجل تحديد الإستراتيجية المثلى للهندسة الأيضية بطريقةً سريعةً فإن الصناعة تبحث في مدى زيادة استخدام الوسائل والأدوات من بيولوجيا الأنظمة. ويشمل هذا كلاً من تقنيات الأوميات "x-ome" مثل

الترانسكريبوم، البروتيوم، والميتابولوم وتحليل التدفقات، وأدوات النمذجة الرياضية المتقدمة مثل النمذجة الأيضية على نطاق الجينوم (genome-scale metabolic modeling). وفي هذا الفصل نقوم بالبحث في تاريخ هذه التقنيات المختلفة واستعراض كيف تجد تطبيقات في مجال التقنية الحيوية الصناعية، الأمر الذي سيؤدي إلى ما نقوم بتعريفه هنا ببيولوجيا الأنظمة الصناعية.

(٢, ٢) التقنية الحيوية الصناعية Industrial Biotechnology

ظهر مصطلح "التقنية الحيوية الصناعية" للمرة الأولى على نطاق واسع في المراجع في أوائل الثمانينيات عندما كانت الهندسة الوراثية، مدفوعة بواسطة تقنية تعديل الحمض النووي، تبحث عن تطبيقات غير الرعاية الصحية والتقنية الحيوية الطبية [١، ٢]. وحالياً تمثل التقنية الحيوية الصناعية مجالاً معروفاً جيداً إذا حضور أكاديمي وحكومي ومؤسسي. رسمياً، تعد التقنية الحيوية الصناعية هي التحويل الحيوي إما عن طريق التخمر الميكروبي وإما التحفيز الحيوي، للمواد الأولية العضوية المستخلصة من الكتلة الحيوية أو مشتقاتها إلى مواد كيميائية، مواد أخرى، وأو طاقة. والكتلة الحيوية هي نتيجة تثبيت الكربون في عملية البناء الضوئي للنبات لتكوين البوليمرات العضوية التي قد تتحلل وتضم إنزيمياً أو كيميائياً إلى كربوهيدرات، وبروتينات، ودهون أحادية. تهدف التقنية الحيوية الصناعية التي غالباً ما يشار في أوروبا إليها باسم التقنية الحيوية البيضاء [٣]، إلى توفير بدائل منافسة لعمليات البتروكيماويات القائمة أو المقترحة من حيث التكلفة، وصديقة للبيئة، وذاتية الاكتفاء.

لقد كسبت العمليات التي تستغل التقنية الحيوية الصناعية اهتماماً عالمياً متزايداً مع الفحص الدقيق للعمليات البتروكيميائية التقليدية نتيجة زيادة تكلفة المواد الأولية الخام، والقيود البيئية، وانخفاض قدرة الاكتفاء الذاتي.

وشهدت التقنية الحيوية الصناعية نمواً غير مسبوق للعمليات القائمة على المصادر الحيوية التي تمثل ٥٪ من حجم المبيعات الكلي للإنتاج الكيميائي. بحلول عام ٢٠١٠م قدرت الكثير من الدراسات أن النسبة الكلية ستزيد إلى ٢٠٪ وهو ما يمثل ٣١٠ مليارات دولار أمريكي من حجم المبيعات الاجمالية المتوقعة وهو ١٦٠٠ مليار دولار أمريكي. سوف تستمر التقنية الحيوية الصناعية في الحصول على نسب مئوية كبيرة لحجم المبيعات في مجالات الكيماويات والسلع الأساسية (٢-١٥٪)، الكيماويات المتخصصة أو المواد الكيميائية ذات القيمة المضافة (٢-٢٠٪)، والبوليمرات (١-١٥٪). ومع ذلك، فإن أكبر نسبة من المكسب من المرجح أن تحدث في سوق الكيماويات الدقيقة (١٦-٦٠٪) حيث قامت منصات التقنية الحيوية الصناعية بتمكين الكيمياء المعقدة التي يتم إنتاجها حالياً عبر طرق تخليقية أو اندماجية معقدة [٤].

وعلاوة على ذلك، فإن التقنية الحيوية الصناعية تقوم بتمكين منتجات جديدة، خاصةً العوامل العلاجية الجديدة مثل البولي كيتيدات (polyketides) والكيماويات المتخصصة التي لم يسبق التعرف عليها مثل الأحماض الدهنية غير المشبعة المتنوعة و البولي ميرات الحيوية المنتجة بواسطة الطحالب الدقيقة [٥].

إن التقنية الحيوية الصناعية ليست بأي حالٍ من الأحوال مجال جديد، وذلك مع عمليات التخمير الثابتة للمضادات الحيوية (إنتاج البنسيلين بواسطة بنيسيليوم كريزوجينوم؛ حجم السوق السنوي يتجاوز ٥,١ مليار دولار أمريكي)، الفيتامينات (إنتاج حمض الاسكوربيك بواسطة عملية راينخشتاين والتحفيز الحيوي بواسطة الجلوكونوباكتر أوكسيدانس؛ حجم السوق السنوي يتجاوز ٦٠٠ مليون دولار أمريكي)، الأحماض العضوية (إنتاج حمض الستريك بواسطة أجناس الأسبرجلس؛ يتجاوز حجم السوق السنوي ٥,١ مليار دولار أمريكي)، والأحماض الأمينية (إنتاج إل-جلوتامات و إل-ليسين بواسطة كورينيباكتيريوم جلوتاميكوم؛ يتجاوز حجم الإنتاج السنوي ٦٠٠٠٠٠ الف طن) [٥].

في كل من هذه الأمثلة، تم عزل الكائنات المضيفة طبيعياً لتكون ملائمة لإنتاج المركب المطلوب. وبالإضافة إلى ذلك، فقد تم استخدام التطهير العشوائي تحت ظروف بيئية محكمة، متبوعاً بعملية الفحص، الاختيار، وتطوير العمليات الحيوية التقليدية لتحسين عائد الإنتاج، والتركيزات، والإنتاجية والثبات. على الرغم من أن هذه الطريقة في حقيقة الأمر لا تمدنا بشيء يذكر من المعلومات لفهم الآلية أو الميكانيكية التي عن طريقها تؤدي الاضطرابات الوراثية المحددة إلى سلالات محسنة بحيث يمكن ان تُستغل أكثر، فقد ثبت نجاحها تجارياً كما تم توضيحه بواسطة تحسين أكثر من ١٠٠٠-مرة في معدلات البنسيلين بواسطة بنيسيليوم كريزوجينوم [٦].

وتعزى الزيادات الكبيرة في مجال البحوث الأساسية والتنمية وتسويق عمليات التقنية الحيوية على النطاق الصناعي إلى عدة عوامل رئيسة والتي يمكن جمعها إلى أربعة عوامل واسعة النطاق من المهم أخذها في الاعتبار مرتبطة بتطوير العمليات الجديدة القائمة على المصادر الحيوية:

١- اقتصاديات العملية.

٢- تطوير عملية التقنية الحيوية.

٣- الأثر البيئي.

٤- الاستدامة والاكتفاء الذاتي.

ويتضمن كل من هذه العوامل واسعة النطاق عدة دوافع تعريفية وكمية تدعم تطبيقات التقنية الحيوية الصناعية إلى عمليات سابقة مقصورة على صناعة البتروكيماويات أو لإنتاج مواد كيميائية جديدة. ويوضح الشكل

رقم (١, ٢) لمحة عامة عن مدى أخذ هذه العوامل الأربعة بالاعتبار وتقييمها قبل البدء في تطوير أي عملية تقنية حيوية صناعية.

وقد تلقت التقنية الحيوية الصناعية في الآونة الأخيرة اهتماماً كبيراً وذلك بوصفها وسيلة لتطوير العمليات البتروكيميائية البديلة والتي تتميز بتكلفتها المناسبة، وجدواها التجارية، واستدامتها، واكتفائها الذاتي وتفضيلها بيئياً، وذلك مع زيادة أسعار النفط الخام خلال الفترة من يناير ٢٠٠٧م و ٢٠٠٨م حتى وصلت هذه الزيادة إلى ٤١, ٢٪ [٧]. علاوةً على ذلك، فإنه بين عامي ١٩٩٧-٢٠٠٧م فقد شهد الغاز الطبيعي، وهو وسيط مشترك لإنتاج السلع الأساسية والكيماويات ذات القيمة المضافة، ارتفاعاً ملحوظاً في الأسعار بنسبة ٤, ١٧٥٪ [٨]. يلخص الشكل رقم (١, ٢) العوامل الأربعة الرئيسية التي غالباً ما يتم تقييمها عند النظر في استبدال عملية بتروكيميائية بعملية تقنية حيوية، أو تطبيقها لإنتاج مواد كيميائية جديدة. وتعد اقتصاديات العملية بالمقارنة بالمكافئات البتروكيميائية أو عمليات القياس الأخرى أمراً حاسماً وذلك في تحديد الجدوى التجارية مع التركيز بشكل خاص على تكاليف التشغيل على المدى الطويل. وبعد ذلك يؤخذ في الاعتبار تكاليف تطوير التقنية الحيوية، والموارد، وجهود التنمية، وذلك بالتركيز على التحليل الأولي لإنشاء مبدأ إثبات صحة الفكرة على النطاق نصف الصناعي. وسوف يسلط هذا التقرير الضوء على وجه الخصوص على التأثير الذي كان للهندسة الأيضية وبيولوجيا الأنظمة على تطوير العمليات الأولية، مشيراً إلى نموذج تغيير الطريقة والذي يشار إليه "بيولوجيا الأنظمة الصناعية." ويشمل العاملان الأخيران الواجب تقييمهما الاستدامة والاكتفاء الذاتي، والأثر البيئي. لا ترتبط الاستدامة والاكتفاء الذاتي فقط باعتباريات محددة في سير العملية مثل توافر المواد الخام أو وجود فرص لمزيد من التوسع عن طريق تكامل المصافي الحيوية، ولكنها أيضاً تشمل التركيز على التصور العام وعلى المشهد الاجتماعي السياسي. ليس هناك شك في أن المحاولات الراهنة لضخ الجهود والموارد لعمليات التقنية الحيوية لن تكون ممكنة، حتى في ظل المناخ الاقتصادي الراهن، إذا لم تتواجد المبادرات المهمة الخاصة بالسياسات الحكومية، إضافةً إلى الدعم الاجتماعي واسع النطاق. ويلاحظ هذا أيضاً عند دراسة الأثر البيئي، ولاسيما في ضوء التأكيد العلمي الأخير على التغير المناخي العالمي الناتج من زيادة انبعاث الغازات الدفيئة [٩]. وسوف تحدد الدراسة الدقيقة لتلك العوامل الأربعة العامة ما إذا كان البدء في تنمية عملية التقنية الحيوية أمراً مضموناً أم لا. وفي حين أنه يكون من غير الواضح حالياً لمعظم علماء البحوث والتنمية أو المهندسين، فإنه من الضروري عدم تجاهل أثر تلك الاعتبارات الذي قد يلقي بظلاله على تنمية العملية، ولاسيما في تصميم إستراتيجيات لإنشاء مصنع خلايا ميكروبية. وإن هذا التحليل هو الذي يحدد العوائق والحدود والأهداف وإستراتيجيات الهندسة الأيضية المجدية، بما في ذلك التعرف على منهجيات أو طرق بيولوجيا الأنظمة التي يتعين استغلالها واستخدامها لتوضيح إثبات صحة تلك الفكرة عملياً.

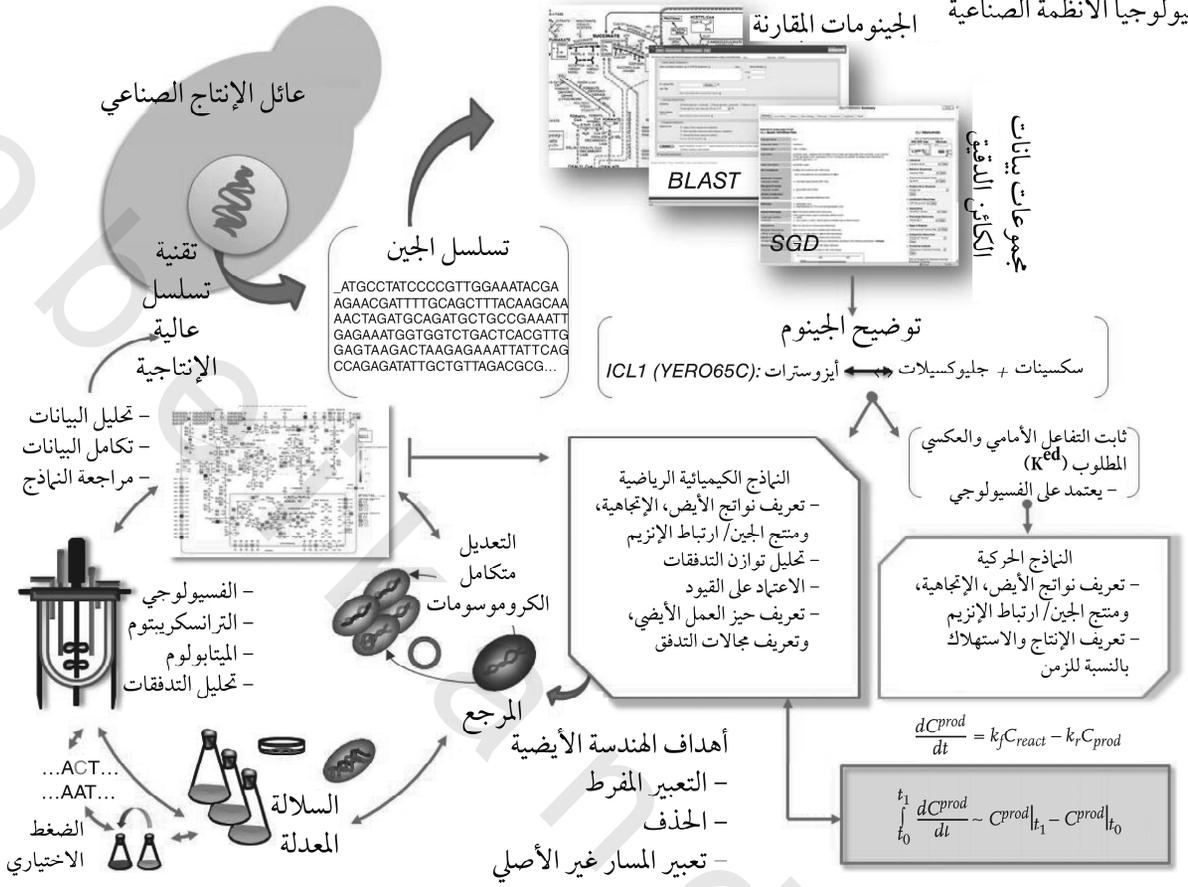


الشكل رقم (١, ٢). الدوافع الأربعة للتقنية الحيوية الصناعية.

ويهدف هذا الاستعراض إلى توضيح المنظور التاريخي لتطوير عملية التقنية الحيوية الصناعية، ولاسيما التركيز على التوزيع السريع للهندسة الأيضية وتقنيات بيولوجيا الأنظمة التي ظهرت لأول مرة بواسطة المجموعات البحثية الأكاديمية والتي كانت بدافع قطاعات صحة الإنسان وقطاعات التقنية الحيوية الطبية. وبوجه خاص، ومن أجل التحفيز، فسوف يتم توضيح أمثلة للمنتجات الناضجة، وحديث الإصدار وقيد التطوير والتي استفادت من أساليب التشغيل الجديدة المذكورة، أي بيولوجيا الأنظمة. واستناداً على تلك الأمثلة والعمليات الجديدة الموجودة قيد إثبات صحة الفكرة، فإننا هنا نعرف مصطلحاً جديداً وهو بيولوجيا الأنظمة الصناعية موضحين بأن الأدوات المحددة في مجال بيولوجيا الأنظمة الخاص المتنامي بسرعة هائلة والتي غالباً ما تنطبق على الهندسة الأيضية تنتشر في شكلين. تعيد الشركات هيكله مجموعات تنمية العمليات الموجودة أو المتكونة بقدرات وخبرات بيولوجيا الأنظمة الصناعية، أو أنها تستعين بمصادر خارجية من أجل تنمية العمليات، وذلك للهيئات التي تم تأسيسها حديثاً والمتخصصة في بيولوجيا الأنظمة الصناعية.

ويقدم الشكل رقم (٢, ٢) عرضاً تخطيطياً مركزاً على أنظمة التقنية الحيوية الصناعية والمستوى المهم لدمج وتحليل البيانات المطلوبة لكي تؤدي في النهاية إلى عملية تجارية جيدة. إن بيولوجيا الأنظمة الصناعية هو تفاعل ديناميكي بين مختلف الأنظمة والأساليب. تعتمد تلك التقنية على عائل الإنتاج، الذي يتوفر له سلسلة الجينات الوراثية والتفسيرات التالية التي تعتمد على المراجع الحالية وقواعد البيانات إلى جانب علم الجينومات المقارن والبيانات التجريبية، إذا كانت متوفرة. وقد تختلف التفسيرات في أنواع بيانات علم الجينات الوظيفية المخصصة لمجالات محددة؛ ومع ذلك فعادةً ما يتم تطبيق هيكل تكويني معياري لتعريف الجين، ومنتج الجين (مثل إنزيم الأيض)، ونواتج الأيض التي تعمل كمتفاعلات والنواتج (بها في ذلك أية عوامل مساعدة أو مركبات وسيطة) والحركية الناتجة. وقد يمتلك هذا التوضيح الجينومي مجالات إضافية محددة مثل مستويات التعبير التي تم تحديدها بشكل تجريبي وتركيزات منتجات الأيض داخل وخارج الخلية، وقياسات التدفق المعتمدة على النظائر المشعة، ومستويات ترجمة البروتينات. ويمكن استخدام هذا الإطار المشار إليه على أنه إعادة هيكلة شبكات الأيض على المستوى الجينومي لإعداد النماذج الحركية أو الكيميائية الحيوية الكمية. ولأن عوامل الحركية مثل معدلات التفاعل الأمامية والعكسية تحت ظروف فسيولوجية معينة لم يتم تحديدها تجريبياً لقطاع كبير من تلك الشبكة، فإنه يتم استخدام تحليل توازن التدفق وذلك للنمذجة المتوقعة حيث إذ إنه يعتمد فقط على قيود الشبكات والمقياس الكيميائي الكمي (مثل التعريف الكيميائي الكمي للكتلة الحيوية، معدل الحفاظ على الـ ATP ومعدل استيعاب للجولوكوز).

بيولوجيا الأنظمة الصناعية



الشكل رقم (٢, ٢). بيولوجيا الأنظمة الصناعية.

تسمح هذه النمذجة بوجود وظيفتين أساسيتين لمهندسي الأيض ويجب أن يتم إنجازهما. أولاً، فهي تكون أرشيف هيكل للأيض الميكروبي الذي قد يتم فحصه واستبياناه وتعظيمه من خلال العروض المرئية، ثانياً، هي تقدم إطاراً للمحفزات المتوقعة في ظل قيود معينة مما يساعد على تضيق إستراتيجيات الهندسة الأيضية التي يتم دراستها، والتي تكون قائمة في أغلب الأحيان على معرفة المسارات الكيميائية الحيوية الكلاسيكية أو الإستراتيجيات الجديدة التي تنشأ من نتائج المحاكاه. وعند تحديد درجة إستراتيجية هندسة أيضية عالية الاحتمال ناجحة، التي تتطلب عادةً معدل مفرط في التعبير الجيني، والحذف أو إعادة هيكلة المسار غير الأصلي، فإنه يتم إجراء الهندسة الوراثية على عائل الإنتاج مؤدية إلى سلالة معدلة. ويتم توصيف السلالة المعدلة مبدئياً، وقد تمر بعملية تطور موجه أو أية طرق أخرى غير مستهدفة؛ وذلك لكي تنتج تركيب ظاهري متطور. ويتم توصيف السلالة المعدلة الناتجة تحت ظروف تخمير جيدة التحكم، حيث يتم تحديد العوامل الفسيولوجية مثل معدل النمو الخاص الأقصى، معدلات استهلاك وسط التفاعل، وعائد وتركيزات

المنتج، وتكوين المنتجات الثانوية والشكل الظاهري. وبالإضافة إلى ذلك يتم استكمال توصيف الجينومات الوظيفية، الذي يتطلب عادةً قياسات الترانسكريبتوم والبروتيوم والميتابولوم والتدفقات. وهنا تكون المعلومات الحيوية مع تكامل البيانات مطلوبة لتحليل السلالة المعدلة الناتجة، ولتحديد فرص الجولة الثانية من الهندسة الأيضية.

وبالإضافة إلى ذلك فإنه يتعين أن يؤدي التحليل إلى نموذج مراجع ذو قوة توقع مطورة تؤدي إلى إستراتيجيات واعدة لتطوير النمط الظاهري بشكل أكبر. بينما يتم الإشارة إلى ذلك المنهج عادةً بدورة الهندسة الأيضية، فإننا هنا نفضل الدورة التقليدية لتشمل الطرق المتكاملة ومجموعات البيانات من بيولوجيا الأنظمة. وعند تطبيقها لمنتجات التقنية الحيوية الصناعية فإنه يشار إليها باسم بيولوجيا الأنظمة الصناعية.

سوف تقدم الأجزاء التالية عرضاً موجزاً لما يلي: (١) دوافع الأسواق للتقنية الحيوية الصناعية، (٢) بيولوجيا الأنظمة الصناعية. سوف تركز الأجزاء التالية على استكشاف بيولوجيا الأنظمة الصناعية من منظور نمذجة الأيض الميكروبي، ولاسيما عند تقديم دراسات الحالة لمختلف المنتجات التي انتفعت بشكل كبير من الاكتشافات الهائلة في الهندسة الأيضية ومن بيولوجيا الأنظمة.

(٢, ٣) دوافع السوق للتقنية الحيوية الصناعية Market Drivers for Industrial Biotechnology

ترتبط العوامل الأربعة المشار إليها في الشكل رقم (١, ٢) ببعضها بعضاً بشكل كبير، وهناك جدل كبير فيما يتعلق بتصنيف تلك العوامل من حيث الأولوية والتأثير. يتم عادةً تقدير اقتصاديات العملية بإعداد النماذج الكمية التي تشمل تكاليف العمليات الرئيسية، التشغيلية والرأسمالية، وقيمة العملية المخصصة من قبل سعر السوق المقدر للمنتج، ومعدل زيادة الطلب، ونصيب السوق وأية ميزات تنافسية قد توجد. وبالنسبة للترويج التجاري فإنه من المناسب أن نفترض أن اقتصاديات العملية يجب أن تكون مفضلة قبل الاستمرار في أي محاولة عند دراسة تطوير عمليات التقنية الحيوية واستدامتها أو أثرها البيئي (انظر الشكل رقم ١, ٢).

إن الاستدامة والاكتفاء الذاتي قد يكونا أقل تعريفاً، مع ملاحظة أن الكثير من الأمور المأخوذة في الاعتبار، بما في ذلك وفرة المواد الخام واحتمال تكامل العمليات إلى مصفاة حيوية، قد يتم مناقشتها في إطار اقتصاديات العملية. وهي مدرجة في الشكل رقم (١, ٢) ويتم مناقشتها كقناة منفصلة؛ وذلك بسبب التركيز الأخير الذي تلقته في ضوء زيادة أسعار البترول والمواد الخام. ويمكن للاكتفاء الذاتي والاستدامة أن يعملوا على دعم اقتصاديات العملية في الحالات التي تؤدي فيها موضوعات مثل الأمن القومي دوراً مهماً (مثل الاعتماد على دولة أجنبية من أجل الحصول على نسب كبيرة من الطاقة).

في حين يبدو من غير المنطقي مناقشة دوافع السوق من خلال فصل يركز على التطور في الهندسة الأيضية وبيولوجيا الأنظمة اللذان يوضحا الأيض الميكروبي مما يمكن من استغلالها، فإنها تعد في حقيقة الأمر من بين الخصائص التي تميز التقنية الحيوية الصناعية عن أية أنظمة أخرى. وسوف توجه دوافع السوق، والفهم الواضح لأثرها بشكل كبير أي إستراتيجية هندسة أيضية يتم تفضيلها، وعليه تدفع البحث والتطوير. فعلى سبيل المثال فإن اختيار المواد الأولية المناسبة مثل الجلوكوز والزيلوز أو الجليسرين، أو المواد الأولية المعقدة مثل الليجنوسيليلوز لعملية تقنية حيوية صناعية سوف يحدد اختيار إستراتيجية الهندسة الأيضية، وعليه يجد أدوات بيولوجيا الأنظمة التي يتم استخدامها. وبالتأكيد فإن اختيار المواد الأولية يرتبط بشكل وثيق بالقطاعات التي تم إيصالها في الشكل رقم (١, ٢).

وقد تم تقديم مثال أكثر واقعية في مرجع أخير للأثر الذي قد يكون للوقود الحيوي وتحديد الإيثانول الحيوي على مجال التقنية الحيوية الصناعية. وهو يوفر سياقاً وعلاقة واضحة بين دوافع السوق وبين الإنجازات المهمة التالية في بيولوجيا الأنظمة الصناعية وأثرها في تطوير العمليات [١٠].

(٤, ٢) بيولوجيا الأنظمة الصناعية Industrial Systems Biology

إن بيولوجيا الأنظمة هي الجمع الكمي والتحليل والدمج لكافة مجموعات البيانات التي تمكن من إجراء وإعداد النماذج الرياضية التوقعية. ومع إتاحة تسلسلات الجينات لكائنات الإنتاج، فإن تطوير العمليات كان العامل الأساسي للإنجازات العلمية في بيولوجيا الأنظمة، ولاسيما في مجالات الترانسكريبتومات، والبروتيومات، والميتابولومات، والفلوكسومات. وتشمل تلك التطورات حالياً صندوق أدوات بيولوجيا الأنظمة الذي يمكن استغلاله أكثر لإنتاج نواتج الأيض الثانوية التي قد تستخدم كمادات في القطاع البتروكيميائي. وبمعلومية التعريفات الكثيرة والتسميات الواسعة التي تطورت في بيولوجيا الأنظمة، فقد أعطى قاموس لمصطلحات الأومييات في الجدول رقم (١, ٢)، وسيتم استخدام هذه التعريفات هنا.

وسوف تركز الأمثلة التي سيتم مناقشتها هنا بشكل كبير على تطوير العمليات الأولية، مع الاهتمام الخاص بإستراتيجية الهندسة الأيضية المستخدمة، وكيف يوفر تحليل وبيانات الجينات الوظيفية مميزات واضحة. وسوف تحدد الأمثلة المذكورة بعض الأمثلة من كائنات التخمر الكثيرة، مع التركيز على خميرة السكر وميسيس سيرفيسي. وسيكون من المدهش معرفة أن منتج التقنية الحيوية الصناعية الأضخم في العالم، الذي يكسب دعماً مؤسسياً واجتماعياً وحكومياً غير مسبوق هو الإيثانول الحيوي. في عام ٢٠٠٥م بلغ إجمالي الإنتاج العالمي من الإيثانول الحيوي ٤٦ مليار لتر، مع زيادة حجم إنتاج وإجمالي عدد معامل التكرير التي تم إنشاؤها ما بين عامي ٢٠٠٥-٢٠٠٦م في الولايات المتحدة الأمريكية بمقدار ٦, ٢ مليار لتر و١٤، على التوالي [١١].

الجدول رقم (١, ٢). قاموس مصطلحات الأوميات (X-omic).

بيولوجيا الأنظمة	طريقة متعددة الأنظمة تعتمد على تكامل واستجابات الأنواع المختلفة من البيانات التي تساهم في الدعم المشترك على أساس علم الجينوم وخصائص علم الجينوم الوظيفي للنظام الحيوي مع التركيز المعين على تطوير الأساليب الرياضية التوقعية والكمية.
الهندسة الأيضية	مجال يشمل كل من الهندسة الأيضية الأمامية والعكسية. الهندسة الأيضية هي المنهج العقلاني والكمي الموجه عن طريق الجينات لإعادة توجيه تدفقات الأيض لتطوير العائد، والتركيز، والإنتاجية، و/أو الثبات المرتبط بمنتج أيض محدد في النظام الحيوي.
بيولوجيا الأنظمة الصناعية	تطبيق أساليب تجريبية أو رقمية يتم تطويرها نتيجة التحليل الفردي أو الجماعي للأوميات وذلك لتطوير العملية الحيوية. ويشمل تطوير العملية الحيوية تحسينات السلالة أو نظام التعبير من حيث تركيز المنتج النهائي، والعائد، والإنتاجية أو التحسينات في قوة وفاعلية العمليات.
الهندسة الأيضية الأمامية	هذه هي هندسة أيضية مستهدفة تمثل التقدم الخطي من النمذجة إلى تحديد الجين المستهدف لتركيب وتوصيف السلالة. وتتضمن هذه الإستراتيجية التعديل الوراثي المتخصص والقائم على النظريات، والذي يعتمد على النمذجة الأيضية التوقعية، من توازن حركيات المسار الكيميائي الحيوي البسيط إلى نماذج الحركيات الأكثر تعقيداً.
الهندسة الأيضية العكسية	يتم فحص سلالة العائل المكونة بواسطة الطفرات الموجهة أو العشوائية و/أو التطور من خلال أدوات علم بيولوجيا الأنظمة لتحديد التغيرات الوراثية التي تؤدي إلى النمط الظاهري المطلوب.
الأوميات	مصطلح عام يشير إلى جمع وتحليل أية مجموعة بيانات عالمية والذي يتم بواسطته بحث أي نوع من مسارات المعلومات بالعودة إلى جينوم الخلية. ويتطلب تحليل الأوميات وجمع البيانات كامل التسلسل الوراثي للخلية.
علم الجينوم	الدراسة الشاملة للتفاعلات والديناميكيات الوظيفية لجميع مجموعات الجينات ومنتجاتها، عادةً تعتمد على الفصيلة والسلالة.
علم الترانسكريبتومات	دراسة الجينوم الواسعة لمستويات تعبير الحمض النووي الريبوزي الرسول mRNA في خلية حيوية واحدة أو مجموعة منها لمجموعة معينة من الظروف البيئية المحددة.
علم الميتابولومات	قياس منتجات الأيض لتقييم الاستجابة الأيضية الكاملة لكائن لمحفز بيئي أو تعديل وراثي. ويعرف منتج الأيض هنا بأنه أي وسط تفاعل أو منتج يشارك في تفاعل يتم تحفيزه بواسطة أي منتج جيني.
علم الفلوكسومات	دراسة المجموعة الكاملة من التدفقات التي يتم قياسها أو حسابها في شبكة تفاعل أيضي معينة. ويعرف تدفق الأيض بالقياس الكمي لمعدل تحويل المتفاعلات إلى المنتجات، بينما يمكن تعريف المعدل بأنه هو الكتلة أو التركيز لكل وحدة زمنية لاستهلاك المتفاعلات وتكوين المنتج.
علم البروتيومات	التحليل على المستوى الكبير لتركيب ووظيفة البروتينات وكذلك تفاعلات البروتينات مع بعضها في الخلية.
علم الميتاجينومات	دراسة الجينومات والأوميات المرتبطة في الكائنات التي يتم استعادتها من البيئة في مقابل الزراعات المعملية. وعادة ما يصعب زراعة الكائنات المستعادة من البيئة في الظروف المعملية المحكومة، ولكن يمكن أن تظهر خصائص مهمة التي يمكن الحصول عليها من خلال علم الجينوم الوظيفي.

