



Modele matematyczne w inżynierii metabolicznej

Krzysztof W. Szewczyk

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska,
Warszawa

Mathematic's models in metabolic engineering

Summary

Metabolic engineering is an integrating methodology of analysis and synthesis for improvement of flux distribution of metabolic pathways. It has two main aspects: modeling and analysis of metabolic networks to establish strategies for pathway engineering and actual molecular level engineering the pathway. Mathematical modeling is one of the key methodologies of metabolic engineering. The review presents the currently used metabolic modeling approaches. Metabolite balancing is the basis for analysis of metabolic flux and cell capability to form a targeted product. The use of isotope – labeled substrates with nuclear magnetic resonance (NMR) and gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) analyses of intracellular and extracellular metabolites enables determination of metabolic flux distribution. Metabolic Control Analysis (MCA) is a theoretical framework for investigation of control mechanism of metabolic network to identify key parameters influencing productivity. Kinetics models present a more detailed approach to simulate metabolic net behavior. Linear approximation of kinetic model, the so called (log)linear kinetics, is useful for modeling spatiotemporal variations of the net. The including of genetic regulation to metabolic models, the next step in the development of metabolism models, needs new methods of experimental approaches and mathematic and computational resources.

Metabolic engineering is barely a decade old, but its significance is already widely recognized in the research-intensive biotechnology community and attracts great interest of industry.

Key words:

metabolic engineering, mathematical models, metabolic flux analysis, metabolic control analysis, kinetics models.

Adres do korespondencji

Krzysztof W. Szewczyk,
Wydział Inżynierii
Chemicznej i Procesowej,
Politechnika Warszawska,
ul. Waryńskiego 1,
00-645 Warszawa,
szewczyk@ichip.pw.edu.pl

1. Wstęp

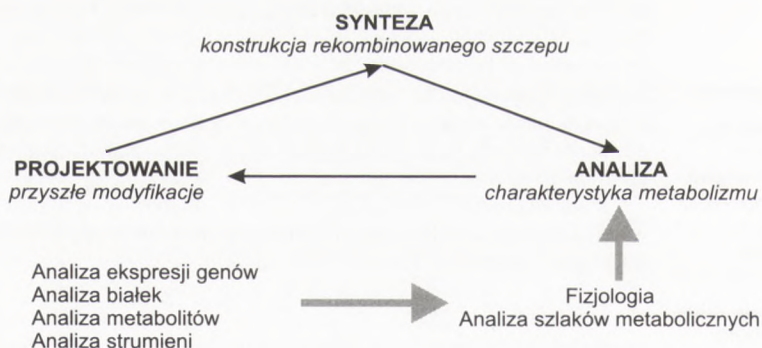
Nazwę „inżynieria metaboliczna” dla nowej dyscypliny zajmującej się „polepszeniem aktywności komórek w wyniku zmiany funkcji enzymatycznych, transportowych i regulacyjnych za pomocą techniki rekombinacji DNA” wprowadził J. E. Bailey w 1991 r. [1]. Cameron i Tong [2] określili tę dziedzinę jako „celową modyfikację metabolizmu za pomocą technik rekombinacji DNA”. Początkowo inżynieria metaboliczna stanowiła po prostu część biologii molekularnej, ukierunkowaną na praktyczne zastosowania. Wraz z bardzo szybkim rozwojem nowych metod analitycznych oraz technik inżynierii genetycznej coraz łatwiejsze stawało się bezpośrednio wprowadzanie zmian do materiału genetycznego, zaś istotnego znaczenia nabierała ocena efektów prowadzonych zmian genetycznych. Program inżynierii metabolizmu postulowany przez Baileya zakładał racjonalną, tzn. wykorzystującą ilościowe, matematyczne metody opisu przemian wewnątrzkomórkowych, analizę efektów zmian genetycznych. Schemat tego podejścia przedstawiono na rysunku 1. W tym ujęciu inżynieria metabolizmu obejmuje trzy zasadnicze etapy [3]:

- analizę szlaków metabolicznych,
- projektowanie zmian genetycznych,
- syntezę tzn. tworzenie zrekombinowanych komórek o zmienionych właściwościach.

Cykl analiza – projektowanie – synteza powtarzany jest kilkakrotnie, zaś końcowym efektem jest uzyskanie komórek o pożądanym cechach.

Kinetyczna kontrola szlaku metabolicznego zwykle nie jest związana z pojedynczą reakcją, ale raczej jest rozłożona pomiędzy wiele etapów reakcyjnych (przemian). Powoduje to konieczność przejścia od analizy pojedynczych reakcji do analizy sieci przemian biochemicznych [4].

Inżynieria metaboliczna to interdyscyplinarna dziedzina wykorzystująca zasady inżynierii reakcji chemicznych, technik obliczeń numerycznych, biochemii i biologii molekularnej dla zmiany szlaków metabolicznych w celu lepszego zrozumienia i wy-



Rys. 1. Schemat postępowania w inżynierii metabolicznej.

korzystania przemian wewnątrzkomórkowych do transformacji chemicznych i użytkowania pożytecznych produktów [5].

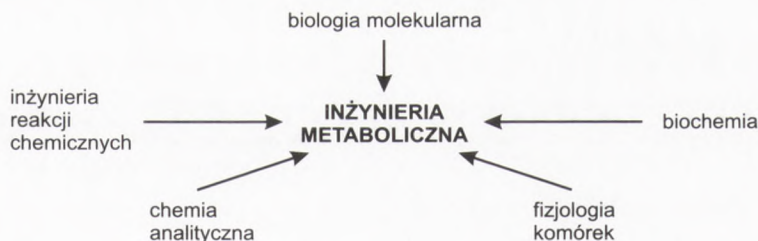
W istocie inżynieria metaboliczna polega na zastosowaniu zasad inżynierii do analizy i projektowania szlaków metabolicznych dla osiągnięcia określonego celu. Tym celem może być zwiększenie produktywności metabolitów lub rozszerzenie zdolności komórek wykorzystywanych w syntezie substancji lub ich degradacji. Dzięki wykorzystaniu opisów ilościowych i modeli matematycznych możliwe było odejście od metody prób i błędów na rzecz ścisłego planowania modyfikacji genetycznych. Zagadnienia modyfikacji metabolizmu zostały przeniesione z obszaru umiejętności (*art*) w obszar ścisłych rozważań naukowych (*science*) [6].

Inżynieria metaboliczna stanowi praktyczne połączenie kilku dyscyplin (rys. 2). Synteza rekombinowanych białek zależy od wielu wewnątrzkomórkowych procesów molekularnych i regulacyjnych obejmujących: transkrypcję, translację, modyfikację potranslacyjną, indukcję i represję. W dodatku wiele genów jest zwykle odpowiedzialnych za wiele izoprotein, a tylko jedna z nich jest pożądanym produktem. Inżynieria metaboliczna proponuje radykalnie nowe podejście do racjonalnego projektowania systemów biologicznych. Dzięki wykorzystaniu najnowszych metod analitycznych i matematycznych do rozpatrywania reakcji w ich złożonych zależnościach, a nie w izolacji proponuje holistyczne podejście do opisu funkcjonowania komórki i dzięki temu pozwala na dokładniejsze zrozumienie interakcji pomiędzy sieciami metabolicznymi i regulacyjnymi, a w rezultacie staje się ważnym czynnikiem w poprawianiu właściwości komórek [7].

Podstawowym zagadnieniem inżynierii metabolicznej jest analiza zmian metabolizmu wywołana zmianami genetycznymi. Dziedzina ta określana jest jako analiza strumieni metabolicznych (MFA – *Metabolic Flux Analysis*). Jej zasadnicze zagadnienia to:

- identyfikacja struktury sieci metabolicznej (topologia szlaków metabolicznych),
- kwantyfikacja strumieni metabolicznych,
- identyfikacja struktury sterowania w sieci metabolicznej.

W ujęciu „klasycznym” inżynieria metaboliczna to droga od wiedzy o kinetyce enzymatycznej, szlakach metabolizmu, strumieniach i strukturze strumieni metabolicznych do manipulacji genetycznych prowadzących do pożądanego efektu. Interesująca jest



Rys. 2. Schemat usytuowania inżynierii metabolicznej.

propozycja zgłoszona przez Bailey'a i wsp. [8] „odwróconej inżynierii metabolicznej”. Polega ona na zidentyfikowaniu w pierwszej kolejności pożądanego fenotypu, a następnie określeniu genetycznych i środowiskowych warunków odpowiadających temu fenotypowi i wreszcie, traktując ten fenotyp jako wzór, zmodyfikowaniu metodami inżynierii genetycznej genotypu wybranego drobnoustroju. W wyniku rozwoju technik genetycznych i technik modelowania przemian wewnątrzkomórkowych [9] możliwa stała się praktyczna realizacja postulatów odwrotnej inżynierii metabolicznej [10,11].

Podstawowymi obszarami wykorzystania inżynierii metabolicznej są [3,4]:

- wytwarzanie produktów nowych dla komórek jak białka heterologiczne, biopolimery,
- tworzenie szlaków do nowych produktów,
- rozszerzenie zakresu substratów asymilowanych przez drobnoustroje, a zwłaszcza degradacja ksenobiotyków,
- ulepszanie fizjologii komórek, np. dostosowanie do warunków hiperosmotycznych, zmiana szlaków asymilacji azotu,
- eliminacja wytwarzania produktów ubocznych,
- zwiększanie wydajności lub produktywności natywnych produktów biosyntezy,
- wytwarzanie związków chiralnych, jako produktów pośrednich dla farmacji.

Odrębnym i niezwykle ważnym obszarem zastosowań metodyki opracowanej w ramach inżynierii metabolicznej są zastosowania medyczne obejmujące analizę metabolizmu całych organów i tkanek, identyfikację mechanizmów rozwoju chorób, ich kontroli i sprawdzanie efektywności terapii [12-16]. Metody rozwinięte dla opisu metabolizmu drobnoustrojów okazały się również skuteczne w ilościowym ujęciu procesów przebiegających w komórkach roślinnych i zwierzęcych [7,17,18]. Różnorodne zastosowania inżynierii metabolicznej zostały ostatnio przedstawione w artykułach przeglądowych [3,10,19-24].

