[آسان داک](http://www.asandoc.com/) (www.Asandoc.com)

**تجزیه و تحلیل شار متابولیک در گیاهان: مقابله با پیچیدگی**

DOUG K. ALLEN, IGOR G. L. LIBOUREL\* & YAIR SHACHAR-HILL

*Michigan State University, Plant Biology Department, East Lansing, MI 48824, USA*

داگ K. آلن، ایگور GL Libourel \* و یر Shachar-HILL

ایالات متحده آمریکا ، MI 48824، شرق لانسینگ، گروه زیست شناسی گیاهی دانشگاه ایالتی میشیگان

**چکیده**

تئوری و تجربه در مهندسی متابولیک نشان می دهند که متابولیسم در سطح شبکه ،عمل می کند. در گیاهان،این پیچیدگی توسط درجه بالایی از دهلیزبندی ، و سنتز یک آرایه بسیار گسترده از محصولات متابولیک ثانویه ، ترکیب می شود.چالش بیشتر برای درک پیش بینی تابع متابولیک گیاه به دلیل جهل ما در مورد ساختار شبکه های متابولیک است واین امر حتی در سیستم هایی که به خوبی مطالعه شده اند ، مطرح شده است. تجزیه و تحلیل (MFA) شار متابولیک، ابزاری برای اندازه گیری فراهم می کند و عملکرد متابولیسم بدن را مدل سازی می کند ، و مشارکت های قابل توجهی برای مقابله با پیچیدگی آنها ایجاد میکند.

این بررسی ، یک دید کلی از روش های MFA مختلف، اندازه گیری های لازم برای پیاده سازی آنها و اطلاعاتی که آنها ارایه می دهند را فراهم می کند. کاربرد روش های MFAدر سیستم های گیاه توسط چندین مثال از مقالات اخیر ، نشان داده شده است.در مرحله بعد، چالش هایی که متابولیسم گیاهی را برای MFA وضع می کند به همراه راههایی که می تواند مشخص کنند ، بحث می شود. در نهایت، تحولات جدید درMFA توضیح داده می شود که می تواند دامنه و قابلیت اطمینانMFA گیاه را در سال های آینده بهبود ببخشد.

واژه های کلیدی: متابولیسم مرکزی. دهلیز بندی کردن. برچسب گذاری ایزوتوپی. مهندسی متابولیک. شبکه های متابولیک.طراحی بهینه. متابولیسم بدن گیاهی. سیستم های زیست شناسی گیاهی.مدل سازی پیش گویانه. مقررات.

**مقدمه**

شبکه های متابولیک گیاهی به طور قابل ملاحظه ای پیچیده تر از سایر ارگانیسم ها هستند.این امر به دلیل چندین جنبه به هم پیوسته از زندگی گیاهی است :بی ساقه بودن ، اکتوترمیک ،آتوتروف ،و داشتن موجودی شیمیایی وسیع و درجه بالایی ازدهلیزبندی زیر سلولی . بنابراین، تعجب آور نیست که مهندسی متابولیک (به خصوص در متابولیسم اولیه) نسبت موفقیت کمی دارد، به عنوان مثال، معمولا تغییرات ژنی تک سبب تغییرات مطلوب کمی در ترکیب ، بازده و یا رشد می شود.رابطه بین ژنوتیپ و فنوتیپ ،ذاتا پیچیده است چون عملکرد پروتئین های تک و یا حتی مسیر، بستگی به حالت عملکردی شبکه متابولیک بزرگتردارد (کروگر و Ratcliffe 2008؛مورنو-سانچز و همکاران. 2008). دستکاری ژنتیک، پس از توسط فنوتیپی - حتی 'omic' - تجزیه و تحلیل، همچنین به عنوان رویکرد ی در درک نحوه متابولیسم گیاه محدود شده است،و نیاز واضحی برای ابزار اندازه گیری و عملکرد مدل متابولیک (همان طور که ازاجزای متابولیسم ، واضح است) در سطح شبکه وجود دارد.

تجزیه و تحلیل شارمتابولیک (MFA) چنین ابزاری، فراهم می کند. MFA، جریان مواد از طریق متابولیسم،نقشه های بازده شار را بیان می کند و می توانند به تلاش های مهندسی با توضیح جزئیات فنوتیپ ، کمک کند. تجربه در مهندسی متابولیک از بهره وری بهبود یافته توسط باکتری ها، نشان می دهد که MFA می تواند همکاری قابل توجهی در بیوتکنولوژی داشته باشد. که در یک چرخه از تغییر ژنتیکی پس از تجزیه و تحلیل بعدی مورد استفاده قرار می گیرد. MFAسبب بهبود فشار باکتریایی برای اهداف صنعتی (کیم، کیم و لی 2008) می شود برای مثال، به طور بالقوه با برجسته کردن فرایند های متابولیک بی فایده این عمل را انجام می دهد (پترسون و همکاران، 2000، 2001؛ نیلسن 2001؛ Koffas، یونگ و Stephanopoulos، 2003؛ Koffas و Stephanopoulos 2005). MFAقبلا بینش جدید قابل توجهی در ساختار و عملکرد شبکه های متابولیک ایجاد کرده است و وعده هدایت مهندسی موفق برای اهداف عملی در سال های آینده را داده است.

رویکردهای مورد بهره MFA در اینجا روش هایی هستند که بر برآورد مدل های چند شاره از طریق یک شبکه متابولیک

یا بیشتر ، یک زیر شبکه، تمرکز می کند وشامل سیستم ها در حالت پایدار (مجموعه ای ثابت از شار متابولیک) و آنهایی است که شار در آنها ممکن است تغییر کند. روش های MFA به چند دسته تقسیم می شوند که در اطلاعات مورد نیاز ، نوع مدل مورد استفاده و نوع اطلاعات به دست آمده متفاوت اند و به صورت خلاصه در جدول 1 بیان شده اند.اینکه آیا سیستم های بیولوژیکی می تواند به حالت پایدار ارزیابی شود، اندازه (زیر) شبکه و سطح جزئیاتی که با آن واکنش ها توصیف می شوند ، تعیین خواهد کرد کدام روش MFA برای هر سیستم ، مناسب تر است. تجزیه و تحلیل شارهمه با یک توصیف شبکه واکنش ،شروع می شوند ( مجموعه ای از معادلات) که به طور استوکیومتری به زیر لایه های هر واکنش به محصول آن مرتبط است.با توجه به اینکه چند مسیراز طریق شبکه وجود دارد، شرح استوکیومتری ،طیف گسترده ای از رفتارهای متابولیک را نشان می دهد.تجزیه و تحلیل حالت ابتدایی (EMA، شوستر، Dandekar و 1999 Fell ؛ شوستر، Fell و Dandekar 2000؛ Poolman، Fell و Raines 2003)و تجزیه و تحلیل مسیر افراطی (EPA، شیلینگ، Letscher و Palsson 2000) روش های ساختاری هستند که برای کشف این محدوده و تعریف مرزهای توزیع شار حالت پایدار استفاده می شود.



در حالت پایدار، طیفی از الگوهای شار، محدود هستند اما هنوز بسیار وسیع هستند. با تخمین مقادیر شار ورودی و خروجی و تابع هدف (یعنی بهینه سازی که برخی از هدف های ویژه: مانند حداکثر تولید زیست توده را به حداکثر یا حداقل می رساند)تحلیل تعادل شار (FBA. Varma و Palsson 1994) مجموعه ای از مقادیر شار خالص از "فضای شار"عملی را نتیجه می دهد .استفاده از برنامه ریزی خطی با یک تابع هدف برای محدود کردن این طیف وسیع از راه حل ها، ضروری است. هنوز، نتیجه FBA ممکن است بیش از مجموعه ای از رفع یک شار به همان اندازه مطلوب، و تجزیه و تحلیل تعادل انرژی (EBA) باشد و MFA مبتنی بر ترمودینامیک(TMFA) برای تحمیل FBA توسط تحمیل ملاحظات ترمودینامیکی بیشتر در شبکه استفاده می شود.روی هم رفته ، آنها قوانین انرژی آزاد را اجرا می کنند (مثلا کاهش انرژی آزاد از طریق شبکه)و تعداد راه حل به دست آمده را کاهش می دهند.به طور کلی ،روشهای EMA ، EPA و FBA اغلب به شبکه متابولیک کامل ، اعمال می شوند (~ 1000 واکنش برای یک میکروب) .این امر ممکن است چون فقط شارهای خالص در نظر گرفته می شوند ، هیچ توده اندازه منبع یا اندازه گیری برچسب زدن برای متابولیت ها مورد نیاز نیست،و چون یک نتیجه قابل قبول ، ممکن است مستلزم چند راه حل باشد. روش های تجربی با زیر شبکه های با اندازه های مختلف ، مقابله می کند(جدول 1).