إن السكرومييسيس سيرفيسي حالياً هي المنتج المفضل للإيثانول الحيوي، من بين منتجات التقنية الحيوية الصناعية الأخرى، وذلك نتيجة ثبات العملية الصناعية وتوصيف الأوميئات الفسيولوجي غير العادي [١٢] - ١٥]. وقد أتيح تسلسل جينوم السكرومييسيس سيرفيسي الذي يتكون من ٦٦٠٤ هياكل قراءة مفتوحة (٤٤٣٧ مؤكدة؛ ١٣٤٣ بدون توصيف؛ و ٨٣٤ غير محددة المعالم) [١٦] للجمهور في عام ١٩٩٦م بواسطة أندرو جوفوي من الجمعية الأوروبية لبحوث الخمائر [١٧]. وبعد ذلك في عام ١٩٩٧-١٩٩٨م، تم تقديم مجموعة الدنا الحلقي المصغرة التي تستكشف تنظيم الجين الأيضي وبيانات المجموعة المصغرة للمنصة التجارية الأولى (Affymetrix) التي تقوم باستكشاف تنظيم الخلايا التفتلية [١٨، ١٩].

وقد مكّن تسلسل الجينوم مع الشرح المكثف على أساس الكيمياء الحيوية، والمراجع والبيانات المتاحة من نشر نموذج الأيض الأول على مستوى الجينوم لخميرة السكرومييسيس سيرفيسي في عام ٢٠٠٣م [٢٠]. ويمثل هذا النموذج دمجاً لكميات كبيرة من البيانات في صيغة موحدة ومحددة مما يسمح بمحاكاة الطرز الجينية التي تم هندستها وذلك للحصول على الطرز الظاهرية المرغوب فيها [٢٠، ٢١].

وقد ساد تطوير السلالات عن طريق التطفيرات العشوائية لعائل الإنتاج، بواسطة المطفرات الكيميائية والإشعاع، يتبعه بعد ذلك الفحص والاختيار في بيئات محكمة من أجل الحصول على النمط الظاهري المرغوب فيه. وعلى الرغم من أن هذه المنهجية كانت ناجحة بشكل كبير، إلا أنها كانت مدفوعة بالمنتج النهائي بصورة كبيرة مع فهم ميكانيكي بسيط. وحالياً، ومع الزيادة التصاعدية في تسلسلات الجينوم لعوائل الإنتاج الحالية والمستقبلية، إلى جانب أدوات المعلومات الحيوية التي تمكن من دمج مجموعات بيانات الأوميئات، فإنه يمكن تحديد الإستراتيجيات الوراثية المستهدفة عالية الحدوث لزيادة العائد والتركيز والإنتاجية و/أو الثبات [٢٢-٢٤]. ومن الممكن الآن إجراء هندسة أيضية عكسية، حيث يتم توصيف أنظمة الإنتاج الناجحة سابقاً أو مياً لتوضيح مسارات أيض أساسية ونقاط تحكم للجولات المستقبلية للهندسة الأيضية المستهدفة [٢٥]. وفي كل من الهندسة الأيضية العكسية والأمامية، فإن نماذج مستوى الأنظمة تعمل على تسريع عملية تطوير العمليات القائمة على المصادر الحيوية، مما يؤدي إلى خفض المدة الزمنية حتى يتم الترويج لها في حيز ضيق.

وحالياً فإن علماء التقنية الحيوية الصناعية لم يعودوا يفكرون في المنتجات الفردية، ولكنهم يقومون بدراسة المجموعات المتنوعة من السلع البتروكيمياوية، والكيمائيات ذات القيمة المضافة، وذات القيمة المضافة العالية، والكيمائيات المتخصصة لإنتاجها باستخدام التقنية الحيوية. وقد استخدم مصطلح المصافي الحيوية لأول مرة في عام ١٩٩٩م، عندما تم الاقتراح أن تحويل المواد الخام اللجنوسليلولوزية إلى عدة سلع حيوية بواسطة عمليات وحدة متكاملة قد يقدم أداءً تنافسياً لمعامل التكرير البتروكيمياوية الحالية [٢٦].

وفي حالة نشأة نموذج معمل التكرير الحيوي (المصفاة الحيوية) من التصور الأكاديمي إلى الواقع الصناعي فإنه يتطلب عاملين دافعين أساسيين: أولاً: يتعين أن تستمر المظاهر والمعالج الاقتصادية والسياسية الاجتماعية في دعم الاستثمار المالي وضمانه، والسياسة القانونية المفضلة، والطلب المدفوع من قبل المستهلك. ثانياً: يجب أن يتم تطبيق التطورات والأدوات التي تم تطويرها داخل بيولوجيا الأنظمة للهندسة الأيضية (التمثيل الغذائي) بنجاح في البيئات التجارية. وقد اقترحت أمثلة عديدة مثل الإيثانول الحيوي أن المصافي الحيوية تكون مناسبة تجارياً؛ إلا أن مسارات المنتجات المتنوعة المطلوبة تستمر في حاجتها لأساليب هندسة أفضية أكثر تعقيداً ومتعددة الجينات الأصلية وغير الأصلية. ويمكن فقط تحقيق هذه الأساليب من خلال الدمج والتكامل المتقدم لمجال الأيض الميكروبي باستخدام أدوات بيولوجيا الأنظمة.

(٢, ٥) نماذج الأيض Metabolic Models

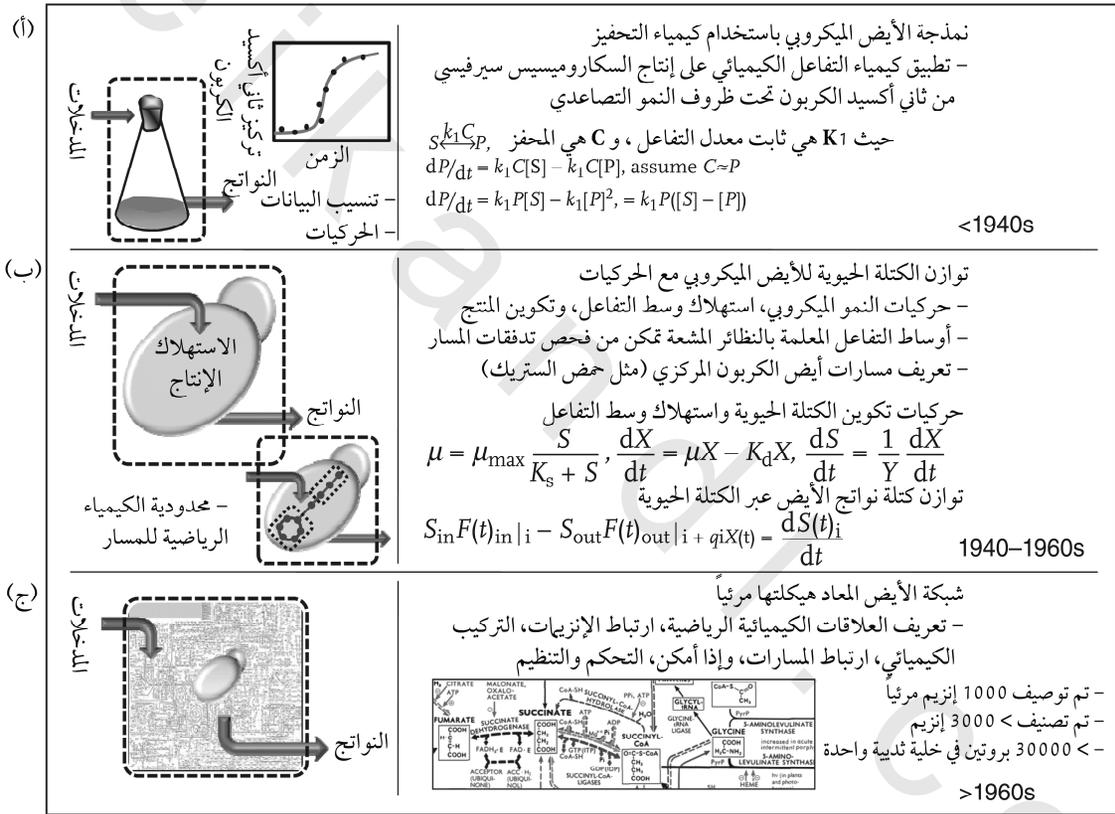
(٢, ٥, ١) الأيض الميكروبي - منظور تاريخي Microbial Metabolism-A Historical Perspective

كانت هناك استعراضات مكثفة حول تطبيق التطويرات العشوائية والتطور الموجه للتنمية الجديدة أو تحسين مصانع الخلايا الميكروبية الحالية لإنتاج سلسلة هائلة من منتجات التقنية الحيوية الصناعية [٢٧-٣٢]. ويعتمد ما يشار إليه عادةً بتحسين السلالات الكلاسيكي على قدرة تحفيز ودعم التنوع الوراثي، تحت ظروف عملية محكمة، في عائل إنتاج معين والذي يمكن فحصه وفصله وزراعته والاحتفاظ به على أساس معايير النمط الظاهري. ويمكن تحفيز التنوع الوراثي باستخدام العوامل الكيميائية المطفرة، والإشعاع والتعرض للضوء فوق البنفسجي وعوامل الإدخال أو خلال التعديل الوراثي [٢٧]. وبينما قد يحدث توصيف فيسيولوجي للسلالات المعدلة الناتجة بعد ذلك، فإن التحولات والتغيرات الوراثية النوعية والمستهدفة التي أدت إلى تحسين النمط الظاهري تكون غير معروفة، مما يحول دون تطبيق الفهم الميكانيكي في البحوث المستقبلية الخاصة بتطوير السلالات.

وقد تم توصيف الأيض الميكروبي، وهو مجال عمل الهندسة الأيضية الحديثة، وإنشاء معرفة علمية ما يقارب من قرن؛ ومع ذلك، ففي حالة تحديد خط زمني فإن عام ١٩٣٢ م قد يكون هو البداية والانطلاقة حيث إذ إنه يتزامن مع نشر الأستاذ ألبير جان كلوفير (١٨٨٨-١٩٥٦ م) في مجلة العلوم لبحثه "الأيض الميكروبي وتأثيره على مشكلة السرطان" [٣٣]. ومثل تقنية الحامض النووي المعدلة التي تم تطويرها في أوائل السبعينيات في جامعة ستانفورد وجامعة كاليفورنيا في سانفرانسيسكو [٣٤]، فإن التطبيقات الأولى للأيض الميكروبي ارتبطت بصحة الإنسان والدواء. وأيضاً في عام ١٩٣٢ م وقبل نشر مقالة كلوفير بخمسة أشهر، عرضت مقالة أخرى أحد الأمثلة الأولى للدور الذي يلعبه الأيض الميكروبي في التقنية الحيوية الصناعية، والتي تلقت حينها القليل من الانتباه. وظهرت هذه

المقالة بواسطة بولي وجريفز بعنوان "تطبيق منحنى النمو الذاتي التحفيزي على الأيض الميكروبي" في مجلة علم البكتيريا [٣٥]. وقد قدّم المؤلفون في مقالة من ٢٢ صفحة مع أربعة مراجع ملحوظتين أساسيتين، الملحوظة الأولى بسيطة، ومع ذلك توضح علم حركية النمو الميكروبي والتي تم تلخيصها بدقة في الفقرة الافتتاحية التالية:

لا يحدث النمو بمعدل ثابت في الكائنات الحية. ويكون بطيئاً تصاعدياً في الزراعات البكتيرية في أول الأمر، ثم تزيد سرعته، وبعد ذلك يكون بطيئاً تنازلياً بشكل استثنائي. ويكون هذا نتيجة وجود الباديء الأساسي في البيئة الجديدة بكمية صغيرة. وقد وجدنا بالمثل أن معدل تراكم منتجات الأيض الميكروبي ليست ثابتة ولكنها تبدأ بشكل بطيء وتزداد بسرعة ثم تعود للبطء مرة أخرى [٣٥].



الشكل رقم (٣، ٢). الأيض الميكروبي.

إن الملاحظة الثانية هي إمكانية حدوث منهج متعدد الأساليب حيث يمكن استخدام تطبيق معادلات التفاعل الحركي المختلفة، التي تم تطبيقها أولاً للتفاعلات الكيميائية ذاتية التحفيز أحادية الجزيئات وبعد ذلك لنمو النباتات والحيوانات [٣٦]، للملاءمة بيانات تراكم ثاني أكسيد الكربون والنترات في بكتيريا التربة وفي السكر وميسيس سيرفيسي، على التوالي [٣٥]. وهذا هو المثال الأول الواضح لاستخدام النماذج الرياضية للملاءمة

بيانات الأيض الميكروبي الحالية، ومن ثمَّ يؤدي إلى علاقة توقعية بين تراكم منتجات الأيض (مثل النترات وثاني أكسيد الكربون) والزمن، عن طريق ثابت معدل التفاعل (الشكل رقم ٣, ٢). وقد تم بحث الأيض الميكروبي بشكل مكثف منذ الثلاثينيات، عندما تم تطبيق عبارات معدل التفاعل الكلاسيكية لوصف كيمياء التفاعل ذاتية التحفيز لتكوين ثاني أكسيد الكربون في السكارومييسيس سيرفيسي. ويتطلب هذا النهج مظاهر تركيز المنتج كدالة في الزمن، والتركيز الأولي للمنتج لتحديد ثابت معدل التفاعل. وكان هذا أسلوب ملاءمة البيانات مع تركيز بسيط على قوة التوقع؛ ومع ذلك، فإنه استكشف بشكل شبه كمي العلاقة بين استهلاك منتج الأيض ومعدلات الإنتاج فيما يتعلق بمعدل النمو [٣٥]. وفي العشرين عاماً التالية تم تطوير التقدم الهائل المحرز في توضيح تحليل الجلوكوز ودورة حمض الستريك وأكسدة الأحماض الدهنية وحركية النمو والعلاقة بين معدل النمو ومعدل استهلاك وسط التفاعل ومعدل تكوين المنتج. وقد اعتمدت هذه الطريقة على توازن الكتل الكلاسيكية مع التأكيد على تحديد العوامل الحركية. ومن الستينيات فصاعداً فقد امتد نهج وصف الأيض مع توازن الكتل وتقدير عوامل الحركية بشكل كبير ليشمل الغالبية العظمى من مجال الأيض (الشكل رقم ٣, ٢ب). وكان نشر المسارات الكيميائية الحيوية التي وفرت التمثيل المرئي الأول لمكونات الأيض الأساسية معلماً أساسياً. ويوجد أكثر من ١٠٠٠ تفاعل يتم تحفيزه بواسطة الإنزيمات تم تقديمها بالشرح المحدد وموجودة في الطبعة الرابعة من المسارات الكيميائية الحيوية الأخيرة بما في ذلك المقاييس الكيميائية الكمية والهيكل الكيميائي وارتباط المسارات والتقسيم وإذا أمكن التنظيم [٣٧]. وقد سمحت الشبكة الميكروبية المعاد هيكلتها، والمتوفرة خاصةً في أشكال تصويرية فردية، بإخراج الجيل الأول من إستراتيجيات الهندسة الأيضية التي يتم ابتكارها على أساس الإستراتيجيات القائمة على الافتراضات.

وعلى الرغم من أنه عادةً يذكر الفضل لجاك مونود على أنه هو المسئول عن التوصيف الرياضي الحديث لحركية النمو، غالباً ما يشار إليه باسم "حركية النمو لمونود"، والتي تشمل علاقة الحركية لتكوين الكتلة الحيوية كدالة لتركيز وسط التفاعل والانجذابية التي تنشأ من عمله القوي على حركية الإنزيم باستخدام بيتا-جالاكتوسيديز في إيشيريشيا القولون، كما تم تلخيصه في سلسلة من الأبحاث التي كان آخرها البحث المنشور من مجلة الطبيعة في عام ١٩٥٣م [٣٨]، إلا أن بولي وزملاءه وذلك قبل عشرين عاماً كانوا هم الذين قيموا علاقات الأيض الميكروبي والتي قد تستخدم كأسس للتخميرات الصناعية الأولى. وخلال الفترة نفسها فقد قام علماء آخرون، بما فيهم مايرهوف [٣٨-٤٥]، وإمبدن [٤٦]، وبارناس [٤٧]، وفاربورج [٤٨، ٤٩]، وكوري [٥٠-٥٢]، وهاردن [٥٣-٥٧]، ونويرج [٥٨]، بشرح مسارات الأيض ولاسيما المرتبطة بالتخمير اللاهوائي، وأيضاً مع التركيز الخاص على التطبيقات الطبية.

وخلال الفترة نفسها عمل هانز كريس على المكونات الأساسية لأيض الكربون المركزي، مثل أيض الأحماض الأمينية، (مثل حمض الجلوماتيك والبرولين)، ودورة حمض الستريك، المشار إليها حالياً بدورة كريس [٥٩-٧٠]، مؤكداً قابلية الخلية للأيض الهوائي وأكسدة نواتج الأيض. ومن الجدير بالملاحظة أن خميرة الخباز أدت دوراً أساسياً في متابعة خط البحث هذا، عندما تم استخدام التعليم بالخلات المحتوية على نظائر الكربون ¹⁴C وملاحظة أن الأحماض ثنائية الكربوكسيل مازالت غير معلمة، مما وضع وجود نماذج مختلفة للتخمير والأكسدة تنتج من مختلف أنواع مصادر الكربون المستخدمة [٦٩]. وعلى عدة أوجه أخرى، يمكن للمرء أن يجادل بأن هذا كان هو بداية قياسات تدفق الأيض في تحديد المسارات. (ملاحظة: إن التعليم بالنظائر المشعة كان واسع الاستخدام في الأربعينيات لدراسة توزيع ذرات الكربون في الأحماض الدهنية وخلات الخليك التي ثبت وجودها في دورة حمض الستريك. وقد ثبت بعد ذلك أن الأحماض ثنائية الكربوكسيل تكون وسيطة في الأكسدة الكاملة للأحماض الدهنية [٧٠]). وقد حصل كريس على جائزة نوبل في الفسيولوجي في عام ١٩٥٣م مشاركة مع فريتز ليبمان (يرجع إليه الفضل لاكتشاف العامل المساعد للإنزيم أ)؛ بسبب توضيحها لأيض المركبات الوسيطة. وفي حين أن التركيز مازال على الصحة البشرية، فقد أشار كريس في خطاب حصوله على الجائزة إلى المناقشة المتعلقة بأكسدة الخلات وعلاقتها بدورة حمض الستريك.

قد يكون حقيقياً أنه قد لا ينظر إلى هذه النتائج كنتائج جامعة بسبب وجود عوائق النفاذية التي قد تحول دون خلط المواد الناتجة من المركبات الوسيطة مع هذه الموجودة في الأقسام الأخرى من الخلية، وفي الوقت الحالي فإنه من الأفضل اعتبار مسار الأكسدة النهائي في الخميرة وبعض الكائنات الحية الدقيقة الأخرى مثل إيشيريشيا قولون كمشكلة مفتوحة، وذلك على الرغم من حدوث تفاعلات الدورة في تلك المواد [٦٨].

وعند ذلك، فقد تم بالفعل تقييم خميرة الخباز وإيشيريشيا القولون، الذين يعدا اثنين من أهم عوائل التقنية الحيوية الصناعية الرائدة، ككائنات نموذجية، وقد تم ملاحظة أحد السمات المميزة الأساسية لتلك الكائنات التي تؤثر حتى الآن في إستراتيجيات الهندسة الأيضية: وهو تقسيم الخلية.

ويمكن استكمال تتبع أسس الأيض الميكروبي الحديث خلال المراجع، ولكن تعتزم المجموعة الفرعية الصغيرة من الأمثلة المقدمة هنا تقديم المنظور والسياق لعمليات التقنية الصناعية الأولى. وقبل تطوير تقنية الحامض النووي المعدل، فقد كان هناك تطوراً أساسياً في مراجع الأيض التي تستمر حتى يومنا هذا في التأثير على الهندسة الأيضية وعلى طرق بيولوجيا الأنظمة؛ ومع ذلك، لم يتم مناقشتها في هذا السياق. وفي عام ١٩٦٥م تم نشر الطبعة الأولى من كتاب المسارات الكيميائية الحيوية بواسطة شركة بورنجر مانهيم المتحدة (مانهيم، ألمانيا)، التي أنشئت بواسطة د. جيرهارد ميشال. وكان هذا هو أول تمثيل مصور ومرئي وشامل للأيض، والذي كان مبدئياً

على شكل رسم مخططات جدارية (الشكل رقم ٣, ٢) ولكن تم تحويله مؤخراً إلى صيغة كتاب [٣٧]. (ملاحظة: أنه مع هذا الكتاب يوجد أربع طبقات من مخططات المسارات الكيميائية الحيوية، شاملة الكتاب المرجعي، المسارات الكيميائية الحيوية، المنشور عام ٢٠٠٥م، والتي يستمر تحريرها بواسطة د. جيرهارد ميشال. ويمكن الحصول على المخططات الجدارية من شركة روش للتشخيص المتحدة (مانهايم، ألمانيا) من الموقع http://www.roche-applied-science.com/techresources/publications_req.jsp). وقد تم لأول مرة جمع هذا الدمج من البيانات الحيوية، الذي اشتمل على العلاقات الكيميائية الكمية، والهيكلي الكيميائي لكافة المتفاعلات، والنواتج والمركبات الوسيطة والعوامل المساعدة وتخصيص الإنزيمات لتفاعلات خاصة، وتحديد التقسيمات والنقل، وإن أمكن البيانات التنظيمية أو التفاعلات، في مسارات مركزية مثل تحليل الجلوكوز، ودورة حمض الستريك، وتخليق وتحليل الأحماض الدهنية، والأحماض الأمينية والنيكليوتيدات. وقد وفرت بصورة أهم أحد التمثيلات العالمية المرئية الأولى لشبكة الأيض المعاد هيكلتها، حيث يمكن تحديد الارتباط بين نواتج الأيض والمسارات والتقسيمات. ويسمح التمثيل النظامي المرئي لشبكات الأيض بتطوير أساليب هندسة أيضية بديهة على أساس الافتراض استناداً على تدفق الكربون في اتجاهات معينة أو إعادة توجيه تدفقات أيض أخرى في الاتجاهات المرجوة. وقد ترددت خريطة الأيض هذه على جدران كل المراكز البحثية الأكاديمية والصناعية الأساسية للتقنية الحيوية الصناعية، وزودت مهندسي الأيض بعرض شامل للمظاهر التي تعمل من خلالها تلك التقنية.

وبالطبع كان الجزء الأساسي المفقود من المعلومات هو العلاقة بين الجينات ومنتجات الجينات (مثل الإنزيمات الوظيفية)، ومسارات الأيض التي تعمل عليها. وبالإضافة إلى ذلك، فإن مخططات جدران المسارات الكيميائية الحيوية، في حين تطورت لتشمل تفاصيل خاصة بالكائن الحي، قد تم معاملتها على أنها ملخص لكافة التفاعلات الأيضية في مختلف الكائنات التي تمت دراستها. ومرة أخرى، فقد يوفر علم الجينوم المقارن؛ بالإضافة إلى جهود المعلومات الحيوية لإيجاد قواعد بيانات تركز على الكائن المتخصصة المطلوبة.

(٢, ٥, ٢) تسلسل الجينوم وعلم الجينوم الوظيفي **Genome Sequencing and Functional Genomics**

لقد وفرت مراجع عديدة المنظورات التاريخية المتعلقة بتكوين المجال متعدد الاختصاصات لبيولوجيا الأنظمة، وأثره في الهندسة الأيضية أو بشكل أشمل على التقنية الحيوية الصناعية، والتي غالباً ما تركز على مراجع الاكتشافات المهمة [٧١-٧٥]. وكان الأسلوب التكميلي الأكثر تركيزاً على توضيح ما إذا كانت تلك الاكتشافات المهمة حاسمة للترويج التجاري للتقنية الحيوية الصناعية أم لا، هو دراسة مراجع براءات الاختراع التي تعمل بجانب فهرسة الإنجاز التكنولوجي والعلمي الخاص على تحديد الأهمية الصناعية لها. إن تسلسل الاختراعات

المحددة أدناه، وبصورةٍ غير شاملة، يقدم سياق مؤقت لبعض الاكتشافات الرئيسية في مجالات التقنية الحيوية الصناعية وتقنية الحامض النووي المعدل، والتي قد انتهت بإيجاد أول منتج أساسي ذو قيمة مضافة عن طريق الهندسة الأيضية الأمامية الموسعة.

في عام ١٩٤٨م تم منح براءة اختراع أمريكية لمعمل كولد سبرنج هاربر (كولد سبرنج هاربر، نيويورك، الولايات المتحدة الأمريكية) بعنوان "إنتاج البنيسيلين"، التي تنص على "إن موضوع هذا الاختراع هو إنتاج البنيسيلين بكميات كبيرة للغاية". والموضوع الآخر هو إنتاج طفرات للفطريات من جنس الميسيتات قادرة على إنتاج كميات كبيرة من أوساط المضاد الحيوي" [٧٦]. وفي عام ١٩٨٢م تم منح شركة جينين تك (جنوب سان فرانسيسكو، كاليفورنيا، الولايات المتحدة الأمريكية) براءة اختراع بعنوان "طريقة لتعبير البولي بيتيدات الميكروبية"، التي ذكرت السوماتوستاتين، مثبط لهرمون النمو، كمثال للبولي بيتيد، على النحو التالي:

على الرغم من العمل واسع النطاق في السنوات الأخيرة في أبحاث الحامض النووي الدنا، فقد ظهرت بعض النتائج القابلة للتطبيق الفوري والعملي. وقد أثبت هذا ولاسيما في حالة المحاولات الفاشلة للتعبير عن البولي بيتيدات ومثيلها المشفر بواسطة "الدنا التخليقي"، والناجمة إما من الطريقة التقليدية بإنشاء نيوكليوتيدة ثم أخرى وإما عن طريق الاستنساخ العكسي من الحامض النووي الريبوزي الرسول (المكمل أو "الدنا الحلقي"). وفي هذا التطبيق فإننا نصف ما يبدو على أنه يمثل التعبير الأول لمنتج بولي بيتيدي وظيفي من جين تخليقي، مع التطويرات المتعلقة التي تبشر بتطبيقها بشكل منتشر [٧٧].