We wszystkich ujęciach inżynierii metabolicznej zasadniczą rolę odgrywają modele matematyczne. Umożliwiają one ilościowe określenie strumieni metabolicznych i analizę wpływu wybranych czynników na wielkość tych strumieni. W pracy przedstawiono zasady tworzenia i wykorzystania modeli matematycznych w inżynierii metabolicznej oraz przedyskutowano ich ograniczenia, a także wskazano na perspektywy rozwoju.

2. Modele metabolizmu

Modele matematyczne systemów biologicznych mogą spełniać wiele funkcji [6,25]:

- organizowanie rozproszonych informacji w spójną całość,
- analiza, które składniki i relacje w złożonym systemie są istotne,
- odkrywanie nowych strategii,
- weryfikacja konwencjonalnej wiedzy,
- zrozumienie istotnych jakościowych zjawisk.

We współczesnych naukach biologicznych, zwłaszcza w biologii molekularnej i genetyce ujęcia ilościowe i modele matematyczne odgrywają coraz większą rolę [26]. Ogromny postęp w metodach eksperymentalnych prowadzi do nagromadzenia olbrzymich zbiorów danych doświadczalnych. Ich właściwa interpretacja i przetworzenie wymaga nowych technik i metod matematycznych. Zrozumienie istoty zjawisk komórkowych nie jest możliwe bez modeli matematycznych i odpowiednich narzędzi analitycznych i obliczeniowych [6]. Zachowania komórek nie można sprowadzać wyłącznie do czynników genetycznych. Uwzględnione muszą być złożone zależności wynikające z oddziaływań pomiędzy genami, białkami i metabolitami [27].

Modele stosowane w inżynierii metabolicznej reprezentują szczególne ujęcie procesów wewnątrzkomórkowych. Celem ich konstruowania nie jest pełna symulacja procesów życiowych komórki, tworzenie komórki *in silico* [28-31], ale jedynie dostarczenie właściwych narzędzi matematycznych dla rozwiązania praktycznie ukierunkowanych zagadnień analizy metabolizmu. To ukierunkowanie powoduje, że modele inżynierii metabolicznej w sposób bardzo uproszczony traktują wiele zjawisk komórkowych. Rozbudowane wersje tych modeli stanowią podstawę szybko rozwijającej się dziedziny jaką jest biologia systemów [7,32,33].

Z kolei modele stosowane w inżynierii metabolicznej, mimo że podobne do modeli stosowanych w klasycznej inżynierii reakcji chemicznych wykazują kilka zasadniczych różnic związanych ze specyfiką przemian wewnątrzkomórkowych. Najważniejsze z nich to [4]:

- reakcje katalizowane są przez enzymy, zaś zestaw enzymów jest charakterystyczny dla danej komórki,
- występuje kontrola (sterowanie) na poziomie genetycznym modulująca szlaki metaboliczne,
- występuje hierarchiczna struktura sterowania aktywnością z wieloma sprzężeniami wstecznymi,
- niektóre cząsteczki mające istotne znaczenie w systemie sterowania i kontroli występują w nieznacznych ilościach, np. kilka egzemplarzy na komórkę,
- złożone systemy reakcji chemicznych można analizować wskazując etap limitujący, tego typu podejście okazuje się niedostateczne w analizie sieci metabolicznych.

Przemiany wewnątrzkomórkowe mogą być rozpatrywane jako sieć reakcji chemicznych. Biochemiczna struktura takiej sieci wynika z wiedzy biochemicznej. Dla podstawowych szlaków metabolicznych znane są wszystkie reakcje chemiczne i ich mechanizmy [34-37], lecz często brak jest danych kinetycznych. Tworzone na potrzeby inżynierii metabolicznej modele przemian wewnątrzkomórkowych nie obejmują wszystkich reakcji przebiegających w komórkach. W niektórych przypadkach wynika to z braku danych o niektórych przemianach. Uwzględnienie wszystkich reakcji powodowałoby znaczny wzrost liczby równań opisujących, a zatem i trudności matematycznych. Nie jest to jednak konieczne z uwagi na funkcje, które modele

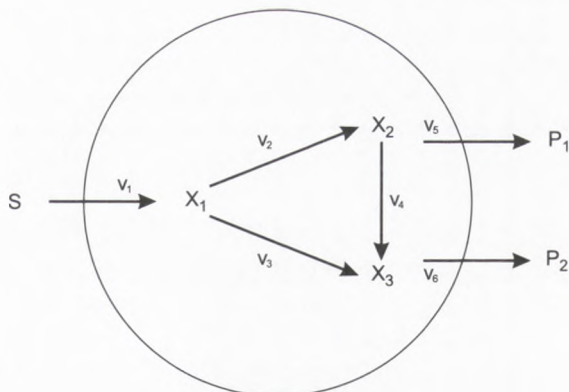
metaboliczne spełniają. Wiele przemian nie jest dokładnie reprezentowanych, gdyż nie odgrywają one istotnej roli (zdaniem autorów danego modelu) w przemianach będących głównym przedmiotem analizy. Najczęściej w modelach metabolizmu uwzględniany jest centralny szlak kataboliczny oraz przemiany prowadzące do wyróżnionych, istotnych w danym modelu, produktów. Przemiany anaboliczne reprezentowane są w uproszczeniu. Wykazano, że można je efektywnie opisać jako syntezę biomasy z nie więcej niż 12 prekursorów [38]. Pozwala to na znaczne zredukowanie liczby reakcji i produktów pośrednich uwzględnianych w modelach metabolizmu. Grupowanie kilku metabolitów w tzw. pule metabolitów i traktowanie ich jako jednego metabolitu pozwala na zredukowanie liczby rozpatrywanych reakcji i substancji oraz zredukowanie liczby równań opisujących sieć metaboliczną. Odrębnym zagadnieniem jest analiza poprawności przyjętej struktury sieci metabolicznej [39,40].

3. Modele stechiometryczne

Najprostszymi modelami umożliwiającymi ilościowy opis przemian metabolicznych są modele stechiometryczne. Modele uwzględniają bilans masy dla sieci reakcji metabolicznych. Większość przemysłowych procesów produkcyjnych przebiega w warunkach quasi-stacjonarnych. Można zatem przyjąć występowanie warunków ustalonych dla przemian wewnątrzkomórkowych. Jest to znaczące uproszczenie rzeczywistych procesów biochemicznych, gdyż pomija występowanie zjawisk oscylacyjnych [41,42]. Pojedyncza komórka może wykazywać fluktuacje wokół pewnego stanu wynikające z jej cyklu życiowego. W badaniach doświadczalnych uzyskuje się uśrednione dane dotyczące pewnej populacji komórek. Metody badania metabolizmu pojedynczych komórek są jeszcze niedostatecznie rozwinięte, aby dostarczyć odpowiedniej liczby danych eksperymentalnych. Założenie o quasi-stacjonarności procesów metabolicznych może dobrze opisywać dane uśrednione w czasie dla populacji komórek, ale nie może być stosowane do opisu pojedynczej komórki.

Dla przykładu rozważymy prostą sieć metaboliczną przedstawioną na rysunku 3. Składa się ona z jednego substratu (S), dwóch produktów (P_1 , P_2), trzech metabolitów wewnętrznych (X_1 , X_2 , X_3) tworzących węzły sieci oraz sześciu strumieni metabolicznych: trzech zewnętrznych (v_1 , v_5 , v_6) i trzech wewnętrznych (v_2 , v_3 , v_4). W stanie ustalonym bilanse metabolitów wewnętrznych mają postać:

$$\begin{aligned} v_1 - v_2 - v_3 &= 0 \\ v_2 - v_4 - v_5 &= 0 \\ v_3 + v_4 - v_6 &= 0 \end{aligned} \quad (1)$$



Rys. 3. Schemat prostej sieci metabolicznej.

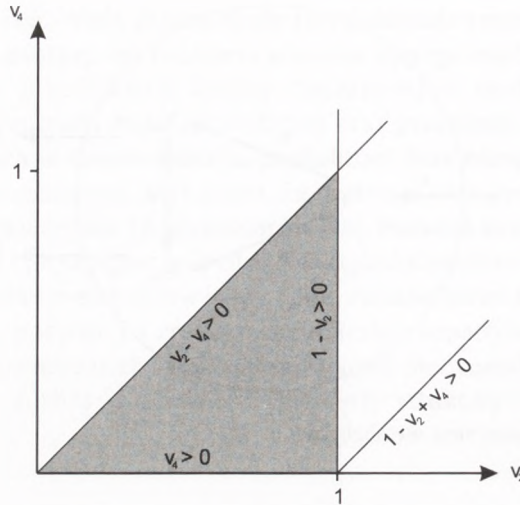
lub w formie macierzowej:

$$\begin{bmatrix} 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (2)$$

w której, obok wektora strumieni występuje macierz zawierająca współczynniki stechiometryczne. Wiersze tej macierzy zawierają współczynniki stechiometryczne bilansu odpowiedniego metabolitu. Macierz współczynników stechiometrycznych zawiera informacje o strukturze sieci (jej topologii). W rozpatrywanym przypadku mamy trzy równania bilansowe i sześć nieznanymi strumieni. Przedstawiona na rysunku 3 sieć jest wyjątkowo prosta. Jeśli znane są wartości strumieni zewnętrznych (v_1 , v_5 i v_6) to możliwe jest wyznaczenie wartości strumieni wewnętrznych. Jeśli założymy, że znany jest jedynie strumień v_1 to układ posiada dwa stopnie swobody tzn. istnieje dwuwymiarowa przestrzeń zawierająca wszystkie dopuszczalne rozwiązania równania (1). Przyjmując strumień v_2 i v_4 jako zmienne niezależne i podstawiając dla uproszczenia $v_1 = 1$, można wyznaczyć pozostałe strumienie:

$$\begin{aligned} v_3 &= 1 - v_2 \\ v_5 &= v_2 - v_4 \\ v_6 &= 1 - v_2 + v_4 \end{aligned} \quad (3)$$

Wartości strumieni są wielkościami nieujemnymi. Można wyznaczyć obszar dopuszczalnych wartości strumieni v_2 i v_4 spełniających równania bilansowe (1). Na ry-



Rys. 4. Obszar dopuszczalnych rozwiązań dla przykładowej sieci metabolicznej.

sunku 4 przedstawiono ograniczenia bilansowe (3) i przestrzeń rozwiązań spełniających równania bilansowe. W narożach trójkąta znajdują się rozwiązania ekstremalne (jeden ze strumieni przyjmuje wartość największą zaś jeden wartość zero). Można powiedzieć, że zaznaczona na rysunku 4 przestrzeń dopuszczalnych rozwiązań reprezentuje fenotyp danej sieci metabolicznej, gdyż zawiera wszystkie możliwe realizacje przepływów w sieci.

