

# مدل سازی شبکه‌ی متابولیکی میکروارگانسیم سودوموناس آئروجینوزا

رضا قشلاقی\*<sup>+</sup>، زهرا حیدری، محمود اخوان مهدوی

مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی شیمی، صندوق پستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴

**چکیده:** در این مقاله یک شبکه‌ی متابولیکی، در بردارنده‌ی مسیرهای متابولیکی مرکزی سودوموناس آئروجینوزا در شرایط بی‌هوازی ارایه شده است. به منظور تأیید دقت مدل، پیش‌بینی‌های مدل با نتیجه‌های تجربی به دست آمده از کار دیگر پژوهشگران مقایسه شده است. برای دست‌یابی به این مهم، از برنامه ریزی خطی برای بهینه‌سازی معادله‌های حاکم بر سامانه استفاده شد. تابع هدف برای بررسی درستی مدل، نرخ ویژه رشد این میکروارگانسیم بوده است. طبق پیش‌بینی‌های مدل با این تابع هدف، مسیرهای انتردودورف و پنتوز فسفات برای فرساخت گلوکز فعال بودند. هم‌چنین چرخه‌ی تری‌کربوکسیلیک اسید به طور کامل انجام نمی‌شد. در صورتی که مقادارهای بهینه تولیدی کوفاکتورهای ATP و NADPH به عنوان تابع هدف در نظر گرفته شوند مسیر پنتوز فسفات و در صورتی که تولید بیشینه‌ی NADH مورد نظر باشد مسیر انتردودورف مسیر فعال می‌باشد. پیش‌بینی‌های مدل در مقایسه با اندازه‌گیری‌های آزمایشی دارای خطای نسبی کمتر از ۱۰ درصد بوده است. این میزان خطای کم، نشان‌دهنده‌ی قابل‌اعتماد بودن مدل بوده و امکان کاربرد آن را در پژوهش‌های آتی فراهم می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** شبکه‌ی متابولیکی، آنالیز شار متابولیکی، سودوموناس آئروجینوزا، بهینه‌سازی نرخ رشد ویژه.

**KEY WORDS:** Metabolic pathways, Metabolic flux analysis, Pseudomonas aeruginosa, Specific growth rate optimization.

## مقدمه

که به فراوانی در پساب‌ها یافت می‌شود و به دلیل مقاوم بودن در برابر گسترده‌ی گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها عامل بارز عفونت‌های سودوموناسی در انسان می‌باشد [۲]. سودوموناس آئروجینوزا در شرایط هوازی به خوبی رشد می‌کند اما در شرایط بی‌هوازی نیز در مجاورت نیترات‌ها که نقش پذیرنده‌ی الکترون را به عهده دارند قابلیت رشد دارد [۳، ۱]. علاوه بر همه جایی بودن این میکروارگانسیم (به ویژه در پساب) و قابلیت زنده ماندن در شرایط بی‌هوازی (که شرایط حاکم

سودوموناس با دارا بودن بیش از هشتاد گونه‌ی شناخته شده، یکی از بزرگترین خانواده‌ها در باکتری‌ها می‌باشد که جزء میکروارگانسیم‌های گرم منفی دسته‌بندی می‌شوند. گونه‌های سودوموناس نیاز غذایی بسیار ساده‌ای دارند و در شرایط آزمایشگاهی در محیط‌های حاوی مقداری ماده آلی در pH خنثی به خوبی رشد می‌کنند (به تقریب همه‌ی سودوموناس‌ها با نمک‌های آمونیم به همراه یک منبع کربن قادر به ادامه‌ی زندگی هستند) [۱]. یکی از گونه‌های سودوموناس، سودوموناس آئروجینوزا است

\*عهدہ دار مکاتبات

+E-mail: gheshlaghi@ferdowsi.um.ac.ir

به عنوان مثال *اوبرهاردت*<sup>(۲)</sup> در سال ۲۰۰۸ میلادی [۹] به بررسی شبکه‌ی متابولیسی این میکروارگانیسم در شرایط هوازی در مقیاس ژنوم پرداخت و در سال ۲۰۱۰ میلادی [۱۰] این شبکه را به منظور بررسی مسیرهایی که این میکروارگانیسم در عفونت‌هایی که در بیماران سیستیک فیبروزیس<sup>(۳)</sup> طی می‌کند، مدل‌سازی کرد. همچنین *پوچالکا*<sup>(۴)</sup> و *همکاران* [۱۱] در سال ۲۰۰۸ میلادی به بررسی و مدل‌سازی شبکه‌های متابولیسی گونه‌ی دیگری از *سودوموناس* به نام *سودوموناس پوتیدا*<sup>(۵)</sup> پرداختند. *ویرکس*<sup>(۶)</sup> و *همکاران* [۱۲] در سال ۲۰۰۹ میلادی از آنالیز شار متابولیسی به عنوان ابزاری برای بررسی اصلاح‌های ژنتیکی انجام شده در *سودوموناس پوتیدا* پرداختند. در سال ۲۰۱۰ میلادی نیز *جیانگ*<sup>(۷)</sup> [۱۳] از این روش تجزیه برای بررسی تولید پلیمر PHA<sup>(۸)</sup> و افزایش بازده آن استفاده کرد. همچنین *ونگ*<sup>(۹)</sup> و *همکاران* [۱۴] در سال ۲۰۱۲ میلادی از آنالیز شار متابولیسی برای پیش‌بینی رفتار *سودوموناس دنیتریفیکنز*<sup>(۱۰)</sup> در شرایط گوناگون استفاده کردند. هدف اصلی در این پژوهش، مدل‌سازی شبکه‌ی متابولیسی میکروارگانیسم *سودوموناس ائروجینوزا* در شرایط بی‌هوازی بوده است. برای دستیابی به این هدف، ابتدا با جمع‌آوری اطلاعات از مقاله‌ها و منابع در دسترس، شبکه‌ی متابولیسی مربوطه به دست آمد و سپس با استفاده از آنالیز شار متابولیسی مقدار بهینه‌ی رشد و شارهای مربوط به واکنش‌ها پیش‌بینی شد. از این مدل می‌توان در پژوهش‌های بعدی برای پیش‌بینی میزان الکترون انتقالی از این سلول و همچنین چگونگی بس‌فرآوری<sup>(۱۱)</sup> استفاده کرد، چرا که این بس‌فرآوری می‌تواند نقش به‌سزایی در بهبود عملکرد پیل‌های سوختی میکروبی داشته باشد.