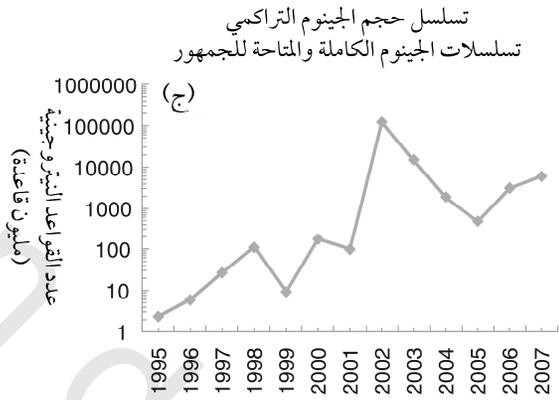
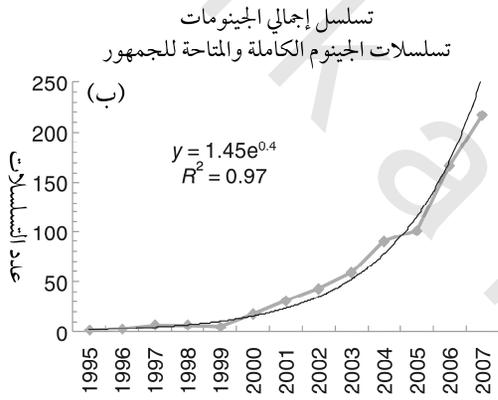
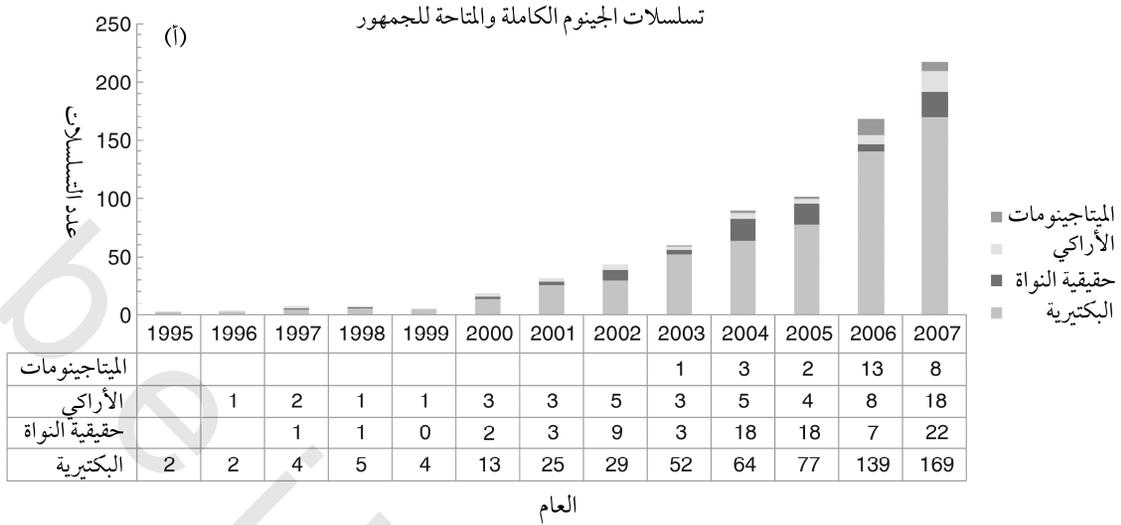
وفي عام ١٩٨٥م تم منح مؤسسة برودو البحثية (لافاييت الغربية، إنديانا، الولايات المتحدة الأمريكية) براءة اختراع بعنوان "التخمير المباشر للدي-زيلوز إلى الإيثانول بواسطة طفرة خميرة التي تخمر الزيلوز"، حيث ذكروا، "يتم وصف عملية لإنتاج طفرات الخمائر القادرة على استخدام دي-زيلوز إلى الإيثانول بعائد كبير" [٧٧]، وكانت طفرة الخميرة هي الكانديدا XF217 والسكراروميسيس سيرفيسي SCXF138. وفي عام ١٩٩٧م تم منح شركة دوبونت (ويلمينجتون، ديلاوار، الولايات المتحدة الأمريكية) براءة اختراع أمريكية بعنوان "التحويل الحيوي لمصدر كربوني قابل للتخمير إلى ٣،١-بروبان دايل بواسطة كائن دقيق واحد" [٧٨]. وقد وصفت براءة الاختراع هذه مسارات الأيض الموجودة في الكائنات الدقيقة الحية المنتجة بشكل طبيعي (مثل جنس السيتروباكترا، جنس الكلوستريديوم، جنس الكليبيسيلا)، ونشاطات الإنزيمات المحددة المطلوبة من أجل إعادة توجيه تدفق الكربون وتوازن الأكسدة والاختزال (على سبيل المثال: توليد NAD^+). وفي أحد أكبر العمليات الناجحة للهندسة الأيضية الحديثة، تم وصف عوامل التعبير الخاص وتقنيات الاستنساخ المستخدمة لبناء سلالة معدلة من إيشيريشيا قولون قادرة على إنتاج عالٍ من ٣،١-بروبان دايل [٧٨، ٧٩]. (ملاحظة: تم إصدار عدة براءات

اختراع أمريكية لشركة دوبونت، والشركات المتعاونة معها، مثل جينيكور العالمية، على تطوير ٣،١-بروبان دايل؛ ومع ذلك، فإن البراءة الأمريكية الصادرة في عام ١٩٩٥ م تمثل أول هذه السلسلة).

وتقترح هذه الإحصائية الموجزة على مراجع براءات الاختراع في التقنية الحيوية بأنه لمدة ٤٠ عاماً تقريباً (١٩٤٨-١٩٨٥ م)، أن تطوير عمليات التقنية الحيوية الصناعية قد تراجع للدرجة الثانية بالنسبة لطرق اختيار الطفرات. ومع ذلك، وفي غضون عشر سنوات إضافية (بحلول ١٩٩٧ م)، تم استخدام أساليب الجينات المستهدفة لبناء مصانع الخلايا الميكروبية القادرة على إنتاج الكيماويات ذات القيمة المضافة العالية.

وسوف يتذكر ذوو الخبرة الصناعية أنه في أواخر الثمانينيات وأوائل التسعينيات، مع ظهور تقنية الحامض النووي الدنا المعدل من التقنية الحيوية الطبية، فإننا قد شهدنا محاولة تخليق المركبات والتي تم إنتاجها مسبقاً بواسطة المسارات التخليقية في كائنات الإنتاج [٢٨، ٨٠-٨٢]. وشملت هذه المركبات حمض إل-جلوتامك (مليون طن سنوياً)، وحمض الستريك (مليون طن سنوياً)، وإل-ليسين (٣٥٠ ألف طن سنوياً)، وحمض اللاكتيك (٢٥٠ ألف طن سنوياً)، وإنزيمات معاملة الأغذية (١٠٠ ألف طن سنوياً)، وفيتامين ج (٨٠ ألف طن سنوياً)، وحمض الجلوكونيك (٥٠ ألف طن سنوياً)، والمضادات الحيوية (٣٥ ألف طن سنوياً)، وإنزيمات الأعلاف (٢٠ ألف طن سنوياً)، والزانثان (١٠ آلاف طن سنوياً)، وإل-هيدروكسي فينيل ألانين (١٠ آلاف طن سنوياً)، وفيتامين ف (ألف طن سنوياً)، وفيتامين ب^{١٢} (١٢ طن سنوياً)، ولذكر البعض [٥، ٨٣-٨٥]. وقد تم إتاحة ذلك عن طريق إدخال التسلسلات الوراثية التي ترمز للإنزيمات التي قد تحفز وجود التفاعلات المطلوبة، أو حذف الجينات التي قد تعمل على التنظيم الخفزي للتفاعلات والمسارات غير المرغوب فيها. وقد استندت تلك الأساليب على الافتراضات، وذات مصادر مكثفة وإنتاجية منخفضة، مما قلل من احتمال تحديد الطرز الجيني بنجاح والتي قد تظهر بوصفها نمطاً ظاهرياً متطوراً. وكانت الميزة الحقيقية للطفرات العشوائية وفحصها واختيارها هي المجال التجريبي الكبير الذي يمكن تغطيته، حتى في حالة التضحية بالفهم الميكانيكي. وكانت الميزة الأخرى هي سجل التتبع لها. بعد ذلك بعشر سنوات تقريباً وما الذي تغير؟

على الرغم من وجود الأساليب التي سمحت بمعالجة الحمض النووي الدنا، فإن تسلسلات الجينوم المشروحة الخاصة بعوائل الإنتاج الصناعي لم تكن متاحة. ويوضح الشكل رقم (٤، ٢) الزيادة التصاعدية في تسلسلات الجينوم المنشورة التي بدأت في أول مرة عام ١٩٩٥ م واستمرت في التوسع حتى عام ٢٠٠٨ م بإجمالي ٧٣٠ مشروعاً تسلسل جينوم و٩٠٥، و١٧٦٣ م، و٩١ مشروع تسلسل جينوم جاري بحثها حالياً للبيكتيريا، والخلايا حقيقية النواة، والأراكي، على التوالي. ويوضح الشكل رقم (٤، ٢ أ) وصفاً لعدد تسلسلات الجينوم الكاملة التي تم اكتشافها تبعاً لتصنيف الكائن (الأراكي، الخلايا حقيقية النواة، والميتاجينومات).



إجمالي عدد تسلسلات الجينوم الكاملة يتضاعف حوالي كل 1.7 عام

الشكل رقم (٤، ٢). تسلسلات الجينوم الكاملة والمتاحة للجمهور. ملخص لخصائص كل تسلسلات الجينوم الكاملة المتاحة للجمهور على أساس سنوي بين عامي ١٩٩٥-٢٠٠٧م. تم تحويل البيانات من قاعدة بيانات الجينومات المباشرة.

وعلى الرغم من تزايد اكتشاف التسلسل لجينومات الأراكي وحقيقيات النواة، فإن البكتيريا تشكل الغالبية العظمى من الكائنات التي يتم اكتشاف تسلسلها. وكما هو موضح في الشكل رقم (٤، ٢)، فقد تضاعف عدد تسلسلات الجينوم كل ١,٧ سنة، على الرغم من أن البيانات التي تم الحصول عليها عام ٢٠٠٦م، ٢٠٠٧م و٢٠٠٨م (غير مبينة) تقترح أن معدل تسلسل الجينوم هذا ينخفض. في حين أن الشكل رقم (٤، ٢) يأخذ فقط تسلسلات الجينوم التي تم إكمالها في الاعتبار، فإن الشكل رقم (٤، ٢ ج) يقدم الحجم التراكمي للجينات المسلسلة. وعلى وجه الخصوص فقد تم تلخيص حجم كل جينوم مسلسل على مستوى كافة الجينومات المسلسلة في عام معين (لم يتم إدراج تغطية كل الجينومات المسلسلة في هذه العملية الحسابية). وقد زاد حجم الجينوم المتراكم

بشكل كبير حتى عام ١٩٩٨م؛ ومع ذلك، فبين عام ١٩٩٩م و٢٠٠١م، فقد كان هناك انخفاضاً ملحوظاً، ينتهي بزيادة هائلة في عام ٢٠٠٢م. وبين عامي ٢٠٠٢-٢٠٠٥م انخفض الحجم التراكمي بصورة كبيرة. وبين عامي ٢٠٠٥-٢٠٠٧م كانت هناك زيادة، على الرغم من أنها ما زالت أقل من مستويات عام ٢٠٠٢م. ويوضح الشكل رقم (٤، ٢، ب، ج) أنه في حين توجد زيادة في عدد تسلسلات الجينوم الإجمالية التي تم إكمالها والمتاحة للجمهور، فإن حجم هذه الجينومات لم يزداد. وهذا يتلاءم مع ملاحظة أن الجينومات الأصغر حجماً، مثل تلك المثلة بالميتاجينومات في الكائنات البكتيرية قد سيطرت على معظم جهود التسلسل الأخيرة.

كانت هذه الثورة الجينومية مدفوعة أساساً بمجال البحث الطبي، كما هو موضح بالجدول رقم (٢، ٢)، الذي يقدم خصائص للجينات المسلسلة ما بين عامي ١٩٩٥-١٩٩٩م. ومن الجدير بالملاحظة أنه في حين تم تصنيع منتجات التقنية الحيوية الصناعية مثل حمض الستريك والبنسيلين والأحماض الأمينية خلال هذا الوقت، إلا أن تسلسلات الجينوم لعوائل الإنتاج الصناعي لم تكن متاحة. وتم تطبيق الكائنات الباقية، الموضحة تبعاً لأهميتها، في التقنية الحيوية الطبية والدواء البشري [٨٦]. ويمكن ملاحظة أنه يمكن فقط اعتبار أن ثلاث تسلسلات فقط من بين ٢٤ تسلسل متاحة لها إمكانية تطبيق شاملة في قطاع التقنية الحيوية الصناعية: السكراروميسيس سيرفيسي، إيشيريشيا القولون، والباسيلس ساتليس، في حين تم دفع الباقي بواسطة المجال الطبي. ويمكن للمرء أن يجادل بأن تسلسل تلك الجينومات الثلاثة كان بدافع الأهمية الطبية لها، إما بوصفها كائناً نموذجياً للخلايا حقيقية النواة وإما عاملاً ممرضاً نموذجياً.

وفي حالة انتقالنا بعد عام ١٩٩٩م، كما هو موضح بالجدول رقم (٢، ٣)، فقد تم وضع تسلسل جينومات عدة مصانع خلوية صناعية مهمة، وقد أصبح تسلسل الجينوم حتى مع وجود خفض كبير في تكاليف التسلسل أداة لتحليل المصانع الخلوية ذات الأنماط الظاهرية المختلفة. ويوفر الجدول رقم (٢، ٣) ملخصاً لكافة تسلسلات الجينومات المتاحة والمنشورة بين يناير ٢٠٠٧م وفبراير ٢٠٠٨م [٨٦]. وقد تم خلال هذه الفترة نشر إجمالي ٩٦ جينوم مع تصنيف ٣٤ على أنهم لديهم أهمية للتقنية الحيوية و/أو البيئة. وكان عدد الكائنات المسلسلة ذو أهمية خاصة، مدفوعاً من قبل عمليات التقنية الحيوية الصناعية، حيث تم الاستشهاد بمنتجات محددة مثل حمض الستريك والإيثانول الحيوي وحمض اللاكتيك والأحماض الأمينية (على سبيل المثال الجلوتامات). وعلى الرغم من أن جزءاً كبيراً من تسلسلات الجينومات، حوالي الثلث، كان بدافع التقنية الحيوية الطبية، فقد ازداد عدد الجينومات المسلسلة المرتبطة بالتقنية الحيوية الصناعية. وقد أكدت على هذا عن طريق استعراض الميزانيات التشغيلية للسنة المالية ٢٠٠٨م الخاصة بالمعهد القومي الأمريكي للصحة، والمقدرة بـ ٢٩,٥ مليار دولار أمريكي، مقارنة بوزارة الطاقة الأمريكية، قسم كفاءة الطاقة والطاقة المتجددة، بمقدار ١,٧ مليار دولار [٨٧، ٨٨].

الجدول رقم (٢، ٢). خصائص تسلسلات الجينوم الناتجة للجمهور المنشورة بين عامي ١٩٩٥-١٩٩٩م.

العدد	عدد ORFs	الحجم (كيلو قاعدة)	الأهمية	الكائن	المجال	التاريخ
Science 269, 496-512	١٢٥٧	١٨٣٠	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	<i>Haemophilus influenza</i>	ب	يوليو ١٩٩٥م
Science 270, 397-403	٤٧٧	٥٨٠	طبية، مسببات الأمراض للإنسان والطيوريات	<i>Mycoplasma genitalium</i>	ب	أكتوبر ١٩٩٥م
DNA Res. 3, 109-136	٣١٧٢	٣٥٧٣	التقنية الحيوية، بيئية، دورة كربون المحيطات	<i>Synechocystis sp.</i>	ب	يونيو ١٩٩٦م
Science 273, 1058-1073	١٧٢٩	١٢٦٤	التقنية الحيوية، إنتاج الطاقة	<i>Methanococcus jannaschii</i>	أ	سبتمبر ١٩٩٦م
Nucleic Acids Res. 24, 4420-4449	٦٨٩	٨١٦	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	<i>Mycoplasma pneumonia</i>	ب	نوفمبر ١٩٩٦م
Nature 387, 5-105	٥٨٦٠	١٢٠٦٩	كائن نموذجي	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ح	مايو ١٩٩٧م ^٢
Nature 388, 539-547	١٥٧٦	١٢٦٧	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	<i>Helicobacter pylori</i>	ب	أغسطس ١٩٩٧م
Science 277, 1453-1474	٤٢٤٣	٤٦٣٩	طبي	<i>Escherichia coli</i>	ب	سبتمبر ١٩٩٧م
J. Bacteriol. 179, 7133-7155	١٨٧٣	١٧٥١	التقنية الحيوية، إنتاج الطاقة	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	أ	نوفمبر ١٩٩٧م
Nature 390, 249-256	٤١٠٥	٤٢١٤	التقنية الحيوية	<i>Bacillus subtilis</i>	ب	نوفمبر ١٩٩٧م
Nature 390, 364-370	٢٤٢٠	٢١٧٨	التقنية الحيوية	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	أ	نوفمبر ١٩٩٧م
Nature 390, 580-586	٨٥١	٩١٠	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ب	ديسمبر ١٩٩٧م
Nature 392, 353-358	١٥٢٩	١٥٥١	التقنية الحيوية	<i>Aquifex aeolicus</i>	ب	مارس ١٩٩٨م
DNA Res. 5, 55-76	١٩٥٥	١٧٣٨	التقنية الحيوية	<i>Pyrococcus horikoshii (shinkaj)</i>	أ	أبريل ١٩٩٨م
Nature 393, 537-544	٤٤٠٢	٤٤١١	طبية، مسببات الأمراض للإنسان والطيوريات	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ب	يونيه ١٩٩٨م
Science 281, 375-388	١٠٣٦	١١٣٨	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	<i>Treponema pallidum</i>	ب	يوليو ١٩٩٨م
Science 282, 754-759	٨٩٥	١٠٤٢	طبية، مسببات الأمراض للإنسان والطيوريات	<i>Chlamydia trachomatis</i>	ب	أكتوبر ١٩٩٨م
Nature 396, 133-140	٨٣٥	١١١١	طبية، مسببات الأمراض للإنسان، تهديد حيوي	<i>Rickettsia prowazekii</i>	ب	نوفمبر ١٩٩٨م
Science 282, 2012-2018	٢٣٢٠٩	١٠٠٢٧٢	كائن نموذجي	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ح	ديسمبر ١٩٩٨م
Nature 397, 176-180	١٤٩١	١٢٤٣	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	<i>Helicobacter pylori</i>	ب	يناير ١٩٩٩م
Nat. Genet. 21, 385-389	١٠٥٢	١٢٣٠	طبية، مسببات الأمراض للإنسان	<i>Chlamydia pneumonia</i>	ب	أبريل ١٩٩٩م
DNA Res. 6, 83-101	١٧٠٠	١٢٦٩	التقنية الحيوية	<i>Aeropyrum pernix</i>	أ	أبريل ١٩٩٩م
Nature 399, 323-329	١٨٥٨	١٨٦٠	التقنية الحيوية، إنتاج الطاقة، تطوري	<i>Thermotoga maritima</i>	ب	مايو ١٩٩٩م
Science 286, 1571-1577	٢٦٣٧	٣٠٦٠	بيئية، معالجة حيوية	<i>Deinococcus radiodurans</i>	ب	نوفمبر ١٩٩٩م

أ) الكيتريا (ب)، الخلالا حقيقي النواة (ح)، الأراكي (د).

ب) تمثل التسلسلات الموضحة بخط أسود الكائنات المهمة التي استخدمت بصورة واسعة لتطبيقات التقنية الحيوية الصناعية.

الجدول رقم (٣، ٢). خصائص تسلسلات الجينومات المتاحة للجمهور والتي تم نشرها في عام ٢٠٠٧م.

المصدر	عدد الـ ORFs	الحجم (كيلو قاعدة)	الاهمية	الكائن	البيانات	التاريخ
<i>PLoS Genet.</i> 3, e231	١٩٢١	١٢٦٩	MMI، دورة الكربون، بيئية،	<i>Prochlorococcus marinus</i>	ب	يناير ٢٠٠٧م
<i>PLoS Genet.</i> 3, e231	١٩٠٦	١٧٠٤	دورة الكربون، بيئية، MMI،	<i>Prochlorococcus marinus</i>	ب	يناير ٢٠٠٧م
<i>Archaea</i> 2, 127-35	١٢٠٢	١٢٦٧	تقنية حيوية	<i>Hyperthermus budjensis</i>	أ	يناير ٢٠٠٧م
<i>PLoS Genet.</i> 3, e231	٢١٩٣	١٨٦٤	دورة الكربون، بيئية، MMI،	<i>Prochlorococcus marinus</i>	ب	يناير ٢٠٠٧م
<i>PLoS Genet.</i> 3, e231	٢٩٩٧	٢١٨٢	دورة الكربون، بيئية، MMI،	<i>Prochlorococcus marinus</i>	ب	يناير ٢٠٠٧م
<i>Nat. Biotechnol.</i> 25, 221-231	١٤١٦٥	٣٣٩٠٠	تقنية حيوية، التخمير، إنتاج حمض الستريك	<i>Aspergillus niger</i>	ح	يناير ٢٠٠٧م
<i>J. Bacteriol.</i> 189, 931-45	٣٨١٩	٤٠٤٤	بيئية، المعالجة الحيوية	<i>Rubrivivax (Methylthiom) gelatinosus (petroleiphilum)</i>	ب	يناير ٢٠٠٧م
<i>J. Bacteriol.</i> 189, 3256-3270	٢٤٣٤	٢٥٢٩	صناعة الدنم، تقنية حيوية	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	ب	يناير ٢٠٠٧م
<i>Nature</i> 444, 97-101	٦٩٠٢	٢٠٥٠٠	زراعية، مسببات أمراض النبات	<i>Ustilago maydis</i>	ح	فبراير ٢٠٠٧م
<i>J. Bacteriol.</i> 189, 3166-3175	٢٧٧٠	٢٣٨٨	طبية، مسببات أمراض الإنسان	<i>Streptococcus sanguinis</i>	ب	فبراير ٢٠٠٧م
<i>J. Bacteriol.</i> 190, 1495-1496	٢٠١٢	٢٧٧٤	مسببات أمراض الحيوانات، طبية،	<i>Acinobacillus pleuropneumoniae</i>	ب	فبراير ٢٠٠٧م
<i>Nat. Biotechnol.</i> 25, 319-326	٥٨١٦	١٥٤٢١	تقنية حيوية، إنتاج الطاقة، إنتاج الإيثانول، التخمير	<i>Pichia stipitis</i>	ح	فبراير ٢٠٠٧م
<i>Genes Dev.</i> 21, 601-614	٣٣٥٢	٣٩٧٦	مسببات أمراض الإنسان، طبية	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ب	مارس ٢٠٠٧م
<i>Science</i> 313, 370-372	٣٠٨٥	٣١٧٩	تقنية حيوية	<i>Uncultured methanogenic archaeon RC-1</i>	أ	مارس ٢٠٠٧م
<i>PLoS Genet.</i> 3, e231	١٩٠٧	١٢٤١	دورة الكربون، بيئية، MMI،	<i>Prochlorococcus marinus</i>	ب	مارس ٢٠٠٧م
<i>PLoS Genet.</i> 13, e53	٢٣٢٥	٢٤٢٤	تقنية حيوية، بيئية	<i>Hermiimimonas (Centrobacterium) arsenicoxydans</i>	ب	مارس ٢٠٠٧م
<i>Nat. Biotechnol.</i> 25, 447-453	٧١٩٨	٨٢١٢	تقنية حيوية، إنتاج المضاد الحيوي، إنتاج الإريثروميسين	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	ب	مارس ٢٠٠٧م
<i>PLoS ONE</i> 2, e947	١٢٣٤	١٨٩٨	مسببات أمراض الحيوانات، طبية	<i>Francisella tularensis tularensis</i>	ب	مارس ٢٠٠٧م
<i>PNAS</i> 104, 5602-5607	٣٣٩٢	٣٦٠٧	بيئية، تقنية حيوية	<i>Geobacillus thermodentificans</i>	ب	مارس ٢٠٠٧م
<i>Microbiology</i> 153, 1042-1058	٣٠٥٢	٣٣٠٠	تقنية حيوية، إنتاج الجلutarامات، إنتاج الأحماض الأمينية، صناعة الأغذية	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ب	أبريل ٢٠٠٧م
<i>PLoS Biol.</i> 5, e77	١١٢٣٩٥	لا يوجد	MMI، بيئية	<i>Marine microbial communities</i>	م	أبريل ٢٠٠٧م

المصدر	عدد الـ ORFs	المجموع (كيلو قاعدة)	الأهمية	الكائن	المجال	التاريخ
Science 316, 222-234	٣٤,٠٢٣	٢٨٧١١٨٩	لا يوجد	<i>Macaca mulatta</i>	ح	أبريل ٢٠٠٧م
PNAS 104, 10376-10381	٤٥٣٦	٥١٨٣	تقنية حيوية، علاج السرطان، ضيئة	<i>Salmispora tropica</i>	ب	أبريل ٢٠٠٧م
PLoS ONE 2, E315	٢١٩٨	٢٠٩٥	طبية، مسبب أمراض الإنسان، مسبب أمراض الخنازير، مسبب أمراض للحيوانات	<i>Streptococcus suis</i>	ب	أبريل ٢٠٠٧م
PLoS ONE 2, E315	٢١٨٦	٢٠٩٦	طبية، مسبب أمراض الإنسان، مسبب أمراض الخنازير، مسبب أمراض للحيوانات	<i>Streptococcus suis</i>	ب	أبريل ٢٠٠٧م
Appl. Environ. Microbiol. Epub	٢٢٥٦	٢١٩١	المعالجة الحيوية، تقنية حيوية	<i>Metallospira sedula</i>	أ	أبريل ٢٠٠٧م
Science 316, 1307-1312	٦٧١٧	٧٤٥٦	زراعية	<i>Brachyribobium</i> sp.	ب	مايو ٢٠٠٧م
PNAS 104, 7705-7710	٧٦٥١	١٣٢٠٠	لا يوجد	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	ح	مايو ٢٠٠٧م
Nat. Biotechnol. 25, 569-575	١٢٨٠	١٣٨٩	طبية، مسبب أمراض الخنازير	<i>Dichelobacter nodosus</i>	ب	مايو ٢٠٠٧م
PNAS 104, 7981-7986	١١٨٢	٢١٢٧	طبية، مسبب أمراض الخنازير	<i>Orientia (Rickettsia) tsutsugamushi</i>	ب	مايو ٢٠٠٧م
Nature 447, 167-177	١٨٠٢٢	لا يوجد	لا يوجد	<i>Monodelphis domestica</i>	و	مايو ٢٠٠٧م
Science 316, 1307-1312	٧٣٩٤	٨٢٦٤	زراعية	<i>Brachyribobium</i> sp.	ب	مايو ٢٠٠٧م
PNAS 104, 9451-9456	٢٢٩٧	٢٩٠٦	طبية، مسبب أمراض الإنسان والحيوان والواجن	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	ب	مايو ٢٠٠٧م
J. Bacteriol. 190, 2138-2149	٢٩٨٤	٣٢٩٧	زراعية، مسبب أمراض النبات	<i>Clarithibacter (Corynebacterium) michiganensis michiganensis</i>	ب	مايو ٢٠٠٧م
Curr. Biol. 17, 881-886	٩٣٧	١٠٢٢	تقنية	<i>Vesicovirusus okutanii</i>	ب	مايو ٢٠٠٧م
Genome Res. 17, 1082-1092	٣٥٧٤	٣٨٨٦	طبية، مسبب أمراض الإنسان، مهدد حيوي	<i>Clostridium botulinum</i>	ب	مايو ٢٠٠٧م
Nat. Methods 4, 495-500	٣٥٢٣٠	٢٢٢٨٦٠	لا يوجد	<i>Simulated microbial communities</i>	م	يونيو ٢٠٠٧م
PNAS 104, 10643-10648	١٧٩٣	١٨٥٣	طبية، HGM1	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	أ	يونيو ٢٠٠٧م
PNAS 104, 11889-11894	٤٠٧٨	٣٤٥٠	طبية	<i>Oral TM7 microbial communities</i>	م	يونيو ٢٠٠٧م
Science 316, 1718-1723	لا يوجد	١٣٨٠٠٠٠	مسبب أمراض الخنازير والإنسان، طبية	<i>Aedes aegypti</i>	ح	يونيو ٢٠٠٧م
Nat. Biotechnol. 25, 763-769	٢٤١٢	٧٨٦١	طبية، مسبب أمراض الأسماك	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م
PLoS Bio. 5, E156	٤٠٦٥	٥١٦٣	طبية، مسبب أمراض الخنازير والإنسان، HGM1	<i>Bacteroides vulgatus</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م

المصدر	عدد ORFs (الـ)	الحجم (كيلو قاعدة)	الأهمية	الكائن	المجال	التاريخ
<i>PLoS Bio.</i> 5, E156	٢٨٥٠	٤٨١١	طبية، مسببات أمراض الطيور، والإنسان، HGMI	<i>Parabacteroides distasonis</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>PNAS</i> 104, 9451-9456	٢٧٤٧	٢٩٠٦	طبية، مسببات أمراض الحيوانات، والماشية، والإنسان، والبواجن	<i>Staphylococcus aureus</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>J. Bacteriol.</i> 190, 300-310	٢٦١٤	٢٨٧٨	طبية، مسببات أمراض الحيوانات، والإنسان	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>PLoS Genet.</i> 3(8), E138	٣٦٩٧	٤١١٠	بيئية، طبية	<i>Janthinobacterium</i> sp.	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>ISME J.</i> 1, 283-290	لا يوجد	لا يوجد	لا يوجد	<i>Soil microbial communities</i>	م	يونيو ٢٠٠٧م
<i>PNAS</i> 105, 2128-2133	٢٨٣٨	٣٩٦٤	تقنية حيوية	<i>Clostridium kluyveri</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>PLoS ONE</i> 25, e1271	٢٥٥٢	٣٨٦٣	التجهيز الحيوي، طبية، مسببات أمراض الإنسان	<i>Clostridium botulinum A</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>PLoS ONE</i> 25, 1281-1289	٢٤٠٧	٣٧٦٠	التجهيز الحيوي، طبية، مسببات أمراض الإنسان	<i>Clostridium botulinum A</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>PNAS</i> 104, 12146-12150	٢٤٣٨	٢٥٦٢	بيئية	<i>Sulfurovum</i> sp.	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>PNAS</i> 104, 12146-12150	١٨٤٣	١٨٧٧	بيئية	<i>Nitratinaptor</i> sp.	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>PLoS Genet.</i> 3(8), E142	٤١٢٤	٤٧٢٣	طبية، مسببات أمراض الإنسان	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ب	يونيو ٢٠٠٧م
<i>Nat. Biotechnol.</i> 25, 1007-1014	٣٦٩٣	٣٩١٨	تقنية حيوية، إنتاج الغذاء الحيوي، تخطيط مسببات أمراض النبات، وزراعية	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	ب	أغسطس ٢٠٠٧م
<i>PNAS</i> 104, 8397-8402	٥٣٦٧	١٤٦٦١	تطورية	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	ح	أغسطس ٢٠٠٧م
<i>Science</i> 317, 86-94	لا يوجد	٢٩٧٣٩٨	كائن نموذجي	<i>Nematostella vectensis</i>	ح	أغسطس ٢٠٠٧م
<i>Science</i> 317, 1400-1402	لا يوجد	٣٦٠٠٠١	زراعية، ومسببات أمراض النبات، FGI	<i>Fusarium (Gibberella) graminearum (zeae)</i>	ح	سبتمبر ٢٠٠٧م
<i>PLoS ONE</i> 2(9), e914	لا يوجد	٧٢٠	بيئية	<i>Marine plankton communities</i>	م	سبتمبر ٢٠٠٧م
<i>J. Bacteriol.</i> Epub	١٦٢٦	١١٢٨	طبية، مسببات أمراض الإنسان	<i>Campylobacter jejuni jejuni</i>	ب	سبتمبر ٢٠٠٧م
<i>PLoS Genet.</i> 3, e231	١٩٨٣	١٧٣٨	دور الكروم، بيئية.	<i>Prochlorococcus marinus</i>	ب	سبتمبر ٢٠٠٧م
<i>PLoS Biol.</i> 5, e254	لا يوجد	٢٧٨٢٥٧	طبية	<i>Homo sapiens</i>	ح	سبتمبر ٢٠٠٧م
<i>Science</i> 317, 1756-1760	١١٥٠٠	٩٠٠٠٠	لا يوجد	<i>Brugia malayi</i>	ح	سبتمبر ٢٠٠٧م
<i>PLoS ONE</i> 2, e928	٣٦٨١	٣٧٠٤	تقنية حيوية، الطاقة الحيوية، طبية	<i>Bacillus pumilus</i>	ب	سبتمبر ٢٠٠٧م
<i>Nature</i> 499, 463-467	لا يوجد	٤٧٥٠٠٠	لا يوجد	<i>Virus vinifera</i>	ح	سبتمبر ٢٠٠٧م