Ten prosty przykład modelu stechiometrycznego można uogólnić na dowolną sieć metaboliczną. Bilans masowy dla stanu ustalonego można przedstawić w postaci równania macierzowego:

$$N \cdot v = \vec{0} \quad (4)$$

gdzie N jest macierzą współczynników stechiometrycznych zaś v jest wektorem strumieni metabolicznych. Jeżeli model sieci metabolicznej zawiera n_R strumieni i n_M metabolitów to macierz N ma n_M wierszy i n_R kolumn. Każdy wiersz macierzy N jest zatem zapisem bilansu masy dla pojedynczego węzła sieci metabolicznej.

W typowych modelach metabolicznych liczba analizowanych strumieni metabolicznych zwykle nie przekracza kilkudziesięciu. Dla przykładu w modelu metabolizmu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [43] uwzględniono 31 strumieni metabolicznych i 19 metabolitów. Tworzone są także bardziej rozbudowane modele obejmujące do kilkuset strumieni metabolicznych [30,44]. W modelu sieci metabolicznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* występują 723 metabolity i 1175 strumieni metabolicznych [45]. Operowanie tak dużymi zestawami danych wymaga specjalistycznego oprogramowania [46-49].

Liczba strumieni metabolicznych jest większa od liczby metabolitów uwzględnionych w modelu. Zatem z punktu widzenia matematycznego równanie (4) jest równaniem algebraicznym niedookreślonym; zawiera więcej niewiadomych niż równań. Niektóre strumienie metaboliczne tzw. zewnętrzne – strumienie asymilowanego substratu węglowego, strumienie wydzielanych produktów metabolizmu, mogą zostać zmierzone doświadczalnie. W przypadku prostych modeli metabolicznych zawierających niewiele strumieni wewnątrzkomórkowych możliwe jest zatem wyznaczenie ich wartości na podstawie pomiarów doświadczalnych [50-53]. Stosowanie pomiarów strumieni zewnętrznych metabolitów wraz ze stechiometrią wewnątrzkomórkowych przemian datuje się od prac Aiba i Matsuoki z 1979 r. [54] nad wytwarzaniem kwasu cytrynowego. Pierwsze prace nad wykorzystaniem strumieni wewnątrzkomórkowych do określenia kontroli metabolizmu pochodzą z początku lat dziewięćdziesiątych [53,55].

Analiza modelu stechiometrycznego może dostarczać wskazówek o pożądanych zmianach sieci metabolicznej. Przykładem mogą być bakterie *E. coli*, które są powszechnie używane w inżynierii genetycznej i w technologiach wytwarzania cennych białek. W warunkach wysokiego stężenia komórek i dużej ekspresji genów odpowiedzialnych za wytwarzanie białek występuje niekorzystne wytwarzanie kwasu octowego. Przekierowanie strumieni metabolicznych, prowadzące do ograniczenia wytwarzania octanu, jest jednym z rozwiązań pozwalającym wyeliminować tę niedogodność technologiczną. Dla przykładu utworzenie nowego szlaku od pirogronianiu do acetoiny prowadzi do znacznych zmian rozkładu strumieni metabolicznych i zmniejszenie wydzielania octanu poniżej wartości toksycznej dla komórek [5].

W ogólnym przypadku sieci metabolicznej o n_R strumieniach i n_M węzłach (metabolitach) istnieje przestrzeń o wymiarze nie większym niż $n_R - n_M$ zawierająca wszystkie rozwiązania równania bilansowego (4). Przestrzeń ta, nazywana przestrzenią zerową, obrazuje fenotyp danej sieci metabolicznej. Badanie właściwości przestrzeni zerowej danej sieci metabolicznej może dostarczać istotnych informacji o właściwościach sieci m.in. o maksymalnych „zdolnościach” wytwarzania poszczególnych produktów [56-58].

Rozwiązanie równania (4) wymaga wprowadzenia dodatkowych warunków aby przekształcić układ niedookreślony w układ równań liniowych określony [59]. Liczbę równań w modelu stechiometrycznym można zwiększyć uzupełniając bilans masowy o bilans czynników energetycznych tzn. bilans ATP, UTP, NADH, NADPH. Pozwala to na uzyskanie dodatkowych równań wiążących strumienie przemian katabolicznych, syntezy biomasy i wytwarzania produktu. Nissen i in. [60] wykorzystali bilanse metabolitów energetycznych do opisu metabolizmu drożdży *S. cerevisiae* i wykazali, że możliwe jest zwiększenie wydajności etanolu poprzez redukcję wytwarzania glicerolu i zwiększenie części węgla dostępnego do wytwarzania etanolu. Wytwarzanie glicerolu jest związane z utlenianiem NADH powstającego w reakcjach syntezy biomasy. Wytwarzanie etanolu z glukozy jest w sensie bilansu redoks neutralne –

na mol wytwarzanego etanolu powstaje jeden mol NADH (redukowany jest 1 mol NAD^+) i 1 mol NADH jest utleniany. Zatem utlenianie NADH powstającego podczas syntezy materiałów komórkowych musi przebiegać w innym szlaku metabolicznym – temu służy wytwarzanie glicerolu. Autorom udało się, w wyniku usunięcia genu GHD1 kodującego zależną od NADPH dehydrogenazę glutaminianową oraz nadekspresji genów kodujących syntetazę glutaminy (GLN1) i syntetazę galutaminianową (GLT1) uzyskać zmianę szlaku asymilacji azotu. W miejsce syntezy glutaminianu z amoniaku i α -ketoglutaranu, w której utleniany jest NADPH, aktywowany został szlak, w którym zużywany jest ATP i NADH. W efekcie uzyskano redukcję nadmiaru NADH, zmniejszenie wytwarzania glicerolu o 38% i zwiększenie wydajności etanolu o 10% [60].

Uzupełnienie bilansu masowego bilansem energetycznym wymaga wprowadzenia dodatkowych współczynników stechiometrycznych, ujmujących złożone procesy generowania i zużywania energii. Efektywność fosforylacji oksydacyjnej określana jest tzw. współczynnikiem P/O tzn. liczbą moli ATP wytwarzanym w łańcuchu oddechowym. Zwykle przyjmuje się wartość tego współczynnika równą 2,5 chociaż dane doświadczalne wskazują, że wartość ta może się zmieniać w zależności od stanu fizjologicznego komórek [3,61]. Z kolei zużycie ATP w procesach syntezy materiału komórkowego określane jest współczynnikiem wydajności $Y_{X/ATP}$, którego wartość zależy od składu pożywki i warunków wzrostu. Bilans „metabolitów energetycznych” wymaga dokładnego ilościowego wyznaczenia wszystkich przemian, w których są one wytwarzane bądź zużywane. Zwykle występuje nadmiar wytwarzania NADH w stosunku do potrzeb i muszą być uwzględnione dodatkowe reakcje w których NADH jest utleniany. Również „nadmiar” wytwarzanego ATP jest zużywany w reakcjach z ATPazami [62,63]. Z tych względów wykorzystanie bilansu czynników energetycznych ma ograniczone zastosowanie i jest częściej spotykane w tzw. strukturalnych modelach wzrostu [64] niż w modelowaniu procesów metabolicznych.

Innym sposobem uzyskania rozwiązania równania (4) jest wprowadzenie dodatkowych zależności wynikających z założenia o optymalnym działaniu sieci metabolicznej tzn. przyjęciu, że jest ona optymalna z uwagi na pewną funkcję celu [65]. Dzięki temu rozwiązanie niedookreślonego układu równań może zostać potraktowane jako zadanie optymalizacyjne. Jeżeli funkcja celu jest liniową kombinacją strumieni to zagadnienie należy do zakresu optymalizacji liniowej: poszukuje się takiego wektora strumieni v , który spełnia z jednej strony równanie (4) z drugiej zaś spełnia kryterium optymalności:

$$\sum_i c_i v_i \rightarrow \min \quad (5)$$

gdzie współczynniki c oznaczają wagi poszczególnych strumieni w funkcji celu.

W literaturze przedmiotu przedstawione były różne kryteria optymalności: maksymalizacja szybkości syntezy biomasy [66-69], maksymalizacja wytwarzania pro-

duktu, minimalizacji wytwarzania ATP dla danej szybkości asymilacji substratu [70] lub maksymalizacja produkcji ATP w mitochondriach [71]. Uzyskiwane wyniki istotnie zależą od zastosowanej funkcji celu. Maksymalizacja wytwarzania biomasy w wielu przypadkach daje wyniki zgodne z danymi doświadczalnymi [68,72,73]. Ibarra i in. [72] wykazali, że *E. coli* może ewoluować według zasady maksymalizacji biomasy. Jednakże w pewnych warunkach zachowanie komórek jest niezgodne z tą zasadą [65,72,73]. W takich przypadkach można uzyskać zgodność z danymi doświadczalnymi, stosując wielowymiarową funkcję celu [73]. Okazuje się także, że w niektórych przypadkach, niezależnie od przyjętej funkcji celu można, korzystając z procedury optymalizacyjnej, jednoznacznie wyznaczyć wartości niektórych strumieni wewnętrznych [74,75].