## بخش تجربی

### شبکه متابولیسی

برای به دست آوردن شبکه‌ی متابولیسی لازم است تا ابتدا داده‌های مورد نیاز برای تعریف شبکه را از میان منابع موجود جمع‌آوری و سپس فهرستی از کلیه‌ی واکنش‌هایی که مواد

در پیل‌های سوختی میکروبی است)، این میکروارگانیسم می‌تواند به صورت ذاتی الکترونی را که در طی تجزیه‌ی خوراک تولید می‌کند به پذیرنده‌ی الکترون (یا آند پیل سوختی) انتقال دهد؛ پس می‌توان از *سودوموناس ائروجینوزا* به عنوان یکی از گزینه‌های دلخواه برای استفاده در پیل‌های سوختی میکروبی یاد کرد، پیل‌هایی که در آن میکروارگانیسم از تجزیه‌ی خوراک (که اغلب پساب است) ایجاد الکترون و تولید الکتروسیسته می‌کنند.

از اصلی‌ترین هدف‌های صنایع زیست فناوری، افزایش تولید فراورده‌ی دلخواه است که برای رسیدن به این منظور می‌توان از روش‌های متفاوتی همچون بهینه‌سازی فرایند زیست فناوری [۴]، بهینه‌سازی محیط کشت [۵]، و مدل‌سازی ریاضی [۶] استفاده کرد. با پیشرفت علم و فناوری می‌توان با ایجاد اصلاحاتی در میکروارگانیسم مثل افزایش یا کاهش سطح آنزیم‌ها، مسیرهایی که منجر به تولید فراورده‌های جانبی می‌شود را بست. اما مسئله‌ی مهم این است که در کدام آنزیم‌ها و به چه میزان تغییر ایجاد شود، چرا که انتخاب نامناسب تغییرها باعث دریافت پاسخ نامناسب و یا حتی معکوس می‌شود. برای غلبه بر این مشکل بایستی از روش‌های کمی، که قادر به شبیه‌سازی رفتار میکروارگانیسم هاست، استفاده نمود.

آنالیز شار متابولیسی<sup>(۱)</sup> اطلاعات مهمی همچون بهینه‌سازی بازده‌ی فراورده بر اساس خوراک، تشخیص نقطه‌های حساس در تولید بیشتر فراورده‌ی مورد نظر و شناسایی پارامترهای فعال و همچنین محاسبه‌ی شارهای اندازه‌گیری نشده را در اختیار قرار می‌دهد [۷]. این تجزیه بر اساس استوکیومتری شبکه و معادله‌های بقای جرم است و نیازی به اطلاعاتی در مورد سینتیک آنزیم‌ها ندارد و به‌طور عموم با نوشتن معادله‌های دیفرانسیلی ساده‌ی خطی به دست می‌آید. برتری بسیار مهم روش استوکیومتری تشکیل یک سری از واکنش‌های جبری در حالت پایا است که مسیر بهینه‌سازی خطی را هموار می‌کند [۸].

شبکه متابولیسی میکروارگانیسم *سودوموناس ائروجینوزا* در شرایط هوازی توسط تعدادی از پژوهشگران بررسی شده است.

(۱) Metabolic flux analysis

(۲) Oberhardt

(۳) Cystic fibrosis

(۴) Puchalka

(۵) *Pseudomonas putida*

(۶) Wierckx

(۷) Jiang

(۸) Poly 3-hydroxy alkanooates

(۹) Wang

(۱۰) *Pseudomonas denitrificans*

(۱۱) Over production

تولید می‌کند و برخلاف مسیر EMP فقط تعداد محدودی از میکروارگانیزم‌ها که گرم منفی هستند، به‌طور عموم از خانواده سودوموناس‌ها، از این مسیر استفاده می‌کنند [۲۵، ۲۴]. مسیر پنتوز فسفات و یا هگزوز یک فسفات<sup>(۸)</sup>، با تبدیل گلوکز ۶ فسفات به پنتوز فسفات‌ها، سرانجام به تولید فروکتوز ۶ فسفات و گلیسرآلدهید ۳ فسفات منجر می‌شود و انرژی کاهشی را برای واکنش‌های بیوسنتزی و مواد آلی فراهم می‌کند. نقش اصلی این مسیر تولید پیش‌سازها برای تولید زیست توده است [۲۶]. چرخه ی تری کربوکسیلیک اسید که با نام چرخه ی سیتریک اسید<sup>(۹)</sup> یا کربس<sup>(۱۰)</sup> نیز مشهور است، ترکیبی از واکنش‌های بیوشیمیایی است که ماده ی آلی تولید شده از گلایکولیز (پیروات) را به شکل فعال استات، که به استیل کوآنزیم - آ نیز معروف است، تبدیل می‌کند و بعد از آن وارد چرخه‌ای از واکنش‌ها می‌شود [۲۸، ۲۷] اما در شرایط بی‌هوازی کل این چرخه ی فعال نیست [۳۱ - ۲۹]. در شکل ۱ قسمت فعال این چرخه کشیده شده است. در شرایط بی‌هوازی میکروارگانیزم می‌تواند بعد از تبدیل پیروات به استیل کوآنزیم - آ، آلفاکتوگلوکوتارات را تولید کند و یا با تبدیل به آگزالواتات، ساکسینیت را تولید کند. هم چنین با مصرف ۱ مول NADH، پیروات می‌تواند به لاکتات تبدیل شود [۳۲]. شایان گفتن است که در شرایط بی‌هوازی مسیر گلی اکسیلات در این میکروارگانیزم فعال می‌باشد [۳۳].

