

**ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *Geobacillus kaustophilus*
ΜΕ ΣΤΟΧΟ
ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ «ΘΕΡΜΟΣΑΣΙ»**

Μ. Λογοθέτη^{1*}, Δ. Κέκος¹, Δ. Χατζηνικολάου², Φ. Κολίσης¹

¹Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

²Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα

(*mlogothesi@hotmail.com)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δυνατότητα ανάπτυξης των βακτηρίων του γένους *Geobacillus* σε υψηλές θερμοκρασίες καθιστά τους μικροοργανισμούς αυτούς και τα προϊόντα τους ιδανικά για βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Αρχικά, αποτελούν πλούσια πηγή θερμοσταθερών ενζύμων και φυσικών προϊόντων, επίσης αποδιατάσσουν τη λιγνινοκυτταρινούχο βιομάζα και διάφορους υδρογονάνθρακες ενώ είναι και παραγωγοί βιοκαυσίμων. Τα βακτήρια του γένους *Geobacillus* έχουν μεγάλες δυνατότητες ως βιολογικά σασί για συνθήκες λειτουργίας σε υψηλές θερμοκρασίες («θερμοσασί») λόγω του ότι είναι θεرمόφιλα, με βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης μεταξύ 45 και 70 °C^[1].

Η διαδικασία κατασκευής μοντέλων γονιδιακής κλίμακας είναι ένα ουσιαστικό πρώτο βήμα προς την ανάλυση της μεταβολικής φυσιολογίας μικροβιακών οργανισμών. Τα μεταβολικά μοντέλα επιτρέπουν τον τοπολογικό χαρακτηρισμό του δικτύου, τον προσδιορισμό σημαντικών γονιδίων, στόχους διαγραφής γονιδίων για βελτιωμένη παραγωγή παραπροϊόντων καθώς και πρόβλεψη φαινοτύπων ανάπτυξης κάτω από ποικίλες συνθήκες. Η συγκεκριμένη μελέτη αποσκοπεί στην ανάπτυξη ενός μεταβολικού μοντέλου γονιδιακής κλίμακας που θα καλύπτει το μεταβολισμό του μικροοργανισμού *Geobacillus kaustophilus* και θα βοηθήσει μέσω του σχεδιασμού *in silico* πειραμάτων στην κατασκευή θερμοανθεκτικού σασί. Η μελέτη πραγματοποιείται στο πλαίσιο της Εθνικής Ερευνητικής Υποδομής OMIC-ENGINE (MIS 5002636), η οποία έχει σκοπό την προώθηση της έρευνας στην Συνθετική Βιολογία και τη δημιουργία προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας στο ελληνικό αγροδιατροφικό σύμπλεγμα και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΣΠΑ 2014-2020). Τη βάση για την κατασκευή του συγκεκριμένου μεταβολικού μοντέλου θα αποτελέσει το μοντέλο γονιδιακής κλίμακας του *Geobacillus thermoglucosidasius* (C56-YS93)^[2]. Εφαρμόζοντας γραμμικό προγραμματισμό, η μελέτη της φυσιολογίας των μικροοργανισμών του γένους *Geobacillus* θα καταλήξει στην κατανόηση της φυσιολογίας των συγκεκριμένων μικροοργανισμών και στη σχεδίαση στρατηγικών μεταβολικής μηχανικής.

Για την μοντελοποίηση του μεταβολικού δικτύου του εξεταζόμενου μικροοργανισμού τέσσερα βασικά στάδια ακολουθούνται. Αρχικά πραγματοποιείται η δημιουργία ενός προσχέδιου του μοντέλου που ουσιαστικά αφορά μια αρχική συλλογή υποψηφίων μεταβολικών λειτουργιών του οργανισμού που προκύπτουν άμεσα από το επισημειωμένο γονιδίωμά του, στη συνέχεια ακολουθεί η βελτίωση του προσχέδιου, επανεξετάζονται τα αρχικά δεδομένα, προστίθενται καινούργια και συντίθενται ένα ολοκληρωμένο μεταβολικό δίκτυο. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει τη μαθηματική αναπαράσταση του μοντέλου, στο οποίο καθορίζονται τα όρια του συστήματος. Τέλος το μοντέλο αξιολογείται με *in silico* πειράματα για τυχόν κενά που μπορεί να παρουσιάζει. Το μοντέλο μετασχηματίζεται σε μορφή ενός COBRA Toolbox αρχείου και ακολουθεί η ανάλυση ισορροπίας ροών του^[3].