التاريخ	المجال	الكائن	الأهمية	الحجم (كبير أو صغير)	عدد الـ ORFs	النشر
سبتمبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Arco bacter butzleri</i>	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٢٣٤١	٢٢٥٩	<i>PLoS ONE 2, e1358</i>
أكتوبر ٢٠٠٧م	ح	<i>Giardia lamblia (intestinalis)</i>	لا يوجد	١١١٩٢	١٣١٠٠	<i>Science 317, 1921-1926</i>
أكتوبر ٢٠٠٧م	ح	<i>Chlamydomonas marina</i>	لا يوجد	١٠٠٠٠٠٠	١٥٣٥٦	<i>Science 318, 254-250</i>
أكتوبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Acanthochloris marina</i>	تقنية حيوية	٦٥٠٣	٢٢٥٤	<i>PNAS 105, 2005-2010</i>
أكتوبر ٢٠٠٧م	ح	<i>Babesia bovis</i> ♦	لا يوجد	٨٢٠٠	٣٦٧١	<i>PLoS Pathog. 3, e148</i>
أكتوبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Sorangium cellulosum</i>	تقنية حيوية	١٣٠٣٣	٩٣٨٤	<i>Nat. Biotechnol. 25, 1281-1289</i>
نوفمبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Lactobacillus helveticus</i>	تقنية حيوية، صناعة الأغذية	٢٠٨٠	١٦١٠	<i>J. Bacteriol. 190, 727-735</i>
نوفمبر ٢٠٠٧م	ح	<i>Hemiselms anderseni</i>	تقنية حيوية، إنتاج الطاقة	٥٧١	لا يوجد	<i>PNAS 104, 19908-19913</i>
نوفمبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٢٨٧٢	٢٦٥٧	<i>BMC Microbiol. 7, 99</i>
نوفمبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Bartonella tribocorum</i>	طبية، مسببات أمراض النقران	٢٦١٩	٢٠٧٤	<i>Nat. Genet. 39, 1469-1476</i>
نوفمبر ٢٠٠٧م	م	<i>Gut microbiome</i>	تقنية حيوية، إنتاج الطاقة	لا يوجد	لا يوجد	<i>Nature 450, 56١-565</i>
نوفمبر ٢٠٠٧م	ح	<i>Malassezia globosa</i>	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٩٠٠٠	٤٢٨٥	<i>PNAS 104, 18730-18735</i>
نوفمبر ٢٠٠٧م	ح	<i>Laccaria bicolor</i>	زراعية	٦٥٠٠٠	لا يوجد	<i>Nature in press</i>
ديسمبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Neisseria meningitidis</i>	مسببات أمراض الإنسان، طبية	٢١٥٣	٢٠٢٠	<i>Genomics 91, 78-87</i>
ديسمبر ٢٠٠٧م	م	<i>Gut microbiome</i>	طبية	٧٢٧٠٠٠	لا يوجد	<i>DNA Res. 14, 169-181</i>
ديسمبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Candidatus sulcia muelleri</i>	زراعية	٢٤٥	٢٢٧	<i>PNAS 104, 19392-9397</i>
ديسمبر ٢٠٠٧م	ح	<i>Vitis vinifera L</i>	لا يوجد	٥٠٤٦٠٠	٢٩٥٨٥	<i>PLoS ONE 2, e1326</i>
ديسمبر ٢٠٠٧م	ح	<i>Monosiga brevicollis</i>	لا يوجد	٣٨٦٤٨	لا يوجد	<i>Nature 51, 783-788</i>
ديسمبر ٢٠٠٧م	ب	<i>Microcystis aeruginosa</i>	مسببات أمراض الإنسان، والحيوان، والبيئة، طبية	٨٥٤٢	٦٣٦٢	<i>DNA Res. 14, 247-256</i>
يناير ٢٠٠٨م	ب	<i>Clavibacter (Corynebacterium) michiganensis sepehronicus</i>	زراعية، مسببات أمراض النبات	٣٢٥٨	٣٠٥٨	<i>J. Bacteriol. 190, 2150-2160</i>
يناير ٢٠٠٨م	ب	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	طبية، مسببات أمراض الطيور و الخنازير	٢٢٤٢	٢٠٣٦	<i>PLo ONE 3, e1450</i>
يناير ٢٠٠٨م	ب	<i>Rickettsia rickettsii</i>	مسببات أمراض الإنسان، طبية	١٢٦٨	١٣٨٤	<i>Infect. Immun. 76, 542-545</i>
يناير ٢٠٠٨م	ب	<i>Chlamydia trachomatis</i>	مسببات أمراض الإنسان و الخنازير، طبية	١٠٣٨	٨٧٤	<i>Genome Res. 18, 161-171</i>

النشر	عدد ORFs-ال	الحجم (كيلو قاعدة)	الأهمية	الكائن	المجال	التاريخ
<i>Genome Res.</i> 18, 161-171	٨٧٤	١٠٣٨	مسيبات أمراض الإنسان والحيوان، طبية	<i>Chlamydia trachomatis</i>	ب	يناير ٢٠٠٨م
<i>J. Biotechnol. Epub</i>	٤٤٧١	٥٠٧٩	مسيبات أمراض النبات، زراعية	<i>Xanthomonas campestris campestris</i>	ب	يناير ٢٠٠٨م
<i>Science</i> 319, 64-69	لا يوجد	٤٥٣٩٢٩	لا يوجد	<i>Physcomitrella patens patens</i>	ج	يناير ٢٠٠٨م
<i>J. Biotechnol. Epub</i>	٤٣٠٥	٤٦٨٦	مسيبات أمراض الإنسان، طبية	<i>Escherichia coli</i>	ب	فبراير ٢٠٠٨م
<i>J. Biotechnol. Epub</i>	١٨٢٠	٣٢٤٦	تقنية حيوية، معالجة مياه الصرف	<i>Candidatus cloacamonas acidaminovorans</i>	ب	فبراير ٢٠٠٨م
<i>DNA Res. Epub</i>	١٦٣١	١٧٩٧	لا يوجد	<i>Finnegoldia magna</i>	ب	فبراير ٢٠٠٨م
<i>J. Biotechnol. Epub</i>	١٧٠٢	١٧٩٦	إنتاج الخلات، تقنية حيوية، إنتاج الإيثانول، صناعة الغذاء، إنتاج جفص اللاكتيك	<i>Leuconostoc citreum</i>	ب	فبراير ٢٠٠٨م
<i>Genomics in press</i>	لا يوجد	٣٠٠٠	تقنية حيوية	<i>Halobacterium salinarum</i>	أ	فبراير ٢٠٠٨م
<i>J. Biotechnol. Epub</i>	٤٧٨٦	٤١٣٩	مسيبات أمراض الخضراوات، زراعية	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	ب	فبراير ٢٠٠٨م

(١) البكتيريا (ب)، خلايا حقيقية النواة (ج)، الأركي (د)، الميكروبية (م).
 =MIMI =مبادرة الميكروبات البحرية، =FQI =مبادرة الجينوم النظري، =HGMI =مبادرة ميكروبيوم الأمعاء البشرية.

وقد تم تمويل كافة تسلسلات الجينومات التي ذكر أن لها أهمية في التقنية الحيوية بواسطة وزارة الطاقة الأمريكية، مما يوضح بأن علم الجينومات الوظيفية وبيولوجيا الأنظمة يتم الاعتراف بهما كميزة أساسية في تقدم التقنية الحيوية الصناعية. وبالتأكيد لم يكن هذا هو الوضع قبل عقد من الزمان طبقاً للجدول رقم (٢, ٢). وقد سمحت تسلسلات الجينومات الكاملة الموجودة بالاستهداف الأفضل للتعديلات الوراثية، والمعلومات حول قوائم الأجزاء الكاملة لمصنع خلوي معين قيماً بصورة واضحة.

ومع توفر تسلسلات الجينومات لعدة كائنات نموذجية صناعية، فقد كان توضيح تلك التسلسلات هو الذي سد الفجوة بين قواعد البيانات القائمة على المعلومات المتوسعة (مثل مجموعات تسلسل الجينومات) وبين قواعد البيانات القائمة على البيانات (مثل تطبيق تسلسلات الجينوم للتوضيح، وتطوير النماذج، والفهم الأعمق) [٨٩]. وقد تطور توضيح تسلسلات الجينومات إلى مجالٍ معرفٍ بصورة جيدة والذي يشار إليه بعلم الجينومات الوظيفية والذي يركز على تطوير عدة أدوات تجريبية ونظرية لتحديد وظيفة الجين [٩٠]. وقد سمح علم الجينومات الوظيفية، من خلال ربط منتجات الجينات (مثل الإنزيمات) بوظائف الجينات (مثل القياس الكمي الكيميائي للتفاعل) بتطوير نماذج على مستوى الجينوم لمختلف أنواع البيانات، مثل نماذج شبكة الأيض المعاد هيكلتها.

(٢, ٦) نماذج شبكات الأيض المعاد هيكلتها Reconstructed Metabolic Network Models

(٢, ٦, ١) مقدمة Introduction

على الرغم من أن تسلسل الجينوم قد سهل بوضوح من استخدام التعديلات الوراثية المستهدفة لبناء المصانع الخلوية بأنماط ظاهرية مرغوبة، إلا أن الخطوة الأساسية للأمام تمثلت في إدخال الهندسة الأيضية، العلم الذي مكن من تصميم وبناء المصانع الخلوية. وتشمل الهندسة الأيضية تحديد التعديلات الوراثية المستهدفة والمحددة (حذف الجينات، والتعبير المفرط، أو التعديل) متبوعاً بتطبيق تلك التعديلات بواسطة أدوات البيولوجيا الجزيئية التي تؤدي إلى إعادة توجيه التدفقات لتحسين الإنتاج أو الثبات لمنتج أو كائن، على التوالي [٣٢, ٩١-٩٥] (الشكل رقم ٢, ٢). وكانت التقنية الأساسية في التطبيق الناجح للهندسة الأيضية هي إتاحة الجينوم الموضح بشكل جيد، بما في ذلك الأدوات الكمية التي تسمح بالفحص والمعاملة الدقيقين للجينوم. وقد كان التطور الأخير في نماذج الأيض على النطاق الجينومي (GSMs) من بين هذه الأدوات. ولتطوير نموذج للأيض الخلوي يتيح توقع مظاهر التركيز كدالات في الزمن، فإن ذلك يتطلب الكيمياء الرياضية ومعدلات التفاعل الحركية لكل تفاعل كيميائي حيوي في خلية تحت الظروف الفسيولوجية. وحالياً، فإن هذه المعلومات غير متاحة، إما من خلال التقدير وإما من خلال القياس التجريبي. ومع ذلك، فمن خلال الشرح الدقيق اعتماداً على المعلومات الكيميائية الحيوية

الحالية، واستعراض المراجع، والتجارب العملية؛ فإنه يمكن ربط الجينات المعروفة بالتفاعلات الكيميائية الحيوية المعروفة والرياضة الكيميائية الخاصة بها. وينتج عن ذلك نموذج كيميائي حيوي يصف تكوين واستهلاك كل منتج أيضا. وعن طريق توفير ظروف حدود توازن الكتل، فإن هذا يتيح المحاكاة المعتمدة على القيود لكيفية عمل شبكة الأيض تحت الظروف المختلفة. وبمعنى أبسط، فإنه يمكننا باستخدام الرياضيات الكيميائية الأساسية استخدام تلك النماذج لتوقع العلاقات بين الجينات ذات الوظيفة في شبكات الأيض العاملة في الخلية. في حالة تغذية الخلية بـ X جرامات من الجلوكوز فإنه يمكن باستخدام البرمجة الخطية والنموذج الكيميائي الحيوي توقع الحد الأقصى من الجرامات Y_i للمنتج المتكون i .

ويتضح لنا أيضاً أنه يمكن استخدام نماذج الأيض على النطاق الجينومي (GSMMs) لتوقع المظاهر النظرية للتغيرات الوراثية التي يمكن أن تزيد من الإنتاج وتكوين الكتلة الحيوية، حتى تحت ظروف النمو المختلفة (النمو على مصادر الكربون البديلة). وقد تم تطوير الـ GSMMs لعدة كائنات إنتاج نموذجية، وكانت خطوة أساسية لا تتيح فقط الهندسة الأيضية الموجهة بالنموذج، وإنما أيضاً دمج بيانات الأوميئات المختلفة وذلك للحصول على خصائص أيض تفصيلية. ويقدم الجدول رقم (٤، ٢) ملخصاً شاملاً لكل الـ GSMMs التي تم استكمالها حتى الآن. ومع وجود ٣٤ شبكة تم إعادة هيكلتها، فإن هناك تنوعاً كبيراً في الكائنات الحية، تتراوح من أبسط أنواع البكتيريا (إيشيريشيا القولون) إلى الكائنات حقيقية النواة الراقية والأكثر تعقيداً (مثل الإنسان). ومع ذلك، فإن الذي يجب ملاحظته بنفس القدر من الأهمية هو أنه بينما تقدم تلك البناءات المعاد هيكلتها دعامة للتوضيحات الإضافية باستخدام بيانات الجينومات الوظيفية ومنهجية منتظمة لمحاكاة الأيض، فإن هناك فرصاً هائلة لتوسع الشبكات. وجنباً إلى جنب، فإن كافة شبكات الأيض المعاد هيكلتها لها متوسط تغطية جينوم يقدر بـ $6, 14 \pm$ (٨، ١٪) (ن=٢٩). وعند عزل السكرومييسيس سيرفيسي كمثال، وهي أكثر الكائنات حقيقية النواة وصفاً، فإن أحدث شبكة أيض معاد هيكلتها لها تغطية جينوم بمقدار ٦، ١٣٪، في حين أن ٤٦٩١ من إجمالي ٦٦٠٨ ORFs (٩، ٧٠٪) لديها وظيفة محددة [A]. وعلى الرغم من أن كل الكائنات لا تشارك نفس مستوى الخصائص، السكرومييسيس سيرفيسي، إلا أن الـ GSMMs تستمر في توضيح التحسينات الهائلة في التغطية والتي لا يزال يمكن تحقيقها. وبالإضافة إلى ذلك، فإن التغطية الشاملة في الهياكل المعادة المستقبلية على مستوى الجينوم قد تشمل مناطق أقل توصيفاً من الأيض، مثل الدهون، والمسارات التي لا ترتبط تقليدياً بأيض الكربون المركزي، مثل تخليق البروتينات وطيها ونقلها.

توفر الـ GSMMs دعامة ملائمة للتوسع الإضافي وتكامل البيانات، بسبب نظامها الرياضي سهل المعاملة.

وبينما تم وصف هذا النظام سابقاً، فإننا نسرده بصورة مختصرة في الجزء التالي.

(٢, ٦, ٢) عملية الشبكة المعاد هيكلتها لمعيار الجينوم Genome-Scale Reconstructed Network Process

تم تحديد منهجية قوية لهيكلية النموذج الجديد باستخدام العدد الضخم تقريباً من الهياكل على مستوى الجينوم المتاحة حالياً (الجدول رقم ٤, ٢). وهناك عدة مراجع تصف عملية إعادة هيكلة شبكة الجينوم، بما في ذلك التوضيح الكيميائي الحيوي المبدئي الذي أجري، والإطار الرياضي المستخدم لوصف الأيض، والنظام الناتج لمعادلات التفاضل الخطية، والفروض والقيود المطلوبة للتبسيط، وأخيراً طرق الحلول الرقمية [٩٦-٩٨]. على الرغم من أن تاريخ تحليل توازن التدفق الكمي له أصول في مختلف المجالات، ولا سيما في حالة أخذ تجارب وسط التفاعل ذات النطائر السابق مناقشتها التي أجريت في الخمسينيات، فإنه يكون مقبولاً بشكل عام القول بأن تحليل توازن التدفق قد انتشر لأول مرة في الستينيات والسبعينيات. وقد ركزت المحاولات الأولى على بعض حركات الإنزيمات الخاصة، توصيف إنزيم البيروفات كينيز في الخميرة في المعمل لحساب تدفق الجلوكوز تحت ظروف زراعة لا هوائية [٩٩]. وبالإضافة إلى ذلك، فإنه من خلال عمل ميشيل سافوج والمجموعات الأخرى في تطوير تحليل الأنظمة للعمليات الكيميائية الحيوية، قد ظهر الإطار الأشمل لما يعرف حالياً بنظرية الأنظمة الكيميائية الحيوية خلال الستينيات عبر سلسلة من المراجع القوية في مجلة الأحياء النظرية [١٠٠-١٠٢]. وبالتوازي مع ذلك، طورت مجموعتين بحثيتين منفصلتين، كازر وبيرنز (١٩٧٣م) [١٠٣] وهينريش ورايبورت (١٩٧٤م) [١٠٤-١٠٧]، إطار رياضي للتحليل الكمي لكيفية توزيع تحكم التدفق في المسارات، وهو المبدأ الذي يعرف حالياً بتحليل تحكم الأيض. ومع ذلك، فإنه يجب ملاحظة أن تحليل توازن التدفق، وخاصةً مع التحليل على مستوى الجينوم، قد تم تطويره بصورة كبيرة في أواخر التسعينيات مع وجود الأدوات الحسابية المهمة والمنهجيات المتطورة التي هدفت لاستخلاص قوى توقعية أكثر من جمع النماذج المتاحة [٢٣، ١٠٨-١١١].

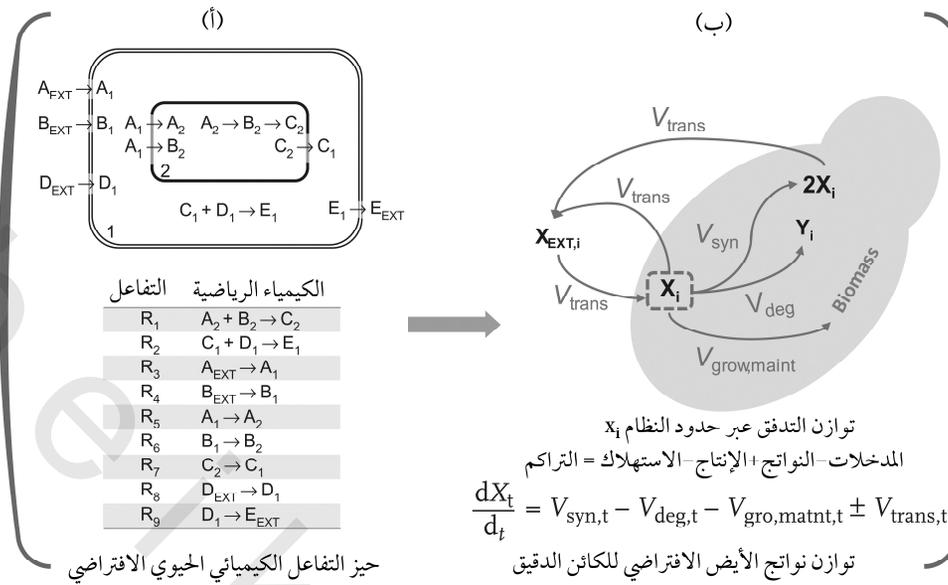
ومع حوالي ٣٠ نموذج أيضاً معياري للجينوم التي تم هيكلتها، والكثير الذي تم اقتراحه، فإنه من الضروري فحص الطريقة الأساسية لتحليل توازن التدفق. وقد تم تكييف الإطار الرياضي المبسط هنا من العرض الممتاز لتحليل توازن التدفق [١١٢]. ولاستخدام قوة هذه الطريقة، دعنا نعرف نظام أيضاً افتراضي مكون من نواتج أيضاً فريدة A, B, C, D, E وحيز تفاعل كيميائي حيوي ذي جزئين (جزء ١ و ٢) (الشكل رقم ٥, ٢). إن التفاعلات والكيمياء الرياضية يتم تعريفها بوضوح، ويتم إدراج توضيح التقسيمات في الكيمياء الرياضية. ولأغراض هذا المثال فسوف يتم الإشارة إلى $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7$ كتفاعلات تحفيزية، في حين يتم اعتبار أن R_3, R_4, R_8, R_9 تفاعلات نقل متبادل. ومن الضروري ملاحظة أن التسمية والمنهج قد تختلف في هيكلية النموذج، ولكن، على سبيل المثال فإن النقل الداخلي للمنتج الأيض A_1 من الجزء ١ إلى الجزء ٢ ينتج في منتج أيضاً جديد وهو A_2 . وعليه يعرف هذا التفاعل على أنه حفزي؛ لأنه يمكن نمذجة R_5 على أنه نضوب A_1 لتكوين A_2 ، حتى ولو لم تكن نواتج الأيض هذه فريدة من الناحية الكيميائية.

الجدول رقم (٤) : شبكات الأبيض هيكلها صل مستوى الجينوم.

المرجع	خصائص شبكة الأيض					أبعاد الجينوم		المرجع	الجينوم المسلسل	
	النموذج ^١	التقسيمات ^٢	نسبة الجينوم النشط ^٣	إجمالي الجينات (إنزيمات) ^٤	إجمالي فروع الأيض (وريدة) ^٥	إجمالي التفاعلات (وريدة) ^٥	إجمالي ال ORFs			الجينوم (كيلو قاعدة)
<i>Escherichia coli</i>										
[١٩٩]	JIE660	الستيويلازيم، خراج الخلية	١٥,٦	٦٦٠	(٤٤٣٨)	(٦٢٧)	٤٢٤٣	٤٦٣٩	[١٨٠]	<i>E. coli</i> K-12 MG1655
[٢٠٠]	JIR904	الستيويلازيم، خراج الخلية	٢١,٣	٩٠٤	(٦٢٥)	(٩٣١)	٤٢٤٣	٤٦٣٩	[١٨٠]	<i>E. coli</i> K-12 MG1655
[٢٠١]	IAF1260	الستيويلازيم، خراج الخلية	٢٩,٧	١٢٦٠	(١٠٣٤) ١٦٦٨	(١٣٣٤) ٢٠٧٧	٤٢٤٣	٤٦٣٩	[١٨٠]	<i>E. coli</i> K-12 MG1655
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>										
[٢٠٢]	IEF708	الستيويلازيم، النيروكوتندريا خراج الخلية	١٢,١	٧٠٨	٥٨٤	(٨٤٢) ١١٧٥	٥٨٦٠	١٢٠٦٩	[١٧]	<i>S. cerevisiae</i> S288C
[٢٠٣]	IND750	الستيويلازيم، النيروكوتندريا البيروكسيوزوم، الأغمية الاندولازيمية، الفصوة جهاز جولي، خراج الخلية	١٢,٨	٧٥٠	٦٤٦	١٤٨٩ (١١٤٩)	٥٨٦٠	١٢٠٦٩	[١٧]	<i>S. cerevisiae</i> S288C
[٢٠٤]	iLL672	الستيويلازيم، النيروكوتندريا خراج الخلية	١١,٥	٦٧٢	٦٣٦	١٠٣٨	٥٨٦٠	١٢٠٦٩	[١٧]	<i>S. cerevisiae</i> S288C
[٢٠٥]	iIN795	الستيويلازيم، النيروكوتندريا خراج الخلية	١٣,٦	٧٩٥	١٠١٣	١٤٣١	٥٨٦٠	١٢٠٦٩	[١٧]	<i>S. cerevisiae</i> S288C
اتصال شخصي هناك حالياً جهد تجديدي كبير للمرجع فروع عام الشبكة المادة هيكلها. ويتوقع أن يكون هذا النموذج العام متاحاً في عام ٢٠٠٨م.										
<i>Haemophilus influenza</i>										
[٢٠٦]	iCS400	الستيويلازيم، خراج الخلية	٢٤,١	٤٠٠	٤٥١	٤٦١	١٦٥٧	١٨٣٠	[١٨١]	<i>H. influenza</i>
<i>Helicobacter pylori</i>										
[٢٠٧]	iCS291	الستيويلازيم، خراج الخلية	١٨,٥	٢٩١	٤٠٣	٣٨٨	١٥٧٦	١٦٦٧	[١٨٢]	<i>H. pylori</i> 26695

المرجع	خصائص شبكة الأيض					أبعاد الجينوم		المرجع	الجينوم المسلسل	
	النموذج ^١	التقسيمات ^٢	نسبة الجينوم اللغطي ^٣	اجمال الميتات (انزيمات) ^٤	اجمال بروتاج الأيض (وريدة) ^٥	اجمال التفاعلات (وريدة) ^٦	اجمال الـ ORFs			الحجم (كيلو قاعدة)
[٢٠٨]	IT341	الستيولازم، خارج الخلية	٢١,٢	٣٤١	٤٨٥	٤٧٦	١٥٧٦	١٦٦٧	[١٨٨]	<i>H. pylori</i> 26695
Plasmodium falciparum										
[٢٠٩]	IT816	الستيولازم، خارج الخلية	لا يوجد	(٨١٦)	٥٢٥	٦٩٧	٥٢٦٨	٢٢٩٠٠	[١٨٣]	<i>P. falciparum</i> 3D7
Mannheimia succiniproducens										
[١٦٠]	ISH329	الستيولازم، خارج الخلية	٠,١	٣٢٩	٢٥٢	٢٧٣	٢٣٨٠	٢٣١٤	[١٦٠]	<i>M. succiniproducens</i> MBE1555
[١٦٣]	ITK425	الستيولازم، خارج الخلية	١٧,٩	٤٢٥	٥١٩	(٦٣٨) ٦٨٦	٣٣٨٠	٢٣١٤	[١٦٠]	<i>M. succiniproducens</i> MBE1555
Methanococcus jannaschii										
[٢١٠]	IST436	الستيولازم، خارج الخلية	لا يوجد	(٤٣٦)	٥١٠	٦٠٩	١٧٢٩	١٦٦٤	[١٨٤]	<i>M. Jannaschii</i> DSM 2661
Streptococcus coelicolor										
[٢١١]	IB711	الستيولازم، خارج الخلية	٩,٢	٧١١	٥٠٠	(٧٠٠) ٩٧١	٧٧٦٩	٨٦٦٧	[١٨٥]	<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145
Aspergillus niger										
[٢١٧]	HD20	الستيولازم، البيوتكنديريا جليوكسينوم، خارج الخلية	٠,١	٢٠	٢٨٤	٣٥٥	١٤١٦٥	٣٣٩٠٠	[١٨٦]	<i>A. niger</i> CBS 513.88
[٢١٣]	JS988	الستيولازم، خارج الخلية	لا يوجد	(٩٨٨)	٣٣٤٩	٢٤٤٣	١٤١٦٥	٣٣٩٠٠	[١٨٦]	<i>A. niger</i> CBS 513.88 and <i>A. niger</i> ATCC9029
[٢١٤]	IMA871	الستيولازم، البيوتكنديريا حارج الخلية	٦,١	٨٧١	(٧٨٢) ١٠٤٥	(١١٩٠) ٢٢٤٠	١٤١٦٥	٣٣٩٠٠	[١٨٦]	<i>A. niger</i> CBS 513.88 and <i>A. niger</i> ATCC1015
Aspergillus nidulans										
[٢١٥]	HD666	الستيولازم، البيوتكنديريا جليوكسينوم، خارج الخلية	٧,٠	٦٦٦	(٥٥١) ٧٣٢	(٧٤٤) ١٢١٣	٩٥٠٠	٣١٠٠٠	[١٨٧]	<i>A. nidulans</i> FGSC A4
[٢١٦]	NW1184	الستيولازم، البيوتكنديريا حارج الخلية	٩,٨	١١٨٤	١٠٤٠	(١٦٧٩) ١٢٠٧٤	١٢٠٧٤	٣٧٠٠٠	[١٨٨]	<i>A. oryzae</i> R1840

المرجع	خصائص شبكة الأيض						أبعاد الجينوم		المرجع	الجينوم المسلسل
	السموخ ^١	التقسيمات ^٢	نسبة الجينوم المعطي ^٣	إجمالي الجينات (النزعات) ^٤	إجمالي نواتج الأيض (فريدة) ^٥	إجمالي التفاعلات (فريدة) ^٦	إجمالي ORFs ^٧	الحجم (كيلو قاعدة)		
[٢١٧]	IAO358	الستريلازيم، خارج الخلية	٣٠,٦	٣٥٨	٥٠٩ (٤٢٢)	٦٢١	٢٣٢١	٢٣٦٥	[١٨٩]	<i>L. lactis</i> IL1403
[٢١٨]	IBT710	الستريلازيم، خارج الخلية	٢٣,٦	(٧١٠) ٢١٠	٦٧٠	٧٠٤	٣٠٠٩	٣٣٠٨	[١٩٠]	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>L. plantarum</i> WFC51
[٢١٩]	YO844	الستريلازيم، خارج الخلية	٢٠,٦	٨٤٤	٩٨٨	١٠٢٠	٤١٠٥	٤٢١٤	[١٩١]	<i>B. subtilis</i> 168
[٢٢٠]	IAG534	الستريلازيم، خارج الخلية	١٣,٠	٥٣٤	لا يوجد	٥٦٣	٤١٠٥	٤٢١٤	[١٩١]	<i>B. subtilis</i> 168
[٢٢١]	ISB619	الستريلازيم، خارج الخلية	٢٣,٩	٦١٩	٥٧١	٦٤٠	٢٥٨٨	٧٨١٣	[١٩٢]	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. aureus</i> N315 (MRSA)
[٢٢٢]	IKK446	الستريلازيم، خارج الخلية	١٤,٩	٤٤٦	٤١١	(٤٤٦)	٢٩٩٣	٣٣٠٩	[١٩٣]	<i>C. glutamicum</i> Nakagawa
[٢٢٣]	INJ661	الستريلازيم، خارج الخلية	١٥,٠	٦٦١	٨٧٨	٩٣٩	٤٤٠٢	٤٤١١	[١٩٤]	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (lab strain)
[٢٢٤]	IDB726	الستريلازيم، خارج الخلية	١٦,٥	(٧٢٣) ٧٢٦	٧٣٩	٨٤٩	٤٤٠٢	٤٤١١	[١٩٤]	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (lab strain)
[٢٢٥]	IAF692	الستريلازيم، خارج الخلية	١٩,٢	٩٦٢	٥٥٨	٦١٩	٣٦٠٦	٤٨٣٧	[١٩٥]	<i>Methanosarcina barkeri</i> <i>M. barkeri</i> Fusato
[٢٢٦]	IRO363	الستريلازيم، خارج الخلية	٩,٠	٣٦٣	٣٧١	٣٨٧	٤٠٣٥	٤٣٨١	[١٩٦]	<i>R. elii</i> CFN42



الشكل رقم (٥, ٢). حيز التفاعل الكيميائي الحيوي كما وصف في النص.