#### موازنه ی مواد

برای نمایش ریاضی شبکه های متابولیسی به شکل ماتریس استوکیومتری، ماتریس S که شامل m سطر متناظر با تعداد متابولیت‌ها و n ستون متناظر با تعداد واکنش‌ها است در نظر گرفته می‌شود. درایه ی  $s_{ij}$  در این ماتریس ضریب استوکیومتری متابولیت  $i$ ام در واکنش  $j$ ام را نشان می‌دهد. ضریب استوکیومتری برای واکنش دهنده‌ها منفی و برای فرآورده‌ها مثبت است، اگر متابولیتی در واکنشی حضور نداشته باشد درایه ی متناظر آن صفر قرار داده می‌شود. اگر موازنه ی جرم دینامیکی پیرامون کلیه ی متابولیت‌های موجود در سامانه نوشته شود، معادله ی (۱) در شکل ماتریسی به‌دست می‌آید.

در آن‌ها حضور دارند، تهیه کرد. متأسفانه منبعی که تمام اطلاعات مربوط به مسیرهای بی‌هوازی فعال در سودوموناس اتروچینوزا را به صورت یکجا و طبقه بندی شده در اختیار قرار دهد، وجود ندارد. پس اولین قدم به دست آوردن واکنش‌های مربوطه و ساختن شبکه‌ی استوکیومتری با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی [۱۷ - ۱۵] و نشریه‌های مربوطه بوده است. در موردهایی که اطلاعات مورد نیاز وجود نداشته یا ناکافی بوده است، از اطلاعات مربوط به سویه‌های همانند و یا دارای ویژگی‌های نزدیک به سودوموناس اتروچینوزا استفاده شده است. شبکه‌ی واکنش‌های این میکروارگانیزم به صورت چکیده در ادامه آورده شده است. این شبکه شامل مسیرهای گلیکولیز<sup>(۱)</sup>، پنتوز فسفات<sup>(۲)</sup>، انتردودورف<sup>(۳)</sup> و چرخه‌ی تری کربوکسیلیک اسید<sup>(۴)</sup> و واکنش‌های مربوط به مسیر گلی اکسیلات<sup>(۵)</sup> می‌باشد. درستی توالی واکنش‌ها در طول مسیر بسیار مهم است زیرا که تمامی آنالیزها بر پایه‌ی آن‌هاست. مسیر متابولیسی پیش‌بینی شده شامل تعداد زیادی واکنش می‌باشد که کار با این تعداد، بسیار پیچیده و سخت است. برای حل این مشکل، با تعدادی فرضیه‌ها (مانند ترکیب واکنش‌های پشت‌سر هم و بدون انشعاب به‌عنوان یک واکنش کلی)، بدون لطمه زدن به اطلاعات اصلی، شبکه‌ی به دست آمده ساده سازی شده است.

شکل ۱ شمای کلی مسیرهای متابولیسی اصلی سودوموناس اتروچینوزا را نشان می‌دهد. واکنش‌ها در پیوست ۲ ارائه شده اند. مسیر گلایکولیز یا امبدن - میرهوف - پاراناس<sup>(۶)</sup>، مجموعه‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی است که در طی آن گلوکز به پیروات تبدیل می‌شود. در شرایط بی‌هوازی این مسیر در سودوموناس اتروچینوزا فعال می‌باشد [۱۷]. مسیر جانبی تجزیه‌ی گلوکز که در شرایط بی‌هوازی فعال است مسیر تبدیل گلوکز به گلوکز ۶ فسفات و سپس به گلوکونات ۶ فسفات می‌باشد، برخلاف رشد هوازی این تبدیل از روش گلوکونات انجام نمی‌گیرد [۲۰ - ۱۸]. مسیر انتردودورف به‌طور ویژه برای این میکروارگانیزم، به منظور تبدیل گلوکز و دیگر قندها استفاده می‌شود [۲۳ - ۲۱]. این مسیر برای اولین بار برای نشان دادن مسیر فعال در سودوموناس ساکاروفیلا<sup>(۷)</sup> استفاده شد. این مسیر به ازای هر مول گلوکز تنها یک مول ATP

(۱) Glycolysis

(۲) Pentose-phosphate (PP) shunt

(۳) Entner-Doudoroff pathway

(۴) Tricarboxylic acid cycle (TCA)

(۵) Glyoxylate

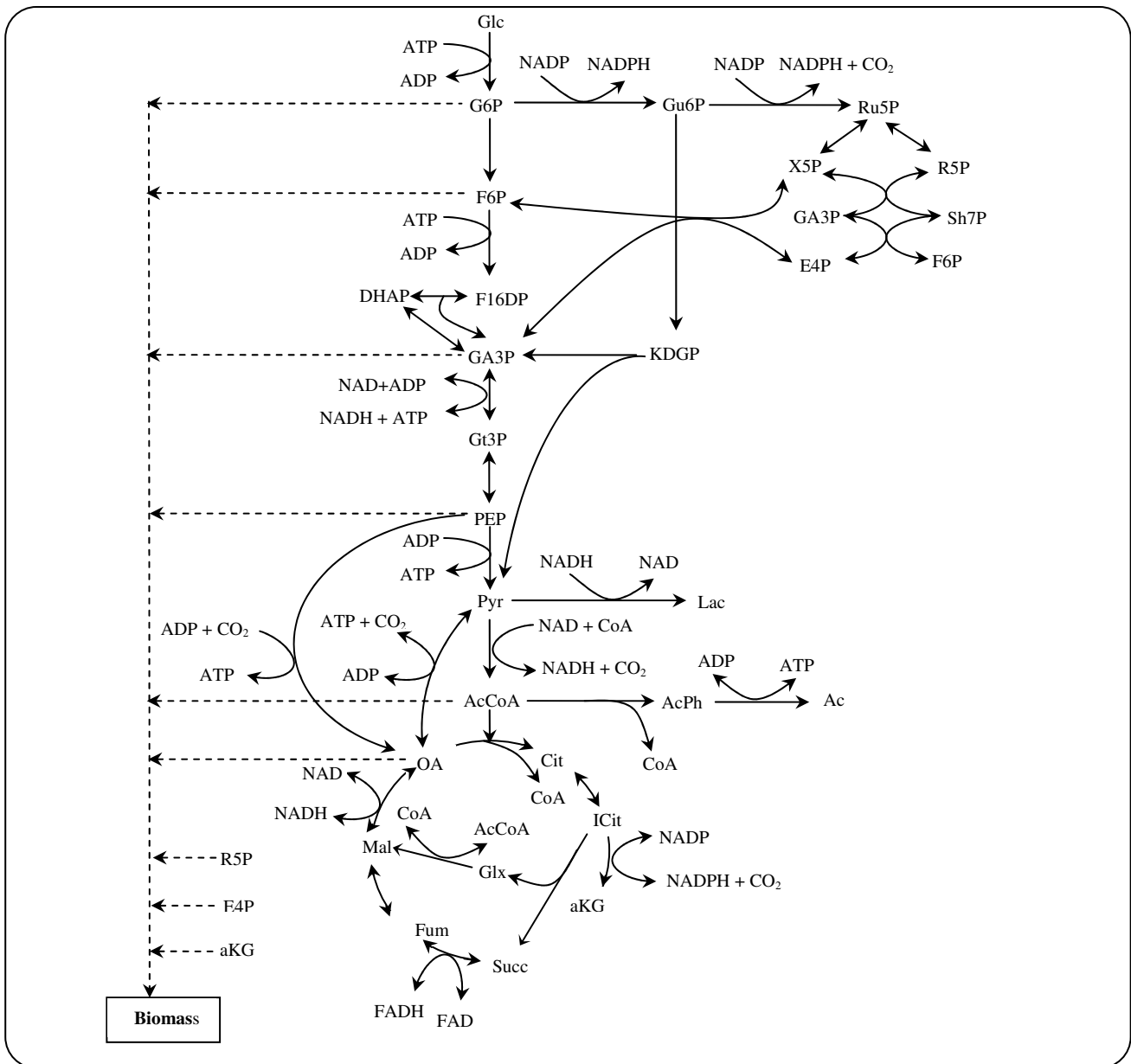
(۶) Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway

(۷) *Pseudomonas saccharophila*

(۸) Hexose MonoPhosphate (HMP) Pathway

(۹) Citric acid cycle

(۱۰) Krebs cycle



شکل ۱- شمای کلی مسیر متابولیسی سودوموناس ائروجینوزا در شرایط بی‌هوازی و گلوکز به عنوان خوراک. (در پیوست ۱ نام کامل متابولیت‌ها و در پیوست ۲ شکل کامل واکنش‌ها را می‌توان دید.)

از آن جا که بیشتر شارهای واکنش‌های موجود در این شبکه مجهول می‌باشند، درجه‌ی آزادی بالا بوده و سامانه معادله‌ها، یک سامانه نامعین<sup>(۱)</sup> خواهد بود و حل یگانه‌ای برای آن وجود ندارد. برای غلبه بر این مشکل می‌توان با اندازه‌گیری تعدادی از شارهای تبدیل، درجه‌ی آزادی سامانه را کم کرد و حل معادله‌های جبری را ساده تر نمود. بدین منظور بردار شارها

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot V \quad (۱)$$

که در این معادله X بردار غلظت کلیه ی متابولیت‌ها، S ماتریس استوکیومتری و V بردار فلاکس‌ها در شبکه‌ی متابولیسی است. با فرض حالت شبه پایا [۸]، خواهیم داشت:

$$S \cdot V = 0 \quad (۲)$$

(۱) Underdetermined

تغییر کنند. همچنین اگر از اطلاعات آزمایشی اطلاعاتی از مقدار شارهای درونی و یا شار انتقال موجود است، می‌توان این اطلاعات را نیز به عنوان محدودیت به سامانه به کار برد. بردارهای موجود در برنامه ریزی خطی به دلیل ماهیت الگوریتم سیمپلکس<sup>(۳)</sup>، بایستی همواره نامنفی باشند در نتیجه واکنش‌های رفت و برگشتی را بایستی به صورت دو واکنش جدا از هم در نظر گرفت، یکی در جهت رفت و دیگری در جهت برگشت [۸]. برنامه ریزی خطی در این پروژه با نرم افزار لیندو انجام شده است.

## نتیجه‌ها و بحث

### بررسی دقت مدل

با کاوش نشریه‌ها، براساس شواهد و مدارکی که از بررسی مقالات مرتبط به دست آمد، شبکه‌ی متابولیکی این میکروارگانیسم با فرض گلوکز به عنوان سبستریت اصلی، در شرایط بی‌هوازی رسم شده است. پس از رسم این شبکه، که به عنوان مدل اصلی این بحث به کار می‌رود، لازم است تا درستی آن با داده‌های آزمایشگاهی بررسی شود. مدل ریاضی این سامانه بر اساس موازنه‌ی متابولیکی مواد نوشته شده است و در تمامی موارد فرض شده است که شرایط پایدار بر سامانه حاکم می‌باشد. همانگونه که پیش تر گفته شد از آنجا که معادله‌های نوشته شده برای این مدل کمتر از تعداد مجهول‌ها (شارها) می‌باشد، تنها با بهینه کردن یک تابع هدف تعریف شده برای سامانه قابل حل خواهد بود. در این کار تابع هدف نرخ رشد ویژه و بیشینه کردن آن مورد نظر بوده است. جوابی که مدل ارائه می‌دهد علاوه بر بیشینه‌ی مقدار تابع هدف، مقدارهای مجهول شارها (شامل مصرف سبستریت و یا تولید فرآورده) نیز خواهد بود. این مقادیر، مقدارهای نظری‌ای هستند که برای رسیدن تابع هدف به مقدار بیشینه‌اش لازم می‌باشند. برای بیشینه کردن تولید زیست توده، مقدار مصرف گلوکز (و یا هر ماده‌ی دیگری که در بین مواد سامانه حضور دارد و به عنوان خوراک به سامانه وارد می‌شود) به عنوان قید (محدود کننده) به سامانه اعمال شده است.