ترکیب داده ها ی برچسب ایزوتوپی اجازه می دهد گذار را نه تنها از متابولیت ها بلکه از اتم ها ی جداگانه از طریق متابولیسم ،مدل سازی کنیم . نقشه گذاراتم ها (تقریبا همیشه کربن) تا حد زیادی محتوا ی اطلاعات را برای افزایش MFA برای حالت پایدار برچسب ایزوتوپی MFA افزایش می دهد ، تمام شار ها ثابت هستند و ااگو های برچسب زدن در واسطه ها و محصولات برای رسیدن به مقادیر ثبات ، مجاز است.توزیع برچسب در محصولات نهایی می تواند همراه با توازن جمعی برای تعیین شار در سراسر شبکه ،مورد استفاده قرار گیرد. حالت پایدار MFA ایزوتوپی مبتنی بر برچسب زدن با اطلاعات بیشتر از پارامترهای شار، سبب یک سیستم بیش از حد تعیین شده ریاضی می شود(برای زیر شبکه هایی از متابولیسم بدن)، و اجازه می دهد شارخالص و برخی مبادلات شار بدون در نظر گرفتن یک تابع هدف، بدست آید.شار با اتصال مقادیر آنها دریک مدل اسکیومتریک در داده برچسب و اندازه گیری جذب / جریان از طریق برنامه نویسی درجه دوم ،به دست می آید.برای بافت هایی که می توانند در حالت پایدار متابولیک حفظ شود یا نزدیک به حالت پایدار متابولیک هستند ، این روش جذاب است و در واقع اصطلاح ‘MFA’ اغلب به طور انحصاری به تحلیل حالت پایدار ، اعمال می شود.اگرچه مدل MFA حالت پایدار، یک مدل پیشگویانه تولید نمی کند ، اما جذاب است چون نگاشت های شار را بدون نیاز به اندازه گیری سایز توده متابولیک یا تخمین پارامتر های جنبشی ، می دهد که معمولا به سختی بدست می آیند و برای MFA پویا (جنبشی ) نیاز هستند.علاوه بر این، هر مجموعه ای از واکنش های بین نقاط شاخه ای در یک مرحله در MFA حالت پایدار ترکیب می شوند،که به طرز چشمگیری تعداد متغیرهایی که باید تعیین شود را کاهش میدهد.در رویکرد جنبشی / پویا و یا حالت ناپایدار، شار نیاز نیست ثابت باشد(بنابراین ، اندازه توده متابولیک می تواند تغییرکند) و شار از اندازه گیری دوره زمانی اندازه توده و برچسب گذاری ، ایجاد می شوند.استفاده از آزمایش های برچسب زدن پویا برای ارزیابی های تک شار و برای تبیین مسیر ، به خوبی در زیست شیمی گیاه ،ایجاد شده است و کمک های فراوانی کرده است.اما فراتر از محدوده این بررسی است. با MFA پویا ، تعداد بسیار بزرگتری از پارامترهای مستقل استفاده شده است چون مراحل آنزیمی و حمل و نقل جدا ، مدل سازی شده اند.که هریک شامل غلظت های مختلف و مقادیر مقادیر ثابتی هستند.

برای آزمایشات MFA حالت پایدار با استفاده از برچسب زدن ،سیستم باید به اندازه کافی طولانی در یک حالت پایدار متابولیسم برای رسیدن به حالت پایدار ایزوتوپی قرار بگیرد (یک الگوی برچسب زدن پایدار درمتابولیت). با این حال، بسیاری از بافتهای گیاهی، متابولیسم حالت پایدار را نشان نمی دهند و یا نمی تواند به حالت پایدار ایزوتوپی در شرایط مرتبط فیزیولوژیکی ، برچسب گذاری شوند.دراین موارد ، MFA پویا برای بیان کردن های شار متعدد از طریق شبکه ها مورد نیاز است و این رویکرد ،مزایای بیشتری از مدل های متورق دارد که می تواند برای پیش بینی اثرات ژنتیکی یا سایر تغییرات شار متابولیک و اندازه های توده استفاده شود (مورگان و رودز 2002؛ Poolman، Assmus وسقوط 2004). شناسایی MFA پویا و تحلیل نقاط نظارتی در این مسیر مهم است که با استفاده از تجزیه و تحلیل متابولیک انجام می شود (MCA.ریس و هیل 1994؛ مورنو-سانچز و همکاران. 2008). در MCA،کنترل شار در طول مسیر بر حسب صفات به آنزیم های مختلف واگذار می شود. (هاینریش و Rapoport را 1974؛ Kacser وبرنز 1981؛ سقوط 1998). با آشکار کردن اینکه کدام آنزیم بیشترین کنترل را بر حفظ شار دارد، این روش، یک راهنمای پیش بینی قدرتمند برای تلاش های مهندسی متابولیک است. در تجزیه و تحلیل کنترل بالا و پایین (Hafner، براون و Brand 1990)، واکنش های آنزیمی به سه بلوک گروه بندی می شوند تجزیه و تحلیل MCA اطلاعاتی در مورد کنترل بین شار را فراهم می کند اما اطلاعاتی در مورد بین این بلوک ها نمی دهد .

موفقیت های اخیر در MFA به دلیل ابزار مدرن، امکان پذیر شده است : رزونانس مغناطیسی هسته ای (NMR) واسپکتروسکوپی جرم، در دسترس بودن طیف وسیعی از زیر لایه هایی که به صورت موضعی با ایزوتوپ های پایدار برچسب گذاری می شوند ، و مهمتر از همه،توسعه نظریه مدل سازی و روش های محاسباتی است.محاسبه مفصل اینکه انواع متفاوت تجزیه و تحلیل MFA چگونه با استفاده از این ابزار انمی شود نیز در این مقالات داده شده است :بررسی اجمالی عمومی (Stephanopoulos، Aristidou ونیلسن 1998)، FBA (شیلینگ و Palsson 1998؛ ادواردز، Covert و Palsson 2002)، EMA (شوستر و همکاران 1999، 2000)، EPA (شیلینگ و همکاران 2000)، MFA حالت پایدار و ثابت (Zupke و Stephanopoulos 1994؛ اشمیت و همکاران 1997؛ویچرت و همکاران. 2001؛ Ratcliffe و Shachar-هیل 2006؛ Rios- Estepa و لانگه 2007؛ ستوئر 2007) و MCA. (1992 Fell ؛ Kacser، برنز و Fell 1995).

همانطور که در شکل 1 نشان داده شده، نتیجه MFAممکن است از یک مجموعه واحد از مقادیر شار به طیفی ازمقادیر ممکن در "فضای شار" ، تغییر کند.درجه ای که در آن یک محدوده یا مجموعه مطلقی از مقادیر، ایجاد می شود توسط تعداد و دامنه محدودیت ها و اندازه گیری های تجربی موجود و همچنین عنوان پیچیدگی شبکه و انتخاب استراتژی MFA تعریف می شود. داده‘omics’ مختلف می تواند طیف عملی از مقادیر را برای شار ایجاد کند اما برای شبکه های هرپیچیدگی، تعداد اساسی از اندازه گیری های عملکرد برای تعیین دقیق مقدار شار ، لازم است. از دیدگاه MFA، داده ‘omics’به عنوان ورودی و محدودیت برای مدل سازی و پاسخ استفاده می کند.



از دیدگاه 'omics'، fluxomeبه سادگی سطح دیگری از توضیحات سطح سیستم گسترده است.از دیدگاه زیست شناسی سیستم های MFA از نظر کیفی از 'omics برای توصیف تابع به جای ساختار و هدف آن از مدل های پیش بینی ساختمان،متفاوت است .در این مفهوم از مدل سازی کمٌی،برای پیش بینی، MFA بیشتر شبیه روش های پردازش اطلاعات است ،اگرچه در دومی ، مدل ها آماری هستند و در MFA مکانیکی هستند.سایرین ، تحقیق اخیر و راهنما هایی برای MFA گیاهی دارند (Ratcliffe و Shachar-هیل 2006؛ ریوس-Estepa و لانگه 2007؛ Schwender2008؛ Sweetlove، Fell و Fernie 2008). در اینجا، تعداد کمی از مطالعات را بحث می کنیم تا سهم MFA برای درک ما از پیچیدگی های متابولیسم گیاهی را نشان دهیم و سپس بر چالش های پیش رویMFA از سیستم های گیاهی ، استراتژی هایی برای مقابله با آنها و روش های جدید برای کار آینده ، تمرکز می کنیم.

**مطالعات MFA به صورت منحصر به فرد در مورد عملکرد سیستم های گیاهی آموزنده اند**

بافت های گیاهی که با استفاده از روش های MFA مختلف ،از جمله تعلیق سلول کشت، مورد مطالعه قرار گرفته است (Ronteinهمکاران. 2002؛ باکستر و همکاران. 2007؛ کروگر و همکاران. 2007a. ماتسودا، Wakasa و Miyagawa 2007؛ ویلیامز و همکاران. 2008)، ریز جلبک ها (یانگ، هوآ و شیمیزو 2002؛ شاستری و مورگان 2005، 2007؛ بویل و مورگان 2009)، دانه های در حال رشد (Glawischnigهمکاران. 2002؛ Schwender، Ohlrogge و Shachar-هیل 2003؛ Sriram و همکاران. 2004؛ Ettenhuber و همکاران. 2005b. ، Schwender، Shachar -هیل و Ohlrogge 2006؛ Spielbauer و همکاران. 2006؛آلونسو و همکاران. 2007. Junker و همکاران. 2007؛ Troufflard و همکاران. 2007؛ Iyer و همکاران. 2008؛ آلن، Ohlrogge و Shachar-هیل 2009؛ Grafahrend-Belau و همکاران. 2009)،ساقه (Rohwer و بوتا2001؛ Uys و همکاران. 2007)، نوک ریشه (Dieuaide-Noubhani و همکاران. 1995؛ آلونسو و همکاران. سال 2005، 2007b، C)، فرهنگ ریشه دگرگون شده (Sriram، فولتن، نیویورک و 2007a شانکس)، برگ (مک نیل و همکاران. 2000A، ب. Poolman، سقوط و توماس 2000)، گل (Boatrightهمکاران. 2004؛ ارلوا و همکاران. 2006)، کرک (ریوس-Estepa و همکاران. 2008) و قارچ دنبلان (ماتسودا و همکاران، 2003، 2005؛ Heinzle و همکاران. 2007). مطالعات اخیر، پتانسیل را کشف کرده اند و چالش را درآن نشان داده اند ، و MFA را در کل گیاهان اعمال کرده اند (Ettenhuber و همکاران 2005a؛ Huege و همکاران 2007؛ Romisch- Margl و همکاران. 2007).