Analizy optymalizacyjne, wykorzystujące różne funkcje celu mogą być użyte do badania zdolności i ograniczeń sieci biochemicznej. Dla przykładu stabilność przemian metabolicznych może być badana poprzez sprawdzenie wpływu zmian maksymalnych strumieni w wybranym szlaku metabolicznym na szybkość wzrostu. W ten sposób Edwards i Palsson [57] wykazali, że *E. coli* jest odporna na zmiany aktywności pojedynczych enzymów lub szlaku metabolicznego. Z kolei van Dien i Lidstrom [67] wykazali doświadczalnie i za pomocą obliczeń modelowych, że u *Methylobacterium extorquens* AM1 występuje kilka nadmiarowych szlaków metabolicznych. Zahamowanie przemian w jednym szlaku nie wpływało na wzrost drobnoustrojów, gdyż pozostałe szlaki kompensowały wprowadzone zmiany.

Beard i in. [76] uzupełnili bilans masy o bilans energii wprowadzając do ograniczeń zmiany potencjału termodynamicznego, a zatem ograniczenia wynikające z II zasady termodynamiki. Zmiana entropii w każdej reakcji jest wielkością nieujemną zatem dla wszystkich strumieni obowiązuje nierówność:

$$v_i \Delta\mu_i \leq 0 \quad (6)$$

gdzie: $\Delta\mu_i$ jest zmianą potencjału termodynamicznego *i*-tej reakcji (różnicą pomiędzy potencjałem termodynamicznym produktów i substratów reakcji). Wyznaczenie szybkości wzrostu i wartości strumieni wewnątrzkomórkowych sprowadzono do rozwiązania nieliniowego problemu optymalizacyjnego. Wynikowa przestrzeń rozwiązań jest podprzestrzenią przestrzeni zerowej przewidywanej przez tradycyjną analizę bilansu masowego. Z uwagi na nieliniowość problemu optymalizacyjnego, możliwe jest znalezienie optimum lokalnego, które nie musi pokrywać się z globalnym rozwiązaniem optymalnym. Stwierdzono, że połączenie bilansu energii z bilansem masy daje szybkość wzrostu zgodną z doświadczeniami, ale obserwowane wartości strumieni różnią się znacząco od danych doświadczalnych [76]. Uwzględnienie bilansu energii w modelu metabolizmu rozszerza możliwości analizy i pozwala np. wyjaśnić, dlaczego pewne geny, które tradycyjna analiza strumieni identyfikowała jako nieznaczące były faktycznie istotnymi [65].

4. Analiza strumieni węgla

Analiza strumieni metabolicznych wykorzystująca jedynie modele stechiometryczne ma istotne ograniczenie wynikające z trudności rozwiązania równania bilansowego. Nie udaje się także na podstawie modeli stechiometrycznych rozróżnić przemian równoległych, szlaków cyklicznych i dwukierunkowych [25,77]. Wynika to z braku dostatecznych danych pomiarowych pozwalających zmniejszyć liczbę stopni swobody modelu stechiometrycznego. Te dodatkowe informacje można uzyskać dzięki technikom znakowania izotopowego. Zastosowanie znaczników izotopowych, od połowy lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, pozwoliło na weryfikację wartości strumieni uzyskanych z bilansów masowych oraz dostarczyło dodatkowych danych o strumieniach wewnętrznych.

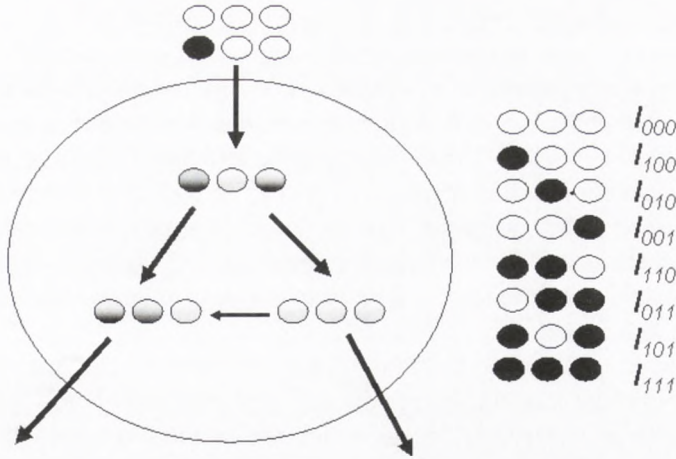
Techniki znakowania izotopowego polegają na wykorzystaniu substratów znakowanych węglem ^{13}C . Najczęściej stosuje się glukozę znakowaną izotopem węgla w pozycji 1. W stanie ustalonym węgiel ^{13}C występuje w metabolitach pośrednich szlaków metabolicznych. Wyznaczając charakterystykę widmową za pomocą ^{13}C NMR i spektrometrii masowej można wyliczyć wartości strumieni metabolicznych [78-80]. Znakowanie izotopem ^{15}N jest przydatne w analizowaniu szlaków asymilacji azotu. Stosowane są także substraty znakowane izotopami ^{17}O , ^{18}O i ^2H [81].

Bilans izotopów może być sporządzony na dwóch poziomach: atomów bądź cząsteczek. W przypadku bilansu na poziomie atomów węgla, oznacza się ułamki wzbogacenia poszczególnych metabolitów i wykorzystuje do obliczania strumieni. Suma znaczonych węgla wchodzących do danego węzła sieci (metabolitu) jest równa sumie znaczonych atomów opuszczających ten węzeł. Równanie bilansowe można zatem zapisać w postaci:

$$\mathbf{F} \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (7)$$

gdzie: \mathbf{F} jest macierzą zawierającą ułamki wzbogacenia poszczególnych metabolitów. Ten typ bilansu jest podobny do bilansu masowego, jedyną różnicą jest to, że strumienie wejściowe i wyjściowe są związane ze współczynnikami wagi według ułamka wzbogacenia izotopów. Układ równań (7) jest dwuliniowy. Jeżeli znane są szybkości wszystkich reakcji to równania stają się liniowe względem ułamków wzbogacenia i istnieje analityczne rozwiązanie zagadnienia. Podobnie, jeżeli znane są ułamki wzbogacenia, układ staje się liniowy względem strumieni, jednakże brak jest dowodu na istnienie tylko jednego rozwiązania [62]. Stosowana jest procedura iteracyjna: zakładane są wartości strumieni i obliczane odpowiednie ułamki wzbogacenia. Wartości te są porównywane z wartościami mierzonymi. Procedurę powtarza się do uzyskania zadowalającego dopasowania wyników obliczeń do danych doświadczalnych [78,82,83].

Obraz jest bardziej skomplikowany w przypadku bilansowania izotopów na poziomie molekuł. Zamiast badać ułamek znaczonych atomów węgla w danym meta-



Rys. 5. Schemat bilansu izotopomerów. Izotopomery cząsteczki o trzech atomach węgla. Ciemne kółko oznacza atom znaczoney.

bolicie, rozpatruje się ułamek cząsteczek mających pewną kombinację znaczonego węgla. Dla cząsteczki o trzech atomach węgla jest 2^3 kombinacji. Pojedyncza taka kombinacja nosi nazwę izotopomeru. Słowo to powstało z połączenia słów izotop i izomer. Rozkład izotopomerów zawiera pełną informację o znakowaniu metabolitu. Na rysunku 5 przedstawiono izotopomery dla cząsteczki C_3 oraz schemat podziału znakowanych atomów w przykładowej sieci metabolicznej. Jeżeli przez I_{100} oznaczymy ułamek izotopomeru, który w pozycji 1 zawiera atom znaczoney zaś w pozycjach 2 i 3 atomy nieznaczone to ułamek wzbogacenia w pozycji 1 jest równy:

$$f_1 = I_{100} + I_{110} + I_{101} + I_{111} \quad (8)$$

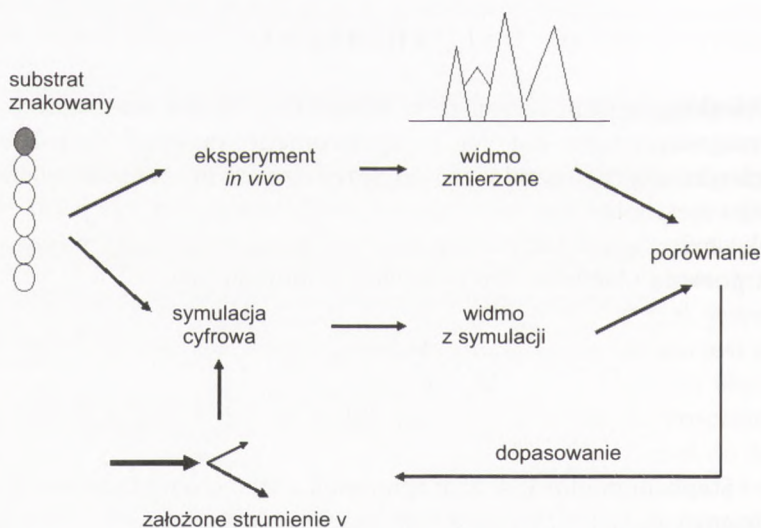
Ułamki wzbogacenia pozycyjnego są wyznaczone za pomocą magnetycznego rezonansu magnetycznego. Z kolei ze spektrometrii masowej można wyznaczyć ułamki wzbogacenia cząsteczki w izotop. Jeżeli oznaczymy przez M_0 ułamek cząsteczek danego metabolitu nie zawierający atomów znaczonego zaś przez M_1 ułamek cząsteczek zawierających jeden atom znaczoney to wartości te można wyrazić następująco za pomocą ułamków odpowiednich izotopomerów:

$$\begin{aligned} M_0 &= I_{000} \\ M_1 &= I_{100} + I_{010} + I_{001} \\ &\dots \text{ itd} \end{aligned} \quad (9)$$

Zupke i Stephanopoulos [84] zaproponowali elegancką metodę sporządzania bilansu izotopowego wykorzystującą tzw. macierze mapujące tzn. macierze zawierające informacje o możliwych przejściach izotopów pomiędzy substratami i pro-

duktami reakcji. Schmidt i in. [85,86] rozszerzyli zastosowanie macierzy mapującej na bilans izotopomerów. We wszystkich tych metodach podstawą obliczeń jest model stechiometryczny metabolizmu. Bilans izotopomerów umożliwia wykorzystanie danych pochodzących z różnych źródeł: spektrometrii masowej i jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [87,88]. Z uwagi na złożoność obliczeń wynikającą ze wzrostu ilości zmiennych w porównaniu z analizą wzbogacenia ułamkowego bilans izotopomerów był wykorzystywany z początku do analizy jedynie reakcji jednomo- lekularnych takich jak cykl Krebsa [62]. Rozwój metod matematycznych pozwolił rozszerzyć analizę izotopomerów również na reakcje dwucząsteczkowe oraz od- wracalne [79,80,82,83,89,90].