در بین مقاله‌های چاپ شده در این زمینه، مقاله‌هایی که به بحث در مورد سودوموناس ائروجینوزا پرداخته‌اند - به ویژه در رشد بی‌هوازی

به سه دسته تقسیم می‌شوند: بردار شارهای درونی مجهول، بردار شارهای انتقال مجهول،  $V_k^E$  بردار شارهای انتقال معلوم. منظور از شارهای درونی و انتقال، نسبت به مرزی است که برای سامانه و واکنش‌ها انتخاب شده است. پس از آن ماتریس  $S$  به  $S_u^E$ ،  $S_k^E$  و  $S_u^I$  تقسیم می‌شود پس معادله‌ی (۲) را می‌توان این گونه نوشت:

$$S \cdot V = S_k^E V_k^E + V_u^E S_u^E + S_u^I V_u^I = 0 \quad (3)$$

$S_u^I$  یک ماتریس  $m \times n_u^I$ ،  $S_u^E$  یک ماتریس  $m \times n_u^E$  است که  $m$  تعداد متابولیت‌ها و  $n_u^E$  و  $n_u^I$  به ترتیب تعداد شارهای درون سلولی و انتقال مجهول هستند. برای ساده‌سازی  $S_k^E V_k^E$  با علامت منفی با بردار  $b$  که یک بردار  $m \times 1$  است جایگزین شده و به سمت راست معادله برده شده است. پس معادله‌ی زیر که اساس همه‌ی محاسبه‌ها است، به دست می‌آید:

$$V_u^E S_u^E + S_u^I V_u^I = b \quad (4)$$

### برنامه‌ریزی خطی

همان گونه که پیشتر گفته شد به دلیل بیشتر بودن تعداد شارهای مجهول ( $n_u$ ) از رنک<sup>(۱)</sup> ماتریس  $S_u$ ، سامانه معادله‌ها نامعین بوده و درجه‌ی نامعینی آن با افزایش پیچیدگی سامانه، به دلیل زیاد شدن واکنش‌ها، افزایش می‌یابد [۱۲]. برای حل این مشکل می‌توان از برنامه ریزی خطی و تعریف یک تابع هدف<sup>(۲)</sup> مناسب استفاده کرد. هدف از برنامه ریزی، بیشینه یا کمینه کردن این تابع هدف خواهد بود. برنامه ریزی خطی به صورت زیر تنظیم می‌شود [۳۴]:

$$\begin{aligned} Z &= \sum \omega_j v_j && \text{تابع هدف} \\ S_u^I V_u^I + V_u^E S_u^E &= b && \text{محدودیت‌ها} \end{aligned} \quad (5)$$

تابع تعریف شده‌ی  $Z$  تابع هدف مسئله است و عنصر وزنی  $\omega_j$  مشخص کننده‌ی اهمیت شارهای متناظر  $v_j$  در تابع هدف است. اصلی‌ترین دسته‌ی بیان‌کننده‌ی محدودیت، معادله‌ی موازنه شارها یا همان معادله‌ی (۴) می‌باشد. البته می‌توان به عنوان محدودیت برای هر یک از شارها یک حد بالا و یک حد پایین تعریف کرد تا مقدارهای به دست آمده فقط در این بازه بتوانند

(۱) Rank

(۲) Objective function

(۳) Simplex algorithm

جدول ۱- مقایسه ی نرخ رشد مخصوص مدل با داده های آزمایشگاهی.

داده های آزمایشگاهی		محاسبه شده		% خطا
منبع	خوراک مصرفی ( $\text{mmol (h.g}_{\text{DW}})^{-1}$ )	نرخ رشد مخصوص ( $\text{h}^{-1}$ )	نرخ رشد مخصوص ( $\text{h}^{-1}$ )	
[۱۸]	۳٫۸۰	۰٫۱۹	۰٫۱۸	۵
[۲۲]	۲٫۶۰	۰٫۲۰	۰٫۱۸	۱۰

همان مقدار در نظر گرفته می‌شود. با دادن این مقدار گلوتامات به عنوان داده‌ی ورودی به برنامه می‌توان نرخ رشد ویژه را به‌عنوان خروجی به دست آورد. در جدول ۱ می‌توان نتیجه‌ها را دید. در این مقاله نرخ رشد بر حسب  $\text{h}^{-1}$  برای خوراکی‌های گوناگون داده شده است که این میزان برای گلوتامات معادل ۰٫۲ می‌باشد. درصد خطا را در هر دو شرایط می‌توان دید. روشن است که مقدار پیش بینی شده توسط مدل بسیار به مقدار واقعی نزدیک می‌باشد و این توانایی مدل را در محاسبه‌ی مقدارهای با تقریب بسیار نزدیک با واقعیت، بیان می‌دارد.

هرچند میزان خطای دیده شده بسیار کم است، اما در حالت کلی خطای موجود می‌تواند ناشی از دو علت باشد: اول اینکه پژوهش‌های آزمایشگاهی همواره با مقداری خطا، ولو کم، همراه است که می‌تواند از شخص آزمایش کننده و یا دستگاه منشا گرفته باشد. دوم اینکه در این مدل به دلیل نبود ترکیب زیست توده سودوموناس / ائروجینوزا، از فرمول تشکیل زیست توده میکروارگانیسم / اثرشیاکلی [۳۶، ۳۵] استفاده شده است. شایان گفتن است که در موارد همانند دیگر نیز این تقریب به کار برده شده است [۳۷، ۱۰، ۹]. با وجود این فرضیه‌ها، با توجه به نتیجه‌ها و پایین بودن درصد خطا در جدول ۱، قابل اعتماد بودن این مدل را می‌توان اثبات کرد. هم چنین باید در نظر گرفت که در مقاله‌هایی که از داده‌های آن‌ها به عنوان ورودی برنامه استفاده شد، شرایط آزمایشی بسیار متفاوت بوده است، اما با توجه به هم پوشانی خوبی که مدل با نتیجه‌های آزمایشی دارد، می‌توان گفت که این مدل قابلیت انعطاف بسیار خوبی داشته است. با تأیید مدل توسط داده‌های آزمایشگاهی، می‌توان نسبت به توزیع شارها درون شبکه نیز اطمینان داشت، چرا که زیست توده از قسمت‌های گوناگون شبکه گرفته شده است و شارها بایستی طوری تنظیم شده باشند تا مقدار زیست توده بیشینه شود.