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

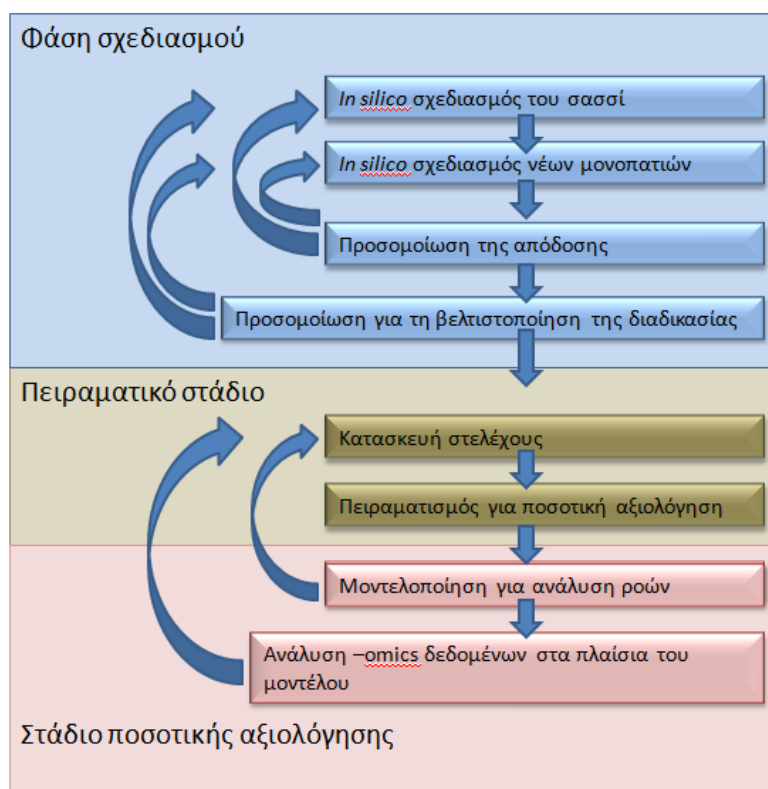
Η εισαγωγή νέων μονοπατιών με στόχο την παραγωγή συγκεκριμένων ουσιών μέσω ενός βελτιστοποιημένου σασί αποτελεί τον πυρήνα της συνθετικής βιολογίας. Η συνθετική βιολογία

στοχεύει στη δημιουργία νέων βιολογικών λειτουργιών και συστημάτων που δεν υπάρχουν στη φύση συνδυάζοντας την επιστήμη της βιολογίας με τη μηχανική. Η μηχανική παρέχει τον ποσοτικό *in silico* σχεδιασμό και την ποσοτική αξιολόγηση νέων βιολογικών λειτουργιών και συστημάτων ^[4].

Η έννοια του σασί περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση ενός κυττάρου-ξενιστή στον οποίο εισάγεται τροποποιημένο DNA. Μερικοί από τους οργανισμούς που έχουν χρησιμοποιηθεί ως ξενιστές είναι τα βακτήρια *E. coli*, *B. subtilis*, και *P. putida* ^[5-7]. Ο ξενιστής προσφέρει το βασικό κυτταρικό περιβάλλον το οποίο εμπλουτίζεται με νέες ιδιότητες που εισάγονται μέσω του τροποποιημένου DNA. Η κύρια δυσκολία της προσέγγισης αυτής είναι ο έλεγχος της συμπεριφοράς του ξενιστή.