دانه ها ، مقدار زیادی از ذخایر ذخیره سازی تولید شده در میزان پایدار حین دوره پرشدن راتولید می کنند و در نتیجه نیازمندی های حالت پایدار متابولیک را در یک دوره برچسب گذاری به اندازه کافی طولانی ،برآورده می سازد تا به حالت پایدار ایزوتوپی برسد.همراه با مقادیر آنها به عنوان منابع پروتئین، روغن وکربوهیدرات، این امر رشد دانه ها را برای MFA حالت پایدار ، جذاب می کند.کار در توسعه رویان های کلزا سبب بینش های زیادی در حالت های جدید عمل های آنزیم های مطالعه شده و مسیر های عبور دارد.



MFA اعلام کرده است که بر خلاف انتظارات،نه مسیر پنتوز فسفات اکسیداتیو (Schwender و همکاران، 2003) و نه آنزیمهای چرخه اسید تری کربوکسیلیک (TCA) (Schwender و همکاران 2006؛ Junker و همکاران. 2007) در نقش متعارف آنها در بافت هتروتروف در مواد شیمیایی سوختی، کارایی ندارد. MFA همچنین قادر بود که راندمان مصرف بالای کربن در طول سنتز در کلزاهای در حال رشد ، را با آزاد کردن CO2 ای که در حین Rubisco بدون عمل کاهش مسیر پنتوز فسفات، توضیح دهد (Schwender همکاران. 2004a).

این کشف آخر ، توانایی حالت پایدار به کمک برچسب را در آزاد کردن جنبه های عملکردی جدید شبکه های متابولیک پیچیده را نشان می دهد. حین سنتز اسید چرب از کربوهیدرات، یک سوم از کربن به عنوان دی اکسید کربن منتشر می شود [یک CO2 برای هر استیل کوآنزیم-(COA) تولید شده توسط پیروات دهیدروژناز]. در Schwenderهمکاران. (2004a)، میزان تکامل CO2 توسط رویان براسیکا در حال توسعه در فرهنگ ، پایین تر از نرخ مورد انتظار از سنتز چربی بود.علاوه بر این، ممکن نیست به صورت کمٌی ، نتایج 13 C آزمایش های برچسب گذاری را از طریق مسیر متابولیسم توضیح داد.آلانین برچسب گذاری شده با C 13 برای رویان حاصل از برچسب گذاری در مکان کربن اول فسفو گلیسرات (PGA) که در اسید های آمینه آروماتیک تشخیص داده شد(شکل 2). این امر ،توسط اقدامات موفق آلانین آمینوترانسفراز و پیروات دهیدروژناز ، توضیح داده شد که سبب ایجاد 13CO2 می شود که با Rubisco برای تولید PGA برچسب گذاری شده ، تلفیق شد. عدم انتقال این برچسب به اسید های چرب در این آزمایش ، یا وقتی 13CO2 تولید شد،نشان داد که Rubisco خارج از حالت معمول زمینه کاهش دهنده مسیر پنتوز فسفات تقلیل دهنده، عمل می کرد. MFA حالت پایدار با دیگر منابع کربن برچسب گذاری شده که از این نتیجه پشتیبانی میکند ، قادر به محاسبه الگوهای برچسب گذاری شده بود و کربن بالا از کارایی این داده ها استفاده کرد و با یافته های Rubisco که در شکل فعال خود در دانه های روغنی سبزوجود دارد ، سازگار بود. (Ruuska ، Schwender و Ohlrogge، 2004). تجزیه و تحلیل قابلیت های شبکه با استفاده از EMA دیگر ابزار قدرتمند برای درک الگوهای شار از طریق شبکه های پیچیده است (جدول 1)، و در این مورد نشان داد که پتانسیل برای این نقش تا کنون ناشناخته برای Rubisco در ساختار شبکه، ذاتی است (2004a Schwender و همکاران). کار MFA حالت پایدار اخیر در سویا نیز از نقشی برای Rubisco در دانه های سبز در حال رشد ، (هر چند کمتر از در براسیکا)با وجود سطوح پایین نوری که به آنها می رسد ، پشتیبانی می کند (آلن و همکاران. 2009).

تا 45٪ از اسیدهای چرب در کلزا (cv. Reston) روغن دانه، دارای زنجیر بسیار طولانی با افزایش طول در حال وقوع درسیتوزول (Ohlrogge، پولارد و Stumpf 1978؛ ،مورفی و هیلز1993؛ بائو، پولارد و Ohlrogge 1998) است.استیل کوآ در سراسر غشاء منتقل نمی شود (Liedvogel و Stumpf 1982)، اما می تواند برای سیتوزول از طریق ارسال سیترات از میتوکندری به سیتوزول، و تقسیم بعدی توسط lyase ATP- سیترات ارایه دهد .برای توصیف شار موجود، آزمایشاتی که از زیر لایه های Clabelled استفاده می کنند انجام شدند و به اسید های آمینه و آلی تقسیم شدند همچنین چربی و کربوهیدرات اندازه گیری شدند.بازرسی اولیه از نتایج به نظر می رسید با بهره برداری از فرایند متابولیک شناخته شده سازگار باشد ، اما مدل سازی داده ها از یک عملکرد غیر معمولی آنزیم های چرخه اسید تری کربوکسیلیک پشتیبانی کرد. به خصوص دی هیدروژن ایزو سیترات ، که یک مرحله غیر قابل برگشت در متابولیسم گیاه است ، ظاهرا بسیار قابل برگشت است و حتی شار خالص را به عقب حمل می کند که سبب کربوکسیل دار کردن اکسو گلوتارات می شود.برگشت پذیری این مرحله در آزمایشات با استفاده از گلوتامین برچسب گذاری شده کامل ، تایید شد که سبب ایجاد سیترات حاوی اسکلت سیترات دست نخورده پنج کربن از زیر لایه است.مدلسازی داده های برچسب گذاری در این MFA حالت پایدار علاوه بر این نشان داد که الگوی جریان خالص از طریق آنزیم های میتوکندری شامل یک جریان مهم از طریق آنزیم مالیک است و سیتراتی که توسط استیله کردن از اکسالو استات تشکیل شده (سیترات سنتاز) صادر می شود، به جای اینکه ایزومری شود ،و سپس مانند چرخه TCA معمولی ، اکسیده می شود. همان برگشت پذیری دی هیدروژن های ایزو سیترات در سویا مشاهده شده است(آلن و همکاران 2009)اگرچه این دانه ها ی این گیاه ، شار خالص از طریق دی هیدروژن ایزو سیترات (ICITDH) دی کربوکسیله می شود و چرخه TCA با یک شار ارسال معمولی ، عمل می کند.

MFA حالت پایدار همچنین می تواند درک ما از متابولیسم گیاهی را با استفاده از مشخص کردن تغییرات پیچیده بالقوه در شار های تهییج شده توسط تغییرات محیطی و رشدی را بهبود دهد. (Rontein و همکاران 2002؛ آلونسو و همکاران 2007b؛ Junker و همکاران. 2007؛ ویلیامز و همکاران. 2008) بررسی اخیری از سلول Arabidopsis کشت شده (ویلیامز و همکاران. 2008) انعطاف پذیری متابولیسم را در آشفتگی سطح اکسیژن برجسته می کند. انتقال الکترون به طور مستقیم با

فعالیت چرخه TCA با مصرف اکسیژن سلول همراه می شود و در نتیجه تغییرات در سطح اکسیژن به شدت متابولیسم اولیه را تحت تاثیر قرار می دهد (دیویس، Grego و گرگو Kenworth 1974).در مطالعه ویلیامز و همکاران ،تعادل تنفسی و شار بیوسنتزی از طریق متابولیسم اولیه تا حد زیادی بدون تغییر بود. هر چند شار مطلق از طریق شبکه با نرخ بالاتری از اکسیژن افزایش یافت. این کار به معنی این است که متابولیسم سلولی ، به جای اینکه کربن محدود داشته باشد ، اکسیژن محدود دارد.

تا به امروز، تنها تعداد انگشت شماری از مطالعات MFA اثر ژنوتیپ را بررسی کرده اند: آلونسو و همکاران،(2007b) نقش سنتاز ساکارز در نشاسته و تولید دیواره سلولی درنوک های ریشه تغییر پذیر و نوع وحشی ذرت را کشف کرده اند.