شکل ۲ توزیع شارها را (به صورت چکیده) برای بیشینه کردن

که شرایط حاکم بر مدل ارایه شده است- بسیار محدود می‌باشد. اما در بین آن‌ها می‌توان به مقاله‌ی هانت<sup>(۱)</sup> و همکاران [۱۸] اشاره کرد که در سال ۱۹۸۳ میلادی به بررسی مسیرهای گوناگون کاتابولیسم گلوکز در سودوموناس / ائروجینوزا در رشد هوازی و بی‌هوازی پرداختند. در این آزمایش از سویه‌ی PA01 سودوموناس / ائروجینوزا استفاده شد که در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  روی محیط کشت مایع همراه با نمک های ضروری همراه با ۲۰٪ مخمر و  $\text{KNO}_3$  به‌عنوان پذیرنده‌ی الکترون در شرایط بی‌هوازی، و گلوکز به‌عنوان سبستریت، رشد داده شد. مقدار رشد میکروارگانیسم بر اساس زمان در شکل ۲ و مقدار مصرف گلوکز بر اساس زمان در شکل ۴ این مقاله رسم شده است. با استفاده از این نمودارها، اطلاعات مورد نظر استخراج شد که بر اساس آن مقدار گلوکز مصرف شده در زمان مشخص و نرخ رشد ویژه<sup>(۲)</sup> (مربوط به زیست توده) در همان زمان به دست آمد. سپس این مقدار گلوکز مصرفی به عنوان داده‌ی ورودی به برنامه داده شد و برای بررسی درستی این مدل، نرخ رشد ویژه به عنوان خروجی از برنامه خواسته شد. برای بیان سرعت واکنش‌ها، زیست توده (جرم خشک<sup>(۳)</sup>) به عنوان پارامتر مینا برای توصیف سرعت ویژه در نظر گرفته شد، بنابراین واحد سرعت دیگر واکنش‌ها  $\text{mmol (h.g}_{\text{DW}})^{-1}$  می‌باشد. نتیجه‌ها در جدول ۱ قابل دیدن است.

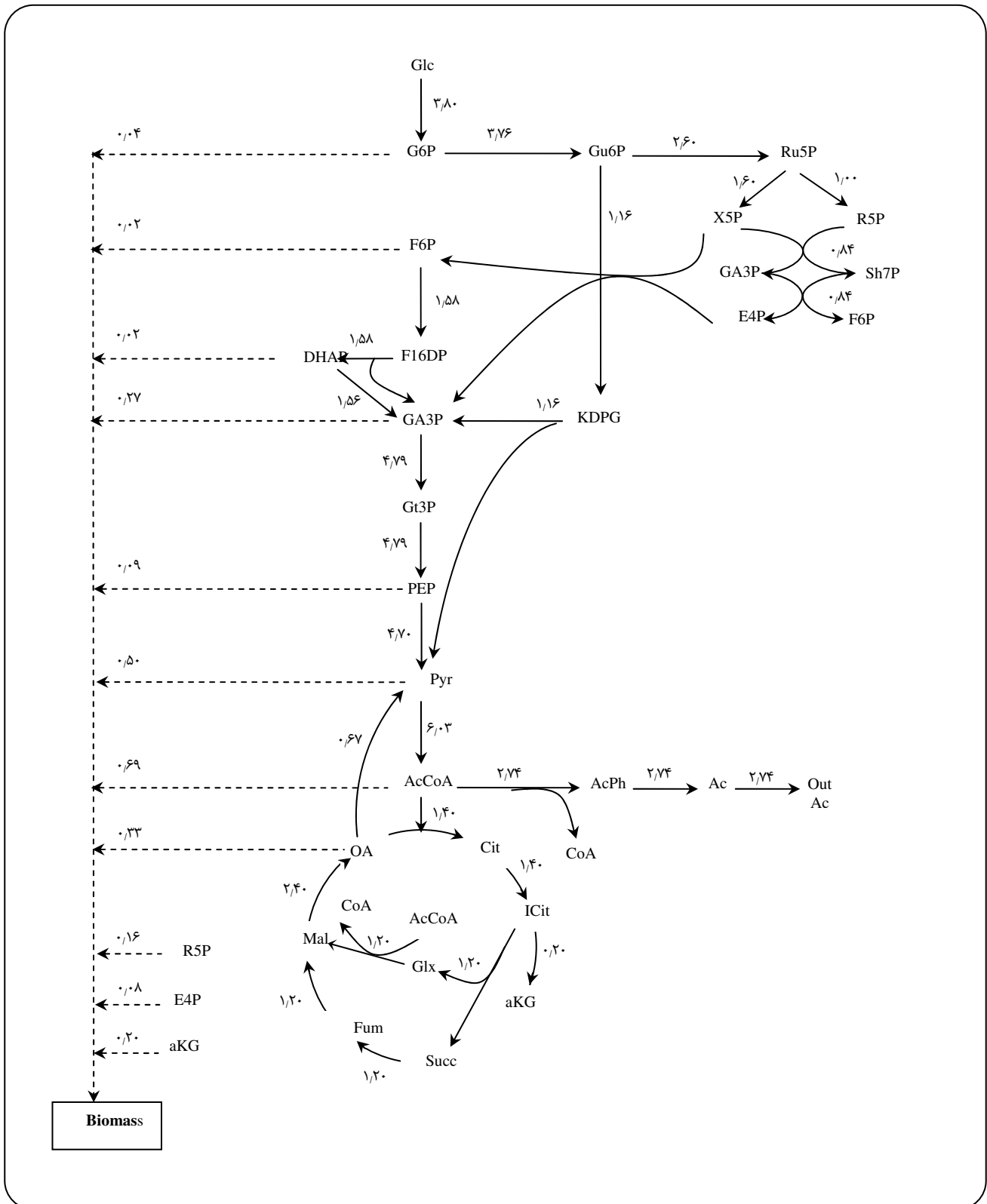
هم چنین کوئیک<sup>(۴)</sup> و همکاران [۲۲]، به بررسی رشد هوازی و بی‌هوازی این میکروارگانیسم در دو شرایط نیمه پیوسته و راکتور کموستات پرداختند. این آزمایش‌ها در pH خنثی (۷) انجام گرفت که حالت بهینه برای رشد سودوموناس / ائروجینوزا می‌باشد. در شکل ۲ این مقاله میزان رشد باکتری بر حسب زمان نشان داده شده است. نمودار در شکل ۳ این مقاله نشان دهنده‌ی آن است که اضافه کردن گلوتامات تنها تا  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  در شرایط بی‌هوازی باعث رشد بیشتر شده و افزودن بیشتر آن سودمند نخواهد بود، بنابراین مقدار گلوتامات مورد استفاده