Όταν εισαχθεί το νέο DNA, το σύστημα ενδέχεται να μην συμπεριφερθεί με τον αναμενόμενο και επιθυμητό τρόπο. Για τον λόγο αυτόν, ένας αριθμός ερευνητικών ομάδων εργάζεται πάνω στα αποκαλούμενα «ελάχιστα κύτταρα», δηλαδή κύτταρα-ξενιστές τα οποία διατηρούν μόνο τις ελάχιστες απαραίτητες βιολογικές λειτουργίες για την επιβίωσή τους ^[1]. Ένα παράδειγμα τέτοιας εργασίας που έχει δημοσιευτεί περιέγραφε την αφαίρεση όλων των μη απαραίτητων στοιχείων του κυττάρου ώστε να ανακτηθεί ο μεγαλύτερος δυνατός έλεγχος σε μια διεργασία συνθετικής βιολογίας ^[8]. Στη συνθετική βιολογία έχει διατυπωθεί η ανάγκη για εύρεση νέων μικροοργανισμών που θα αποτελέσουν βιολογικά σασί. Τα βακτήρια του γένους *Geobacillus* έχουν μεγάλες δυνατότητες ως βιολογικά σασί λόγω του ότι είναι θερμοφιλά, με μέγιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης μεταξύ 45 και 70° C, καθιστώντας τα χρήσιμα σασί για συνθήκες λειτουργίας σε υψηλές θερμοκρασίες ή αλλιώς «θερμοσασί». Κάποιες άλλες ιδιότητες του συγκεκριμένου γένους μικροοργανισμών που τα καθιστούν ελκυστικά ως βιολογικά σασί είναι ότι περιλαμβάνουν αερόβια και δυνητικά αναερόβια είδη που σχηματίζουν σπόρια, έχουν καταβολική ευελιξία δηλαδή καταβολίζουν ένα ευρύ φάσμα σακχάρων και εκκρίνουν εμπορικά χρήσιμα ένζυμα ^[1].

Οι διαφορετικές μαθηματικές αναπαραστάσεις του μεταβολισμού, των μεταβολικών μονοπατιών ή των ενζύμων και των μεταβολιτών είναι χρήσιμα σε διάφορες φάσεις της ανάπτυξης των βιολογικών σασί στη συνθετική βιολογία. Η μεταβολική μοντελοποίηση αποτελεί μια απλουστευμένη αναπαράσταση της πραγματικότητας. Πιο συγκεκριμένα ένα μοντέλο αποτελεί μια ποσοτική, μαθηματική αναπαράσταση των βιολογικών συστημάτων και των τμημάτων που τα αποτελούν. Η ροή εργασιών για την ανάπτυξη ενός σασί χωρίζεται στη φάση του σχεδιασμού, στο πειραματικό στάδιο και στο στάδιο αξιολόγησης του νέου στελέχους (Εικόνα 1). Η φάση σχεδιασμού περιλαμβάνει την κατασκευή του μεταβολικού μοντέλου. Σε αυτή τη φάση πραγματοποιείται ο *in silico* σχεδιασμός του σασί και των περιεχόμενων μεταβολικών μονοπατιών με στόχο την προσομοίωση του μεταβολισμού και την εισαγωγή νέων μονοπατιών παραγωγής. Περαιτέρω μοντελοποίηση του μεταβολισμού με τα μονοπάτια που έχουν σχεδιαστεί για το σασί δίνει σε επόμενη φάση τη δυνατότητα προσομοίωσης της αποδοτικότητας των εναλλακτικών μονοπατιών στα κύτταρα. Στη πειραματικό στάδιο πραγματοποιείται συλλογή δεδομένων από την *in vivo* συμπεριφορά του καινούργιου στελέχους και στη συνέχεια ανάλυση των ροών στο στάδιο της ποσοτικής αξιολόγησης. Μετά το πειραματικό στάδιο, η μεταβολική μηχανική εφαρμόζεται ξανά. Τα ποσοτικά δεδομένα που συλλέγονται στο πειραματικό στάδιο ερμηνεύονται σε συμπεράσματα που αφορούν τις λειτουργίες ρύθμισης και το μεταβολισμό των νέων στελεχών. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο αξιολόγησης, στο οποίο εξετάζεται αν η απόδοση του στελέχους που κατασκευάστηκε είναι ικανοποιητική, όπως επίσης και αν απέχει σημαντικά από τη συμπεριφορά του σχεδιαζόμενου *in silico* στελέχους ^[4].



Εικόνα 1. Γενικό διάγραμμα ροής σχεδιασμού βιολογικού σασιί. Η ροή εργασιών για την ανάπτυξη ενός σασιί χωρίζεται σε τρία στάδια: το στάδιο σχεδιασμού, το πειραματικό στάδιο και το στάδιο ποσοτικής αξιολόγησης του νέου στελέχους. Η κατασκευή μεταβολικών μοντέλων εμπλέκεται στα στάδια του σχεδιασμού και της ποσοτικής αξιολόγησης. Η προσομοίωση της συμπεριφοράς του *in silico* στελέχους ή η *in vivo* συμπεριφορά του νέου στελέχους μπορεί να οδηγήσει στην επιστροφή σε προηγούμενα βήματα.