Spielbauer و همکاران،(2006) الگوهای شار در هسته ذرت از 18 ژنوتیپ را مقایسه کرده اند.و مک نیل و همکاران، (2001) از MFA پویا برای تجزیه و تحلیل بیوسنتز گلیسین بتایین در تراریخت توتون و تنباکو استفاده کردند. کاربردهای MFA تراریخت انتظار می رود، با توجه به یافته های مکرر از تغییرات متابولیسم غیر منتظره در گیاهانی که به صورت ژنتیکی تغییر کرده اند و پیشرفت MFA گیاه در سال های اخیر ، رشد کند (کروگر و Ratcliffe 2007، 2008).عوامل اضافی رشد دهنده MFA در گیاهان جهش یافته و تراریخت به احتمال زیاد ،سبب نقشه شار برای بافت های مدل، پیشرفت درمتد های MFA به طور کلی و به ویژه برای گیاهان، وپتانسیل استفاده از سیستم های تعلیق سلول برای مقایسه ژنتیکی خطوط مختلف (Rontein و همکاران 2002؛ باکستر و همکاران 2007؛کروگر و همکاران. 2007؛ ویلیامز و همکاران. 2008) می شود.

تلاش در جهت اعمال MFA به گیاهان تحت شرایط عادی فیزیولوژیکی چند جهت در سال های اخیر گرفته است . برای سلول های اتوتروف یا بافت، CO2 بستر طبیعی است. با این حال، برچسب زدن CO2 در حالت پایدار ایزوتوپی سبب برچسب گذاری یک شکل و بی ارزش است.بنابراین ، آزمایشات حالت غیر پایدار و تحلیل ها نیاز است.یک روش در این چالش ، برچسب زدن گذاری تمام توده های داخلی با CO2و انجام فنوتیپی متابولیسم ترقیق بعدی برچسب در کل گیاهان است. (Huege و همکاران 2007؛ Romisch-Margl و همکاران، 2007).هر چند از دیدگاه فیزیولوژیک جذاب است ، اگر این روش بتواند به نقشه شارمنجرشود، متابولیسم مخلوط در سراسر بافت گیاهی،نامشخص می شود. در مطالعات برچسب گذاری دیگر، درجه حرارت (Iyer و همکاران. 2008) و یا نور (Ettenhuberهمکاران. a 2005) به صورت روزانه حین برچسب زدن تغییر کرد تا شرایط رشد گیاه طبیعی نسبت به مطالعات انجام شده که در آن شرایط ثابت ، حفظ می شود را بیشتر نشان دهد.نقطه پایان ناشی از الگوهای برچسب زدن ،متابولیسمی را منعکس می کند که به صورت پویا حین آزمایش، تغییرمی کند و این پیچیدگی زود گذر سبب می شود ارزیابی چنین مطالعاتی چالش انگیز تر باشد. روش دیگر،تجزیه و تحلیل از برچسب زدن در طول دوره های زمانی کوتاه ترآزمایشات در برچسب زدن پویا می تواند با دقت بیشتری انجام شود. و این امر به طیف وسیعی از بافت های گیاهی دست نخورده کمتر یا بیشتر برای متابولیسم ثانویه ، اعمال می شود. (در زیر، بحث شده است). تحولات اخیر در رابط حالت پایدارو روش هایMFA پویا (نوح، Wahl و ویچرت2006؛ Antoniewicz و همکاران. 2007؛ نوح و همکاران. 2007؛ Wahl، نوح و ویچرت 2008؛ ژائو و همکاران. 2008) در میکروارگانیسم ها باید طیف وسیعی از گزینه ها برای MFA متابولیسم مرکزی گیاه را افزایش دهد و شروع به تجزیه بخش های مفهومی بین روش های MFA حالت ثابت و پویا می کند.

مطالعات دینامیکی MFA بر اساس اندازه گیری دوره زمانی از غلظت و / یا سطوح برچسب گذاری واسطه های متابولیک، و خواص جنبشی آنزیم ها و حمل و نقل در شبکه است(معمولا در شرایط in vitro اندازه گیری می شود). MFA پویا شده با موفقیت به متابولیسم کار گیاهی مورد مطالعه ، اعمال شده بود.(بررسی در مورگان و رودز2002؛ Poolman و همکاران. 2004؛ Ratcliffe و Shachar-هیل 2006؛ ریوس-Estepa و لانگه 2007؛ Libourel و Shachar-هیل 2008).در دسترس بودن نرم افزار مدل سازی پویا و اسپکتروسکوپی تحلیلی برای اندازه گیری سطوح متابولیت و برچسب گذاری ایزوتوپی پایدار ، با هم، اندازه شبکه هایی که میتواند با پویا MFA مورد مطالعه قرار گیر را گسترش می دهد ،اگر چه حالت پایدار MFA یا FBA اغلب برای تجزیه و تحلیل زیر شبکه متابولیک مرکزی بزرگتر استفاده می شود. روش MFA پویا ، به صورت گسترده تری به مطالعه فتوسنتز (به عنوان مثال زو، de Sturlerو Long 2007) و متابولیسم ثانویه (به عنوان مثال ریوس-Estepaهمکاران. 2008)، اعمال شده اند و می تواند سبب پیش بینی های جذاب در مورد فرصت های مهندسی متابولیک بالقوه برای بهبود عملکرد گیاه شود (Rohwer و بوتا 2001؛. Uys و همکاران، 2007).

به عنوان مثال، Uys و همکاران تجمع ساکارز بلوغ در ساقه نیشکر را بررسی کردند. با استفاده از مدل سازی جنبشی و MCA، این نویسندگان اصلی توانستند واکنش هایی با بزرگترین کنترل بر چرخه بیهوده مرتبط با تجمع ساکارز در واکوئل ایجاد کنند.

این استفاده از مدل سازی جنبشی با MCA روشی برای پیش بینی تاثیر تغییرات به آنزیم خاص ارائه می دهد ، اما مدل سازی پویا در این روش نیاز به دانش پارامترهای جنبشی ندارد . در واقع، توصیف قانون قدرت فرآیندهای بیوشیمیایی سبب یک چارچوب جامع ریاضی به عنوان تئوری سیستم بیوشیمیایی شناخته شده است (Savageau 1998 و مراجع در آن). Heinzle و همکاران،(2007) متابولیسم فنیل پرو پانویید را با استفاده از داده ها بر روی دیسک های برچسب زده شده با فنیل آلانین ، با استفاده از یک نمایش سینتیک قدرت قانون مدل سازی کرد (ماتسودا و همکاران، 2003، 2005). آنها توانستند شار مسیر و ضرایب کنترلی که دلیلی برای حفاظت از خود از گیاهان توسط تجزیه و تحلیل کنترل شار مقایسه بین کنترل و سلولی که یک elicitor دریافت می کند را فراهم کند (شکل 3).

یک مطالعه اخیر از متابولیسم مونو تر پنوید در نعناع نشان میدهد که چگونه ویژگی های نظارتی متابولیسم می تواند از طریق داده ها ی مدل سازی متابولیت جنبشی با MFA پویا کشف شود. (ریوس-Estepa و همکاران. 2008). متابولیسم Monoterpenoid مسئول بیوسنتز طیف وسیعی از ترکیبات ثانویه گیاهی است و هدف قابل توجه تلاش مهندسی متابولیک است. (محمود و Croteau 2002). ریوس-Estepa و همکاران یک مدل جنبشی زیر شبکه متابولیک با استفاده از اندازه گیری واسطه های سطوح و محصولات توسعه دادند ، که غلظت آنها در سلول های ترشحی از تجزیه و تحلیل میکروسکوپی و با استفاده از دانش قبلی در مورد سطوح و سینتیک آنزیم های دخیل را برآورد می کند.



این مدل جنبشی برای تجزیه و تحلیل اثرات استرس های محیطی (نور کم) در تجمع محصولات و واسطه ها مورد استفاده قرار گرفت که به یک اثر مهاری تاکنون ناشناخته یک واسطه (Menthofuran) در یک شاخه کلیدی آنزیم نقطه (ردوکتاز پولگون). اشاره کرد.این نتیجه مشتق شده از مدل توسط سنجش در شرایط آزمایشگاهی تایید شد. این مطالعه و مطالعات دیگر، قدرت MFA پویا در شناسایی فرایندهای نظارتی جدید به عنوان بخشی از مهندسی متابولیک گیاه را نشان می دهد.

**دهلیز بندی زیر سلولی**

دهلیز بندی زیر سلولی، انعطاف پذیری متابولیسم، تخصص و مقررات را افزایش داد. همچنین چالش هایی در تجزیه و تحلیل متابولیسم را با مستثنی نکردن MFAنشان می دهد .برای MFA دهلیز بندی ، ساختار شبکه متابولیک ، محلی سازی و اندازه گیری سطح متابولیت و تعیین متابولیت برچسب زدن را پیچیده می کند که ممکن است برای متابولیت مشابه در محفظه های مختلف (شکل 4)تفاوت داشته باشد.در گیاهان، حضور واکوئل بزرگ و plastids فعال متابولیسمی ، چالش اضافی در مقایسه با حیوانات و یا برخی سیستم های قارچ ایجاد می کند. شکست محاسبه درستی برای دهلیز بندی به طور بالقوه می تواند سبب تفاوت نقشه شار، مدل ها و نتیجه گیری شود، همان طور که اخیرا برای موضوع چرخه بیهوده مربوط به نیشکر و تغییر گلوکز نشان داده شد.