يوضح الشكل رقم (٥, ٢) كلاً من حيز تفاعل كيميائي حيوي مفترض (أ) وتوازن أيضاً مفترض للكائن (ب). ويتم اقتراح حيز تفاعل كيميائي حيوي مكون من جزئين في (أ)، مع نواتج أيضاً فريدة A، B، C، D، E، وتعدُّ في شبكة لتفاعلات النقل المتبادل، وتفاعلات التحفيز، وتفاعلات النقل الداخلي. ويتم تعريف تفاعلات التحفيز في هذا السياق على أنها تفاعلات أيضاً بنائية أو هدمية، وتشمل تفاعلات النقل الداخلي. ويمكن أن يكون هذا بسبب أنه في حين يكون A₁، A₂ نواتج أيضاً متطابقة كيميائياً (على سبيل المثال، يعدُّ ناتج الأيض A ناتج أيضاً واحد وفريد)، ومن أجل النمذجة يتم اعتبارها نواتج أيضاً مستقلة، ويساوي نقل A من الجزء ١ (A₁) إلى الجزء ٢ (A₂) تحويل A₁ إلى A₂. ولذلك يتم اعتبار R₁، R₂، R₅، R₆، R₇ في الحقيقة تفاعلات أيضاً. ويتم عند ذلك اعتبار التفاعلات R₃، R₄، R₈، وR₉ تفاعلات نقل متبادل، حيث يدخل ناتج الأيض الخارجي (A_{EXT}) إلى النظام. وفي (b) يتم وضع المبادئ المطبقة على حيز التفاعل الكيميائي الحيوي النظري في إطار سياق الأيض الخلوي. ويؤخذ توازن التدفق (V_{n,i}) عبر ناتج الأيض X_i في الاعتبار، وتشمل أربعة تدفقات حاسمة: تدفقات النقل (V_{trans,i})، تدفقات التخليق (V_{syn,i})، تدفقات التحليل (V_{deg,i})، وتدفق يمثل نضوب ناتج الأيض X_i لتلبية متطلبات النمو والاستمرار (V_{gro,maint,i}). ويمكن تلخيص هذه التدفقات لتحديد تراكم ناتج الأيض X_i خلال حدود النظام بالنسبة للزمن. ومع ذلك، فإنه بالنسبة لمعظم تطبيقات تحليل توازن التدفق عادةً ما تكون مستويات الزمن للتغير الديناميكي في تجمعات نواتج الأيض أسرع بدرجة كبيرة من مستويات الزمن المرتبطة بالنمو، ولذلك، عادةً ما يتم افتراض وجود حالة ثبات (dX_i/dt = صفر).

وفي إعادة هيكلة شبكة الجينوم فإن كل من هذه التفاعلات يتم توضيحه بصورة أشمل عن طريق تحديد دالة لإطار قراءة مفتوح محدد (ORF)، وعليه يتم إعادة تركيب قائمة مفصلة لكافة التفاعلات ونواتج الأيض وإطارات القراءة المفتوح المحددة لها، بما في ذلك تعريف تلك التفاعلات ونواتج الأيض الفريدة (على سبيل المثال بصورة مستقلة عن التقسيم تمثل الجوانب الكيميائية الجديدة وتفاعلاتها الهدمية أو البنائية). وتشتق الطريقة التي يتم تطبيقها بعد ذلك من المبادئ الكلاسيكية للهندسة الكيميائية، حيث يتم أساساً إجراء توازن للكتلة عبر حدود نظام معرفة. (ملاحظة: في إطار التعليم الحديث، يرتبط توازن الكتلة والطاقة عادةً بمجال الهندسة الكيميائية؛ ومع ذلك، فمن منظور الأحياء ينشأ تحليل توازن التدفق من التوصيف الإنزيمي المبكر وتحليل المسارات الكيميائية الحيوية، كما نوقش أعلاه. ومن الناحية التاريخية فإنه من الضروري ذكر أن توازنات الكتلة والطاقة تنبع من قوانين الكيميائي جون دالتون، والتي تم توضيحها بالتجارب العملية بواسطة الكيميائي ميخائيل لومونوزوف [١١٣]).

ويمكن اعتبار اسلوب توازن الكتلة لمنتج أيضاً معين من الصورة النوعية:

(٢, ١)

$$\text{In} - \text{Out} + \text{Generation} - \text{Consumption} = \text{Accumulation}$$

الداخل - الخارج + الإنتاج - الاستهلاك = التراكم

ومن منظور التفاعل الكيميائي الحيوي يمكن تشكيل توازن الكتل أعلاه رياضياً إلى التعبير:

(٢, ٢)

$$\frac{dX_i}{dt} = V_{\text{syn},i} - V_{\text{deg},i} - V_{\text{gro,maint},i} \pm V_{\text{trans},i}$$

في المعادلة (٢, ٢) يتم تعريف تراكم ناتج الأيض X_i بالنسبة للزمن على أنه معدل التخليق ($V_{\text{syn},i}$) ناقص معدل التحليل ($V_{\text{deg},i}$) ناقص معدل الاستهلاك المرتبط بالنمو أو الحفاظ على الكتلة الحيوية الموجودة ($V_{\text{gro,maint},i}$)، وبعد ذلك جمع أو طرح معدل النقل ($V_{\text{trans},i}$) عبر حدود بيولوجية محددة (على سبيل المثال، الغشاء). وقد يمكن بعد ذلك كتابة المعادلة (٢, ٢) الموجودة في صورة عديدة، بطريقة مصفوفة، لتنتج المعادلة (٢, ٣).

(٢, ٣)

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot V \pm V_{\text{trans}}$$

وتمثل المعادلة (٢, ٣) توازن الكتلة خلال كل نواتج الأيض في حيز التفاعل الكيميائي الحيوي المأخوذ في الاعتبار، ذات التركيز X ، ثم تحديد عامل لكل التفاعلات الأيضية، V ، ومصفوفة كيميائية رياضية، S . وعادةً ما تكون مستويات الزمن البيولوجية المرتبطة بالتغيرات في تركيزات نواتج الأيض سريعة جداً، وأسرع بصورة أكبر من مستويات الزمن المرتبطة بالنمو (على سبيل المثال زمن التضاعف للسكرارومييسيس سيرفيسي حوالي ساعتين).

ولذلك فمن المنطقي افتراض أن تركيزات كل نواتج الأيض داخل الخلية تكون في حالة ثبات، مما يعطي المعادلة (٢, ٤):

$$(٢, ٤) \quad 0 = S \cdot V \pm V_{trans}$$

ويمكن تبسيط المعادلة (٢, ٤) أكثر بالأخذ في الاعتبار أنه يمكن خفض معدل نقل جميع نواتج الأيض، X ، إلى قيمة ثابتة تساوي مجموع نقل نواتج الأيض إلى أو خارج حيز التفاعل الحيوي. وهذا التبسيط يحول (V_{trans}) إلى ثابت، b ، وهو عامل يمثل محصلة تبادل تدفق نواتج الأيض. ويعبر عن هذه القيمة الثابتة، b ، لكل ناتج أبيض، في صورة مصفوفة في المعادلة (٢, ٥)، مع توضيح استخدام مصفوفة الهوية، I .

$$(٢, ٥) \quad 0 = S \cdot V + b \cdot I$$

وقبل المزيد من التبسيط، فإنه من المناسب أخذ المعادلة (٢, ٥) وتطبيقها على النظام الموضح في الشكل رقم (٢, ٥). ويوجد أدناه المصفوفة الكيميائية الرياضية، S ، والعامل الذي يصف كل التفاعلات الأيضية، V ، في المعادلة (٢, ٦). وعلاوةً على ذلك، فقد تم تمثيل العامل، b ، الذي يمثل محصلة تبادل تدفقات كل ناتج أبيض في المعادلة (٢, ٦) (لغرض التبسيط فإن مصفوفة الهوية غير مدرجة حيث إن $b \cdot I = b$). ولغرض التوضيح، فإن الصف العلوي لكل مصفوفة يعمل كرأس عمود. وفي حالة العامل b ، فبينما تم تحديد كل نواتج الأيض، فإن بعض نواتج الأيض فقط لها مجموع نقل، المعرف سابقاً كـ R_3, R_4, R_8, R_9 . ويتم تحديد نواتج الأيض تلك مع تفاعل النقل المقابل (R_n) كما هو موضح بالشكل رقم (٢, ٤).

$$(٢, ٦) \quad \begin{array}{c|ccccc} A_1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ B_1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ C_1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 1 \\ D_1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ E_1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ A_2 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ B_2 & -1 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ C_2 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 \end{array} \cdot \begin{array}{c} R_n \\ R_1 \\ R_2 \\ R_5 \\ R_6 \\ R_7 \end{array} + \begin{array}{c} b_n \\ (R_3)A_1 \\ (R_4)B_1 \\ C_1 \\ (R_8)D_1 \\ (R_9)E_1 \\ A_2 \\ B_2 \\ C_2 \end{array} = 0$$

ويمكن إعادة ترتيب المعادلة (٢, ٥)، وخاصةً مع التركيز على فصل نواتج الأيض التي لها محصلة تبادل تدفق. وتم هذا بالفعل عن طريق تعريف عامل جديد، b_i ، والذي سوف يشمل فقط صفوف نواتج الأيض التي لها محصلة تبادل تدفق (على سبيل المثال، لا يتم نقل كل نواتج الأيض عبر حدود النظام). وعليه، سوف يتم خفض أعمدة مصفوفة الهوية لنفس عدد الصفوف مثل العامل b_i ، وتسميته I_i . وعلاوةً على ذلك، يمكن تقسيم المصفوفة

الكيميائية الرياضية، S ، لتشمل الكيمياء الرياضية للتفاعلات المرتبطة بالهدم أو البناء الأيضي الأمر الذي ينتج عنه محصلة تراكم أو نقل لنواتج الأيض، المعرف بالـ S_r ، وإلى تفاعلات تشكل تكوين واستمرار الكتلة الحيوية، المعرف بالـ $S_{b,m}$. وأخيراً تتم معاملة مصفوفات الكيمياء الرياضية المعدلة بواسطة عوامل التدفق المقابلة، V_t و $V_{b,m}$. وأدناه توجد المعادلة النهائية الناتجة (٢, ٧).

$$(٢, ٧) \quad 0 = S_r \cdot V_r + S_{b,m} \cdot V_{b,m} + b_t \cdot I_t$$

وباستخدام توضيح للمصفوفة أكثر ألفة، يمكن إعادة صياغة المعادلة (٢, ٧) إلى المعادلة (٢, ٨):

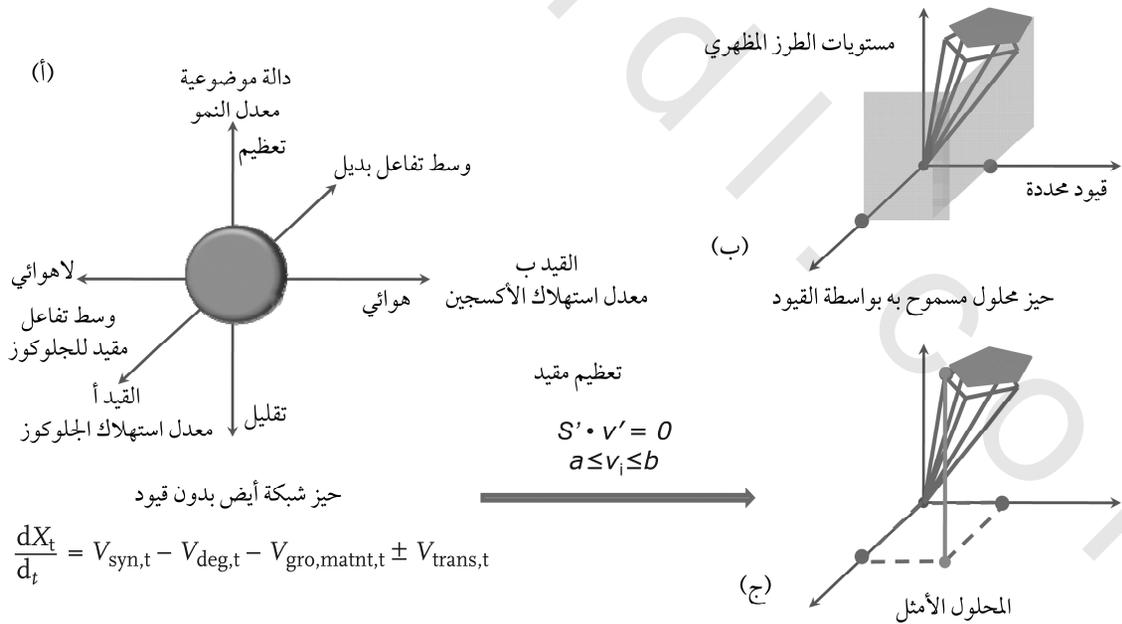
$$(٢, ٨) \quad \begin{aligned} S' &= \langle S_r | S_{b,m} | I_t \rangle \\ V' &= \begin{pmatrix} V_r \\ V_{b,m} \\ b_t \end{pmatrix} \\ S' \cdot V' &= 0 \end{aligned}$$

والصورة أعلاه (٢, ٨) هي الأكثر استخداماً في المراجع لتوضيح توازن التدفق لحيز تفاعل حيوي معرف كيميائياً ورياضياً، وهي مماثلة لما هو موجود في الشكل رقم (٢, ٥). وبعد هذه النقطة، يتم تضمين قيود إضافية والتي عادةً ما تكون خاصة بحيز التفاعل الحيوي المأخوذ في الاعتبار. وسوف تشمل هذه الاعتبارات، ولن تكون مقصورة على تقسيم ناتج الأيض والتفاعل، انعكاسية التفاعلات، ومحصلة معادلة الكتلة الحيوية (على سبيل المثال، محصلة جميع مرادفات نواتج الأيض، والعوامل المساعدة في الاختزال والأكسدة، والعوامل المساعدة للطاقة في كميات كيميائية رياضية)، والحد الأدنى والأقصى النظري لتدفقات نواتج الأيض، والحد الأدنى والأقصى لمعدلات النمو، كمية الـ ATP (أو وحدات الطاقة المكافئة) المطلوبة للاستمرار، وكمية التدفقات الأولية لتدفقات تبادل المدخلات (على سبيل المثال، معدل استهلاك الجلوكوز). وأخيراً، يجب تحديد دالة موضوعية، لكي يتم تعظيمها أو تقليلها، وعادةً ما تأخذ صورة المعادلة (٢, ٩)، حيث تكون Z هي دالة موضوعية تساوي محصلة منتج عامل الوحدة، q_i ، والتدفقات الأيضية، V_i ، حيث تكون q_i عادةً هي تدفق معدل النمو أو معدل استهلاك الجلوكوز. ويعمل كل من هذه التدفقات كعوامل تعظيم مناسبة لنمذجة الأيض داخل الخلية حيث يقترب معدل النمو الخاص للميكروبات، μ ، من μ_{max} ، تحت ظروف زيادة المواد المغذية ومحدودية وسط التفاعل. ولاحظ أن المعادلة (٢, ٩) تشمل قيود نواتج الأيض، V_i ، والتي عادةً ما تتراوح من قيمة صغرى (a) إلى قيمة عظمى (b):

$$(٢, ٩) \quad \begin{aligned} Z &= \sum q_i \cdot V_i \\ a &\leq V_i \leq b \end{aligned}$$

ويمكن حل نظام المعادلات الخطية الناتج، لدالة موضوعية معينة، باستخدام طرق البرمجة الخطية، والتي تتوفر لها عدة إجراءات حل رقمية. ويكون الناتج هو حيز حل والذي يمكن تمثيله على الأقل ببعدين أو على الأكثر بثلاثة أبعاد، والتي يتم من خلالها تعريف حيز النمط الظاهري. ويوضح الشكل رقم (٦، ٢) ما يعرف عادةً بمستوى النمط الظاهري (PhPP)، حيث يستخدم حيز حل ثنائي أو ثلاثي الأبعاد للمحاكاة حيث يؤخذ تعظيم دالة موضوعية في الاعتبار تحت قيود معينة، مثل تعظيم معدل النمو في ظل ثبات معدل استهلاك الجلوكوز (q_{gluc})، واستهلاك الأوكسجين (q_{O2}).

يعد الشكل رقم (٦، ٢) ملخصاً لمستويات النمط الظاهري التي تنتج من تحليل توازن التدفق، والذي له أصول في تادية توازن الكتلة الثابت لنواتج الأيض عبر حدود نظام محددة. وكما هو موضح في الشكل رقم (٦، ٢ أ)، فإنه يمكن رسم شبكة الأيض المعاد هيكلتها الناتجة في بعدين أو ثلاثة أبعاد. ويمثل المحور y دالة موضوعية، والتي يمكن تعظيمها أو تقليلها، في حين يمثل البعدين الآخرين (z, x) قيود التدفق. وتشمل القيود الشائعة معدلات استهلاك الجلوكوز والأوكسجين، والتي سوف تخلق حيز حل مقيد، حيث يمكن تعظيم الدالة الموضوعية، عادةً معدل النمو، كما هو موضح في الشكل رقم (٦، ٢ ب). ويؤدي مستوى النمط الظاهري الناتج (الشكل رقم ٦، ٢ ج) إلى حل مثالي والذي يلائم خصائص التعظيم.



الشكل رقم (٦، ٢). تحليل توازن التدفق ومستويات النمط الظاهري.

وقد تم تطبيق المنهج الموصوف هنا في تحليل توازن التدفق لعدة كائنات كما هو موضح في الجدول رقم (٤، ٢)، وقد عمل بصفة خاصة كأداة أساسية في مناهج الهندسة الأيضية، وحديثاً في بيولوجيا الأنظمة. وبيولوجيا الأنظمة هو التوصيف الكمي لاستجابة المسارات الوراثية والتعبيرية والبروتينات والأيض والإشارات والمسارات المعلوماتية الأخرى وتفاعلها مع الاضطرابات المحددة بوضوح في نظام حيوي. ويمكن أن يكون الاضطراب في شكل محفز وراثي أو كيميائي أو بيئي. ويوجد في قلب بيولوجيا الأنظمة تحويل مجموعات البيانات الكمية، عادةً على المستوى الكبير، إلى النماذج الحاسوبية التي تقدم كلاً من التفسير والتوقع. وتوفر الـ GSMMS إطاراً لكيفية تنظيم بيانات الأوميات ووضعها في شبكة أيضية. وبعدها أصبحت التقنيات متاحة لقياسات الترانسكريبتوم (مصفوفات أوليجونيوكلويدات الدنا والدنا الحلقي)، البروتيومات (الفصل الكهربائي الموازي بالهلام ثنائي الأبعاد مع تحليل الكتلة الطيفي أو الكتلة الطيفي المباشر)، الفلوكسومات (الوسائط المعلمة بالنظائر المشعة والتعيين بواسطة تحليل الكتلة الطيفي والفصل اللوني الغازي)، والميتابولومات (عدة طرق تحليلية تشمل تحليل الكتلة الطيفي والفصل اللوني السائل والغازي)، فقد تم الحصول على مجموعات هائلة من البيانات والتي تتطلب تطوير المعلومات الحيوية والنماذج الكمية لتحليل وتفسير وتوقع المعلومات. وبدأت التقنية الحيوية الصناعية في استغلال فوائد هذه الأدوات والتعرف على إستراتيجيات الهندسة الأيضية لتطوير العمليات المحسنة بدايةً باستخدام البرامج الحاسوبية، وإنتاج قائمة محدودة من الاضطرابات الوراثية ذات احتمالية نجاح كبيرة والتي يجب تقييمها عملياً. وتكون العملية شديدة التكرار، مع هيكلية وتوصيف السلالة موفرةً بيانات أوميات جديدة والتي يمكن أن تستخدم لتحسين النماذج (على سبيل المثال، ضبط الجودة العملية باستخدام البرامج الحاسوبية) وإستراتيجيات الهندسة الأيضية (الشكل رقم ٢، ٢).

(٧، ٢) دراسات حالة لبيولوجيا الأنظمة الصناعية Industrial Systems Biology Case Studies

كانت هناك دراسات ومراجع موسعة مكثفة تصف التقنية الحيوية الصناعية، وتوضح عدة دراسات حالة مميزة [٧٣، ٧٥، ١١٤-١١٥]. وكما تم اقتراحه مسبقاً، تتوفر بيولوجيا الأنظمة الصناعية في صورتين: تبني الشركات الموجودة بنيتها التحتية من خلال إعادة هيكلة الكفاءات الداخلية أو تكوين مجموعات جديدة ذات قدرات وخبرات في بيولوجيا الأنظمة الصناعية لتطوير العمليات، أو تجذب المتخصصين في تطوير العمليات من الخارج إلى هيئات صغيرة حديثة التكوين، والتي تخصص في بيولوجيا الأنظمة الصناعية. وتشمل أمثلة هذه الشركات التي ركزت على توفير خبرات بيولوجيا الأنظمة الصناعية لمجموعات تطوير العمليات التقليدية METabolic EXploere (فرنسا، أنشئت عام ١٩٩٩م)، Genomata (الولايات المتحدة الأمريكية، أنشئت عام ٢٠٠٠م)، Fluxome Sciences

(الدنمارك، أنشئت عام ٢٠٠٢م)، و Microbia Precision Engineering (الولايات المتحدة الأمريكية، وهي تابعة من Ironwood Pharmaceuticals، سابقاً Microbia). وعلى الرغم من صغر هذه الشركات، إلا أنها تمتلك تعاونات هائلة مع الكثير من الشركات الكبرى لتصنيع الكيماويات، والدوائيات، والبتروكيماويات.

وقد كان لعلم بيولوجيا الأنظمة الصناعية، خلال نشأته، الأثر الكبير على المنتجات الملموسة المنتجة باستخدام التقنية الحيوية الصناعية. وعلى الرغم من إمكانية تقديم عدة منتجات كدراسات حالة، فإن السياق الأكثر مناسبةً لتحديد تأثير بيولوجيا الأنظمة الصناعية هو اعتبار ثلاث فئات من المنتجات الأكثر شمولاً: (١) منتجات ناضجة ومطورة (مثل الإيثانول الحيوي)، (٢) منتجات حديثة وسريعة التطور (على سبيل المثال، ١، ٣- بروبان دايل)، و (٣) منتجات قيد التطوير (مثل حمض السكسينيك). وقد تأثرت كافة تلك المنتجات المقدمة كأثلة بشكل كبير بتطبيق بيولوجيا الأنظمة لتطوير مصانع الخلايا الميكروبية بصورة تجارية.

(١، ٧، ٢) منتج تقني حيوي صناعي ناضج ومطور: الإيثانول الحيوي

A Mature and Developed Industrial Biotechnology Product: Bioethanol

كما تم توضيحه مسبقاً، فإن الإيثانول الحيوي هو أكبر منتج للتقنية الحيوية الصناعية في العالم من حيث الإنتاجية الكمية وإجمالي المبيعات، والذي يتوسع بشكل كبير بواسطة الدعم المؤسسي والاجتماعي والسياسي غير المسبوق [١٠]. في عام ٢٠٠٧م، زاد إجمالي عدد المصافي الحيوية التي تنتج الإيثانول الحيوي في الولايات المتحدة الأمريكية من ١١٠ تعمل في ١٩ ولاية إلى ١٣٩ في ٢١ ولاية. وفي العام نفسه، ازدادت سعة الإنتاج السنوية بحوالي ٦، ٧ مليار لتر تقريباً لتصل لقدرة إجمالية سنوية في الولايات المتحدة الأمريكية تقدر بـ ٢٩، ٩ مليار لتر، مما يمثل أعلى نسبة من إجمالي قدرة الإنتاج العالمية المقدرة بـ ٤٩، ٦ مليار لتر. وفي ١٩ ديسمبر ٢٠٠٧م، طبقت الولايات المتحدة قانون أمن واستقلال الطاقة لعام ٢٠٠٧م، الذي يعد امتداداً لمعيار الوقود المتجدد التي تم سنها في إطار قانون سياسة الطاقة لعام ٢٠٠٥م. ويفترض التشريع الذي تم تطبيقه مؤخراً حدوث التطبيق الإجمالي للوقود الحيوي المتجدد بين عامي ٢٠٠٨-٢٠٢٢م، في حين يجب أن تنمو منتجات إجمالي الوقود المتجدد الإجمالي من ١، ٣٤ إلى ٣، ١٣٦ مليار لتر، على التوالي. وبالإضافة إلى ذلك، يجب أن ينتج ٣، ١٣٦ مليار لتر من الوقود المتجدد من ٦، ٤١٪ من الوقود الحيوي المتجدد و ٣، ٥٨٪ من الوقود الحيوي المتطور، ويتعين أن يشق على الأقل ٤٤٪ أو ٦، ٦٠ مليار لتر من الوقود الحيوي المطور من الكتلة الحيوية السليلوزية [١١٦]. وفي المستقبل القريب، فسوف يستمر الإيثانول الحيوي في التوسع كمنتج التقنية الحيوية الأكثر نضجاً وتطوراً، مع الطلب غير المحدود على إستراتيجيات الهندسة الأيضية المتطورة وتطبيقات أدوات بيولوجيا الأنظمة لتحسين كل قطاعات تطوير عملية الإيثانول الحيوي.

يستخدم منتجي الإيثانول الحيوي مجموعة من منصات التخمير؛ ومع ذلك، فإن السكرارومييسيس سيرفيسي تعد من بين الأكثر شهرة لثباتها في عمليات التخمير على المستوى الكبير (> ٣٠٠٠٠٠ لتر). وقد تم الإعلان عن أول نموذج أيضاً على مستوى الجينوم للخلايا حقيقية النواة في السكرارومييسيس سيرفيسي في ٢٠٠٣م [٢٠]. ويمكن أن تتوقع إعادة هيكلة شبكة الجينوم، باستخدام بيئة تخليقية بسيطة نسبياً بـ ٨٨٪ من أنماط النمو الظاهرية بشكل صحيح. وفي تقييم آخر، تم استخدام نفس نموذج شبكة الأيض لإنتاج تحليل مستوى نمط ظاهري (PhPP) يصف حالات أيضاً الخميرة عند مختلف مستويات توفر الجلوكوز والأكسجين [١١٧]. وقد أدى فحص الـ PhPP للسكرارومييسيس سيرفيسي إلى تعريف خطين من المثالية: خط مثالية النمو، الذي يمثل الإنتاج الأقصى للكتلة الحيوية خلال النمو الهوائي محدود الجلوكوز، وخط مثالية الإيثانول، والذي يمثل كلاً من الإنتاج الأقصى للإيثانول والنمو الأقصى خلال الظروف الهوائية الدقيقة. وقد تم مقارنة هذا التوقع للـ PhPP للسكرارومييسيس سيرفيسي ببيانات عملية مستقلة، وأظهرت النتائج توافقاً قوياً بين معدلات النمو الخاصة، والاستهلاك والإنتاج المقدر حاسوبياً والمقاسة عملية. ولذلك، يمكن استخدام إعادة هيكلة شبكات الأيض والمحاكاة لتوفيق البيانات الموجودة للسكرارومييسيس سيرفيسي بصورة نظامية، وخاصةً بعد توسع وإتاحة مصادر الخميرة، وقواعد البيانات، والأدوات للتحليل العالمي لبيانات الجينوم، مثل قاعدة بيانات جينوم السكرارومييسيس [١١٨، ١٦-١٢٠].