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η μαθηματική προσέγγιση που χρησιμοποιείται πιο συχνά για τη μελέτη των χαρακτηριστικών και των δυνατοτήτων μεγάλης κλίμακας μεταβολικών δικτύων είναι η ανάλυση ισορροπίας ροών (Flux Balance Analysis/FBA). Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην υπόθεση της ανάπτυξης υπό σταθερές συνθήκες. Η ανάλυση ισορροπίας ροών υπολογίζει τη ροή των μεταβολιτών μέσα σε ένα μεταβολικό δίκτυο, και κατά συνέπεια καθιστά δυνατή την πρόβλεψη των ρυθμών ανάπτυξης ενός οργανισμού ή το ρυθμό παραγωγής βιοτεχνολογικά σημαντικών προϊόντων. Στις προσομοιώσεις ανάλυσης ροών, χρησιμοποιείται συνήθως η συνάρτηση της βιομάζας για την προσομοίωση της κυτταρικής ανάπτυξης, καθώς αποτελείται από όλα τα σημαντικά συστατικά, όπως το DNA, τα αμινοξέα, τα λιπίδια και οι πολυσακχαρίτες τα οποία απαιτούνται για να δημιουργηθεί ένα νέο κύτταρο. Επίσης όταν η ανάλυση ισορροπίας ροών χρησιμοποιείται για να προσομοιωθούν οι αναμενόμενοι ρυθμοί παραγωγής μεταβολιτών ενδιαφέροντος, αντί να μεγιστοποιηθούν οι ρυθμοί ανάπτυξης, μεγιστοποιείται η παραγωγή των μεταβολιτών αυτών μέσω βελτιστοποίησης της ροής εξόδου της αντίδρασης που τα παράγει^[9]. Ουσιαστικά, η ανάλυση ισορροπίας ροών είναι μια υπολογιστική μέθοδος ανάλυσης υπό περιορισμούς που βασίζεται στο γραμμικό προγραμματισμό. Υπολογίζει τις ροές των αντιδράσεων του μεταβολικού μοντέλου μεγιστοποιώντας ή ελαχιστοποιώντας μία αντικειμενική συνάρτηση που αντικατοπτρίζει τον στόχο που εξυπηρετεί το μοντέλο. Η λύση οριοθετείται από τους βιολογικούς περιορισμούς του προβλήματος^[10].

Στην παρούσα εργασία αρχικά έγινε η μετατροπή του μεταβολικού μοντέλου του *Geobacillus thermoglucosidasius* από τη μορφή SBML, σε μαθηματικό μοντέλο μέσω ενός στοιχειομετρικού πίνακα S. Πιο συγκεκριμένα το μοντέλο μετατρέπεται σε μαθηματική μορφή εισάγοντας το αρχείο SBML στο εργαλείο COBRA Toolbox v.3.0. Το εργαλείο αυτό αποτελεί ενσωματωμένο