(۱) Hunt

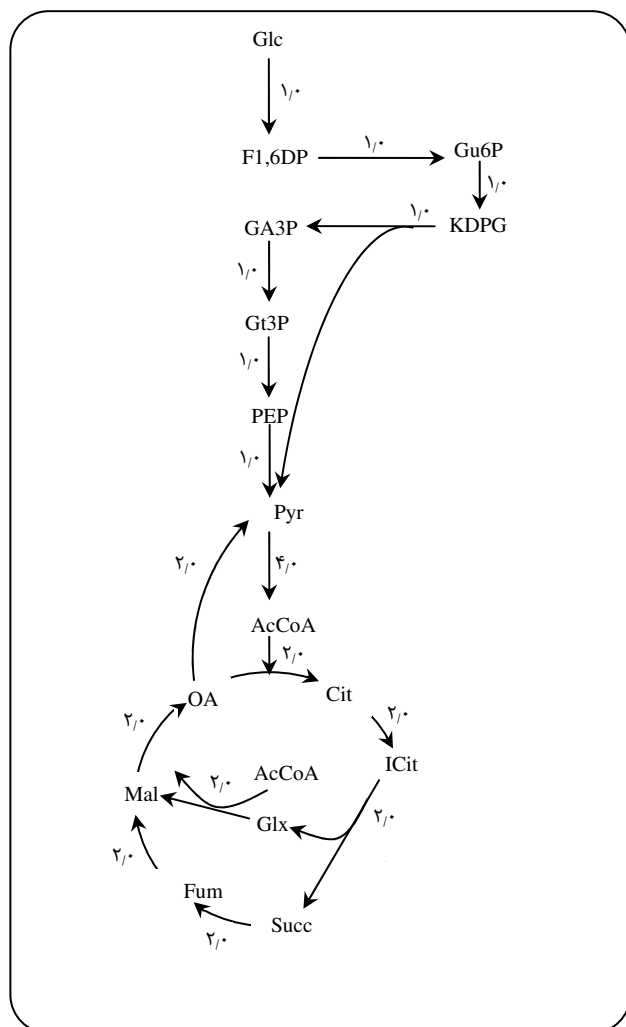
(۲) Specific growth rate ( $\mu$ )

(۳) Dry weight

(۴) Koike



شکل ۲- شمای کلی از مسیرهای پیشنهادی برای سودوموناس اتروجینوزا با خوراک گلوکز (در پیوست ۱ علایم به کار رفته را می توان دید)، ورودی  $3.8 \text{ mmol (h.gDW)}^{-1}$  می باشد.



شکل ۳- توزیع شار برای بیشینه تولید NADH. بیشترین مقدار تولید NADH،  $1^{-1} \text{ mol}(\text{mol.glc})^{-1}$  ۹ در شرایط بی هوازی می باشد.

وجود دارند که در تولید کوفاکتور ویژه‌ای اصلاً استفاده نشده‌اند. پس از به دست آوردن این توزیع شارها، یک دید کلی نسبت به توزیع مواد داخل شبکه به وجود می آید که منجر به تصمیم‌گیری روی فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. به بیان دیگر باید تصمیم گرفت فعالیت کدام آنزیم‌ها تغییر یابند تا مسیری که تولید ماده مورد نظر را بیشینه می‌کند طی شود یا مسیری که در آن تولیدی از آن ماده وجود ندارد طی نشود. شکل ۳ به صورت چکیده چگونگی توزیع مواد، در هنگام بهینه‌سازی بیشینه تولید NADH را نشان می‌دهد. در واقع شکل ۳ بیان کننده‌ی بیشترین توانایی شبکه‌ی متابولیکی سودوموناس *اُروجنیوزا* برای تولید انرژی لازم برای فسفریلاسیون و در مراحل بعد برای انتقال الکترون است.

(۱) Spangler

میزان تولید زیست توده، تحت شرایط بی هوازی و با ورودی خوراک گلوکز به مقدار  $3/8 \text{ mmol (h.gDW)}^{-1}$  (به عنوان محدودیت اعمال شده به سامانه) نشان می‌دهد. همان‌گونه که از پیش انتظار می‌رفت در شکل ۲ دیده می‌شود به تقریب همه‌ی گلوکزی که به عنوان خوراک به سامانه داده می‌شود به سمت مسیرهای انتزردودورف و پتوز فسفات هدایت می‌شود (حدود ۹۹۶٪ از خوراک) زیرا این مسیرها اصلی‌ترین مسیر در متابولیسم سودوموناس *اُروجنیوزا* ها می‌باشد [۲۳ - ۲۱] و هم‌چنین در طی این مسیر NADPH که جزء نیازهای رشد است، نیز تولید می‌شود. پیش‌تر گفته شد که در طی رشد بی هوازی چرخه‌ی تری کربوکسیلیک اسید کامل انجام نمی‌شود، اسپانگلر<sup>(۱)</sup> و همکاران [۲۸] نیز تاکید داشته‌اند در شرایط بی هوازی نرخ عبور کربن از چرخه‌ی تری کربوکسیلیک اسید کمتر از شرایط هوازی است و این چرخه به طور کامل طی نمی‌شود، مطابق با نتیجه‌های مدل، هنگام بیشینه‌سازی زیست توده واکنش آلفاکتوگلوئارات به سوکسینات صورت نمی‌گیرد، اما واکنش‌ها از یک طرف تا تولید آلفاکتوگلوئارات و از روش مسیر گلی اکسلات تا تولید مالات و اگزالوئات پیش می‌رود.