با این حال، اگر دهلیز بندی رفع شود،مطالعات MFA پتانسیل تعیین سهم نسبی محفظه های مختلف در شار متابولیک دارند . مقایسه شار از طریق مسیرهای موازی در سیتوزول و دیسه (مانند آنهایی که hexose- و triose-فسفات را اتصال می دهند)، بسیار دشوار است که اغلب به صورت قابل اعتماد کار کند. MFAهمچنین پتانسیل آشکار کردن وجود توده های متعدد از همان متابولیت به عنوان مثال، برای کولین در برگ را دارد(مک نیل و همکاران. 2001).

ساختار یک شبکه متابولیک به محل آنزیم آن و حامل ها بستگی دارد . مکان این پروتئین ها می تواند با درجه های مختلف اعتماد به نفس توسط ایمونو هیستوشیمی میکروسکوپی و برچسب زدن فلورسانس، توسط شکنش و اندامک پروتئومیکس،و با هدف قرار دادن پیش بینی بر اساس توالی، تعیین شود.اطلاعات ناقص، نادرست و نامطمئن در ساختار شبکه متاسفانه هنجار در متابولیسم گیاه، و مراقبت باید برای بررسی مفروضات کلیدی انجام شود چنین آزمایشی می تواند محاسباتی - برای دیدن اینکه آیا مدلها بر اساس ساختار شبکه های مختلف می تواند به همان اندازه نیز برای داده های مشاهده شده در نظر گرفته شوند - و در حالت ایده آل همچنین تجربی، با جستجوی شواهد در محل پروتئین مهم باشد.غلظت متابولیت ها در MFA پویا استفاده می شوند و تعیین آنها معمولا بستگی به تقسیم سطوح کل تعیین شده پس از استخراج توسط حجمی که آنها اشغال می کنند ، دارد- نیاز به دانش دهلیز بندی آنها دارد.اندازه گیری برچسب گذاری متابولیت در MFA حالت پایدار و پویا استفاده می شود و این امر می تواند برای متابولیت مشابه در قسمت های مختلف ، متفاوت باشد.

**روش های شست و شوی اندامک**

نیاز به اطلاعات قسمت در پروتئین ومتابولیت می تواند تا حدی با استفاده از روش های تصفیه اندامک برآورده شود. (Winter ، رابینسون و Heldt 1993؛ Weise،وبر و Sharkey 2004؛ Farre، Fernie و Willmitzer 2008). در تجزیه غیر آبی، بافت به سرعت منجمد می شود و تحت شرایطی که که در آن سطوح و محلی سازی متابولیت ها کمترین اختلال را داشته باشند ، لیوفیلیزه می شود (Stittهمکاران. 1989). از آنجا که جدایی از اندامکها ناقص است،برآورد سطوح متابولیت های تجزیه شده به مشخص نیست چنین استراتژی دکانولوشن برای تعیین تفاوت برچسب بین محفظه ها چه قدر موفق است. هر چند تنها مقدار کوچکی از بخش های اندامک خالص برای تعیین برچسب با استفاده از روش های اسپکترومی توده حساس نیاز است.روش جزء به جزء آبی (Keech، Dizengremelو Gardestrom 2005) شامل جدا سازی توسط نتایج سانتریفوژ تراکم شیب در یک جدایی بهتر از بخش اندامک است و برای تلاش های محلی سازی برای پروتئین مهم است، اما بعید است محل متابولیت ها به جای محصولات پایانی کمتر متحرک ،حفظ شود.

**متابولیت های بازخوانی محفظه خاص**

استراتژی جایگزین برای رفع برچسب گذاری متابولیت درمحفظه های مختلف شامل استفاده از گزارش دهنده و یا متابولیت های باز خوانی که مختص مکان های زیر سلولی است.به عنوان مثال، استیل کوآ یک واسطه متابولیک مهم است که نقش های متفاوتی را در چند محفظه بازی می کند و در سراسر غشاء ،انتقال نمی یابد (Weaire و Kekwick 1975؛ Roughan، هلند و اسلاک 1979). به عنوان یک پیش ماده برای سنتز چربی، استیل کوآ برای سنتز اسید چرب دی نووو توسط plastidic دهیدروژناز پیروات تولید می شود(بائو و همکاران، 2000.)، در حالی که استیل کوآ برای افزایش طول اسید چرب در سیتوزول تولید می شود (Ohlrogge و همکاران 1978؛ همکاری میکند همکاران. 1993؛ بائو و همکاران. 1998). برچسب گذاری در این توده می تواند توسط تجزیه و تحلیل اسیدهای چربی که در دیسه ساخته شده و در سیتوزول افزایش طول یافته است تعیین شود (Schwender و Ohlrogge2002؛ آلن، Shachar-هیل و Ohlrogge، 2007. )، بنا براین برچسب گذاری اندازه گیری شده در اسیدهای چرب16 و 18 کربن، برچسب گذاری استیل کوآی دیسه ای را نشان می دهد ، در حالی که برچسب زدن در کربن آخر 20 کربنی یا اسید های چرب طولانی تر، برچسب زدن از سیتوزولی استیل کوآ را نشان می دهد .

متابولیت بازخوانی متمایز همچنین می تواند برای تشخیص برچسب توده فسفات قند کلیدی واقع در دیسه و سیتوزول مورد استفاده قرار گیرد. برچسب گذاری نشاسته ، حالت ایزوتوپی پیش سازها را در دیسه و سوکروز نشان می دهد . گلیکان های پروتئین و دیوار های سلول با الگوهای برچسب گذاری از کربوهیدرات سیتوزولی حک شده اند که از آنها ساخته شده است. ، اگر چه برچسب زدن در سوکروز می تواند به طور مستقیم اندازه گیری شود، تجزیه آنزیمی یا شیمیایی برای تسهیل تجزیه و تحلیل کربوهیدرات همراه پلیمر استفاده می شود . بنابراین ، به عنوان مثال، هیدرولیز اسید نشاسته و گلیکان های پروتئین سبب اسید لوولینیک می شود ، که در آن هیدرولیز آنزیمی سبب ایجاد قند می شود که برچسب گذاری آن می تواند با NMR تحلیل شود.( Sriram وهمکاران. 2007b) یک سود متمایز این رویکرد ، توانایی بررسی غنی سازی موضعی و اتصال در بازه طولانی بین کربنهایی است که اطلاعات با ارزشی برای تجزیه و تحلیل شار فراهم می کند (Sriram و همکاران 2007b).برچسب گذاری در مونومر دیواره های سلول، نشاسته و گلیکان پروتئین همچنین می تواند با استفاده از طیف سنج کروماتوگرافی جرمی گاز (GCMS) با کاهش یا بدون کاهش از قبل قند به مشتقات آلدیتول آنها تحلیل شود (آلن و همکاران. 2007). مطالعات متعددی وضوح شار ها بین سیتوزول و دیسه ها بر اساس متابولیت های بازخوانی را گزارش داده اند.(به عنوان مثال Sriram و همکاران، 2004؛آلونسو و همکاران. 2007a.) اگرچه، در مطالعات دیگر، نتیجه گرفته شد که اطلاعات اختصتصی نا کافی برای رفع هر اطمینانی وجود دارد. (به عنوان مثال Schwenderهمکاران. 2003؛ آلن و همکاران. 2009).

**روش غیر مخرب برای تجزیه و تحلیل متابولیت**

در NMR بدن موجود زنده ،تصویربرداری و طیف نمایی، روش های غیر مخرب هستند که می تواند اطلاعاتی در سطوح و برچسب گذاری متابولیت های تشخیص داده شده فراهم کند(Ratcliffe و Shachar-هیل2001؛ Kockenberger و همکاران. 2004). ، اگر چه NMR توسط حساسیت به گزارش متابولیت فراوان تر،در مورد مساعد محدود است، می تواند برای تجزیه و تحلیل توزیع این متابولیت در میان محفظه زیر سلولی ، بین واکوئل و بقیه سلول ، مشارکت کند.

یک ترکیبب که درون سلول در چند محیط درون یاخته ای واقع شده است ،ممکن است سیگنال های مجزا بر اساس اینکه آیا سیگنال به هر تفاوت pH ویسکوزیته یا ترکیب یونی بین آن قسمت ها وابسته است (وگل، لوندبرگ و باغ 1999؛ Ratcliffe، Roscher و Shachar-هیل، 2001)را بدهد .وابستگی pH سیگنال های NMR معمولا برای ترکیبات فسفری و اسیدهای آلی ، بهره برداری می شود. (استیدهام، اکلاهما، Moreland و Siedow 1983؛ Gout همکاران. 1993)، و اطلاعات هر قسمت نیز در اسیدهای آمینه (اوبر و همکاران 1998، 1999) وآمونیوم (لی و Ratcliffe 1991) به دست آمده است .در طیف سنجی NMR بدن موجود زنده نیز برای اندازه گیری مستقیم شار های حالت پایدارتوسط انتقال مغناطیس مورد استفاده قرار گرفته است. این امر در مورد تغییر و تبدیل ترکیبات فسفری در در بافتهای گیاهی هتروتروف ، بسیار آموزنده شده است.(بررسی در Ratcliffe و Shachar-هیل، 2001). در NMR داخل بدن نیز می تواند استفاده شود تا اندازه گیری های دوره زمانی با کیفیت بالا از برچسب گذاری به دست آید که به طور مستقیم ، شار ها را منعکس می کند.(Trouf FL ARD و همکاران. 2007) .