وقد تم توضيح استخدام نماذج الأيض لتعظيم إنتاج الإيثانول الحيوي في السكرارومييسيس سيرفيسي في دراستين. تم استخدام نموذج بسيط لتوضيح حذف إنزيم الجلوتامات ديهيدروجينيز المعتمد على الـ NADPH، والتعبير المفرط لإنزيم الجلوتامات ديهيدروجينيز المعتمد على الـ NADH، والذي أدى إلى زيادة إنتاج الإيثانول مع تقليل إنتاج المنتج الثانوي الجليسرول بـ ٤٠٪ [١٢١]. وفي دراسة ثانية، تم استخدام نموذج الأيض على مستوى الجينوم السابق ذكره لتعريف هدف جديد لتحسين إنتاج الإيثانول الحيوي عن طريق إدخال إنزيم الجليسرالدهيد ديهيدروجينيز المكون للـ NADPH. وقد أدى هذا إلى زيادة تكوين الإيثانول الحيوي مع تقليل تكوين الجليسرول [١٢٢]. وفي كلٍ من هذين المثالين تم تعديل أيضاً الأكسدة والاختزال، وبصورة عامة فقد ثبت فعالية هذا النهج في تحسين الكثير من العمليات الحيوية، حيث إن عوامل الأكسدة والاختزال الـ NADH والـ NADPH تشارك في عدد كبير من التفاعلات.

ومع شيوع الآليات التجريبية لجمع بيانات الترانسكريبتومات، فإنه يتم حالياً الاهتمام والتركيز على طرق تحليل ودمج البيانات بمجموعات بيانات الأومييات الأخرى. وقد أصبح واضحاً أن بيانات الترانسكريبتومات وحدها، مالم تستخدم في الفحص البيئي أو ضبط الجودة (على سبيل المثال، التأكد من أن الطرز الجيني ينتج الصورة التعبيرية المقابلة)، تقدم تفسيراً بيولوجياً ألياً محدوداً لأساليب الهندسة الأيضية. وقد دمجت عدة دراسات

بيانات الترانسكريبتومات مع الميتابولومات والفلوكسومات [١٨، ١٢٣-١٢٥]. فعلى سبيل المثال تم تعيين طرق التدفق الأولية لوسائط التفاعل ثلاثية الكربون (الجلوكوز، الإيثانول، والجالاكتوز) باستخدام تفاعلات أيض هدمية من نموذج الأيض على مستوى الجينوم للسكرارومييسيس سيرفيسي، واستخدمت بعد ذلك في تحليل حذف الجين في الطرز الظاهري. وقد استخدمت تدفقات محكومة التأثير لتوقع نسب تعبير جينات الأيض للنمو في وجود كل وسط تفاعل، مما أدى إلى علاقة ارتباط عالية بين مستويات التعبير النظرية والمعملية لـ ٣٨ جين عند استعمال بيانات الإيثانول والجلوكوز [١٢٦]. ويوضح هذا المثال أن دمج وظائف التعبير والتنظيم في شبكات الأيض للتوقع باستخدام البرامج الحاسوبية يوفر كلاً من النماذج الحيوية المعبرة، ووسائل لربط بيانات الترانسكريبتومات والفلوكسومات.

وفي مثال آخر، تم فحص طبيعة نموذج الأيض على مستوى الجينوم المهيكل للسكرارومييسيس سيرفيسي عن طريق ربط بيانات التعبير مع الأيض. وبصفة خاصة، فقد تم تطوير لوغاريتم يمكن من تحديد نواتج الأيض والتي تحدث تغيرات التعبير الأكثر أهمية حولها (يشار إليها بنواتج الأيض المخبرة) [٢٣٠]. وبسبب الطبيعة عالية الارتباط والتكامل للأيض، فإن الاضطرابات الوراثية أو البيئية المدخلة إلى موضع وراثي معين تؤثر في نواتج أيض معينة وتنتشر بعد ذلك خلال شبكة الأيض. وباستخدام بيانات الترانسكريبتومات التجريبية، يمكن توقع نواتج الأيض التي يمكن أن تتأثر، وتعمل كأهداف منطقية للفحص الإضافي والهندسة الأيضية. وقد تم توسيع هذا اللوغاريتم حديثاً ليشمل التفاعلات المخبرة، حيث تم ربط بيانات التعبير بالتفاعلات الأيضية لنموذج شبكة الأيض على مستوى الجينوم للسكرارومييسيس سيرفيسي المعاد هيكلتها من أجل تحديد هذه التفاعلات والتي تؤدي إلى اضطرابات الوراثية أو البيئية حولها إلى مجموعة تغيرات [١٢٧].

كانت هناك عدة أمثلة حيث ساهمت قياسات وتحليل التدفق بشكل كبير في تطوير سلالات إنتاج الإيثانول الحيوي، ولا سيما فيما يتعلق بهندسة تخميرات هيكلية التخمرات التي تستخدم الزيلوز والبتوز. وكما تم توضيحه سابقاً، سوف يكون تحويل الإيثانول الحيوي من مصادر الكتلة الحيوية السيلولوزية حاسماً في الوفاء بمعايير الوقود المتجدد، ويمثل الزيلوز أحد أكثر أنواع السكر الخماسية استخداماً في الهيميسيلولوز، ومخلفات الأخشاب الصلبة والمحاصيل، وثاني أكثر السكريات الأحادية استخداماً بعد الجلوكوز [١٢٨]. وبسبب عدم استطاعة السكرارومييسيس سيرفيسي استهلاك السكريات الخماسية بكفاءة، مقارنةً بالجلوكوز، فقد تم إجراء بحوث مهمة في هندسة أيض هذه السلالات. على سبيل المثال، فقد قارن جروتكاير وزملاؤه صور التدفق لسلاستي سكارومييسيس سيرفيسي معدلتين وراثياً، TMB3001 وCPB.CR4، وكلاً منهما تعبر إنزيم الزيلوز ريداكتيز (XR) والزيليتول ديهيدروجينيز (XDH) من بيشيا ستيتيس، والزيلوكينيز الأصلي (XK)، ولكن اشتملت سلالة الـ

CPB.CR4 على حذف لجين الـ *GDHI* وتم وضع الـ *GDH2* تحت بادئ *PGK* [١٢٩]. ويؤدي تعبير الـ *XR*، *XDH* و *XK* إلى استخدام غير كفء للزيلوز؛ بسبب عدم توازن عامل مساعد، حيث يجب إنتاج المزيد من الـ *NADH* بواسطة إنتاج الزيليتول، مما يؤدي إلى تقليل إنتاج الإيثانول. ولذلك فإن الهندسة الأيضية لاستخدام الأمونيا عن طريق حذف إنزيم الجلوتامات ديهيدروجينيز المعتمد على الـ *NADPH* (*GDHI*)، والتعبير المفرط لإنزيم الجلوتامات ديهيدروجينيز المعتمد على الـ *NADH* (*GDH2*) أدت إلى زيادة عائد الإيثانول بمقدار ١٦٪؛ بسبب خفض الزيليتول بمقدار ٤٤٪ [١٢٩، ١٣٠]. وباستخدام منهج الهندسة الأيضية العكسية تم استخدام تحليل تدفق الأيض لتوصيف التدفقات داخل الخلية لكل من السلالتين اعتماداً على البيانات المعملية للزراعات المستمرة اللاهوائية باستخدام نمو محدود التغذية بجلوكوز مشع بالكربون ١٣، مما أكد تحول نشاط الـ *XR* من اعتياده عادةً على الـ *NADPH* إلى اعتياده جزئياً على الـ *NADH* في سلالة CPB.CR4.

علاوةً على ذلك، فقد أوضح التحليل، وبصورةٍ غير متوقعة، تنشيط دورة الجليكوزيلات في سلالة CPB.CR4، منتجاً التساؤل عما إذا كان تنشيط دورة الجليكوزيلات مفضلاً لإنتاج الإيثانول. وقد أمكن فقط، بواسطة قياسات وتحليل التدفق اعتماداً على شبكة أيض مهيكلة مخنزلة، التأكد من أن توزيع الكربون قد تم تغييره عن طريق الوراثة الاستهدافية.

في مثالٍ منفصل يعالج مسألة توازن الأكسدة والاختزال الناتجة من تخمير الزيلوز مرةً أخرى، تم استخدام تحليل تدفق الأيض لتوقع أن تنشيط مسار الفسفوكيتولوز (*PKP*)، والذي يؤدي إلى محصلة إعادة أكسدة الـ *NADH* لكل زيلوز محول إلى الإيثانول، يمكن أن يكون مفضلاً [١٣١]. ويحول الـ *PKP* الزيلوز خماسي الفوسفات إلى أسيتيل فوسفات وجليسرالدهيد ثلاثي الفوسفات، مما يتيح العائد النظري الأقصى وهو ٥,٠ جم إيثانول/جم زيلوز بدون التأثير على نسبة استهلاك الـ *NADPH/NADH* في تفاعل الـ *XR*. وقد تمت إعادة هيكلة *PKP* وظيفي في السلالة TMB3001c وتمت زيادة عائد الإيثانول بمقدار ٢٥٪ نتيجة تقليل تكوين الزيليتول؛ ومع ذلك، فقد توقع تحليل تدفق الأيض أن فقط ٣٠٪ من التدفق الأمثل المطلوب؛ لمنع تراكم الزيليتول والجليسرول يكون موجوداً. ومع ذلك، فقد أدت زيادة التعبير المفرط للـ *PKP* إلى زيادة معدل استهلاك الأسيئات وتقليل معدل استهلاك الزيلوز، مما حفز الباحثين لزيادة تعبير إنزيم الأسيئالدهيد ديهيدروجينيز *ald6*. وقد قلل هذا من تكوين الأسيئات، وأنتج سلالة ذات عائد إيثانول أعلى بـ ٢٠٪ ومعدل استهلاك زيلوز أعلى بـ ٤٠٪ مقارنةً بالسلالة الأصلية [١٣٢].

ويخدم تحليل تدفق الأيض غرضين: التحديد البديهي لأهداف الهندسة الأيضية المفضلة والتأكيد المعملية لتوزيعات تدفق الكربون، وكلاً منها غير ممكن اعتماداً على الفحص البصري للمسارات الكيميائية الحيوية.

وهناك الكثير من أمثلة تكامل مختلف تقنيات الأوميات مع إعادة هيكلة الأيض الميكروبي على مستوى الجينوم لشرح الطرز الظاهرية غير المفهومة سابقاً، أو للتوقع الجديد لإستراتيجيات الهندسة الأيضية في سياق تطوير عملية الإيثانول الحيوي [١٠، ١٣٣].

(٢، ٧، ٢) منتج تقني حيوي صناعي حديث وسريع التطور: ١، ٣-بروبان دايلول

A Recently Launched and Rapidly Growing Industrial Biotechnology Product: 1,3-Propanediol

إن ١، ٣-بروبان دايلول، المنتج بواسطة منصة التقنية الجديدة لشركة دوبونت، شركة دوبونت للمواد القائمة على المصادر الحيوية، والمسمى Bio-PDOTM، هو مثال لمنتج حديث، والذي كان ينتج في السابق بواسطة التحويل البتروكيميائي، ويتم توفيره حالياً بواسطة التقنية الحيوية الصناعية. يعد الـ PDO مركب وسيط حاسم في إنتاج حمض التيريفيثالك وبوليمرات الـ PDO، المستخدمة عادة في صناعات القماش والألياف والسجاد، ويعمل كمركب وسيط في منصة دوبونت الجديدة للـ Sorona[®]. وقد تشاركت دوبونت مع شركة تات وليلي لإنتاج الـ PDO الحيوي باستخدام منصة تخمير خاصة اعتماداً على تحويل إيشيريشيا القولون للـ دي-جلوكوز إلى داي هيدروكسي أستيتون فوسفات (DHAP)، ثم إلى جليسرول وفي النهاية إلى الـ PDO.

وقد تم اكمال تطوير مصنع الخلايا الميكروبية بالتعاون مع شركة جينيكور الدولية. (ملاحظة: كانت جينيكور الدولية، التي أنشئت عام ١٩٨٢م، مشروع مشترك بين جينيتيك وكورننج للزجاجيات (دو كورننج) وهي مسئولة عن الكثير من الاكتشافات المهمة في تقنية الدنا المعدل. في ٢٠٠٥م استحوذت شركة مكونات الغذاء الدنماركية دانيسكو على جينيكور الدولية). وقد تم استكمال مرافق الإنتاج في عام ٢٠٠٦م وبدأ الإنتاج في نوفمبر ٢٠٠٦م. وباستخدام الذرة كمصدر أولي رئيس، سوف تنتج ٤٥ مليون كجم/ عام بكامل قدرتها [١٣٤].

ويؤدي تقييم الدورة الحياتية لإنتاج بوليمر النيلون ٦ مقابل إنتاج المصدر المتجدد Sorona بالـ Bio-PDO إلى ٣٠٪ أقل في استخدام الطاقة و ٦٣٪ أقل في انبعاثات غازات الاحتباس الحراري (بما في ذلك المحتوى القائم على المصادر الحيوية المخزن في المنتج) [١٣٥]. وقد ثبت أن عائلة بوليمرات الـ Sorona، المكونة من الـ Bio-PDO والقادرة بالتالي على حث استجابة التهائية، تكون غير سامة وغير التهائية [١٣٦]. ويقدر الطلب على البوليمرات المكونة من الـ PDO بـ ٥٠٠٠٠٠٠-١٠٠٠٠٠٠٠ طن سنوياً [١٣٧].

يعد الـ PDO من بين أحد أقدم منتجات التخمير. وقد تم تعريفه لأول مرة بواسطة أوجست فرويند في عام ١٩٨١م في مزرعة مختلطة لتخمير الجليسرول من الكلوستريديوم باستوريانوم [١٣٨]، وتم تحليله لاحقاً بصورة كمية في مدرسة الميكروبيولوجي في ديلفت [١٣٩] واستمر في شركة إيمس، أيوا [١٤٠]. وقد تم الاستعراض المكثف للعملية البتروكيميائية الأصلية التي تقوم بها شركة شل الكيميائية (قسم من مجموعة شل، هولندا) وشركة

ديجوسا (ألمانيا؛ حصلت دوبونت لاحقاً على عمليتها)، ومسح إنتاج الـ PDO بواسطة الكثير من البكتيريا، بما في ذلك أجناس السيتروباكترا، والكلوستريديوم، والإنثيروباكترا، والكلبيسيلا، واللاكتوباسيلاس، وتحليل هندسة التفاعل الحيوي التي تم إجراؤها مبدئياً لتقييم جدوى الإنتاج بالتقنية الحيوية الصناعية للـ PDO [١٣٧، ١٤١-١٤٣]. في الكائنات الأصلية التي تنتج الـ PDO، يكون تكوين الـ PDO؛ نتيجة التخمر اللاهوائي للجليسرول حيث يتم إنتاج زيادة من المكافئات المختزلة في صورة NADH (NAD⁺) بواسطة نشاط الجليسرول هيدراتيز (*dhaB1-B3*) متبوعاً بنشاط ١،٣-بروبان دايلول أو أكسيدوريداكتيز (*dhaT*) [١٣٧]. وبسبب الفائدة الكبيرة لتكلفة استخدام مصادر الجلوكوز الأولية، فقد تم تطوير إستراتيجية هندسة أيضية تتطلب التعبير غير المتماثل للمسارات التي تحتم إعادة توجيه تدفق الكربون من DAHP إلى الـ PDO. ولم توضح التعديلات الوراثية الأساسية التي تم تطبيقها في دعامة بكتيريا من إيشيريشيا قولون أي تراكم للـ PDO وأن التراكم البسيط نسبياً للجليسرول (بالمقارنة بالخلات أو السكسينات)، كما تم تفصيله بواسطة ناكامورا وزملاؤه يشمل:

- التعبير المفرط لإنزيمات الجليسرول-٣-فوسفات ديهيدروجينيز (DAR1) والجليسرول-٣-فوسفات فوسفاتيز (GPP2) غير الأصلية (السكراروميسيس سيرفيسي) لتراكم الجليسرول.
- التعبير المفرط لإنزيم الجليسرول ديهيدراتيز (DAR1) والعوامل التي تعيد تنشيط فيتامين ب_{١٢} غير الأصلية (الكلبيسيلا نومونيا) لتحويل الجليسرول إلى ٣-هيدروكسي بروبيونالدهيد.
- التعبير المفرط لإنزيم الأوكسيدوريداكتيز الأصلي (*yghD*) لإكمال تحويل ٣-هيدروكسي بروبيونالدهيد إلى PDO؛ ومع ذلك باستخدام NADPH في مقابل NADH.
- حذف إنزيمات الجليسرول كينيز (*glpK*)، الجليسرول ديهيدروجينيز (*gldA*)، والترايوزفوسفات أيزوميريز (*tpi*) الأصلية (الضرورية لتعظيم تدفق الكربون من الجلوكوز إلى الـ DHAP، مع أقل إعادة للكربون إلى الجليسرالدهيد-٣-فوسفات، ومن ثم دورة الـ TCA والتنفس).
- التنظيم الثقيلي لنظام الفوسفوترانسفيريز الأصلي (PTS) وإنزيم الجليسرالدهيد ديهيدروجينيز (*gap*)، ويستبدل الأول بعملية فسفرة حصرية تعتمد على الـ ATP (نزع الاعتمادية على الفوسفوينول بيروفات) باستخدام إنزيمات الجالاكتوز بيرميس (*galP*) والجلوكوكينيز (*glk*) الأصلية، وزيادة الأخير بإنزيم *tpi* أصلي معاد هيكلته. وتوفر إعادة هيكلته الـ *tpi* في خلفية الـ *gap* نقطة تحكم تدفق مفيدة.
- ويؤدي دمج التعديلات أعلاه، بالإضافة إلى الإستراتيجيات التي ظلت محمية بحقوق الملكية الفكرية، إلى إيجاد إيشيريشيا قولون قادرة تحت ظروف التغذية الدفعية على إنتاج الـ PDO بعائد نهائي ٥١٪ (وزن PDO/ وزن جلوكوز)، وتركيز ١٣٥ جم/ لتر، وإنتاجية ٥،٣ جم/ لتر/ ساعة [١٣٧].

يعد الـ PDO الحيوي من بين قصص النجاح الأولى للهندسة الأيضية والتقنية الحيوية الصناعية في صناعة الكيماويات ذات القيمة المضافة. إلا أنه يجب التأكد من أنه للوصول إلى هذه المرحلة فقد تم هذا على مدار عشر سنوات من التطوير والاستثمار في الموارد المهمة. وبالإضافة إلى ذلك، فإنه استناداً على المراجع المتاحة وعروض المؤتمرات، فإن العملية الموصوفة هنا تطلبت تطويراً هائلاً لتقنية الدنا المعدلة، وتوصيف الإنزيم، وتحليل مسارات إنزيمات التفاعلات الحيوية الكلاسيكي، والتي لم تكن متاحة أثناء التطوير. وعليه، فإن الكثير من أدوات بيولوجيا الأنظمة المتاحة حالياً لم تستخدم خلال مرحلة تصميم وتطبيق إستراتيجية الهندسة الأيضية.

وحالياً، يتم تطبيق النمذجة الأيضية للأبيض الميكروبي للـ PDO الحيوي لتأكيد النمط الظاهري المتوقع لتوزيعات التدفق داخل الخلية، ولتحديد الفرص المحتملة للجيل الثاني من إستراتيجيات الهندسة الأيضية. وبصورة خاصة، فقد تم تطوير تحليل تدفق الأبيض (MFA) لتمكين القياس الديناميكي لتوزيعات التدفق داخل الخلية باستخدام الجلوكوز المعلم بالنظائر (^{13}C -1) في تخميرات التغذية الدفعية لإيشيريشيا القولون K12 (سلالة تنتج الـ PDO الحيوي بافراط) بنسبة ١:٣ من الجلوكوز المخصب طبيعياً (^{13}C -U). وقد استكملت شبكة أبيض مهيكلية تفصيلياً، والتي تشمل ٧٥ تفاعلاً و٧٤ ناتج أيضاً، وخمسة أوساط تفاعل (الجلوكوز، السترات، الأوكسجين، الأمونيا، والكبريتات)، وخمسة منتجات (PDO، الكتلة الحيوية، ثاني أكسيد الكربون، الخلات، وATP)، و٦٣ ناتج أيضاً متوازن داخل الخلية [١٤٤].

وقد عانى تحليل تدفق الأبيض السابق تطويره من قيود افتراض وجود حالة ثبات من النظائر؛ بسبب مستويات الزمن القصيرة نسبياً لمجموعات تركيز نواتج الأيض داخل الخلية. وقد قام أنتونيفيتز وزملاؤه بتوسيع مجال تحليل التدفق من الحالة الثابتة إلى البيئات المتغيرة بواسطة إستراتيجية نمذجة والتي تطبق مشتقات التحليل الطيفي النظائري، وتحليل تدفق الأبيض الكلاسيكي اعتماداً على توزيعات نظائر كتل الأحماض الأمينية التي تم تحديدها عن طريق نمذجة وحدة الأيض الابتدائية (EMU) [١٤٤، ١٤٥]. وفي المرة الأولى تم تحليل التدفقات داخل الخلية بالنسبة للزمن لعملية التغذية الدفعية الصناعية لإنتاج الـ PDO الحيوي، وشملت ٨٢ قياسات غزيرة خلال عشرين نقطة زمنية.

وقد وجد أن توزيعات التدفق داخل الخلية تتغير بكثافة خلال مرحلة التغذية الدفعية، مظهراً نقصاً في نسبة الانقسام بين تحليل الجلوكوز ومسار البنتوز فوسفات (PPP) من ٧٠/٣٠ عند ٢٠ ساعة إلى ٥٠/٥٠ عند ٤٣ ساعة، ونقص في التدفق من الجليسرالدهيد-٣-فوسفات إلى ٣-فوسفوجليسرال بحوالي ٢١٪ خلال نفس الفترة الزمنية. وزاد التدفق من الـ DHAP إلى الجليسرول-٣-فوسفات وفي النهاية PDO بحوالي ١٠٪ وظل ثابتاً عند ١٣٢ ساعة. ومع ذلك، فقد تغير خروج الـ PDO بصورة كبيرة حيث زاد من ٧٨ (٦، ١٨ ساعة) إلى ١٣٨ (٦، ٢٨ ساعة) ثم

انخفض بعد ذلك إلى ١٣٠ (٧, ٤٠ ساعة) (تم نسب كل قيم التدفق إلى معدل استهلاك الجلوكوز من ١٠٠). وفي خلال الفترة الزمنية نفسها، فقد ظل مسار إنتاج الطاقة الأولي، تدفق ال-TCA، ثابتاً عند ٤٦.

وتوفر النمذجة الأيضية في حالة تقييمات التدفق وشبكة الأيض المهيكلية التأكد من أن الهندسة الوراثية المعتقد أنها توفر طرزاً مظهرياً مطلوباً تقوم بذلك بالفعل. وبالإضافة إلى ذلك، توفر هذه البيانات فرصة داخل الخلية لتقييم فرص الهندسة الأيضية الإضافية، مثل استهداف التعارض بين خروج ال-PDO وتدفق ال-PDO المكون داخل الخلية. والهدف الآخر المحتمل للهندسة الأيضية هو أن نموذج الأيض لم يكن قادراً على حساب كل محصلة ال-ATP الناتج (١٧٦ فائض تدفق ال-ATP لنسبة P/O من ٣, ٠ و ١٢٣ فائض تدفق ال-ATP لنسبة P/O من ٢) مقارنةً بتفاعلات استهلاك ال-ATP. ومع معطيات تعديلات إشيريشيا القولون K12 PTS وحقيقة أن تدفق دورة ال-TCA، المصدر الأولي لل-ATP تحت الظروف الهوائية، ظل ثابتاً، فقد تكون هناك فرصاً لإعادة توجيه فائض ال-ATP لتكوين كتلة حيوية أعلى، مما يزيد بذلك من إنتاجية ال-PDO.

وسوف يستمر إنتاج ال-PDO باستخدام التقنية الحيوية الصناعية في التسارع والنضج، وسيكون من الملائم أن يصل ال-PDO لحالة السلع الكيميائية، حيث يزيد طلب السوق والاستدامة، والتوفير بتكلفة فعالة. بالإضافة إلى ذلك، يجب ملاحظة أنه قد تم محاولة نمذجة الأيض الميكروبي، وخاصةً في صورة تحليل تدفق الأيض، في كائنات الإنتاج الأخرى، مثل الكليسيلا نومونيا [١٤٦-١٥٠].

(٣, ٧, ٢) منتج تقني حيوي صناعي قيد التطوير: حمض السكسينيك

An In-Development Industrial Biotechnology Product: Succinic Acid

لقد زادت صناعة الكيماويات العالمية بـ ١٥٪ لتصل إلى إجمالي مبيعات يقدر بـ ٦٦٥, ٦ مليار دولار أمريكي بين عامي ٢٠٠٤-٢٠٠٥م، حيث أسهمت الشركات الأوروبية بمقدار ١, ٥٤٪ (٣٠٠, ٥ مليار دولار أمريكي) [١٥١]. وفي الفترة نفسها ارتفع سعر المواد الخام الأساسية لتصنيع الكيماويات، والبتترول الخام بمقدار ٣٠٪ (٣١ دولاراً أمريكياً للبرميل في يناير ٢٠٠٤م إلى ٤١ دولاراً أمريكياً للبرميل في يناير ٢٠٠٥م)، وإذا أخذنا تغير السعر بين ٢٠٠٤-٢٠٠٦م في الاعتبار، فإن زيادة الأسعار تقارب ٨٠٪ (٥٦ دولاراً أمريكياً للبرميل في ٢٠٠٥م). ولم تكن زيادة الأسعار السريعة مدفوعة فقط بزيادة الطلب، ولكن بعدم الاستقرار وتهديدات التوفير.

وقد تم تقدير أن زيادة عشرة دولارات في سعر برميل البترول تزيد التكاليف المتغيرة في الصناعة الكيماوية الأمريكية بمقدار ٦, ٢ مليار دولار أمريكي سنوياً [١٥٢]. ولهذا تبحث الصناعة الكيماوية بشكلٍ فعالٍ عن مصادر المواد الخام فعالة التكلفة، وصديقة للبيئة، ومتجددة ومستدامة، والتي لا تمكن فقط من إنتاج وحدات بناء

الكيمياء الأساسية، ولكن تعمل أيضاً كمنصة للمنتجات المستقبلية (الشكل رقم ١، ٢). وتعد التقنية الحيوية الصناعية بديلاً واعدماً مع الكائنات الميكروبية المعدلة لإنتاج المنتجات الأساسية من الكتلة الحيوية.

وفي عام ٢٠٠٤م واستناداً على تحليل نقدي لتحديد أهم وحدات البناء التي يمكن إنتاجها من الكتلة الحيوية ومن ثم تحويلها إلى كيمياء حيوية عالية القيمة، فقد عرفت وزارة الطاقة الأمريكية حمض السكسينيك كأحد أعلى ١٠ وحدات بنائية [١٥٣]. وفي العام نفسه، تم تخليق ١٦٠ مليون كيلو جرام من حمض السكسينيك من التحويل البتروكيميائي لأنهدريد الماليك (١٠٪ من إجمالي الإنتاج العالمي لأنهدريد الماليك). وفي حالة شيوع إنتاج حمض السكسينيك على أساس حيوي، فمن المتوقع أن يزيد طلب السوق العالمي إلى ٢ مليار دولار سنوياً مع إجمالي توفير طاقة يقدر بـ ٢٨٠٠٠٠٠٠ ميجاوات سنوياً. ويستخدم حمض السكسينيك في عدة منتجات ويعمل بصفة مادة بادئة أساسية أو مادة وسيطة في إنتاج الكيمياء المفيدة للمذيبات والبوليمرات.

يوضح الشكل رقم (٧، ٢) فرص التخليق الكيميائي المتنوعة التي يوفرها استخدام حمض السكسينيك وأنهدريد السكسينيك كأحد وحدات البناء الكيميائية. وحالياً يستخدم حمض السكسينيك بشكل أساسي في قطاع الكيمياء المتخصصة ويصل إجمالي الطلب السنوي إلى ١٥٠٠٠ طن، ويتم إنتاجه من تحويل أنهدريد الماليك. ويتم تخصيص حوالي ١٠٪ من إجمالي أنهدريد الماليك المنتج (٦، ١ مليار كيلو جرام سنوياً) لإنتاج السكسينات. ويستخدم أنهدريد الماليك بشكل كبير في صناعات الإسكان والإنشاء وتصنيع السيارات، والذي سبب نتيجة زيادة الطلب الأخير عليه زيادة الأسعار من ٩٥، ٠ دولار أمريكي للكيلوجرام (٢٠٠٣م) إلى ٢١، ١ دولار أمريكي للكيلوجرام (٢٠٠٥م). وقد أدت زيادة الأسعار هذه إلى زيادة مرافق إنتاج أنهدريد الماليك البتروكيميائي، حيث تستخدم المادة الخام إن-بيوتان. وعليه فقد كان هناك ضغط كبير في الأسعار لتصميم عملية تقنية حيوية صناعية فعالة التكلفة لإنتاج حمض السكسينيك في مواجهة زيادة توفير أنهدريد الماليك. وتشير التقديرات إلى أن سوق السكسينات تزيد عن ملياري دولار أمريكي سنوياً، مع افتراض إمكانية الحصول على حد أدنى من الإنتاجية يقدر بـ ٥، ٢ جم/لتر/ساعة بواسطة التخمر.