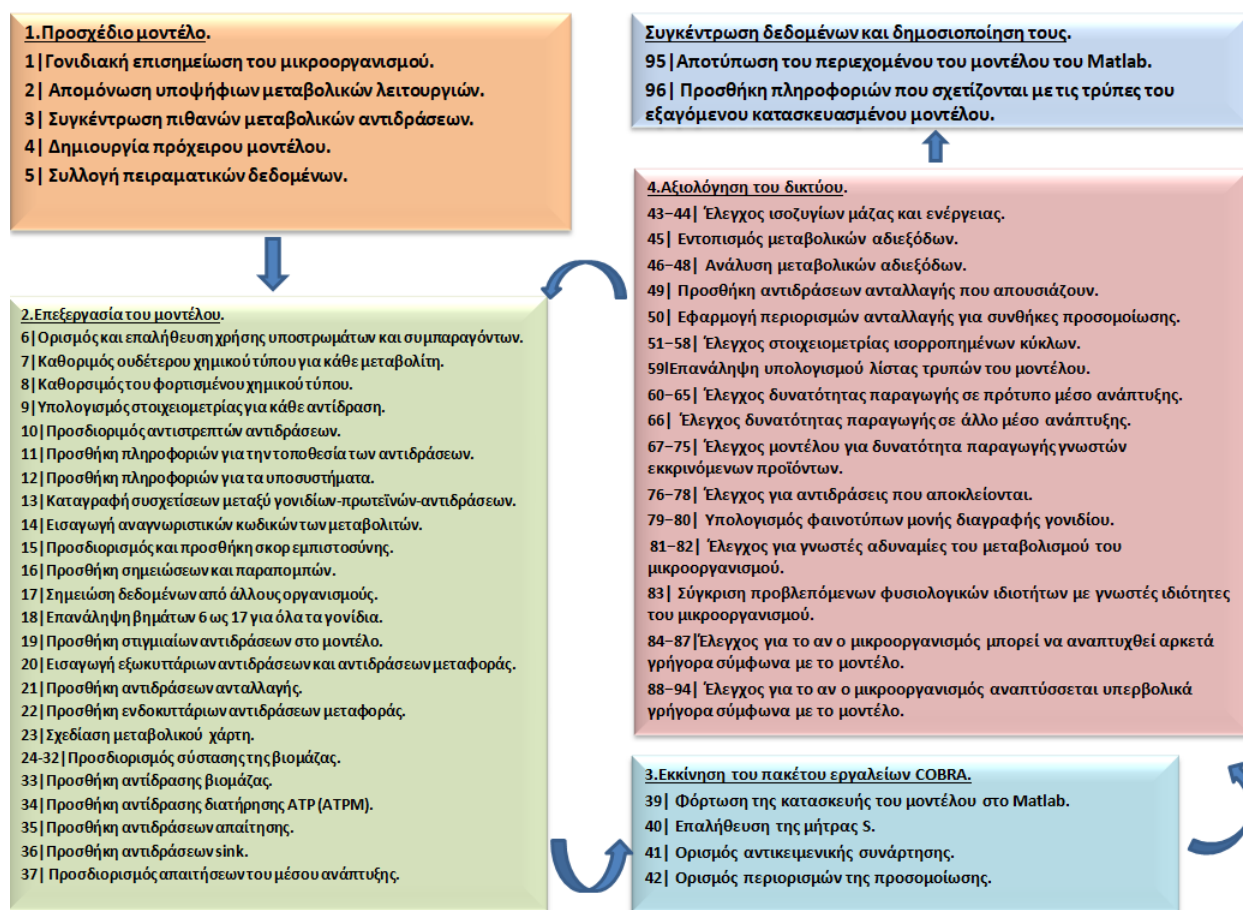
εργαλείο του Matlab R2018a^[11]. Στη συνέχεια επιλέχθηκε το LP solver πακέτο GLPK (επιλυτής γραμμικού προγραμματισμού). Ως αντικειμενική συνάρτηση τέθηκε η αντίδραση παραγωγής της βιομάζας καθώς και της αιθανόλης και άλλων παραπροϊόντων. Επίσης έγινε μεταβολή των ορίων των αντιδράσεων που αφορούν τις αντιδράσεις ανταλλαγής θέτοντας έτσι τα μέσα ανάπτυξης του κυττάρου *in silico*. Μέσω της ανάλυσης ισορροπίας ροών (FBA-Flux Balance Analysis) στο COBRA Toolbox υπολογίστηκαν οι ροές των μεταβολιτών μέσα στο μεταβολικό δίκτυο μεγιστοποιώντας την εκάστοτε αντικειμενική συνάρτηση^[12]. Το μοντέλο αφότου επεξεργάστηκε στο COBRA Toolbox, πήρε μια συγκεκριμένη δομή και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε ως SBML και ως Excel (xls) αρχείο.