Analiza oparta na bilansie izotopomerów jest bardziej złożona niż obliczenia ułamkowego wzbogacenia [91]. Przyczyną tego jest nieliniowość równań bilansu izo- topomerów jako konsekwencja tego, że niektóre metabolity są złożone z atomów węgla pochodzących z kilku cząsteczek. Nawet w przypadku gdy znane są szybkości wszystkich reakcji, układ równań bilansowych nadal pozostaje nieliniowy. Ponieważ liczba równań w układzie wzrasta w porównaniu z modelem stechiometrycznym, analityczne rozwiązanie rozkładu strumieni staje się trudne do uzyskania. Najczę- ściej przyjmuje się założenie o stanie pseudorównowagi, co pozwala uprościć model matematyczny. To przybliżenie ma zastosowanie, wtedy gdy reakcja przebiega bli- skko stanu równowagi i niektóre metabolity mogą być zebrane w pojedynczą pulę [92]. W ogólnym przypadku stosuje się metodę iteracyjnego wyznaczania wartości strumieni metabolicznych przedstawioną schematycznie na rysunku 6. Dla założone- go rozkładu strumieni wyznacza się rozkład izotopomerów, a następnie oblicza się



Rys. 6. Schemat postępowania w analizie izotopowej.

sygnał NMR odpowiadający temu rozkładowi i porównuje go z sygnałem wyznaczonym doświadczalnie. Procedura ma charakter iteracyjny: jest przerywana po uzyskaniu odpowiedniego dopasowania wyników obliczeń do danych eksperymentalnych. Warto podkreślić, że podstawą obliczeń jest przyjęty model metabolizmu.

Mierzony rozkład wewnątrzkomórkowy izotopomerów nigdy nie jest kompletny, gdyż tylko niektóre metabolity mogą być wyizolowane. Ponadto dla danej puli izotopomerów nie wszystkie frakcje mogą być mierzalne. Skwantyfikowane zostały pule metabolitów trzyatomowych i częściowo czteroatomowych [80]. Postęp w metodach badawczych pozwala na zwiększanie liczby oznaczanych związków i dokładniejsze śledzenie strumieni wewnątrzkomórkowych. W badaniach Daunera i in. [93] mierzono 133 sygnały NMR oraz 468 sygnałów spektrometrii masowej, co pozwoliło na pomiar ponad 1000 izotopomerów w pojedynczym eksperymencie.

Mimo że modelowanie wykorzystujące bilans izotopomerów jest złożone i wymaga czasochłonnych obliczeń, ta metoda analizy umożliwia przetwarzanie wszystkich rodzajów danych uzyskanych z doświadczeń i jest obecnie podstawowym narzędziem wykorzystywanym do identyfikacji strumieni metabolicznych [77]. Wyniki badań izotopowych reprezentują wartości średnie dla populacji komórek („uśredniony metabolizm”), a nie metabolizm pojedynczej komórki. Przyszłość analizy sieci metabolicznych leży w rozszerzeniu analizy metabolizmu od uśrednionego czasowo do zależnych od czasu zmian w metabolizmie, które są konsekwencją np. rozmnażania komórek.

5. Analiza regulacji metabolicznej

Analiza strumieni metabolicznych ukierunkowana jest na wyznaczenie wartości strumieni metabolitów w komórkach. Nie daje jednak odpowiedzi na istotne pytanie jak zmienić wartości tych strumieni w pożądanym kierunku. Tego typu informacji może dostarczyć analiza regulacji metabolicznej (MCA – *Metabolic Control Analysis*), która zajmuje się wpływem zmian poszczególnych czynników na wielkość strumieni metabolicznych. Podstawowe założenia teorii MCA zostały sformułowane na początku lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku [94]. Początkowa metoda MCA była obiektem zainteresowań jedynie teoretyków zajmujących się kinetyką reakcji enzymatycznych. Nowe metody badawcze umożliwiające uzyskiwanie dokładniejszych danych o dynamice metabolizmu umożliwiły praktyczne wykorzystanie tej metodyki.

Teoria MCA opiera się na następujących założeniach [95,96]:

- istnieje pojedynczy stan ustalony sieci metabolicznej,
- stężenia metabolitów i szybkości reakcji są funkcją jedynie stężenia enzymów,
- analizowany układ jest homogeniczny.

Miarą stopnia regulacji danego strumienia metabolicznego są tzw. współczynniki regulacji.

Współczynnik regulacji strumienia (FCC – *flow control coefficient*):

$$C_{ij}^J = \frac{d(\ln v_i)}{d(\ln E_j)} \quad (10)$$

określa zmiany i-tego strumienia przy zmianach aktywności j-tego enzymu.

Współczynnik regulacji stężenia (CCC – *concentration control coefficient*):

$$C_{ij}^X = \frac{d(\ln X_i)}{d(\ln E_j)} \quad (11)$$

określa zmiany stężenia i-tego metabolitu przy zmianach aktywności j-tego enzymu.

Zależność pomiędzy zmianami i-tego strumienia a zmianami aktywności j-tego enzymu określa współczynnik elastyczności:

$$\varepsilon_{ij}^X = \frac{d(\ln v_i)}{d(\ln X_j)} \quad (12)$$

Podstawowe twierdzenia teorii MCA stanowią tzw. twierdzenia sumacyjne [95]:

$$\sum_j \frac{\partial(\ln v_i)}{\partial(\ln E_j)} = 1 \quad (13)$$

$$\sum_j \frac{\partial(\ln X_i)}{\partial(\ln E_j)} = 0 \quad (14)$$

Zgodnie z pierwszym twierdzeniem sumacyjnym dla danego strumienia metabolicznego suma wszystkich współczynników regulacji strumienia jest stała i równa jeden. Oznacza to, że wartość danego strumienia metabolicznego może być zależna od aktywności wielu enzymów. Wyznaczenie wartości współczynników regulacji strumienia umożliwia określenie enzymów, które mają dominujący wpływ na wartość danego strumienia (wysokie wartości współczynników regulacji). Drugie twierdzenie sumacyjne określa wpływ enzymów na stężenie danego metabolitu.

Związek pomiędzy współczynnikami regulacji i współczynnikami elastyczności podaje zależność:

$$C^J = I + C^X \cdot \varepsilon^X \quad (15)$$

Na podstawie wartości współczynników regulacji stężenia i współczynników elastyczności można obliczyć wartości współczynników regulacji strumienia. Wartości współczynników regulacji mogą być obliczane bądź z wykorzystaniem kinetycznych modeli metabolizmu omówionych w dalszej części artykułu, bądź na podstawie badań efektów zaburzeń aktywności enzymów. Metoda wykorzystująca równania kinetyczne jest efektywna pod warunkiem, że model reprezentuje rzeczywistą sieć metaboliczną. Tworzenie takich modeli jest bardzo trudne z uwagi na kłopoty z identyfikacją i estymacją wielu parametrów kinetycznych [97]. Bezpośrednie po-

miary *in vivo* dostarczają bardziej wiarygodnych danych. Podstawową techniką pomiarową jest metoda zaburzeń [98]. Polega ona na pomiarze rozkładu strumieni metabolicznych w pewnym stanie ustalonym, a następnie na wprowadzeniu zaburzenia tego stanu w postaci zmiany aktywności enzymów (dodawanie inhibitorów, nadekspresja białek, usuwanie genów [99]). Schlosser i in. [100] zastosowali metodę zaburzeń do analizy fermentacji glukozy przez drożdże *S. cerevisiae* i wyznaczenia kontrolujących reakcji oraz określenia możliwości zwiększenia produktywności etanolu. Simpson i in. [101] wykazali przydatność metody perturbacyjnej w analizie biosyntezy lizyny przez *Corynebacterium glutamicum*. Również w analizie biosyntezy kwasu glutaminowego wyznaczenie wartości współczynników regulacji umożliwiło zaplanowanie odpowiednich modyfikacji genetycznych [97]. Szczególnie użyteczna jest analiza wykorzystująca grupowe współczynniki regulacji [101] tzn. współczynniki odnoszące się nie do pojedynczych strumieni metabolicznych i pojedynczych metabolitów, ale grup strumieni tworzących bloki wokół głównych węzłów. Taka agregacja strumieni, zmniejsza liczbę niezbędnych danych i ułatwia obliczenia [102].

Analiza regulacji metabolicznej (MCA) opiera się na dobrze rozwiniętej teorii, wykorzystuje precyzyjnie definiowane wielkości ilościowe i może być użytecznym narzędziem analizy sieci metabolicznych. Wyniki analiz teoretycznych i badań doświadczalnych wskazują, że regulacja danego szlaku metabolicznego jest rozproszona między wiele enzymów. Uzyskanie zatem pożądanych zmian w metabolizmie wymaga zmian aktywności wielu enzymów. To wskazuje na różnice pomiędzy tradycyjną inżynierią genetyczną działającą wg zasady „jeden gen – jeden produkt” a inżynierią metaboliczną, która postuluje działanie wg zasady „wiele genów – jeden produkt”.