حمض السكسينيك ($C_4H_6O_4$)، وزن جزيئي ١١٨، ٠٩ جم/مول، pK_{a1} ٤، ٢١، pK_{a2} ٥، ٧٢) هو حمض ثنائي الكربوكسيل عديد المجموعات المتأينة ويوجد في الطبيعة. وهو قابل للذوبان في الماء (١٠٠ ملليجرام/مل) ويعطي محلول رائق عديم اللون. والسكسينات، وهو أنيون لحمض السكسينيك، هي مركب وسيط في دورة حمض الستريك وتنتج من الأكسدة المزدوجة للسكسينيل CoA مع GTP بواسطة الإنزيم المخلق للسكسينيل CoA، وفي معظم الحالات، كمنتج ثانوي لتحويل الأيزوسترات إلى الجليوزلات الذي يتم تحفيزه بواسطة إنزيم أيزوسترات لايز. ويتأكسد حمض السكسينيك بعد ذلك إلى الفومارات بواسطة إنزيم السكسينات ديهيدروجينيز،

هذه بالتأكيد هي الإنتاجيات الأعلى المذكورة في ذلك الوقت، وكانت واعدة بصفة خاصة باستخدام المواد الخام للجنوسيلولوزية (وقد أجريت أيضاً التجارب الحاكمة باستخدام وسط مختلط من الجلوكوز والزيلوز، والزراعات ذات الدفعة الواحدة أو المستمرة، وأعطت إنتاجيات وعائدات مقاربة).

وفي العام نفسه تم نشر تسلسل الجينوم للمانهيميا سكسينيروديسينس MBAL55E المحتوي على ٢٣١٤٠٧٨ زوج من القواعد، بالتزامن مع شبكة الأيض المعاد هيكلتها على مستوى الجينوم [١٦٠]. وقد توقعت شبكة الأيض المعاد هيكلتها على مستوى الجينوم، والتي تتكون من ٣٧٣ تفاعلاً (١٢١ تفاعلات قابلة للانعكاس و ٢٥٢ غير قابل للانعكاس) و ٣٥٢ ناتج أيضاً، باستخدام تحليل تدفق الأيض، إنتاجاً نظرياً بمقدار ١,٧١ و ١,٨٦ مول من حمض السكسينيك لكل مول من الجلوكوز تحت ظروف من ثاني أكسيد الكربون وثاني أكسيد الكربون والهيدروجين، على التوالي [١٦٠]. ونتيجة عمليات المحاكاة، ذكر المؤلفون "استناداً على هذه النتائج، فإننا نصمم الآن إستراتيجيات هندسة أيضية للإنتاج المحسن لحمض السكسينيك؛ وأحد هذه الإستراتيجيات ستكون عن طريق زيادة تدفق كربوكسلة ال-PEP وخفض تدفقات أحماض الخليك، والفورميك، واللاكتيك" [١٦٠].

في عام ٢٠٠٦م صمم المؤلفون سلسلة من طفرات مانهيميا سكسينيروديسينس MBAL55E والتي شملت تعطيل ثلاثة تفاعلات يتم تحفيزها بثاني أكسيد الكربون (وهي ال-PEP كربوكسيكينيز، وال-PEP كربوكسيليز، وإنزيم المالك) وتعطيل أربعة جينات مسؤولة عن التكوين الثانوي لللاكتات والفورمات والخلات (جينات *ackA* و *pta*, *pflB*, *ldhA*) [١٦١]. وأكدت هذه النتائج أنه يمكن الحصول على طفرات قادرة عملياً على عدم تكوين اللاكتات والفورمات والخلات، وأن إنزيم ال-PEP كربوكسيليز كان أكثر أهمية للنمو اللاهوائي وتعظيم إنتاج حمض السكسينيك [١٦١].

وأنتجت سلالة مانهيميا سكسينيروديسينس LPK7 المهندسة أيضاً تحت ظروف التخمر ذو الدفعة الواحدة ٩٧,٠ مول حمض سكسينيك/مول جلوكوز، ووصلت تحت ظروف التخمر متعدد الدفعات إلى أقصى تركيز، وإنتاجية، وعائد بـ ٥٢,٤ جم/لتر، و ١,٨ جم/لتر/ساعة، و ١,١٦ مول حمض سكسينيك/مول جلوكوز، على التوالي [١٦١]. وناتج الكربون النظري للسكسينات في ظل الخفض الزائد للقوة الاختزالية وكربوكسلة ثاني أكسيد الكربون هو ٢ مول حمض سكسينيك/مول جلوكوز ($\Delta G^{\circ} = -٣١٧$ نيلو جول/مول) [١٥٤].

في عام ٢٠٠٦م تم نشر البروتيوم الكامل للمانهيميا سكسينيروديسينس [١٦٢]. وكان هذا واحداً من الأمثلة الأولى للبروتيومات التي تم تطبيقها لتطوير عملية التقنية الحيوية الصناعية. وباستخدام عملية الترحيل الكهربائي ثنائية الأبعاد مع قياس طيف الكتلة، فقد تم وصف وتعريف وتوصيف ٢٠٠ بروتين موزعين على كافة

البروتينات الخلوية (١٢٩)، وبروتينات الغشاء (٤٨)، وبروتينات مفرزة (٣٠). وتم إجراء تحديد خصائص نمو الخلية ومستويات الأيض إلى جانب قياسات البروتيوم خلال الانتقال من النمو التصاعدي إلى النمو الثابت.

ويمكن استنتاج نتيجتين مهمتين من هذا التحليل وذلك لم يكن ممكناً في السابق. أولاً، أن موضع الجين المشروح مسبقاً على أنه الوحدة الفرعية A للسكسينات ديهيدروجينيز (*sdhA*) من المحتمل أن يكون هو الوحدة الفرعية A للفومارات ريداكتيز (*frdA*) على أساس تحليل البروتيوم المقارن المدعوم بالبيانات الفسيولوجية. ثانياً، تم تعريف إنزيمين جديدين كأهداف هندسة أيضية للتحسينات المستقبلية في إنتاج حمض السكسينيك. *OadA*, *PutA* هي إنزيمات مسئولة عن تكوين الخلات وتحويل الأوكسالوأسيتات إلى بيروفات، على التوالي، وقد يحفز حذفها زيادة في التدفق نحو حمض السكسينيك من خلال تقليل تكوين المنتجات الثانوية [١٦٢]. ويعد هذا مثلاً واضحاً لكيفية أن قياس وتحليل البروتيوم لا يوفر فقط معلومات جديدة لإستراتيجيات الهندسة الأيضية المستقبلية، ولكنه عمل أيضاً كفحص لضبط الجودة لافتراضين أساسيين: أولاً، أن توضيح الجينوم وشرحه خالٍ من الأخطاء، وثانياً، أن تعبير الحمض النووي الريبوزي الرسول mRNA يرتبط مباشرةً بتعبير ونشاط البروتين.

وحدثاً في عام ٢٠٠٧م، تم عرض شبكة معاد هيكلتها محدثة على مستوى الجينوم للمانهيميا سكسينيروديسينس، والتي شملت ٦٨٦ تفاعل و٥١٩ ناتج أيضاً على أساس تجارب إعادة الشرح والتحقيق [١٦٣]. وتم التحقق من الشبكة المعاد هيكلتها مع تحليل التدفق على أساس القيود باستخدام البيانات التجريبية المقارنة للحد الأقصى لمعدل النمو الخاص ومعدل تكوين إنتاج الأيض لعدة طفرات من سلالة MBEL55. وفي كل حالات المحاكاة، تم توقع معدل النمو الخاص الأقصى بشكل صحيح، بينما كان معدل إنتاج السكسينيك، بالنسبة لمعدل استهلاك جلوكوز ثابت، متوافقاً بصورة جيدة (بين ٨، ٧، ٤ و ٣٠٪، اعتماداً على الطرز الوراثي الذي تم محاكاته داخل الخلية). وقد تم استخدام النموذج لتقييم إستراتيجيات حذف الجينات الإضافية التي من المحتمل أن تساعد على تطوير إنتاج حمض السكسينيك، وقد تم مقارنة عمليات المحاكاة مع الإستراتيجيات المذكورة مسبقاً في المحاكاة على مستوى الجينوم لشبكة أيض إشيريشيا القولون المعاد هيكلتها [١٦٣، ١٦٤]. وأوضح التحليل المقارن لنتائج محاكاة نموذج مستوى الجينوم أن الأثر الإيجابي لحذف الجينات المختلفة على إنتاج حمض السكسينيك كان واضحاً في المانهيميا سكسينيروديسينس أكثر منه في حالة إشيريشيا القولون، وأن الأداء الأيضي، المعروف على أنه التدفق الكامل لإنتاج حمض السكسينيك، كان أعلى في المانهيميا سكسينيروديسينس بسبب معدل استهلاك الجلوكوز العالي الملاحظ تحت الظروف اللاهوائية [١٦٣].

وفي غضون حوالي خمس سنوات (٢٠٠٢-٢٠٠٧م) تم تحويل ميكروب غير معروف سابقاً من المانهيميا سكسينيروديسينس إلى مصنع خلوي ميكروبي أساسي مرشح لإنتاج حمض السكسينيك وذلك نتيجة للتطبيق

الكامل لأدوات بيولوجيا الأنظمة: وهي تسلسل الجينوم، وإعادة هيكلة شبكة الأيض على مستوى الجينوم، والفلوكسومات، والبروتيومات، ومراجعة النموذج المتتالية. ويتعين ملاحظة أنه قد تم ذكر أساليب مشابهة لإيشيريشيا القولون و المانهيميا سكسينيروديسينس؛ ومع ذلك، ومع وجود النقص النسبي للمعرفة الأساسية، وقصر وقت التطوير، وتنوع بيانات الأوميات التي تم جمعها ودمجها، فإنه تظل المانهيميا سكسينيروديسينس هي المثال البارز لتطبيق بيولوجيا الأنظمة الصناعية بنجاح.

(٨, ٢) الخاتمة والمنظور المستقبلي Conclusion and Future Perspectives

لقد وفر تطبيق الإطار الرياضي للأبيض الميكروبي، الذي بدأ بجدية في أوائل الثلاثينيات، دعامة لمجموعات البيانات الكبيرة، والمتعلقة حالياً بالمجال الناشئ لبيولوجيا الأنظمة (الترانسكربتومات، البروتيومات، والفلوكسومات، والميتابولومات) والواجب دمج وتحليله وتوضيحه وفي النهاية إعادة صياغته إلى نماذج توقع يشار إليها بالشبكات المعاد هيكلتها للأبيض على مستوى الجينوم. وقد منحت هذه الشبكات التي تبلغ حالياً ٣٠، إلى جانب تقنية الدنا المعدل، التي يتم تطبيقها مهندسوا الهندسة الأيضية القدرة على تحديد أهداف وراثية لإعادة توجيه تدفق الكربون من الأوساط المتجددة والمستدامة ومنخفضة التكلفة إلى الإنتاج الكيميائي للسلع ذات القيمة المضافة مع وجود احتمال عالٍ وواضح للنجاح. ويتم في الوقت الحالي هيكلة المصانع الخلوية الميكروبية لكي تلبى احتياجات تطوير عملية التقنية الحيوية الصناعية، المرتبطة مسبقاً بالعمليات الكلاسيكية للتطور الموجه، والفحص والاختيار، والعزل والتكاثر بشكلٍ أسرع وأكثر فاعلية من خلال استخدام صناديق أدوات بيولوجيا الأنظمة.

وبناءً على ذلك، فإننا هنا نعرف مصطلحاً جديداً، بيولوجيا الأنظمة الصناعية، الذي يشمل التطبيق المحدد للتقنيات على مستوى الجينوم، بصورةٍ معملية وحاسوبية؛ وذلك لتطوير عملية التقنية الحيوية الصناعية. ويتضح أثر بيولوجيا الأنظمة الصناعية على نطاقٍ كبير من المنتجات، التي يمكن تصنيفها كمنتجات ناضجة ومتطورة (مثل الإيثانول الحيوي)، ومنتجات حديثة وسريعة التطوير (مثل ٣،١-بروبان دايلول)، ومنتجات قيد التطوير (مثل حمض السكسينيك).

وقد احتاجت شركة دوبونت أكثر من عشر سنوات من التطوير والعدد الكبير من المصادر وذلك للترويج التجاري النهائي والناجح لإنتاج التقنية الحيوية الصناعية من ٣،١-بروبان دايلول. وكان التحدي في هذا المجال، ولاسيما لمهندسو الهندسة الأيضية وعلماء بيولوجيا الأنظمة الصناعية، هو تطوير عمليات مشابهة منخفضة التكاليف، وقابلة لزيادة المستوى، ومستدامة، ومتجددة وثابتة بجزءٍ صغير من الموارد. لذا فما هي أكبر المجالات لزيادة تطوير التقنية التي قد تساعد في تحقيق الهدف المذكور أعلاه؟

على الرغم من وجود عدد كبير من شبكات الأيض المعاد هيكلتها على مستوى الجينوم، فإن الأمر الشيق الذي يمكن ملاحظته يتمثل في التغطية الضعيفة نسبياً للأيض الميكروبي التي تقدمها تلك العمليات الخاصة بإعادة الهيكلة. ويوضح الفحص الدقيق للجدول رقم (٤, ٢) أن كافة شبكات الأيض المعاد هيكلتها كان لها متوسط تغطية جينوم تبلغ $14 \pm 8\%$ (ن=٢٩). وفي حالة عزل السكرومييسيس سيرفيسي، أكثر حقيقيات النواة توصيفاً، كمثال، فإن أحدث شبكة أيض معاد هيكلتها لها تغطية جينوم تقدر بـ 13% ، في حين أن ٤٦٩١ من إجمالي ٦٦٠٨ عدد ال-ORFs، $9, 70\%$ ، لها وظيفة موثقة [١٦، ١٢٠]. ومن منظور أكثر شمولاً، فإن مشكلة سد فجوة الأيض تتفاقم بزيادة عدد أنشطة الأيض المعطلة، حيث إن $30-40\%$ من النشاط الأيضي المعروف والمصنفة بواسطة لجنة الإنزيات ليس لها تسلسلات وراثية مرتبطة في أي كائن حي [١١١، ١٦٥، ١٦٦]. وتبذل حالياً جهود هائلة لتوسيع إعادة هيكلة المسارات لتشمل مناطق الأيض المفهومة بشكل ضعيف أو التي تم تجاهلها وظيفياً بدرجة كبيرة [٨٩، ١١١].

وقد ركزت التقنية الحيوية الصناعية بشكل كبير على إنتاج الكيماويات ذات القيمة المضافة والسلع الكيماوية؛ ومع ذلك، فإن قطاع النمو الأكبر المتوقع يكون في مجال الكيماويات التخصصية والدقيقة، حيث تقدم التقنية الحيوية الصناعية مسارات أكثر بساطة للكيمياء التخليقية المعقدة، أو إمكانية الكيماويات الجديدة التي قد تقدم تطبيقاً مماثلاً أو محسناً [٤، ٥]. وعادةً توجد الكيماويات التخصصية والدقيقة كناتج أيض بسيط في مناطق الأيض الثانوية والثلاثية، وعادة ما يتم تفسيرها بشكل ضعيف ونادراً ما يتم إدراجها في إعادة هيكلة شبكات الجينوم. المثال الواضح لذلك في أيض الدهون في السكرومييسيس سيرفيسي، حيث شمل التحديث الأخير لإعادة هيكلة الأيض على مستوى الجينوم الحالي، iN795، ١١٨ تفاعل غير معروف للمواد الدهنية بالنسبة للـ iND750 (الجدول رقم ٤, ٢). ومن الـ ١١٨ تفاعل المشارك في أيض الدهون، فقد تم تخصيص ٢٨ لأسترة الإرجوستيرول وتحليل الدهون، التي لم يتم تقديمها مسبقاً (نوكايف، ونيلسون، اتصالات شخصية، ٢٠٠٨م).

بالإضافة إلى التفسير المحدد والتوسع في نماذج الأيض إلى مسارات الأيض المجهولة، فإن طرق الحسابات المستخدمة للمحاكاة التوقعية وتحليل النماذج تتطور بشكل سريع. فعلى سبيل المثال يمكن للتقييم المنهجي للمدى الواسع من الدوال الموضوعية، التي تشمل تعظيم عائد الكتلة الحيوية، وتعظيم عائد الـ ATP، والحد من التدفق العام داخل الخلايا، وتعظيم عائد الـ ATP لكل وحدة تدفق، وتعظيم عائد الكتلة الحيوية لكل وحدة تدفق، وتقليل معدل استهلاك الجلوكوز، وتقليل عدد خطوات التفاعل، وتقليل جهد الأكسدة والاختزال، وخفض تدفقات إنتاج الـ ATP، وتعظيم خفض تدفقات إنتاج الـ ATP، والحد من خطوات التفاعل، وذلك عند مقارنته

بالتدفقات المعملية التي تم تعيينها داخل الخلايا بواسطة نظائر الكربون أن يقدم منظوراً يمكن من خلاله تحديد أفضل دالة تعظيم تمثل شبكة الأيض [١٦٧].

وهناك مثلاً آخر قام بتطبيق إطار برمجة ثنائي المستوى لتحديد حذف الجينات الأمثل الذي يؤدي إلى زيادة إنتاج منتج مطلوب وذلك من خلال إدراج استنزاف كيميائي رياضي لتكوين الكتلة الحيوية، ومن ثم دمج الإنتاج وتكوين الكتلة الحيوية. وكشفت هذه الطريقة التي تسمى OptKnock، عن إستراتيجيات هندسة أيضية غير بديهية لإنتاج السكسينات واللاكتات وال-٣،١-بروبان دايلول، وقدمت بصفة خاصة إستراتيجيات تساعد في تطوير نفسها من خلال التطور الموجه، حيث لا يرتبط اختيار النمو والتكيف بشكل مباشر بالنمو [١٦٤]. وتدفع هذه الأمثلة، إلى جانب أمثلة أخرى، من حدود إستراتيجيات هندسة الأيض غير البديهية ذات القيمة العالية والتي يمكن فك شفرتها من شبكات الجينوم المعاد هيكلتها [١٦٨-١٧٨].

وكما هو الحال في أي شبكة رياضية تقوم بدمج مجموعات ضخمة من البيانات الحيوية المتنوعة والتي يتم فحصها، وتحديثها، وإعادة تفسيرها، وتحليلها، ومناقشتها بشكل مستمر، فإنه يتعين تحديد أهداف النمذجة الواضحة. ومن منظور التقنية الحيوية الصناعية، التي تركز على تحديد إستراتيجيات هندسة أيض غير بديهية عالية الإنتاج، وثابتة، وسهلة التطبيق، فإنه يجب التوسع في نمذجة الأيض الميكروبي من خلال تحليل توازن التدفقات الكيميائية الرياضية على أساس القيود، والتي تدمج البرهان المعلمي، والتحديث والتوسيع اللاحق للنموذج. وربما تمكن الوفرة الناشئة للعوامل الحركية من إعادة الهيكلة الأيضية الديناميكية بشكل كامل في المستقبل، أما حالياً، فإنه يجب تحقيق الفوائد الكاملة للنمذجة الأيضية الكيميائية الرياضية في هيكلة الجيل التالي من المصانع الخلوية الميكروبية.

إن بيولوجيا الأنظمة الصناعية هي أسلوب جديد لتحدي كبير نسبياً: كيف تطور العمليات لإنتاج الكيمائيات والمواد والطاقة، والتي تكون منخفضة التكلفة، ومتجددة، ومستدامة، وقابلة لزيادة المستوى، ومفضلة بيئياً؟

المراجع References

- [١] Pass, F. (1981) Biotechnology, a new industrial revolution. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **4** (4), 476-477.
- [٢] Ferrandiz-Garcia, F. (1982) Biotechnology. Genetic engineering. Chemico-pharmaceutical area. *Rev. Esp. Fisiol.*, **38** (Suppl.), 353-366.
- [٣] Maury, J., Asadollahi, M.A., Moller, K., Clark, A., and Nielsen, J. (2005) Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **100**, 19-51.
- [٤] Hirche, C. (2006) Trend Report No. 16: industrial biotechnology-white biotechnology: a promising tool for the chemical industry. *ACHEMA 2006 28th International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology*, no. 16, pp. 1-7.
- [٥] Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.*, **23** (7-8), 471-499.
- [٦] Nielsen, J. (1995) *Physiological Engineering Aspects of Penicillium Chrysogenum*, Polyteknisk Forlag, Lyngby, p. 13.

- US Energy Information Administration (2008) World crude oil price data. http://tonto.eia.doe.gov/dnav/pet/pet_pri_wco_k_w.htm (accessed May 2008). [٧]
- US Energy Information Administration (2008) Natural gas price data. http://tonto.eia.doe.gov/dnav/ng/ng_pri_sum_dcu_nus_m.htm (accessed May 2008). [٨]
- Hermann, B.G., Blok, K., and Patel, M.K. (2007) Producing bio-based bulk chemicals using industrial biotechnology saves energy and combats climate change. *Environ. Sci. Technol.*, **41** (22), 7915–7921. [٩]
- Otero, J.M., Panagiotou, G., and Olsson, L. (2007) Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2007; **108**, 1–40. [١٠]
- Renewable Fuels Association (2006) From Niche to Nation: Ethanol Industry Outlook 2006. http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/outlook_2006.pdf (accessed 5 May 2008). [١١]
- Dien, B.S., Cotta, M.A., and Jeffries, T.W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63** (3), 258–266. [١٢]
- Russo, S., Berkovitz Siman-Tov, R., and Poli, G. (1995) Yeasts: from genetics to biotechnology. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **14** (3–4), 133–157. [١٣]
- Adrio, J.L. and Demain, A.L. (2006) Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30** (2), 187–214. [١٤]
- Smedsgaard, J. and Nielsen, J. (2005) Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J. Exp. Bot.*, **56** (410), 273–286. [١٥]
- Fisk, D.G., Ball, C.A., Dolinski, K., Engel, S.R., Hong, E.L., Issel-Tarver, L., Schwartz, K., Sethuraman, A., Botstein, D., and Cherry, J.M. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. *Yeast*, **23** (12), 857–865. [١٦]
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274** (5287), 546, 563–567. [١٧]
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278** (5338), 680–686. [١٨]
- Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., and Davis, R.W. (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell*, **2** (1), 65–73. [١٩]
- Forster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.O., and Nielsen, J. (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.*, **13** (2), 244–253. [٢٠]
- Famili, I., Forster, J., Nielsen, J., and Palsson, B.O. (2003) *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100** (23), 13134–13139. [٢١]
- Vemuri, G.N. and Aristidou, A.A. (2005) Metabolic engineering in the-omics era: elucidating and modulating regulatory networks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69** (2), 197–216. [٢٢]
- Patil, K.R., Akesson, M., and Nielsen, J. (2004) Use of genome-scale microbial models for metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15** (1), 64–69. [٢٣]
- Stephanopoulos, G. (1999) Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab. Eng.*, **1** (1), 1–11. [٢٤]
- Bro, C. and Nielsen, J. (2004) Impact of “ome” analyses on inverse metabolic engineering. *Metab. Eng.*, **6** (3), 204–211. [٢٥]
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., and Gerngross, T.U. (1999) Biocommodity Engineering. *Biotechnol. Prog.*, **15** (5), 777–793. [٢٦]
- Parekh, S., Vinci, V.A., and Strobel, R.J. (2000) Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54** (3), 287–301. [٢٧]
- Demain, A.L. (2000) Microbial biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **18** (1), 26–31. [٢٨]
- Demain, A.L. and Adrio, J.L. (2008) Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation. *Prog. Drug Res.*, **65**, 251, 253–289. [٢٩]
- Demain, A.L. and Adrio, J.L. (2008) Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol. Biotechnol.*, **38** (1), 41–55. [٣٠]
- Schmeisser, C., Steele, H., and Streit, W.R. (2007) Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75** (5), 955–962. [٣١]
- Patnaik, R. (2008) Engineering complex phenotypes in industrial strains. *Biotechnol. Prog.*, **24** (1), 38–47. [٣٢]

- Kluyver, A.J. (1980) Microbial metabolism and its bearing on the cancer problem. *Science*, **76**, 527–532. [٣٣]
- Williams, H., Boyer, H.W., and Helsinki, D.R. (1973) Size and base composition of RNA in supercoiled plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70** (12), 3744–3748. [٣٤]
- Pulley, H.C. and Greaves, J.D. (1932) An application of the autocatalytic growth curve to microbial metabolism. *J. Bacteriol.*, **24** (2), 145–168. [٣٥]
- Robertson, T.B. (1923) *The Chemical Basis of Growth Senescence*, J.B. Lippincott Company, Washington Square Press, Philadelphia. [٣٦]
- Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, 1st edn, John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag Co-Publication, New York. [٣٧]
- Cohn, M., Monod, J., Pollock, M.R., Spiegelman, S., and Stanier, R.Y. (1953) Terminology of enzyme formation. *Nature*, **172** (4389), 1096. [٣٨]
- Meyerhof, O. (1949) Further studies on the Harden-Young effect in alcoholic fermentation of yeast preparations. *J. Biol. Chem.*, **180** (2), 575–586. [٣٩]
- Meyerhof, O. and Green, H. (1949) Synthetic action of phosphatase; equilibria of biological esters. *J. Biol. Chem.*, **178** (2), 655–667. [٤٠]
- Meyerhof, O. and Green, H. (1949) Transphosphorylation by alkaline phosphatase in the absence of nucleotides. *Science*, **110** (2863), 503. [٤١]
- Meyerhof, O. and Oesper, P. (1949) The enzymatic equilibria of phospho(enol)pyruvate. *J. Biol. Chem.*, **179** (3), 1371–1385. [٤٢]
- Meyerhof, O. and Wilson, J.R. (1949) Studies on the enzymatic system of tumor glycolysis; glycolysis of free sugar in homogenates and extracts of transplanted rat sarcoma. *Arch. Biochem.*, **21** (1), 1–21. [٤٣]
- Meyerhof, O. and Wilson, J.R. (1949) Studies on the enzymatic system of tumor glycolysis; comparative study of rat and mouse tumor homogenates. *Arch. Biochem.*, **21** (1), 22–34. [٤٤]
- Meyerhof, O. and Wilson, J.R. (1949) Comparative study of the glycolysis and ATP-ase activity in tissue homogenates. *Arch. Biochem.*, **23** (2), 246–255. [٤٥]
- Kobayashi, S. and Fukumi, H. (1954) Studies on the Embden-Meyerhof system and the Warburg-Lipman-Dickens pathway of the organisms of Pertussis-Parapertussis-Bronchisepticus group. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **7** (4), 377–384. [٤٦]
- Mann, T. (1955) Prof. J. K. Parnas. *Nature*, **175** (4456), 532–533. [٤٧]
- Warburg, O. and Christian, W. (1936) Pyridin, the hydrogen-transferring component of the fermentation enzymes (pyridine nucleotide). *Biochem. Z.*, **287**, 291. [٤٨]
- Krebs, H.A. (1972) Otto Heinrich Warburg, 1883–1970. *Biogr. Mem. Fellows R. Soc.*, **18**, 629–699. [٤٩]
- Cori, C.F., Schmidt, G., and Cori, G.T. (1939) The synthesis of a polysaccharide from glucose-1-phosphate in muscle extract. *Science*, **89** (2316), 464–465. [٥٠]
- Cori, G.T. (1954) Enzymes and glycogen structure in glycogenesis. *Z. Kinderheilkd.*, **10** (1–2), 38–42. [٥١]
- Cori, G.T. and Cori, C.F. (1952) Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem.*, **199** (2), 661–667. [٥٢]
- Harden, A. (1913) The enzymes of washed zymin and dried yeast (lebedew). I. Carboxylase. *Biochem. J.*, **7** (2), 214–217. [٥٣]
- Harden, A. and Norris, R.V. (1914) The enzymes of washed zymin and dried yeast (lebedeff). II. Reductase. *Biochem. J.*, **8** (1), 100–106. [٥٤]
- Harden, A., Thompson, J., and Young, W.J. (1911) Apparatus for collecting and measuring the gases evolved during fermentation. *Biochem. J.*, **5** (5), 230–235. [٥٥]
- Harden, A. and Young, W.J. (1913) The enzymatic formation of polysaccharides by yeast preparations. *Biochem. J.*, **7** (6), 630–636. [٥٦]
- Harden, A. and Zilva, S.S. (1914) The enzymes of washed zymin and dried yeast (lebedeff). III. Peroxydase, catalase, invertase and maltase. *Biochem. J.*, **8** (3), 217–226. [٥٧]
- Gottschalk, A. (1956) Prof. Carl Neuberg. *Nature*, **178** (4536), 722–723. [٥٨]
- Krebs, H.A. (1935) Metabolism of amino-acids: deamination of amino-acids. *Biochem. J.*, **29** (7), 1620–1644. [٥٩]
- Krebs, H.A. (1935) Metabolism of amino-acids: the synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem. J.*, **29** (8), 1951–1969. [٦٠]