گزارش دهندگان پروتئین فلورسنت با ذره بینی فلوئورسنس ،یک روش غیر مخرب اضافی در داخل بدن برای اندازه گیری سطح متابولیت در محفظه های مختلف فراهم می کند.(لالوند، اهرهاردت، کارولینای جنوبی و Frommer، 2005؛ Okumoto، Takanaga و Frommer، 2008) گزارش دهندگان حساس ، برای تعدادی از متابولیت ها توسعه یافته اند (عمدتا قندها و اسیدهای آمینه)و آنها می توانند به صورت انتخابی به چند محفظه داخل سلولی مختلف ، نشان داده شوند. این گزارش دهندگان باید در MFA پویا با ارایه اندازه گیری متابولیت زیر سلولی و تغییرات آنها در پاسخ به آشفتگی ، مشارکت کنند. (Okumoto و همکاران. 2008).

**امتیاز واحد متابولیک**

حضور نقاط شاخه در یک شبکه ، چند گزینه برای شار ها بین واسط های محتلف ایجاد می کند و این امر ، یکی از بزرگترین چالش ها برای MFA را ارایه می دهد . در متابولیسم مرکزی،چنین نقاط شاخه به جای استثنا ، قانون هستند (شکل 2-4)، که سبب می شود این امر ، یکی از چالش برانگیزترین حوزه های مطالعه باشد. به دلیل اهمیت ساختاری آنها،آنزیم ها در نقاط شاخه، اغلب در مقررات ، مهم هستند و هدف مهندسی متابولیک و همچنین تجزیه و تحلیل شار ها شده اند که اغلب مجموعه ای از مراحل خطی را به عنوان فرآیندهای ترکیبی تک ، نشان می دهند.

**مسیر پنتوز فسفات**

چالش دیرینه برای MFA نقطه شاخه در پنتوز فسفات گلوکز-6-فسفات بین مسیر پنتوز فسفات و گلیکولیزاست (کروگر و فون Schaewen 2003).مسیر پنتوز فسفات برای وضعیت ردوکس و برای ارائه زیر لایه ها برای سنتز ribonucleotides، هیستیدین و اسید های آمینه و محصولات اسید shikimic مهم هستند. برای گیاهان، دومی می تواند به دلیل تولید لیگنین و فلاو نویید ها شا رهای بزرگ متفاوت را ارایه دهد .در دسترس بودن برچسب قند در موقعیت های مختلف برای رفع شار در این نقطه شاخه مهم است. نخست برای استفاده از گلوکزC] [1-13 و گلوکز C] [6-13 (ویلیس، ویلیامز و Schleich 1986؛ Kingsley-هیکمن، راس و Krick 1990)، و بعد از آن C] [2-13  و C] [1,2-13 (لی و همکاران. 1998)، که حساسیت بیشتری برای رفع ارائه تقسیم شار ارایه می دهد (Schwender, Ohlrogge & Shachar-Hill 2004b; Libourel, Gehan & Shachar-Hill 2007).با این حال، شارها از طریق نقاط شاخه های دیگر و شار های برگشت پذیر می تواند امکان برچسب زدن تقسیم مسیر گلیکولیز اکسیداتیو پنتوز فسفات را پنهان کند(OPPP) . علاوه بر این، آنزیم کتولاز و آلدولاز می تواند بر روی بسترهای چند گانه ، تفسیر برچسب پیچیده عمل کند (Flanigan و همکاران 1993؛ ویلیامز و مک لوید2006).بنابراین، حتی در تحقیقات کامل از سیستم های ساده، عدم اطمینان (محدوده اطمینان) در مورد نسبت تقسیم می تواند بزرگ باشد (Dauner، بیلی و SAUER 2001؛ ون Winden و همکاران. 2005). به عنوان مثال، مطالعات همان میکروب با گروه های MFA شناخته شده مختلفاز محدوده 33-75٪ برای نسبت تقسیم گلیکولیز / OPPPگزارش شده اند.(کریستنسن و نیلسن 2000؛ کریستنسن، Thykaer و نیلسن 2000؛ ون Gulik و همکاران. 2000؛ ون Windenهمکاران. 2003؛ Kleijn و همکاران. 2006)، اگر چه شرایط ژنتیکی و رشد، احتمالا به به این امر کمک کرده است.

این تجزیه و تحلیل در گیاهان توسط تقلید از PPP و آنزیم های گلیکولیتیک در هر دو سیتوزول و دیسه (نیشیمورا و Beevers 1979؛ Schnarrenberger، Flechner و مارتین 1995؛ کروگر و فون Schaewen 2003؛ Caillau و Quick 2005)، با شار بین محفظه ها از طریق هگزوز، پنتوز و یا حمل تریوز، پیچیده تر می شود(Eicks و همکاران).حضور هر دو آنزیم ها اکسیداتیو و تقلیل PPP (چرخه کالوین بنسون Bassham)در plastids - که فعالیت آنها می تواند منجربه الگوهای برچسب زدنی شود که سخت تمایز قائل می شود - موضوع دیگری است که MFA بافتهای سبز را پیچیده می کند.به نظر می رسد که درمتابولیسم گیاه، عملیات همزمان اکسیداتیوو مسیر پنتوز فسفات تقلیل دهنده به شدت در سطوح مختلف از مقررات ، منع می شود. (بوکانان 1980 Buchananو لوان 2005). با این حال، تغییرات نور- تاریکی وناهمگونی سلولی در بافت نیاز دارد بافت در مغز ، تحمل شود، به ویژه برای بافت فتو هترو تروفیک .با تمایز نهادن میان اکسیداتیو و مسیر پنتوز فسفات تقلیل دهنده، در زمینه MFA با اندازه گیری تکامل CO خالص ، کمک می شود. (آلن و همکاران).

**تبدیل اسید کربوکسیلیک سه و چهار کربن**

شار های اتصال دهنده PEP، پیروات ،اکسالو استات (OAA)و مالات همچنین چالش های قابل توجهی در مهندسی متابولیسمو تجزیه و تحلیل شار در گیاهان ارایه می دهد (شکل 4). در اینجا دوباره، دهلیز بندی و تقلید از مراحل آنزیمی، چند نقاط شاخه و مسیرهای جایگزین که سبب همان الگوهای برچسب در آنالیتها می شود ، همه به سختی رفع شار در این بخش از متابولیسم کمک مس کنند.مثال های نسبتا کمی از تجزیه و تحلیل شار تقسیم شده برای این بخش از متابولیسم وجود دارد و آنهایی که بر اساس برچسب زدن در اسیدهای آمینه، تقسیم شده اند که شناخته شده هستند تا به صورت تقسیمی در در سیستم های دیگر مانند مخمر متمایز باشند (Gombert و همکاران. 2001)، اما نه لزوما در گیاهان. با این وجود، این واکنش ها برای آنا پلروسیس ، متابولیسم اسید آمینه و جهت کربن در بیوسنتزو کاتابولیسم، حیاتی هستند آنها بر انرژی تعادل ردوکس سلول نیز تاثیر می گذارند.دستکاری شار های آنا پلروتیک ،منجر به افزایش تولید اسیدهای آمینه در میکروب مانند گلوتامیکم کرینه باکتریم (PetersWendischو همکاران. 1998؛ پترسون و همکاران. 2001) و در ماشک،بیان بالای کربوکسیلاز فسفوانل پیروات (PEPC) منجر به پارتیشن بندی افزایشی از کربن به پروتئین می شود(Rolletschek و همکاران 2004؛ Radchuk و همکاران 2007). FBA(جدول 1) به تازگی نشان می دهد مکانی که در آن اسید آمینه بالا می گیرد مهم است.یک شار آنا پلروتیک برای بیوسنتز پروتئین مورد نیاز نمی باشد (Schwender 2008).مطالعات MFA گیاه قادر به رفع تمام شار ها از طریق این نقاط شاخه نبوده است، اما با استفاده از یک ترکیب ، ایجاد شده است: تجزیه و تحلیل برچسب زدن اسید آمینه به عنوان متابولیت بازخوانی، اندازه گیری برچسب زدن در اسیدهای آلی به طور مستقیم، سبب تسهیل فرضیات در مورد تعادل برچسب زدن بین توده های مختلف چهار کربن دی کربوکسیلیک و استفاده از چند زیر لایه برچسب زده می شود.بنابراین، مطالعات MFA گیاه قادر به برآورد تخمین نشده است، به عنوان مثال، شار ها در داخل و خارج از چرخه TCA و شارهایی که که C3 را به اسیدهای کربوکسیلیک C4 توسط شار سازی2 CO تبدیل میکند و برای تحلیل سهم واکنش دکربوکسیلاسیون مالات به عرضه پیروات میتوکندری (Schwender و همکاران. 2006) و سنتز اسید چرب دیسه (آلونسو و همکاران 2007a.)