Wyniki analizy regulacji metabolicznej stanowią ważne uzupełnienie analizy strumieni metabolicznych. Warto jednak zauważyć, że z punktu widzenia matematycznego, współczynniki regulacji są jedynie logarytmicznymi współczynnikami czułości dla określonego stanu ustalonego i nie dają pełnej charakterystyki dynamicznej metabolizmu [6], a jedynie określają lokalne właściwości układu. Wartości współczynników regulacji silnie zależą od aktualnego rozkładu strumieni metabolicznych. Przemiana metaboliczna, która nie odgrywa istotnej roli dla jednego stanu fizjologicznego, może być głównym etapem w innym stanie [103]. Współczynniki regulacji nie mogą być stosowane do przewidywania zmian strumieni w wyniku dużych zmian (zaburzeń) wartości parametrów. Dla tego typu sytuacji bardziej przydatne są kinetyczne modele metabolizmu uwzględniające nieliniowość przemian metabolicznych.

6. Modele kinetyczne metabolizmu

W odróżnieniu od modeli stechiometrycznych ujęcia kinetyczne, zwane często modelami mechanistycznymi [25] próbują opisać bezpośrednio strukturę regulacji metabolizmu. Podstawowym założeniem większości modeli mechanistycznych jest przyjęcie, że wszystkie metabolity są jednorodnie rozproszone wewnątrz komórki.

Pozwala to pominąć efekty wynikające z występowania wewnętrznych gradientów stężeń i zjawisk transportu masy wewnątrz komórki. W modelach stechiometrycznych występują jedynie wartości strumieni metabolicznych zaś w modelach kinetycznych wartości strumieni wyznaczone są na podstawie odpowiednich równań opisujących szybkość przemian enzymatycznych. Równania kinetyczne sformułowane są na podstawie badań *in vitro*, a w przypadku braku danych o kinetyce przyjmowane są pewne formalne równania kinetyczne. W niektórych przypadkach efektywnym rozwiązaniem jest wykorzystanie w miejsce klasycznej kinetyki enzymatycznej równań kinetyki fraktalnej [104].

W stanie pseudoustalonym kinetyczny model metabolizmu można przedstawić w postaci układu równań nieliniowych:

$$\mathbf{N} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{S}, \mathbf{X}, \mathbf{E}, \mathbf{p}) = \vec{0} \quad (16)$$

gdzie \mathbf{S} jest wektorem zewnątrzkomórkowych substratów, \mathbf{X} wektorem metabolitów wewnątrzkomórkowych, \mathbf{E} wektorem aktywności enzymów zaś \mathbf{p} wektorem parametrów kinetycznych.

Rozwiązanie układu (16) wymaga znajomości wartości dużej liczby parametrów kinetycznych. Większość niezbędnych danych jest niedostępna [25]. Niektóre dane, np. dotyczące fosfotransferazy uzyskane zostały stosunkowo niedawno [105]. Brak jest także danych o wszystkich efektorach reakcji enzymatycznych. Wiele publikowanych danych o kinetyce przemian wewnątrzkomórkowych dotyczy różnych organizmów i było uzyskane za pomocą różnych technik badawczych. Wartości parametrów kinetycznych publikowane przez różnych autorów mogą różnić się nawet o rząd wielkości. Niemożliwe jest zatem uzyskanie, na podstawie danych literaturowych, jednego spójnego zestawu danych kinetycznych dla rozważanego drobnoustroju. Wartości aktywności enzymów (wektor \mathbf{E}) muszą być wyznaczone na podstawie danych doświadczalnych. Najczęściej przyjmuje się, że wartości te są stałe. Pomija się w ten sposób efekty nieodwracalnej inaktywacji enzymów oraz procesy degradacji. Brak dostatecznie wiarygodnych danych doświadczalnych powoduje, że idea stworzenia pełnego modelu kinetycznego procesów metabolicznych (życie *in silico* [28,29,31]) napotyka na duże trudności. Niemniej jednak, próby wykorzystania modeli kinetycznych, w ograniczonym zakresie, pozwalają na uzyskanie interesujących rezultatów. Ciekawym zastosowaniem modeli kinetycznych jest wyznaczenie optymalnych wartości parametrów, np. maksymalizujących produkcję określonego metabolitu [106,107]. Uzyskane dane mogą stanowić wskazania co do kierunku niezbędnych zmian genetycznych mikroorganizmu: nadekspresji jednych białek i zahamowania wytwarzania innych.

Równanie (16) opisuje stan ustalony. W przypadku stanu nieustalonego układ równań ma postać:

$$\frac{d\mathbf{X}}{dt} = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{S}, \mathbf{X}, \mathbf{E}, \mathbf{p}) \quad (17)$$

W miejsce układu liniowych równań algebraicznych wykorzystywanych w modelach stechiometrycznych, w modelach dynamicznych pojawia się układ nieliniowych równań różniczkowych. Układ (17) opisuje stany nieustalone sieci metabolicznej, zatem takie, które mogą być wywołane szybkimi zmianami środowiska. Najczęściej w badaniach doświadczalnych wykorzystuje się impulsowe bądź skokowe zmiany stężenia substratu. Metody szybkiego próbkowania [108] rozwinięte w ostatnich latach pozwalają na pomiary stężenia 15 metabolitów z częstotliwością 5 Hz [109]. Szybkie oznaczenia i automatyczne metody pomiarów dostarczają olbrzymiej liczby danych, których usystematyzowanie wymaga opracowania odpowiednich modeli matematycznych oraz algorytmów numerycznych stosowanych do estymacji wartości parametrów modeli. Modele niestacjonarne pozwalają na symulacje zjawisk, których opis innymi metodami nie jest możliwy: stabilność stanów stacjonarnych, wielokrotne stany ustalone, zjawiska oscylacyjne [110].

Bailey i Hazamanikatis [111,112] zaproponowali uproszczenie zagadnienia opisanego równaniem (17). Wprowadzając nowe zmienne:

$$z_i = \ln \left(\frac{x_i}{x_{i,0}} \right) \quad (18)$$

$$w_i = \ln \left(\frac{E_i}{E_{i,0}} \right) \quad (19)$$

oznaczające względne zmiany stężenia metabolitów i aktywności enzymów wokół pewnego stanu ustalonego reprezentowanego przez wartości $x_{i,0}$ i $E_{i,0}$, można równanie (17) przybliżyć równaniem liniowym:

$$\frac{dz}{dt} = \Theta z + \Omega w \quad (20)$$

gdzie macierze Θ , Ω są funkcjami macierzy współczynników regulacji. Równanie (20) nosi nazwę równania liniowo-logarytmicznego. Pozwala ono na opisanie dynamiki sieci metabolicznej dla niewielkich zaburzeń wokół stanu równowagi [112-115]. W przypadku dużych zaburzeń strumieni metabolicznych niezbędne jest stosowanie metod nieliniowej analizy regulacji [116]. Zaletą kinetyki logarytmiczno-liniowej jest wykorzystanie wartości współczynników regulacji metabolicznej i elastyczności wyznaczanych na drodze doświadczalnej. Dzięki temu omija się zagadnienie dokładnego wyznaczenia równań i parametrów kinetycznych poszczególnych reakcji metabolicznych. Model liniowo-logarytmiczny został z powodzeniem zastosowany do analizy możliwości zwiększenia wydajności lizyny [117].

7. Modele regulacji genetycznej

W przedstawionych modelach aktywność enzymów przyjmowana była za stałą. Uwzględniają one mechanizmy kontroli przemian enzymatycznych wynikające ze zmiany stężenia metabolitów i ich oddziaływania na szybkość reakcji enzymatycznych. Nie ujmują zjawisk regulacji genetycznej związanych z ekspresją genów i zmianą aktywności enzymów. Zasadnicza różnica pomiędzy regulacją metaboliczną a genetyczną związana jest ze znacznie większą stałą czasową regulacji genetycznej. Stałe czasowe reakcji enzymatycznych wynoszą od 10^{-5} s do kilku sekund, podczas gdy stałe czasowe mechanizmów regulacji genetycznej wynoszą od 10^3 do 10^8 s, są zatem o kilka rzędów wielkości większe [25]. W krótkich przedziałach czasowych obserwuje się jedynie efekty regulacji metabolicznej. Dla dłuższych czasów obserwacji efekty regulacji genetycznej mogą odgrywać znaczącą rolę.

Procesy regulacji genetycznej mogą być w zasadzie opisane podobnie jak przemiany metaboliczne, jako zespół reakcji. Jednakże liczba elementarnych reakcji z których składają się procesy translacji, transkrypcji, aktywacji, represji, inaktywacji i degradacji pojedynczego białka jest na tyle duża, że w praktyce, w modelach matematycznych, konieczne jest stosowanie znacznie uproszczonych opisów. W najprostszych modelach fenomenologicznych aktywność enzymów jest przyjmowana za stałą i określana na podstawie pomiarów doświadczalnych [118]. Takie modele oczywiście nie wyjaśniają mechanizmów regulacji aktywności enzymów chociaż mogą poprawnie odwzorowywać dane pomiarowe. W modelach mechanistycznych wprowadza się proste równania formalne opisujące zmianę w czasie aktywności enzymów i zależność tej aktywności od stanu procesów metabolicznych. Modele mechanistyczne pozwalają na przedstawienie nawet złożonych mechanizmów regulacji. W pracy Tomisty i in. uwzględniono na przykład 100 genów [119]. Metodami mechanistycznymi można modelować również złożone, hierarchiczne struktury regulacji [120]. Podstawowa trudność stosowania modeli mechanistycznych związana jest z koniecznością wyznaczenia wartości dużej liczby nieznanych parametrów równań kinetycznych.