- Krebs, H.A. (1938) Micro-determination of alpha-ketoglutaric acid. *Biochem. J.*, **32** (1), 108–112. [٦١]
- Krebs, H.A. (1937) The role of fumarate in the respiration of *Bacterium coli* commune. *Biochem. J.*, **31** (11), 2095–2124. [٦٢]
- Krebs, H.A. (1940) The citric acid cycle and the Szent-Gyorgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem. J.*, **34** (5), 775–779. [٦٣]
- Krebs, H.A. and Cohen, P.P. (1939) Metabolism of alpha-ketoglutaric acid in animal tissues. *Biochem. J.*, **33** (11), 1895–1899. [٦٤]
- Krebs, H.A. and Eggleston, L.V. (1940) The oxidation of pyruvate in pigeon breast muscle. *Biochem. J.*, **34** (3), 442–459. [٦٥]
- Krebs, H.A. and Holzach, O. (1952) The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase. *Biochem. J.*, **52** (3), 527–528. [٦٦]
- Krebs, H.A., Salvin, E., and Johnson, W.A. (1938) The formation of citric and alpha-ketoglutaric acids in the mammalian body. *Biochem. J.*, **32** (1), 113–117. [٦٧]
- Krebs, H.A. (1964) *Nobel Lectures in Physiology Medicine, 1942–1962*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam. [٦٨]
- Krebs, H.A., Gurin, S., and Eggleston, L.V. (1952) *Biochem. J.*, **51**, 614. [٦٩]
- Krebs, H.A. (1948) The tricarboxylic acid cycle. *Harvey Lect.*, **44**, 165–199. [٧٠]
- Westerhoff, H.V. and Palsson, B.O. (2004) The evolution of molecular biology into systems biology. *Nat. Biotechnol.*, **22** (10), 1249–1252. [٧١]
- Oliver, S.G. (2006) From genomes to systems: the path with yeast. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **361** (1467), 477–482. [٧٢]
- Hermann, B.G. and Patel, M. (2007) Today's and tomorrow's bio-based bulk chemicals from white biotechnology: a techno-economic analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **136** (3), 361–388. [٧٣]
- Nielsen, J. and Jewett, M.C. (2008) Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **8** (1), 122–131. [٧٤]
- Takors, R., Bathe, B., Rieping, M., Hans, S., Kelle, R., and Huthmacher, K. (2007) Systems biology for industrial strains and fermentation processes—example: amino acids. *J. Biotechnol.*, **129** (2), 181–190. [٧٥]
- Demerec, M. (1948) Production of penicillin, US Patent 2,445,758. [٧٦]
- Riggs, A.D. (1982) Method for microbial polypeptide expression, US Patent 4,366,246. [٧٧]
- Laffend, L., Nagarajan, V., and Nakamura, C. (1997) Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by a single microorganism, US Patent 5,686,276. [٧٨]
- Nakamura, C., Gatenby, A., Hsu, A.K., La Reau, R., Haynie, L., Diaz-Torres, M., Trimbur, D., Whited, G., Nagarajan, V., Payne, M., Picataggio, S., and Nair, R. (2000) Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant microorganisms, US Patent 6,013,494. [٧٩]
- Moo-Young, M., Glick, B.R., Bu'Lock, J.D., and Cooney, C.L. (1984) Biotechnology has been associated with the pharmaceutical and brewing industries. *Biotechnol. Adv.*, **2** (2), I–II. [٨٠]
- Poppe, L. and Novak, L. (1992) *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. [٨١]
- Schmid, R.D. (2003) *Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. [٨٢]
- Bruggink, A. (1996) Biocatalysis and process integration in the synthesis of semi-synthetic antibiotics: biotechnology for industrial production of fine chemicals. *Chimia*, **50**, 431–432. [٨٣]
- Bruggink, A., Straathof, A.J., and van der Wielen, I.L. (2003) A “Fine” chemical industry for life science products: green solutions to chemical challenges. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **80**, 69–113. [٨٤]
- Eriksson, K.E. (ed.) (1997) Biotechnology in the pulp and paper industry. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **57**, 339. [٨٥]
- Kyrpides, N.C. (1999) Genomes OnLine Database (GOLD 1.0): a monitor of complete and ongoing genome projects world-wide. *Bioinformatics*, **15**, 773–774. [٨٦]
- US Department of Energy (2008) The fiscal year 2008 budget. <http://www.doe.gov/about/budget.htm> (accessed May 2008). [٨٧]
- National Institutes of Health (2008) The fiscal year 2008 budget. <http://officeofbudget.od.nih.gov/ui/HomePage.htm> (accessed May 2008). [٨٨]

- Viswanathan, G., Seto, J., Patil, S., Nudelman, G., and Sealfon, S. (2008) Getting started in biological pathway construction and analysis. *PLoS Comput. Biol.*, **4** (2). [٨٩]
- Bruggeman, F.J. and Westerhoff, H.V. (2007) The nature of systems biology. *Trends Microbiol.*, **15** (1), 45–50. [٩٠]
- Bailey, J.E. (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science*, **252** (5013), 1668–1675. [٩١]
- Stephanopoulos, G. and Vallino, J.J. (1991) Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, **252** (5013), 1675–1681. [٩٢]
- Nielsen, J. (2001) Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55** (3), 263–283. [٩٣]
- Kern, A., Tilley, E., Hunter, I.S., Legisa, M., and Glieder, A. (2007) Engineering primary metabolic pathways of industrial micro-organisms. *J. Biotechnol.*, **129** (1), 6–29. [٩٤]
- Tyo, K.E., Alper, H.S., and Stephanopoulos, G.N. (2007) Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells. *Trends Biotechnol.*, **25** (3), 132–137. [٩٥]
- Edwards, J.S., Covert, M., and Palsson, B. (2002) Metabolic modeling of microbes: the flux-balance approach. *Environ. Microbiol.*, **4** (3), 133–140. [٩٦]
- Edwards, J.S., Ramakrishna, R., and Palsson, B.O. (2002) Characterizing the metabolic phenotype: a phenotype phase plane analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **77** (1), 27–36. [٩٧]
- Forster, J., Famili, I., Palsson, B.O., and Nielsen, J. (2003) Large-scale evaluation of in silico gene deletions in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS*, **7** (2), 193–202. [٩٨]
- Barwell, C.J. and Hess, B. (1972) Application of kinetics of yeast pyruvate kinase in vitro to calculation of glycolytic flux in the anaerobic yeast cell. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **353** (7), 1178–1184. [٩٩]
- Savageau, M.A. (1969) Biochemical systems analysis. I. Some mathematical properties of the rate law for the component enzymatic reactions. *J. Theor. Biol.*, **25** (3), 365–369. [١٠٠]
- Savageau, M.A. (1969) Biochemical systems analysis. II. The steady-state solutions for an n-pool system using a power-law approximation. *J. Theor. Biol.*, **25** (3), 370–379. [١٠١]
- Savageau, M.A. (1970) Biochemical systems analysis. 3. Dynamic solutions using a power-law approximation. *J. Theor. Biol.*, **26** (2), 215–226. [١٠٢]
- Kacser, H. and Burns, J.A. (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **27**, 65–104. [١٠٣]
- Heinrich, R. and Rapoport, T.A. (1973) Linear theory of enzymatic chains; its application for the analysis of the crossover theorem and of the glycolysis of human erythrocytes. *Acta Biol. Med. Ger.*, **31** (4), 479–494. [١٠٤]
- Heinrich, R. and Rapoport, T.A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.*, **42** (1), 89–95. [١٠٥]
- Heinrich, R. and Rapoport, T.A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. Critique of the crossover theorem and a general procedure to identify interaction sites with an effector. *Eur. J. Biochem.*, **42** (1), 97–105. [١٠٦]
- Rapoport, T.A., Heinrich, R., Jacobasch, G., and Rapoport, S. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **42** (1), 107–120. [١٠٧]
- Covert, M.W., Schilling, C.H., Famili, I., Edwards, J.S., Goryanin, I.I., Selkov, E., and Palsson, B.O. (2001) Metabolic modeling of microbial strains in silico. *Trends Biochem. Sci.*, **26** (3), 179–186. [١٠٨]
- Price, N.D., Papin, J.A., Schilling, C.H., and Palsson, B.O. (2003) Genome-scale microbial in silico models: the constraints-based approach. *Trends Biotechnol.*, **21** (4), 162–169. [١٠٩]
- Borodina, I. and Nielsen, J. (2005) From genomes to in silico cells via metabolic networks. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16** (3), 350–355. [١١٠]
- Breitling, R., Vitkup, D., and Barrett, M.P. (2008) New surveyor tools for charting microbial metabolic maps. *Nat. Rev. Microbiol.*, **6** (2), 156–161. [١١١]
- Edwards, J.S., Ibarra, R.U., and Palsson, B.O. (2001) In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat. Biotechnol.*, **19** (2), 125–130. [١١٢]
- Roscoe, H. and Harden, A. (1895) *A New View of the Origin of Dalton's Atomic Theory*, Macmillan and Co., London. [١١٣]
- Dodds, D.R. and Gross, R.A. (2007) Chemistry. Chemicals from biomass. *Science*, **318** (5854), 1250–1251. [١١٤]

- Hatti-Kaul, R., Tornvall, U., Gustafsson, L., and Borjesson, P. (2007) Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals—a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.*, **25** (3), 119–124. [١١٥]
- Renewable Fuels Association (2008) Changing the climate: ethanol industry outlook. http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/outlook/RFA_Outlook_2008.pdf (accessed 5 May 2008). [١١٦]
- Duarte, N.C., Palsson, B.O., and Fu, P. (2004) Integrated analysis of metabolic phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, **5** (1), 63. [١١٧]
- Liolios, K., Mavromatis, K., Tavernarakis, N., and Kyrpides, N.C. (2008) The Genomes On Line Database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res.*, **36** (Database issue), D475–D479. [١١٨]
- Liolios, K., Tavernarakis, N., Hugenholtz, P., and Kyrpides, N.C. (2006) The Genomes On Line Database (GOLD) v.2: a monitor of genome projects worldwide. *Nucleic Acids Res.*, **34** (Database issue), D332–D334. [١١٩]
- Hong, E.L., Balakrishnan, R., Dong, Q., Christie, K.R., Park, J., Binkley, G., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hitz, B.C., Krieger, C.J., Livstone, M.S., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Oughtred, R., Skrzypek, M.S., Weng, S., Wong, E.D., Zhu, K.K., Dolinski, K., Botstein, D., Cherry, J.M. (2008) Gene ontology annotations at SGD: new data sources and annotation methods. *Nucleic Acids Res.*, **36** (Database issue), D577–D581. [١٢٠]
- Nissen, T.L., Kielland-Brandt, M.C., Nielsen, J., and Villadsen, J. (2000) Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metab. Eng.*, **2** (1), 69–77. [١٢١]
- Bro, C., Regenber, B., Forster, J., and Nielsen, J. (2006) In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab. Eng.*, **8** (2), 102–111. [١٢٢]
- Phelps, T.J., Palumbo, A.V., and Beliaev, A.S. (2002) Metabolomics and microarrays for improved understanding of phenotypic characteristics controlled by both genomics and environmental constraints. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13** (1), 20–24. [١٢٣]
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., and Hood, L. (2001) Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, **292** (5518), 929–934. [١٢٤]
- Erasmus, D.J., van der Merwe, E.G., and van Vuuren, H.J. (2003) Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.*, **3**(4), 375–399. [١٢٥]
- Cakir, T., Kirdar, B., and Ulgen, K.O. (2004) Metabolic pathway analysis of yeast strengthens the bridge between transcriptomics and metabolic networks. *Biotechnol. Bioeng.*, **86** (3), 251–260. [١٢٦]
- Cakir, T., Patil, K.R., Onsan, Z.I., Ulgen, K.O., Kirdar, B., and Nielsen, J. (2006) Integration of metabolome data with metabolic networks reveals reporter reactions. *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 50. [١٢٧]
- Olsson, L., Jørgensen, H., Krogh, K., and Roca, C. (2004) Bioethanol production from lignocellulosic material, in *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, 2nd edn (ed. Dumitriu, S.), Marcel Dekker, New York, pp. 957–993. [١٢٨]
- Grotkjaer, T., Christakopoulos, P., Nielsen, J., and Olsson, L. (2005) Comparative metabolic network analysis of two xylose fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng.*, **7** (5–6), 437–444. [١٢٩]
- Roca, C., Nielsen, J., and Olsson, L. (2003) Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (8), 4732–4736. [١٣٠]
- Sonderegger, M., Schumperli, M., and Sauer, U. (2004) Metabolic engineering of a phosphoketolase pathway for pentose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(5), 2892–2897. [١٣١]
- Herrgard, M.J., Fong, S.S., and Palsson, B.O. (2006) Identification of genome-scale metabolic network models using experimentally measured flux profiles. *PLoS Comput. Biol.*, **2** (7). [١٣٢]
- Antoni, D., Zverlov, V.V., and Schwarz, W.H. (2007) Biofuels from microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77** (1), 23–35. [١٣٣]
- E. I. du Pont de Nemours and Company (DuPont) (2008) Sorona® renewably sourced polymer. http://www2.dupont.com/Sorona/en_US/ (accessed 5 May 2008). [١٣٤]
- E. I. du Pont de Nemours and Company (DuPont). (2007) Annual Review. http://library.corporate-ir.net/library/73/733/73320/items/283770/DD_2007_AR_v2.pdf (accessed 5 May 2008). [١٣٥]

- Bhatia, S.K. and Kurian, J.V. (2008) Biological characterization of Sorona polymer from corn-derived 1,3-propanediol. *Biotechnol. Lett.*, **30** (4), 619–623. [١٣٦]
- Nakamura, C.E. and Whited, G.M. (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**(5), 454–459. [١٣٧]
- Freund, A. (1881) Ueber die bildung und darstellung von trimethylene-alkohol aus glycerin. *Monatsh. Chem.*, **2**, 636–641. [١٣٨]
- Braak, H.R. (1928) Onderzoekingen over Vergisting van Glycerine. Delft. [١٣٩]
- Mickelson, M.N. and Werkman, C.H. (1940) The dissimilation of glycerol by coli-aerogenes intermediates. *J. Bacteriol.*, **39** (6), 709–715. [١٤٠]
- Cameron, D.C., Altaras, N.E., Hoffman, M.L., and Shaw, A.J. (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol. Prog.*, **14** (1), 116–125. [١٤١]
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.P., and Deckwer, W.D. (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52** (3), 289–297. [١٤٢]
- Zeng, A.P. and Biebl, H. (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **74**, 239–259. [١٤٣]
- Antoniewicz, M.R., Kraynie, D.F., Laffend, L.A., Gonzalez-Lergier, J., Kelleher, J.K., and Stephanopoulos, G. (2007) Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol. *Metab. Eng.*, **9** (3), 277–292. [١٤٤]
- Antoniewicz, M.R., Kelleher, J.K., and Stephanopoulos, G. (2007) Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions. *Metab. Eng.*, **9** (1), 68–86. [١٤٥]
- Mu, Y., Teng, H., Zhang, D.J., Wang, W., and Xiu, Z.L. (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.*, **28** (21), 1755–1759. [١٤٦]
- Cheng, K.K., Zhang, J.A., Liu, D.H., Sun, Y., Yang, M.D., and Xu, J.M. (2006) Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. *Biotechnol. Lett.*, **28** (22), 1817–1821. [١٤٧]
- Zhang, Q., Teng, H., Sun, Y., Xiu, Z., and Zeng, A. (2008) Metabolic flux and robustness analysis of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **31** (2), 127–135. [١٤٨]
- Chi, N., Liu, C., Liu, Y., Zhang, Q., and Zheng, X. (2003) Cloning and expressing of 1,3-propanediol oxidoreductase-encoding gene. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **43** (6), 717–721. [١٤٩]
- Liu, H.J., Zhang, D.J., Xu, Y.H., Mu, Y., Sun, Y.Q., and Xiu, Z.L. (2007) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnol. Lett.*, **29** (8), 1281–1285. [١٥٠]
- Short, P.L. (2006) Global Top 50. *Chem. Eng. News*, **84** (30), 13–16. [١٥١]
- E. I. du Pont de Nemours and Company (2005) *Energy Impact and Implications for Pricing*, DuPont's Economist's Office, Press Release. http://www2.dupont.com/Media_Center/en_US/assets/downloads/pdf/Newsletter_Economist_Office.pdf (accessed 5 May 2008). [١٥٢]
- US Department of Energy (2004) Top value added chemicals from biomass: volume I. <http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf> (accessed 5 May 2008). [١٥٣]
- Zeikus, J.G., Jain, M.K., and Elankovan, P., (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 545–552. [١٥٤]
- Song, H. and Lee, S.J. (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, **39** (3), 352–361. [١٥٥]
- McKinlay, J.B., Vieille, C., and Zeikus, J.G. (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76** (4), 727–740. [١٥٦]
- Jantama, K., Haupt, M.J., Svoronos, S.A., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (2008) Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol. Bioeng.*, **99** (5), 1140–1153. [١٥٧]
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., and Chang, H.N. (2002) Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58** (5), 663–668. [١٥٨]
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., and Chang, H.N. (2003) Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **26** (1), 63–67. [١٥٩]

- Hong, S.H., Kim, J.S., Lee, S.Y., In, Y.H., Choi, S.S., Rih, J.K., Kim, C.H., Jeong, H., Hur, C.G., and Kim, J.J. (2004) The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *Nat. Biotechnol.*, **22** (10), 1275–1281. [١٦٠]
- Lee, S.J., Song, H., and Lee, S.Y. (2006) Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72** (3), 1939–1948. [١٦١]
- Lee, J.W., Lee, S.Y., Song, H., and Yoo, J.-S. (2006) The proteome of *Mannheimia succiniciproducens*, a capnophilic rumen bacterium. *Proteomics*, **6** (12), 3550–3566. [١٦٢]
- Kim, T.Y., Kim, H.U., Park, J.M., Song, H., Kim, J.S., and Lee, S.Y. (2007) Genome-scale analysis of *Mannheimia succiniciproducens* metabolism. *Biotechnol. Bioeng.*, **97** (4), 657–671. [١٦٣]
- Burgard, A.P., Pharkya, P., and Maranas, C.D. (2003) OptKnock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol. Bioeng.*, **84** (6), 647–657. [١٦٤]
- Green, M.L. and Karp, P.D. (2005) Genome annotation errors in pathway databases due to semantic ambiguity in partial EC numbers. *Nucleic Acids Res.*, **33** (13), 4035–4039. [١٦٥]
- Lespinet, O. and Labeledan, B. (2006) Orphan enzymes could be an unexplored reservoir of new drug targets. *Drug Discov. Today*, **11** (7–8), 300–305. [١٦٦]
- Schuetz, R., Kuepfer, L., and Sauer, U. (2007) Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 119. [١٦٧]
- Joyce, A.R. and Palsson, B.O. (2008) Predicting gene essentiality using genome-scale in silico models. *Methods Mol. Biol.*, **416**, 433–457. [١٦٨]
- Joyce, A.R. and Palsson, B.O. (2007) Toward whole cell modeling and simulation: comprehensive functional genomics through the constraint-based approach. *Prog. Drug Res.*, **64**, 265, 267–265, 309. [١٦٩]
- Joyce, A.R., Reed, J.L., White, A., Edwards, R., Osterman, A., Baba, T., Mori, H., Lesely, S.A., Palsson, B.O., and Agarwalla, S. (2006) Experimental and computational assessment of conditionally essential genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **188** (23), 8259–8271. [١٧٠]
- Joyce, A.R. and Palsson, B.O. (2006) The model organism as a system: integrating “omics” data sets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7** (3), 198–210. [١٧١]
- Rocha, I., Forster, J., and Nielsen, J. (2008) Design and application of genome-scale reconstructed metabolic models. *Methods Mol. Biol.*, **416**, 409–431. [١٧٢]
- Kim, H.U., Kim, T.Y., and Lee, S.Y. (2008) Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms. *Mol. Biosyst.*, **4** (2), 113–120. [١٧٣]
- Kim, T.Y., Sohn, S.B., Kim, H.U., and Lee, S.Y. (2008) Strategies for systems-level metabolic engineering. *Biotechnol. J.*, **3**, 612–623. [١٧٤]
- Notebaart, R.A., Teusink, B., Siezen, R.J., and Papp, B. (2008) Co-regulation of metabolic genes is better explained by flux coupling than by network distance. *PLoS Comput. Biol.*, **4** (1). [١٧٥]
- Notebaart, R.A., van Enckevort, F.H., Francke, C., Siezen, R.J., and Teusink, B. (2006) Accelerating the reconstruction of genome-scale metabolic networks. *BMC Bioinformatics*, **7**, 296. [١٧٦]
- Zhao, J., Ding, G.H., Tao, L., Yu, H., Yu, Z.H., Luo, J.H., Cao, Z.W., and Li, Y.X. (2007) Modular co-evolution of metabolic networks. *BMC Bioinformatics*, **8**, 311. [١٧٧]
- Satish Kumar, V., Dasika, M.S., and Maranas, C.D. (2007) Optimization based automated curation of metabolic reconstructions. *BMC Bioinformatics*, **8**, 212. [١٧٨]
- Gong, C.-S. (1985) Direct fermentation of D-xylose to ethanol by a xylose-fermenting yeast mutant, US Patent 4,511,656. [١٧٩]
- Blattner, F.R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277** (5331), 1453–1462. [١٨٠]
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269** (5223), 496–512. [١٨١]
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley,

- J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M., Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**(6642), 539–547.
- Gardner, M.J., Shallom, S.J., Carlton, J.M., Salzberg, S.L., Nene, V., Shoaibi, A., Ciecko, A., Lynn, J., Rizzo, M., Weaver, B., Jarrahi, B., Brenner, M., Parvizi, B., Tallon, L., Moazzez, A., Granger, D., Fujii, C., Hansen, C., Pederson, J., Feldblyum, T., Peterson, J., Suh, B., Angiuoli, S., Perlea, M., Allen, J., Selengut, J., White, O., Cummings, L.M., Smith, H.O., Adams, M.D., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Fraser, C.M. (2002) Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* **419** (6906), 531–534. [١٨٣]
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S., Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273** (5278), 1058–1073. [١٨٤]
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*. **417** (6885), 141–147. [١٨٥]
- Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Debets, A.J., Dekker, P., van Dijk, P.W., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S., de Groot, P.W., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J.P., van den Hondel, C.A., van der Heijden, R.T., van der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M.J., Meulenbergh, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N.N., Ram, A.F., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P.J., Wedler, H., Wösten, H.A., Zeng, A.P., van Ooyen, A.J., Visser, J., Stam, H. (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* **25** (2), 221–231. [١٨٦]
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Baştürkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scacciochio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Peñalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A., Birren, B.W. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438** (7071), 1105–1115. [١٨٧]
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438** (7071), 1157–1161. [١٨٨]
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11** (5), 731–753. [١٨٩]

- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (4), 1990–1995. [١٩٠]
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390** (6657), 249–256. [١٩١]
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357** (9264), 1225–1240. [١٩٢]
- Ikeda, M., Nakagawa, S. (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnology processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62** (2–3), 99–109. [١٩٣]
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. 3rd, Teakaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393** (6685), 537–544. [١٩٤]
- Maeder, D.L., Anderson, I., Brettin, T.S., Bruce, D.C., Gilna, P., Han, C.S., Lapidus, A., Metcalf, W.W., Saunders, E., Tapia, R., Sowers, K.R. (2006) The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes. *J. Bacteriol.* **188** (22), 7922–7931. [١٩٥]
- González, V., Santamaría, R.I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S.C., Ramírez, M.A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., Dávila, G. (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (10), 3834–3839. [١٩٦]
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissole, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfeld, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R.,

Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen Y.J. ; International Human Genome Sequencing Consortium. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**(6822), 860–921.

Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Esvara, P., Eyra, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigó, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W.J., Kirby, A., Kolbe, D.L., Korf, I., Kucherlapati, R.S., Kulbokas, E.J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J.P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D.R., Mardis, E.R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J.H., McCarthy, M., McCombie, W.R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J.D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J.P., Miller, W., Miner, T.L., Mongin, E., Montgomery, K.T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J.C., Muzny, D.M., Nash, W.E., Nelson, J.O., Nhan, M.N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M.J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K.H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C.S., Poliakov, A., Ponce, T.C., Ponting, C.P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B.A., Roskin, K.M., Rubin, E.M., Rust, A.G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M.S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J.B., Slater, G., Smit, A., Smith, D.R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J.P., Von Niederhausern, A.C., Wade, C.M., Wall, M., Weber, R.J., Weiss, R.B., Wendl, M.C., West, A.P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R.K., Winter, E., Worley, K.C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S.P., Zdobnov, E.M., Zody, M.C., Lander, E.S. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420** (6915), 520–562.

Edwards, J.S., Palsson, B.O. (2000) The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (10), 5528–5533. [١٩٩]

Reed, J.L., Vo, T.D., Schilling, C.H., Palsson, B.O. (2003) An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). *Genome Biol.* **4** (9), R54. [٢٠٠]

Feist, A.M., Henry, C.S., Reed, J.L., Krummenacker, M., Joyce, A.R., Karp, P.D., Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V., Palsson, B.Ø. (2007) A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 121. [٢٠١]

Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B. Ø., Nielsen, J. (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.* **13** (2), 244–253. [٢٠٢]

- Duarte, N.C., Herrgård, M.J., Palsson, B. Ø. (2004) Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res.* **14** (7), 1298–1309. [٢٠٣]
- Blank, L.M., Kuepfer, L., Sauer U. (2005) Large-scale ¹³C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biol.* **6** (6), R49. [٢٠٤]
- Nookaew, I., Jewett, M.C., Meechai, A., Thammarongtham, C., Laoteng, K., Cheevadhanarak, S., Nielsen, J., Bhumiratana, S. (2008) The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism. *BMC Syst. Biol.* **2**, 71. [٢٠٥]
- Schilling, C.H., Palsson, B.O. (2000) Assessment of the metabolic capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through a genome-scale pathway analysis. *J Theor. Biol.* **203** (3), 249–283. [٢٠٦]
- Schilling, C.H., Covert, M.W., Famili, I., Church, G.M., Edwards, J.S., Palsson, B.O. (2002) Genome-scale metabolic model of *Helicobacter pylori* 26695. *J. Bacteriol.* **184** (16), 4582–4593. [٢٠٧]
- Thiele, I., Vo, T.D., Price, N.D., Palsson, B. Ø. (2005) Expanded metabolic reconstruction of *Helicobacter pylori* (iT341 GSM/GPR): an in silico genome-scale characterization of single-and double-deletion mutants. *J. Bacteriol.* **187** (16), 5818–5830. [٢٠٨]
- Yeh, I., Hanekamp, T., Tsoka, S., Karp, P.D., Altman, R.B. (2004) Computational analysis of *Plasmodium falciparum* metabolism: organizing genomic information to facilitate drug discovery. *Genome Res.* **14** (5), 917–24. [٢٠٩]
- Tsoka, S., Simon, D., Ouzounis, C.A. (2004) Automated metabolic reconstruction for *Methanococcus jannaschii*. *Archaea* **1** (4), 223–229. [٢١٠]
- Borodina, I., Krabben, P., Nielsen, J. (2005) Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A 3 (2) metabolism. *Genome Res.* **15** (6), 820–829. [٢١١]
- David, H., Akesson, M., Nielsen, J. (2003) Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* **270** (21), 4243–4253. [٢١٢]
- Sun, J., Lu, X., Rinas, U., Zeng, A.P. (2007) Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol.* **8** (9), R182. [٢١٣]
- Andersen, M.R., Nielsen, M.L., Nielsen, J. (2008) Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Mol. Syst. Biol.* **4**, 178. [٢١٤]
- David, H., Hofmann, G., Oliveira, A.P., Jarmer, H., Nielsen, J. (2006) Metabolic network driven analysis of genome-wide transcription data from *Aspergillus nidulans*. *Genome Biol.* **7** (11), R108. [٢١٥]
- Vongsangnak, W., Olsen, P., Hansen, K., Krogsgaard, S., Nielsen, J. (2008) Improved annotation through genome-scale metabolic modeling of *Aspergillus oryzae*. *BMC Genomics* **9**, 245. [٢١٦]
- Oliveira, A.P., Nielsen, J., Förster, J. (2005) Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol.* **5**, 39. [٢١٧]
- Teusink, B., van Enckevort, F.H., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E.J., Siezen, R.J. (2005) In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (11), 7253–7262. [٢١٨]
- Oh, Y.K., Palsson, B.O., Park, S.M., Schilling, C.H., Mahadevan, R. (2007) Genome-scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. *J. Biol. Chem.* **282** (39), 28791–28799. [٢١٩]
- Goelzer, A., Bekkal Brikci, F., Martin-Verstraete, I., Noirot, P., Bessières, P., Aymerich, S., Fromion, V. (2008) Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *BMC Syst. Biol.* **2**, 20. [٢٢٠]
- Becker, S.A., Palsson, B. Ø. (2005) Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Staphylococcus aureus* N315: an initial draft to the two-dimensional annotation. *BMC Microbiol.* **5**, 8. [٢٢١]
- Kjeldsen, K.R., Nielsen, J. (2009) In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol. Bioeng.* **102** (2), 583–597. [٢٢٢]
- Jamshidi, N., Palsson, B. Ø. (2007) Investigating the metabolic capabilities of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using the in silico strain iNJ661 and proposing alternative drug targets. *BMC Syst. Biol.* **1**, 26. [٢٢٣]
- Beste, D.J., Hooper, T., Stewart, G., Bonde, B., Avignone-Rossa, C., Bushell, M.E., Wheeler, P., Klamt, S., Kierzek, A.M., McFadden J. (2007) GSMN-TB: a web-based genome-scale network model of *Mycobacterium tuberculosis* metabolism. *Genome Biol.* **8** (5), R89. [٢٢٤]

- Feist, A.M., Scholten, J.C., Palsson, B. Ø., Brockman, F.J., Ideker, T. (2006) Modeling methanogenesis with a genome-scale metabolic reconstruction of *Methanosarcina barkeri*. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0004. [٢٢٥]
- Resendis-Antonio, O., Reed, J.L., Encarnación, S., Collado-Vides, J., Palsson, B. Ø. (2007) Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation in *Rhizobium etli*. *PLoS Comput. Biol.* **3** (10), 1887–1895. [٢٢٦]
- Duarte, N.C., Becker, S.A., Jamshidi, N., Thiele, I., Mo, M.L., Vo, T.D., Srivas, R., Palsson, B. Ø. (2007) Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (6), 1777–1782. [٢٢٧]
- Vo, T.D., Greenberg, H.J., Palsson, B.O. (2004) Reconstruction and functional characterization of the human mitochondrial metabolic network based on proteomic and biochemical data. *J. Biol. Chem.* **279** (38), 39532–39540. [٢٢٨]
- Sheikh, K., Förster, J., Nielsen, L.K. (2005) Modeling hybridoma cell metabolism using a generic genome-scale metabolic model of *Mus musculus*. *Biotechnol. Prog.* **21** (1), 112–121. [٢٢٩]
- Patil, K.R. and Nielsen, J. (2005) Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2685–2689. [٢٣٠]