نتایج مبتنی بر MFA در مورد نوع ، سهم کمٌی و مکان شار ها از طریق PPP و از طریق اسید های آلی 3C و 4C باید با توجه به دقتی که آنها ایجاد شدند ، دریافت شوند. قابلیت اطمینان یافته ها به پیچیدگی و عمق دانش قبلی در مورد ساختار شبکه تحت مطالعه و کیفیت برچسب گذاری و اندازه گیری های ورودی/خروجی،حساسیت زیر لایه ها ی استفاده شده ( که در بخش یعدی بحث می شود ) ، مراقبتی که با آن فواصل اعتماد ، ارزیابی شد و درجه تست مستقل که در آن مدل و نتایج آن در نظر گرفته شدند ،بستگی دارد. در واقع، اگر چه روش ها و استانداردها برای MFA گیاه هنوز تصفیه شدن است ، این معیارها باید در ذهن هنگام ارزیابی تمام مطالعات MFA، تحمل شوند.سپس ، پیشرفت های فنی در حال انجام MFA را در نظر می گیریم که می تواند قابلیت اطمینان و توانایی پیش بینی تحلیل گیاه را بهبود بخشد.

**طراحی برچسب ایزوتوپ- مسیر مناسب**

توانایی تشخیص بین مسیرهای موازی در اندامکهای مختلف ، تا حد زیادی به دسترس پذیری متابولیت بازخوانی محفظه خاص ،بستگی دارد. دقتی که با آن شار می تواند تخمین زده شود به شدت به حساسیت اندازه گیری برچسب در، شار بستگی دارد به دلیل بسیاری از واکنش های تلاش در اکثر شبکه های متابولیک،برچسب موضعی از متابولیت های پایین دست به نزدیک شدن محتوای برچسب متوسط ، بستگی دارد. یعنی محدوده دینامیکی برای شدت برچسب زدن، کاهش می یابد، که حساسیت اندازه گیری را کاهش می دهد. بنابراین، نزدیکی متابولیت به شار های بهره، در تعیین دقت ، مهم است.بین اندازه گیری های برچسب و عدم قطعیت ترکیبات شار و در عمل ، شار های مبادله که نسبتا به اندازه گیری نزدیک هستند ، تمایز مشخصی وجود دارد که تنها مواردی هستند که می توانند به خوبی رفع شوند. کیفیت تخمین شار بهتر ین است اگر با زیر لایه های برچسب زده شده که متابویسمی که از چند نقطه وارد متابولیسم می شوند ، استفاده شود و اندازه گیری برچسب ها از تمام قسمت های شبکه ساخته شوند.

اینکه آیا همه شار در یک مسیر می تواند در اصل برای یک مجموعه اندازه گیری داده شده حل شود ، با استفاده از تجزیه و تحلیل قایبلیت شناسایی ساختاری ، تعیین می شود.(ون Winden و همکاران 2001؛ Isermann و ویچرت (دهانه) 2003؛ چانگ، Suthers و Maranas2008).معمولا، اندازه گیری های با چند برچسب از چند آزمایش های برچسب برای هر درجه ای از آزادی لازم است چون آزمایش برچسب زدن تک، بعید است به صورت منحصر به فرد ، شار ایجاد کند(Suthers و همکاران. 2007). مجموعه ای از اندازه گیری در دسترس برای شناسایی تمام نقشه شار و یا یک مسیر مورد بهره، کافی باشد حساسیت اندازه گیری برچسب برای تخمین شار می تواند با انتخاب ترکیب برچسب زیر لایه، بهینه شود.از آنجا که دقت یک نقشه شار، کیفیت کل سیستم، تابع هدف، باید برای نشان دادن دقت کلی، فرموله شود. بنابراین یک طراحی تجربی بهینه طراحی برچسب زیر لایه ، است در اصل، بهینه سازی(اتصالات) این مشکل است که یک معیار بهینه سازی انتخاب شده را به حداقل می رساند.

برای به انجام رساندن این هدف، اندازه گیری برچسب مورد انتظاراز استفاده ترکیب های مختلف زیر لایه های برچسب زده شده در دسترس و حساسیت اندازه گیری درشار ، محاسبه می شود. این اطلاعات حساسیت در ماتریس کواریانس شار، و یک موجود است، و طرح برچسب بهینه بر اساس کیفیت ماتریس کواریانس به عنوان یک معیار،انتخاب می شود. تئوری طراحی تجربی بهینه به خوبی پیشرفته است و معیارهای بسیاری را توصیف کرده است که همه آنها برای اهداف خاص مناسب اند (Pazman 1986؛ Pukelsheim1993). Libourel و همکاران. (2007) نشان داده اند که بهینه سازی انتخاب چه مقدار از هر زیر لایه برچسب گذاری شده مرتبط دسترس و فیزیولوژیکی برای استفاده در آزمایش MFA در یک حالت پایدارتا حد زیادی می تواند دقت اندازه گیری را شار برای شبکه به عنوان یک کل و برای شار خاص مورد بهره ، افزایش دهد.

حساسیت اندازه گیری برای شار، خطی نیست که باعث می شود ترکیب بهینه زیر لایه وابسته به مقادیر واقعی شار باشد. در نتیجه، ایجاد نقشه شار دقیق ، یک فرآیند تکرار شونده است. اولیه تخمین شار حدسی، میتواند برای طراحی یک ترکیب زیر لایه برچسب گذاری شده استفاده شود که در نتیجه برای اندازه گیری دقیق تر شار، مورد استفاده قرار می گیرد.از آنجا که انتخاب زیر لایه برچسب زده شده ، توزیع متفاوتی از حساسیت در سراسر شبکه، ایجاد میکند ، آزمایش های برچسب گذاری متعدد می تواند دقت تخمین شار را بهبود ببخشد.این روش می تواند به ویژه مفید باشد اگر مسیرهای موازی نیاز به رفع شدن بدون متابولیت بازخوانی محفظه خاص داشته باشند. بنابراین دو یا سه آزمایش برچسب در برخی مطالعات به منظور بهبود کیفیت نقشه شار در گیاهان ، استفاده شده است.(مک نیل و همکاران 2000b؛ Schwender و همکاران 2004a، 2006؛ آلونسو وهمکاران. 2007a. آلن و همکاران. 2009). با این حال، طراحی بهینه مبتنی بر معیار- برای آزمایش های متعدد (Libourel و همکاران. 2007) هنوز به کار گرفته نشده است.

**بینش بهره برداری از مدل های شارمجتمع**

یک نقشه شار ، یک ویژگی نوخاسته از اجزای فیزیکی اصولی است: آنزیم ها، انتقال دهنده ها ومتابولیت ها .یک نقشه شار متابولیک بر اساس برچسب زدن حالت پایدار، با این حال، بدون هیچ گونه دانش این اجزاء اساسی فراتر از استوکیومتری شبکه

، ایجاد شده است و شرح شاررا بدون جزئیات مکانیکی، ارایه می دهد.یعنی چنین نقشه هایی پیش بینی نمی کنند که متابولیسم چگونه تغییر اجزای اساسی ، مانند تغییر در فعالیت آنزیم را می پذیرد.این محدودیت های ارثی سبب می شود برای استفاده از نقشه شار برای آزمایش فرضیه یک مدل توصیفی ،و یا در ارزیابی سیلیکون از جهش متابولیک و تراریخت ها غیر بدیهی باشد.آزمون فرضیه برای ارزیابی درک اساسی ما از سوخت و ساز مهم است و در ارزیابی سیلیکون جهش متابولیک، کلیدی برای مهندسی منطقی گیاهان تراریخت خواهد بود (Libourel و Shachar-هیل2008). اگرچه مدل های جزئیات جنبشی / پویا ذاتا پیش بینی کننده هستند، تحولات مهم اخیری برای پیش گویانه کردن MFA حالت پایدار، وجود داشته است.

**به حداقل رساندن تنظیم متابولیسمی (MOMA)و به حداقل رساندن نظم دهنده روشن / خاموش (ROOM)**

دو روش ساخته شده اند که هدف آن ها پیش بینی تطبیق شار ،مانند یک جهش عالی است.اولین رویکرد ،بر اساس MOMA است که از طریق به حداقل رساندن از مجموع تفاوت مجذور بین نقشه شار اصلی و تنظیم شدع ، انجام شده است. پیش بینی MOMAاغلب در توافق خوب با نتایج تجربی است و کاربرد آسان آن باعث می شود MOMA یک ابزار جذاب برای مهندسی متابولیک باشد. (Segre، Vitkup و کلیسای 2002).شرح MOMA در شکل5 ارائه شده است.روش دوم، ROOM ، بر اساس به حداقل رساندن تعداد تغییرات شار است(Shlomi، برکمن و Ruppin 2005). مفهوم پشت ROOM ، بر اساس مشاهداتی است که در آن بیان ژن به طور چشمگیری بلافاصله پس از اغتشاش متابولیک تغییر می کند،اما به تدریج به حالتی نزدیک به حالتی قبل از انحراف ،باز می گرداند. پیش بینی ROOM نیز در توافق خوب با داده های تجربی برای باکتری ها، است و پیش بینی ROOM، پیش بینی MOMA را در آزمایشاتی که در آن دوره تطابق گنجانده شده بود ، بهتر کار کرد.در مقابل MOMA، ROOM معمولا چند راه حل معادل می یابد ،که باعث می شود کاربرد های عملی ROOM برای مهندسی متابولیک کمتر ساده باشد، به ویژه برای شبکه های پیچیده تر از سوخت و ساز گیاهی. ROOM ،که بر اساس یک مشاهده بیولوژیکی است ، بینشی برای چگونگی تنظیم شبکه سوخت و ساز فراهم می کند.