Odrębne podejście do zagadnienia prezentują modele optymalizacyjne. W modelach tych zakłada się, że w wyniku procesów ewolucyjnych wykształcone zostały mechanizmy maksymalizujące pewne wielkości (kryteria optymalizacji). Zaletą metod optymalizacji jest znaczne uproszczenie problemu. W modelach jedynie część sieci metabolicznej opisywana jest za pomocą znanych równań kinetycznych. Pozostałe przemiany opisywane są za pomocą arbitralnie przyjętych równań formalnych, zaś niektóre przemiany wręcz pominięto jako mało istotne. Varner i Ramkrishna [121] opracowali sformalizowane ujęcie cybernetyczne zagadnienia optymalizacji. Bazuje ono na założeniu, że wydzielonym fragmentom sieci metabolicznej można przypisać pewne kryteria optymalizacyjne, np. maksymalizacja wytwarzania końcowego produktu danego szlaku metabolicznego. Poszczególne podsieci współzawodniczą o zasoby wewnątrzkomórkowe. W modelu cybernetycznym zakłada się

zatem pewną dekompozycję kryteriów optymalizacji. W miejsce jednego, globalnego kryterium, wprowadza się kilka kryteriów dla wybranych podsieci metabolicznych. Możliwe jest zatem także utworzenie hierarchicznej struktury celów optymalizacji metabolicznej.

Ograniczenia regulacyjne zostały po raz pierwszy uwzględnione jako operatory boolowskie [122]. Oddziaływanie poszczególnych czynników, np. metabolitów hamujących transkrypcję genu kodującego odpowiedni enzym opisano jako operację logiczną: jeśli dany czynnik występuje szybkość reakcji katalizowanej przez enzym jest równa zeru, w przeciwnym przypadku przyjmuje wartość niezerową. Analogicznie opisano indukcję genu. Model stechiometryczny uzupełniony w ten sposób dodatkowym zestawem warunków został użyty do rozwiązania zagadnienia maksymalizacji szybkości wzrostu. Covert i in. [123] stwierdzili, że takie ujęcie jest wystarczające do wyeliminowania znacznej liczby szlaków metabolicznych jako nierealizowalnych. Wynika to stąd, że wiele ekstremalnych szlaków wymaga dwóch lub więcej niespójnych zdarzeń regulacyjnych jednocześnie. Mahadevan i in. [68] opisali regulacje transkrypcyjne i translacyjne w sposób bardziej ilościowy. Autorzy porównali dwa ujęcia dynamiki metabolizmu dla opisu zjawiska diauksji (wzrostu dwufazowego): dynamiczną optymalizację (nieliniowe programowanie) i statyczną optymalizację (liniowe programowanie). Stwierdzono, że dynamiczna optymalizacja może być użyta zarówno z wykorzystaniem chwilowej funkcji celu jak i funkcji celu określonej dla punktu końcowego. Analiza wykorzystująca chwilową funkcję celu dawała wyniki bardziej zbieżne z obserwowanymi zachowaniami. Statyczna optymalizacja była efektywna jedynie z wykorzystaniem chwilowej funkcji celu.

Nowym obszarem dla inżynierii metabolicznej jest analiza przenoszenia sygnału w szlakach metabolicznych i wzajemnego oddziaływania pomiędzy szlakami. Jeden ligand może spowodować ekspresję wielu genów jednocześnie ekspresja pojedynczego genu może oddziaływać na więcej niż jeden ligand. Ilościowy opis takich zjawisk wymaga ujęcia systemowego. Zasadnicze zagadnienia to [4]:

- określenie struktury sieci przenoszenia informacji,
- opracowanie właściwych technik pomiarowych,
- dostępność technik pomiaru aktywacji białek.

8. Podsumowanie

Racjonalne projektowanie szlaków metabolicznych rozwinęło się w ciągu ostatniej dekady w funkcjonalną dyscyplinę – inżynierię metaboliczną [124-127]. Zainteresowanie tą dyscypliną jest pobudzone istniejącymi i potencjalnie komercyjnymi zastosowaniami. Dostępne narzędzia biologiczne pozwalają względnie łatwo manipulować strukturą sieci metabolicznej. Ten etap w procesie projektowania nie stanowi obecnie czynnika limitującego, jest nim niedostatek narzędzi matematycznych [121].

W ostatniej dekadzie inżynieria metaboliczna rozwinęła badania nad integracją i systemową analizą szlaków biosyntezy. Wyszła w ten sposób poza prostą amplifikację genów i modulację ekspresji genów. Objęła zagadnienia związane z syntezą szlaków metabolicznych, określaniem etapów i węzłów limitujących, termodynamicznymi ograniczeniami metabolizmu oraz rozkładem i kontrolą szlaków metabolicznych.

Rozwiązywanie analitycznych i obliczeniowych problemów stanowi obecnie centralne zagadnienie rozwoju narzędzi modelowych dla inżynierii metabolicznej. W stosunku do klasycznych modeli używanych w inżynierii bioprosesowej, modele matematyczne metabolizmu składają się ze znacznie większej liczby równań. Wymaga to rozwoju i zastosowania nowych, efektywnych algorytmów tworzenia modeli, ich analizy, walidacji oraz rozwiązywania równań modelu. Niezbędna jest interdyscyplinarna współpraca obejmująca takie dziedziny jak: techniki obliczeń numerycznych, teoria systemów nieliniowych i dyskretnych, inżynieria programowania i symulacji cyfrowej oraz bioinformatyka.

Spis oznaczeń

- C_{ij}^J – współczynnik regulacji strumienia
- C^J – macierz współczynników regulacji strumieni
- C_{ij}^X – współczynnik regulacji stężenia
- C^X – macierz współczynników regulacji stężeń
- E – wektor aktywności enzymów
- f_i – ułamek wzbogacenia w pozycji i
- F – macierz ułamków wzbogacenia
- I_{nnn} – ułamek iztopomeru pozycyjnego
- M_i – ułamek wzbogacenia w i atomów znaczących
- n_M – liczba metabolitów w modelu sieci metabolicznej, liczba węzłów sieci
- n_R – liczba reakcji metabolicznych w modelu sieci metabolicznej, liczba strumieni metabolicznych
- N – macierz współczynników stechiometrycznych
- p – wektor parametrów kinetycznych
- S – wektor substratów
- v – wektor strumieni metabolicznych
- X – wektor stężenia metabolitów wewnętrznych
- w_i – względne odchylenie aktywności od wartości stacjonarnej
- z_i – względne odchylenie stężenia metabolitu od wartości stacjonarnej
- ε_{ij}^X – współczynnik elastyczności
- ε – macierz współczynników elastyczności
- $\Delta\mu_i$ – zmiana potencjału termodynamicznego i -tej reakcji

Literatura

1. Bailey J. E., (1991), Science, 252, 1668-1674.
2. Cameron D. C., Tong I.-T., (1993), Appl. Biochem. Biotechnol., 38, 105-140.
3. Nielsen J., (2001), Appl. Microbiol. Biotechnol., 55, 263-283.
4. Stephanopoulos G., Stafford D. E., (2002), Chem. Eng. Sci., 57, 2595-2602.

5. Yang Y.-T, Bennett G. N., San K.-Y., (1998), *Electronic J. Biotechnol.*, 1, 1-8.
6. Bailey J. E., (1998), *Biotechnol. Prog.*, 14, 8-20.
7. Kell D. B., (2004), *Current Opinion in Microbiol.*, 7, 296-307.
8. Bailey J. E., Sburlati Ai, Hatzimanikatis V., Lee K., Renner W. A., Tsai P. S., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 109-121.
9. Laubenbacher R., Stigler B., (2004), *J. Theor. Biol.*, 229, 523-537.
10. Chotani G., Dodge T., Hsu A., Kumar M., LaDuca R., Trimber D., Weyler W., Sanford K., (2000), *Biochim. Biophys. Acta*, 1543, 434-455.
11. Gill R., (2003), *Current Opinion in Biotechnol.*, 14, 484-490.
12. Schuster S., (1999), *Metabolic Engineering*, 1, 232-242.
13. Bowden A. C., (1999), *Nature Biotechnol.*, 17, 641-643.
14. Voit E. O., (2002), *Drug Discovery Today*, 7, 621-628.
15. Kitano H., (2002), *Nature*, 420, 206-211.
16. Hegde P. S., White I. R., Debouck C., (2003), *Current Opinion in Biotechnol.*, 14, 647-651.
17. Godia F., Cairó J. J., Gñdia F., Cairó J. J., Gñdia F., Cairó J. J., (2002), *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24, 289-298.
18. Voit E. O., (2004), *Drug Discovery Today: Biosilico*, 2, 182-189.
19. Bongaerts J., Krämer M., Müller U., Raeven L., Wubbolts M., (2001), *Metabolic Engineering*, 3, 289-300.
20. Kleerebezem M., Boels I. C., Groot M. N., Mierau I., Sybesma W., Hugenholtz J., (2002), *J. Biotechnol.*, 98, 199-213.
21. Hanson A. D., Shanks J. V., (2002), *Metabolic Engineering*, 4, 1-2.
22. Verpoorte R., van der Heijden R., ten Hoopen H. J. G., Memelink J., (1999), *Biotechnology Letters*, 21, 467-479.
23. de Vos W., Hugenholtz J., (2004), *TrendsBiotechnol.*, 22, 72-79.
24. Capell T., Christou P., (2004), *Current Opinion in Biotechnol.*, 15, 148-154.
25. Wiechert W., (2002), *J. Biotechnol.*, 94, 37-63.
26. May R. M., (2004), *Science*, 303, 790-793.
27. Strohm R. C., (1997), *Nature Biotechnol.*, 15, 194-200.
28. Westerhoff H. V., (2001), *Metabolic Engineering*, 3, 207-210.
29. Covert M. W., Schilling C. H., Famili I., Edwards J. S., Goryanin I. I., Selkov E., Palsson B. Ø., (2001), *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 179-186.
30. Price N. D., Papin J. A., Schilling C. H., Palsson B. Ø., (2003), *TrendsBiotechnol.*, 21, 162-169.
31. Palsson B. Ø., (2004), *Current Opinion in Biotechnol.*, 15, 50-51.
32. Stelling J., (2004), *Current Opinion in Microbiol.*, 7, 513-518.
33. Krzystek L., (2004), *Inż. Chem. Proc.*, 25, 1963-1971.
34. Gerhard M., (1998), *Biosystems*, 47, 1-7.
35. Michal G., (1999), *An atlas of biochemical and molecular biology*, Wiley, New York.
36. Kanehisa M., (1999), *Post-genomic informatics*, Oxford University Press, London.
37. Krieger C. J., Zhang P., Mueller L. A., Wang A., Paley S., Arnaud M., Pick J., Rhee S. Z., Karp P. D., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, D438-D442.
38. Neidhardt F., Ingraham J., Schaechter M., (1990), *Physiology of the bacterial cell – amolecular approach*, Sinauer Associates.
39. Simpson T., Follstad B., Stephanopoulos G., (1999), *J. Biotechnol.*, 71, 207-223.
40. Papin J. A., Stelling J., Price N. D., Klant S., Schuster S., Palsson B. Ø., (2004), *TrendsBiotechnol.*, 22, 400-405.
41. Goldbeter A., (1996), *Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
42. Goldbeter A., (2002), *Nature*, 420, 238-245.
43. Zhang H., Shimizu K., Yao S., (2003), *Biochem. Engng. J.*, 16, 211-220.
44. Reed J. L., Palsson B. Ø., (2003), *J. Bacteriol.*, 185, 2692-2699.
45. Famili I., Forster J., Nielson J., Palsson B. Ø., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 13134-13139.
46. Wittmann C., Heinzele E., (2001), *Eur. J. Biochem.*, 268, 2441-2455.