Τα όρια του συστήματος τίθενται με τη χρήση του COBRA Toolbox, οπότε και μετατρέπεται η γενική μορφή του μοντέλου σε ένα μοντέλο ειδικής κατάστασης. Τα όρια του αρχικού μοντέλου μεταβλήθηκαν σε σχέση με το τελικό μετά από επαναλήψεις αξιολόγησης και βελτίωσης του μοντέλου^[10]. Στο εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε ουσιαστικά επιλύεται ένα πρόβλημα γραμμικού προγραμματισμού, όπου λόγω του ότι συνήθως υπάρχουν άπειρες λύσεις, επιδιώκεται η βέλτιστη λύση μέσω της επιβολής κατάλληλων περιορισμών και μιας αντικειμενικής συνάρτησης^[13]. Οι αντιδράσεις ανταλλαγής των μεταβολιτών που αφορούν τα *in silico* μέσα ανάπτυξης είχαν κατώτερο όριο χαμηλότερο του 0. Όλες οι αντιδράσεις ανταλλαγής είχαν ανώτερο όριο άνω του 0 για να αποφευχθεί η συγκέντρωση μεταβολιτών. Οι λύσεις που παρείχε το μοντέλο είχαν μονάδες $\text{mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, οι οποίες αποτελούν και τις προκαθορισμένες μονάδες του μοντέλου^[14]. Τα δεδομένα εισόδου και εξόδου αφορούν τις εξωτερικές ροές αντιδράσεων που είναι μετρημένες πειραματικά αν διατίθενται ή αλλιώς βιβλιογραφικά. Τιμές για τις εσωτερικές ροές είναι πολύ σπάνιες λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζουν στη μέτρηση τους. Στο μοντέλο η εξίσωση που περιγράφει τη μετατροπή των κυτταρικών συστατικών στην κυτταρική βιομάζα είναι μια εμπειρική αντίδραση που αντιπροσωπεύει τη μετατροπή πρόδρομων μεταβολιτών σε δομικές μονάδες της κυτταρικής βιομάζας όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA) και λιπαρά οξέα^[2].

Οι ενεργειακοί συντελεστές τόσο για την κυτταρική ανάπτυξη όσο και την ενεργειακή διατήρηση έχουν επίσης συμπεριληφθεί. Επίσης έχει ληφθεί υπόψη η ενέργεια που σχετίζεται με τις απαιτήσεις για τη διατήρηση της κυτταρικής ανάπτυξης και οι ενεργειακές απαιτήσεις που δε σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη^[15].

Στόχος στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η προσαρμογή του μοντέλου του *Geobacillus thermoglucosidasius* (C56-YS93) στο μοντέλο του *Geobacillus kaustophilus* αφαιρώντας και προσθέτοντας τις αντιδράσεις που σχετίζονται με ένζυμα που κωδικοποιούνται από τα γονίδια που συγκεκριμένου μικροοργανισμού με βάση τη γονιδιακή του επισημείωση. Στο μοντέλο θα ενσωματωθούν επίσης πειραματικά δεδομένα που έχουν σχέση με την κατανάλωση σακχάρων μέσω εφαρμογής περιορισμών στο μοντέλο όπως επίσης και δεδομένα που έχουν σχέση με την κυτταρική ανάπτυξη. Τα δεδομένα αυτά θα παρέχει η Μονάδα Ενζυμικής και Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Η επαναληπτική διαδικασία που ακολουθείται για την κατασκευή μεταβολικών μοντέλων περιγράφεται στην Εικόνα 2^[3].

(1)



Εικόνα 2. Γενική επισκόπηση της επαναληπτικής διαδικασίας κατασκευής μεταβολικών μοντέλων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μεταβολική μοντελοποίηση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη βιολογικών σασί στον αναδυόμενο τομέα της συνθετικής βιολογίας. Η μοντελοποίηση και η προσομοίωση παρέχουν ποσοτικά δεδομένα που έχουν σχέση με την αποδοτικότητα εναλλακτικών σχεδιασμών. Ειδικά η μεγάλης κλίμακας μοντελοποίηση του μεταβολισμού είναι κεντρικής σημασίας όταν αναζητούνται βέλτιστοι σχεδιασμοί για κύτταρα-σασί. Ειδικότερα στα μοντέλα γονιδιακής κλίμακας εφαρμόζονται αποτελεσματικότερα τα περιοριστικά μοντέλα σε σχέση με τα δυναμικά μοντέλα. Ο επαναληπτικός κύκλος της παραγωγής πληροφοριών και της βελτίωσης των μεταβολικών μοντέλων, στον οποίο επικεντρώνεται η βιολογία των συστημάτων, μπορεί να στηρίξει τον τομέα της συνθετικής βιολογίας. Οι γνώσεις σχετικά με τη ρύθμιση του μεταβολισμού θα πρέπει να ενσωματωθούν στα μεταβολικά μοντέλα ώστε να επιτευχθεί ένα καλό επίπεδο προβλεπτικότητας υπό διάφορες συνθήκες στις οποίες μπορεί να εκτεθούν τα κύτταρα. Οι επαρκείς γνώσεις που ενσωματώνονται στα μοντέλα και η διαθεσιμότητα των πειραματικών δεδομένων αποτελούν προϋποθέσεις για μια γρηγορότερη πορεία από το σχεδιασμό ενός μοντέλου σε ένα βέλτιστο κυτταρικό σασί. Κατά συνέπεια, μέσα από την μελέτη των μεταβολικών δικτύων και την μελέτη των περιοριστικών μοντέλων των βακτηρίων του γένους *Geobacillus*, επιδιώκεται να επιτευχθούν τα πρώτα στάδια σχεδίασης «θερμοσασί» με βάση τα βακτήρια αυτά.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «Synthetic Biology: From omics technologies to genomic engineering (OMIC-ENGINE)» (MIS 5002636) που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό

Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] B.L. Adams. ACS Synth Biol. 5(12) (2016) 1328-1330.
- [2] A. Ahmad, H.B. Hartman, S. Krishnakumar, D.A. Fell, M.G. Poolman, and S. Srivastava. J Biotechnol. 251 (2017) 30-37.
- [3] I. Thiele and B.O. Palsson. Nat Protoc. 5(1) (2010) 93-121.
- [4] P. Jouhten. Comput Struct Biotechnol J. 3 (2012) e201210009.
- [5] T. Matsumoto, T. Tanaka, and A. Kondo. Bioresour Technol. 245(Pt B) (2017) 1362-1368.
- [6] Y. Liu, L. Liu, J. Li, G. Du, and J. Chen. Trends Biotechnol. 37(5) (2019) 548-562.
- [7] P.I. Nikel and V. de Lorenzo. Metab Eng. 50 (2018) 142-155.
- [8] A.C. Forster and G.M. Church. Mol Syst Biol. 2 (2006) 45.
- [9] K. A Curran, N. Crook, and H. S Alper. 834 (2012) 197-216.
- [10] N.D. Price, J.L. Reed, and B.O. Palsson. Nat Rev Microbiol. 2(11) (2004) 886-97.
- [11] L. Heirendt, S. Arreckx, T. Pfau, S.N. Mendoza, A. Richelle, A. Heinken, H.S. Haraldsdottir, J. Wachowiak, S.M. Keating, V. Vlasov, S. Magnusdottir, C.Y. Ng, G. Preciat, A. Zagare, S.H.J. Chan, M.K. Aurich, C.M. Clancy, J. Modamio, J.T. Sauls, A. Noronha, A. Bordbar, B. Cousins, D.C. El Assal, L.V. Valcarcel, I. Apaolaza, S. Ghaderi, M. Ahookhosh, M. Ben Guebila, A. Kostromins, N. Sompairac, H.M. Le, D. Ma, Y. Sun, L. Wang, J.T. Yurkovich, M.A.P. Oliveira, P.T. Vuong, L.P. El Assal, I. Kuperstein, A. Zinovyev, H.S. Hinton, W.A. Bryant, F.J. Aragon Artacho, F.J. Planes, E. Stalidzans, A. Maass, S. Vempala, M. Hucka, M.A. Saunders, C.D. Maranas, N.E. Lewis, T. Sauter, B.O. Palsson, I. Thiele, and R.M.T. Fleming. Nat Protoc. 14(3) (2019) 639-702.
- [12] J.D. Orth, I. Thiele, and B.O. Palsson. Nat Biotechnol. 28(3) (2010) 245-8.
- [13] J. Monk, J. Nogales, and B.O. Palsson. Nat Biotechnol. 32(5) (2014) 447-52.
- [14] J. Schellenberger, R. Que, R.M. Fleming, I. Thiele, J.D. Orth, A.M. Feist, D.C. Zielinski, A. Bordbar, N.E. Lewis, S. Rahmanian, J. Kang, D.R. Hyde, and B.O. Palsson. Nat Protoc. 6(9) (2011) 1290-307.
- [15] Y.J. Tang, R. Sapro, D. Joyner, T.C. Hazen, S. Myers, D. Reichmuth, H. Blanch, and J.D. Keasling. Biotechnol Bioeng. 102(5) (2009) 1377-86.