**FBA**

FBA (جدول 1 و مقدمه را ببینید) یک روش جایگزین بسیار نظری برای استنتاج مقادیر شار متابولیک در یک شبکه است . مقادیر شار FBA بر پایه استوکیومتری واکنش ، اندازه گیری زیر لایه ها و زیست توده شار و فشارهای انتخابی استنباط شده ، تعیین می شود. (بهینه سازی تابع هدف).



با گنجاندن این فرض که فشار انتخابی، بازده متابولیک بهینه شده دارد، FBA بر عملکرد یک شبکه متابولیک ،متمرکز است. در مقابل، این رویکرد در اصل، نه تنها پی بردن به شار متابولیک داخلی، را ممکن می سازد بلکه - زمانی که نقشه شار از MFA تجربی مشخص می شود- بررسی فشارهای انتخابی که سوخت و ساز را شکل میدهند را نیز ممکن می سازد. FBAو نقشه شار بر اساس برچسب می تواند برای این منظور مقایسه شوند ، و برای کلزا، تفاوت جالب بین FBA و نقشه شار مبتنی بر برچسب زدنبه تازگی مورد بحث قرار گرفت (Schwender 2008).

نقشه شار FBA برای نوع وحشی و جهش ، به همین روش با این فرض ضمنی که شبکه هنوز هم تابع هدف را پس از به حداکثر رساندن یک آشفتگی ،ایجاد شده است.این امر ، پیشنهاد می کند که یا تکامل تطبیقی رخ می دهد و یا افزونگی در شبکه وجود دارد. در واقع، مقادیر شار تجربی باکتری جهش یافته ، پیش بینی FBA پس از یک دوره رشد تطبیقی، بهتر منطبق می شود و مقادیر شار گونه ها ی که بسیار به تازگی مختل شده است تمایل به بیشتری دارد که نزدیکتر پیش بینی MOMA زیر بهینه را منعکس کند( shlomi و همکاران 2005).از آنجا که FBA نیاز به هیچ اندازه گیری برچسب برای پیش بینی مقادیر شار ندارد، می تواند شبکه های بسیار بزرگ را مدیریت کند.در واقع، شبکه گسترده ژنوم در حال تقریبا معمولی شدن برای مطالعات FBA از پروکاریوتها هستند(رید و Palsson 2003؛ Feist و همکاران. 2007). با در دسترس در حال رشد ژنوم گیاه تکمیل شده و بهبود مداوم تفسیر مبتنی بر ارتولوگ، نقشه های بسیاری دیگر شار FBA از جمله سیستم های گیاه در آینده مورد انتظار است.در واقع، FBA به تازگی برای تجزیه و تحلیل متابولیسم در دانه جو (Grafahrend-Belau و همکاران. 2009) و Chlamydomonas مورد استفاده قرار گرفت(بویل و مورگان 2009). با این حال، تفسیر ناقص ژنوم گیاه و قسمت ناقص هدف برای پیش بینی هنوز هم چالش های قابل توجهی برای بازسازی شبکه های متابولیک از ژنوم گیاه دارد. (بررسی در Sweetlove و همکاران. 2008).

**تحولات در مدل سازی پیش گویانه**

دو محدودیت قابل توجه در روش FBA وجود دارد.اول، نیاز به دانش تابع هدف است، که برای میکروب معمولا حداکثر نرخ رشد است، اما اغلب برای بافتهای گیاهی ،نامشخص است. این مسئله می تواند با مقایسه توابع هدف مختلف حفظ شود، اگر چه این هنوز باید در یک سیستم گیاه ، نشان داده شود (Burgard و Maranas2003).در مرحله دوم، نقشه شار پیش بینی شده به دست آمده از FBA معمولا منحصر به فرد نیست، اما در عوض یک فضا یک راه حل ،تشکیل می دهد (شکل 1). راه حل معادل شار با جهش ساکت مقایسه شده اند ، که در آن تغییر در بیان ژن بر قابلیت ارگانیسم تاثیر نمی گذارد (رید و Palsson 2004). اگر چه این خاصیت کمی دور از توانایی برای کمک به عملکرد شبکه است، مانع از کاربرد FBA برای اهداف بیوتکنولوژی می شود،که در آن نتیجه یک مداخله ژنتیکی باید صریحا مفید باشد.

FBA نیز تجزیه و تحلیل شار مبتنی بر محدودیت است و آن عدم محدودیت کافی در شبکه سوخت و ساز است که علت وجود یک فضای راه حل به جای یک راه حل شار منحصر به فرد است. شناسایی محدودیت های اضافی برای کوچک شدن فضای راه حل تمرکز توسعه FBA باقی می ماند (Bonarius, Schmid & Tramper 1997; Covert, Famili & Palsson 2003; Price,Reed & Palsson. 2004) مدل شار FBA کنونی با سوخت و سازو اطلاعات فیزیولوژیکی از مقالات زیاد می شود - bibliome (دوآرته و همکاران 2007.) - و همچنین با بیان ژن و پروتئین و محلی سازی اطلاعات به دست آمده از بازسازی شبکه (شیلینگ، ادواردز و Palsson 1999؛ Feist همکاران. 2009). مدل های کنونی FBA نیز شامل اطلاعات تنظیمی برای محدود کردن نقشه شار واقعی برای وضعیت بافت داده شده است (Covertو Palsson 2002).

خطوط مختلف حمله ، توسط گروه هایی گرفته شد که به دنبال محدودیت بیوفیزیکی ذاتی هستند و در متابولیسم عمل می کنند. کار این نوع، از گروه های عملکردی سهم متابولیت ها (Mavrovouniotis 1990، 1991؛ Jankowski و همکاران. 2008)،در ترکیب با برآورد برای pH سلولی و قدرت یونی برای محاسبه انرژی آزاد گیبس خود ،استفاده می کند.

 (Maskow و فون Stockar 2005).با استفاده از این اطلاعات، جهتگیری واکنش را می توان برآورد کرد[تحلیل تعادل انرژی (EBA). ریش، لیانگ و کیان 2002؛ کیان، Beard و لیانگ 2003؛ ریش و همکاران. 2004]و محدوده غلظت متابولیت ترمودینامیکی امکان پذیر ،می تواند ایجاد شود. به همین ترتیب، روش FBAمبتنی بر ترمودینامیکی (TMFA) از کمک های گروه برای درست کردن تعدادی از مسیرهای متابولیک محتمل از لایه تا محصول استفاده می کند(هنری، Broadbelt و Hatzimanikatis2007)، اگرچه الگوریتم های دیگر به طور مستقیم شامل محدوده غلظت متابولیت به عنوان بخشی از معیار بهینه سازی هستند (Hoppe به، هافمن و Holzhutter 2007). ارتباط بین تغییرات انرژی آزاد و برگشت شار، موضوع دو مطالعه نظری اخیر بودند. این مطالعات مشخص می کنند چگونه مکانیسم آنزیم تاثیر بر شار تبادل ، اثر می گذارد که توسط MFA مبتنی بر برچسبتعیین شد (و همکاران 2004 مقرر؛ویچرت 2007). همان رابطه ، می تواند برای گسترش محدودیت ترمودینامیکی در پیش بینی های MOMAاستفاده شود (Libourel و همکاران، نتایج منتشر نشده).

**نتیجه گیری**

گیاهان ،منابع ضروری از مواد غذایی، خوراک و تولید فیبر هستند و منابع بالقوه ارزشمند برای ساخت مواد اولیه تجدید پذیر عرضه و سوخت ها پیشنهاد می کنند. دستکاری سوخت و ساز گیاه برای خدمت بهتر و نیازهای آینده به درک بهتر از ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ نیاز دارد.شار از طریق گزارش سوخت و ساز مستقیم در فیزیولوژی سلولی در سطح شبکه و تجزیه و تحلیل آنها در سال های اخیر ، توجه بیشتری به خود جلب کرده است. یک بازه از روش های مختلف MFA به سیستم های گیاهی اعمال شده است.که سبب بینش منحصر به فرد عملکرد شبکه های سوخت و ساز گیاهی شده است. (به عنوان مثال بازده کلی) تا تجزیه و تحلیل شود،و چشم انداز ارتباط فنوتیپ عملکردی بهتر با ژنوتیپ که تا به روز ممکن شده است را ارائه می دهد.

مجموعه ابزار MFA همچنان درحال رشد است، با تحولات اجتماع مهندسی متابولیک میکروبی جامعه که به روش مدل سازی شار پیش گویانه ، و تحلیل شبکه کل ژنوم، اشاره می کند. اظهارکردن روشهای MFA موجود ودر حال ظهور برای مطالعات گیاه به دلیل پیچیدگی بیشتر شبکه های متابولیک گیاه و جهل ما از آنها در ژن، پروتئین و سطوح محفظه زیر سلولی با موانع قابل توجهی مواجه می شود تحقیقات ژنومی عملکردی و ساختاری، به آشکار کردن قابلیت سوخت و ساز گیاهان ادامه خواهد داد، اما توانایی برآورد شاربه صورت مطمئن و بادقت به اندازه گیری هایی نیاز خواهد داشت که قسمتهای خاص دارند. از آنجا که تکنیک ها رفتار تقسیم شده بهتری دارند ، مدل متابولیک نتیجه دقیق تر می شود و تلاش مهندسی متابولیک مستدل بهتری در گیاه و سایر سیستم های پیچیده دارد.