47. Wittman C., Heinze E., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 642-647.
48. Heinrich R., Schuster S., (1996), *The Regulation of Cellular Systems*, Chapman & Hall, London.
49. Wittmann C., Heinze E., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 642-647.
50. Varma A., Palsson B. Ø., (1994), *Bio/Technology*, 12, 994-998.
51. van der Heijden R. T. J. M., Heijnen J. J., Helling C., Romein B., Luyben K. Ch. A. M., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 3-10.
52. van der Heijden R. T. M., Romein B., Heijnen J. J., Helling C., Luyben K. Ch. A. M., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 11-20.
53. Vallino J. J., Stephanopoulos G., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 633-646.
54. Aiba S., Matsuoka M., (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1373-1386.
55. Vallino J. J., Stephanopoulos G., (1994), *Biotechnol. Prog.*, 10, 327-334.
56. Schilling C. H., Edwards J. S., Palsson B. Ø., (1999), *Biotechnol. Prog.*, 15, 288-295.
57. Edwards J. S., Palsson B. Ø., (2000), *Biotechnol. Prog.*, 16, 927-939.
58. Schilling C. H., Palsson B. Ø., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4193-4198.
59. Bonarius H. P. J., Schmid G., Tramper J., (1997), *Trends Biotechnol.*, 15, 227-238.
60. Nissen, T. L., Kiehlbrandt M. C., Nielsen J., Villadsen J., (2000), *Metabolic Engineering*, 2, 69-77.
61. Sauer U., Bailey J. E., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 66, 750-754.
62. Christensen B., Nielsen J., (2000), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 66, 209-231.
63. van Gulik W. M., Heijnen J. J., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 681-698.
64. Szewczyk K. W., (2002), *Biotechnologia*, 57, 15-32.
65. Segre D., Vitkup D., Church G. M., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15112-15117.
66. Edwards J. S., Ramakrishna R., Palsson B. Ø., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 27-36.
67. van Dien S. J., Lidstrom M. E., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 78, 296-312.
68. Mahadevan R., Edwards J. S., Doyle F. J., (2002), *Biophys. J.*, 83, 1331-1340.
69. Edwards J. S., Palsson B. Ø., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5528-5533.
70. Edwards J. S., Palsson B. Ø., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 162-169.
71. Ramakrishna R., Edwards J. S., McCulloch A., Palsson B. Ø., (2001), *Am. J. Physiol.*, 280, R695-R704.
72. Ibarra R. U., Edwards J. S., Palsson B. Ø., (2002), *Nature*, 420, 186-189.
73. Burgard A. P., Maranas C. D., (2003), *Biotechnol. Bioeng.*, 82, 670-677.
74. Klamt S., Schuster S., Gilles E. D., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 734-751.
75. Klamt S., Schuster S., (2002), *Mol. Biol. Rep.*, 29, 243-248.
76. Beard D. A., Liang S. C., Qian H., (2002), *Biophys. J.*, 83, 79-86.
77. Wiechert W., (2001), *Metabolic Engineering*, 3, 195-206.
78. Marx A., de Graaf A., Wiechert W., Eggeling L., Sahl H., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 111-129.
79. Möllney M., Wiechert W., Kownatzki D., de Graaf A. A., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 66, 86-103.
80. Wiechert W., Möllney M., Petersen S., de Graaf A. A., (2001), *Metabolic Engineering*, 3, 265-283.
81. Kelleher J. K., (2001), *Metabolic Engineering*, 3, 100-110.
82. Wiechert W., de Graaf A. A., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 101-107.
83. Wiechert W., Siefke C., de Graaf A. A., Marx A., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 118-135.
84. Zupke C., Stephanopoulos G., (1994), *Biotechnol. Prog.*, 10, 489-498.
85. Schmidt K., Carlsen M., Nielsen J., Villadsen J., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 831-840.
86. Schmidt K., Nielsen J., Villadsen J., (1999), *J. Biotechnol.*, 71, 175-189.
87. Park S. M., Klapa M. I., Siskey A. J., Stephanopoulos G., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 62, 392-401.
88. Klapa M. I., Park S. M., Siskey A. J., Stephanopoulos G., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 62, 375-391.
89. Wiechert W., Möllney M., Isermann N., Wurzel M., de Graaf A. A., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 66, 69-85.
90. Marx A., Eikmanns B. J., Sahl H., de Graaf A. A., Eggeling L., (1999), *Metabolic Engineering*, 1, 35-48.
91. Schmidt K., Marx A., de Graaf A., Wiechert W., Sahl H., Nielsen J., Villadsen J., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 254-257.
92. Marx A., Striegel K., de Graaf A. A., Sahl H., Eggeling L., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 56, 168-180.
93. Dauner M., Bailey J. E., Sauer U., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 76, 144-156.

94. Kacser H., Burns J. A., (1973), *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 27, 65-104.
95. Visser D., Heijnen J. J., (2002), *Metabolic Engineering*, 4, 114-123.
96. Kell D. B., Westerhoff H. V., (1986), *FEMS Microbiol.Rev.*, 39, 305-320.
97. Shimizu H., (2002), *J. Biosci. Bioeng.*, 94, 563-573.
98. Fell D. A., (1992), *Biochem. J.*, 286, 313-330.
99. Nielsen J., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 125-132.
100. Schlosser P. M., Riedy G., Bailey J. E., (1994), *Biotechnol. Prog.*, 10, 141-154.
101. Simpson T. W., Follstad B. D., Stephanopoulos G., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 149-153.
102. Stephanopoulos G., (2002), *A. I. Ch. E. Journal*, 48, 920-926.
103. Pissara P., Nielsen J., Bazin M. J., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 168-176.
104. Savageau M. A., (1998), *Biosystems*, 47, 9-36.
105. Rohwer J. M., Meadow N. D., Roseman S., Westerhoff H. V., Postma P., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 34909-34921.
106. Hatzimanikatis V., Floudas C., Bayley J., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 485-500.
107. Torres N. V., Voit E. O., Gonzales-Alcon C., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 247-258.
108. Theobald U., Mailinger W., Baltés M., Rizzi M., Reuss M., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 305-316.
109. Schaefer U., Boos W., Takors R., Weuster-Botz D., (1999), *Anal. Biochem.*, 270, 88-96.
110. Wolf J., Passarge J., Somsen O. J. G., Snoep J. L., Heidrich R., Westerhoff H. V., (2000), *Biophys. J.*, 78, 1145-1153.
111. Hatzimanikatis V., Flooudas C. A., Bailey J. E., (1996), *A. I. Ch. E. Journal*, 42, 1277-1292.
112. Hatzimanikatis V., Bailey J. E., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 54, 91-104.
113. Visser D., Schmid J. W., Mauch, K., Reuss M., Heijnen J. J., (2004), *Metabolic Engineering*, 6, 378-390.
114. Visser D., Heijnen J. J., (2003), *Metabolic Engineering*, 5, 164-176.
115. Hatzimanikatis V., Bailey J. E., (1996), *J. Theor. Biol.*, 182, 233-242.
116. Hatzimanikatis V., (1999), *Metabolic Engineering*, 1, 75-87.
117. Hua Q., Yang C., Shimizu K., (2001), *Biochem. Engng. J.*, 9, 49-57.
118. Kanessa M., Goto S., Kawashinma S., Nakaya T., (2002), *Nucleic Acids Res.*, 30, 42-46.
119. Tomita M., Haskimoto K., Takahashi K., Shimizu T. S., Matsuzaki Y., Miyoshi F., Saito K., Tanida S., Yugi K., Venter J. C., Hutchison C. A., (1999), *Bioinformatics*, 15, 72-84.
120. Kremling A., Gilles E. D., (2001), *Metabolic Engineering*, 3, 138-150.
121. Varner J., Ramkrishna D., (1999), *Biotechnol. Prog.*, 15, 407-425.
122. Covert M. W., Schilling C. H., Palsson B. Ø., (2001), *J. Theor. Biol.*, 213, 73-88.
123. Covert M. W., Palsson B. Ø., (2003), *J. Theor. Biol.*, 221, 309-325.
124. Sahm H., Wandrey C., (1996), *Metabolic engineering*, Springer, Berlin.
125. Stephanopoulos G. N., Aristidou A. A., Nielsen J., (1998), *Metabolic Engineering – Principles and Methodologies*, Academic Press, San Diego.
126. Lee S. Y., Papoutsakis E. T., (1999), *Metabolic Engineering*, Marcel Dekker, New York.
127. Torres N. V., Voit E. O., (2002), *Metabolic engineering: debottlenecking metabolic networks: Pathway Analysis and Optimization in Metabolic Engineering*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.