هم‌چنین اسپانگلر و همکاران در ادامه‌ی گزارش‌های خود بیان می‌کنند که واکنش‌های گلی اکسلات در شرایط بی هوازی و هوازی فعال بوده و از نظر نرخ کربن عبوری تفاوت چندانی ندارند. نکته‌ی قابل توجه دیگری که وجود دارد این است که بر اساس بررسی‌ها در رشد بی‌هوازی، استات به مقدار قابل توجهی تولید می‌شود [۲۱] در خروجی این برنامه نیز همان‌گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود حدود  $2/74 \text{ mmol (h.gDW)}^{-1}$  استات تولید شده است.

### پیش‌بینی تولید کوفاکتورها

با تأیید شدن این شبکه توسط داده‌های آزمایشی می‌توان به پیش‌بینی شار مواد در شرایط گوناگون پرداخت. یکی از این شرایط پیش‌بینی چگونگی مسیر توزیع مواد در هنگام بیشینه‌سازی مواد موثر در رشد مانند کوفاکتورهای ATP، NADH و NADPH است. از برنامه‌ریزی خطی می‌توان به منظور پیدا کردن نقطه‌های حساس در تولید این مواد استفاده کرد. بدین منظور بایستی با قرار دادن تابع هدف روی بیشینه کردن تولید کوفاکتورها، چگونگی توزیع شارها را داخل شبکه به دست آورد. همان‌گونه که در ادامه گفته خواهد شد در تولید هر یک از این کوفاکتورها مسیرهای ویژه‌ای طی شده است و هم‌چنین مسیرهایی



جدول ۲- بیشینه‌ی مقدار تولید کوفاکتورها با ورودی ۱ مول گلوکز به عنوان خوراک در شرایط بی‌هوازی

مواد	مقدار تولیدی بیشینه (مول)	درصد عبوری از مسیر پنتوز فسفات
NADH	۹,۰۰	۰,۱۰۰
ATP	۳,۳۳	۱۰۰
NADPH	۲,۸۳	۱۰۰

### بررسی یکی از عوامل ایجاد خطا

همان‌گونه که پیش‌تر گفته شد از آنجا که فرمول مربوط به تشکیل زیست توده برای میکروارگانیسم سودوموناس ائروجینوزا وجود ندارد از فرمول مربوطه برای میکروارگانیسم اشرشیاکلی در محاسبات استفاده شده است که ممکن است یکی از عامل‌های ایجاد خطا باشد. در این کار نیز مانند کارهای همانند دیگر فرض شده است موادی که منجر به تشکیل زیست توده سودوموناس ائروجینوزا می‌شوند همان موادی هستند که در فرمول تشکیل زیست توده اشرشیاکلی وجود دارند، اما به منظور محاسبه دقیق‌تر بایستی بررسی شود که در فرمول تشکیل زیست توده سودوموناس ائروجینوزا (اگر وجود داشت) اگر ضریب‌های موادی که در شکل گیری زیست توده نقش دارند متفاوت بود پاسخ به چه میزان تغییر می‌کرد، به طور مثال اگر هریک از ضریب‌ها ۱۰٪ با مقداری که اکنون در فرمول تشکیل زیست توده اشرشیاکلی وجود دارد، متفاوت بود پاسخ نهایی برنامه یا همان تابع هدف (که میزان تشکیل زیست توده می‌باشد) چقدر متفاوت می‌باشد؟ بدین منظور ابتدا ضریب هریک از مواد ۱۰٪ نسبت به مقدار اولیه خود در فرمول تشکیل زیست توده اشرشیاکلی تغییر داده شد و دیده شد که جز در مورد تغییر ضریب ATP، تغییر ۱۰ درصدی هریک از ضریب‌های مواد دیگر ایجاد تغییر ناچیزی (کمتر از ۰,۷٪) نموده است (جدول ۳). اما حساسیت تابع نسبت به ATP بیشتر بوده و پاسخ نهایی حدود ۶٪ تغییر کرده است می‌توان این حساسیت را این‌گونه تفسیر کرد که چون ATP از قسمت‌های گوناگون شبکه گرفته می‌شود و در تولید این ماده میکروارگانیسم تمامی مسیرهای موجود را طی می‌کند (همان‌گونه که در قسمت پیش بحث شد) پس تغییر ضریب آن تمامی مسیرها را دستخوش تغییر می‌کند. این مقدارهای انحراف از پاسخ قبلی نشان می‌دهد که تشکیل زیست توده در میکروارگانیسم سودوموناس ائروجینوزا به خوبی از فرمول تشکیل زیست توده اشرشیاکلی پیروی می‌کند و اگر حتی ضریب‌های موجود در آن ۱۰٪ با مقدارهایی که گزارش شده است متفاوت باشند باز هم همپوشانی قابل قبولی با نتیجه‌ها دارند.

پس چنین پیش‌بینی برای شارها، اهمیت بنیادی به منظور انتقال الکترون خواهد داشت. دیده شده است که میزان بهینه‌ی تولید NADH، ۹ مول به ازای ۱ مول گلوکز به عنوان خوراک ورودی می‌باشد. نکته‌ی قابل توجه این است این سلول در هنگام بیشینه سازی NADH از مسیر پنتوز فسفات عبور نمی‌کند، زیرا که مسیر پنتوز فسفات، برای تولید پنتوزها و NADPH به کار می‌رود و NADH در این مسیر تولید نمی‌شود. همان‌طور که پیش‌تر نیز ذکر شد مسیر انتردودورف مسیر اصلی تبدیل گلوکز در سودوموناس ائروجینوزا هاست و در شکل ۳ دیده می‌شود که گلوکز ورودی برای تبدیل مسیر انتردودورف را پیش می‌گیرد. مسیر گلی اکسیلات نیز به منظور ساختن مواد حد واسط برای چرخه‌ی کربس، در این بهینه سازی طی شده است. مقدارهای بیشینه‌ی تولید ATP و NADPH به صورت چکیده در جدول ۲ آمده است. بیشینه‌ی تولید ATP، ۳,۳۳ مول به ازای هر ۱ مول گلوکز ورودی است. و این به معنی آن است که سلول تمامی کربنی را که مصرف کرده است در مسیری هدایت می‌کند تا بتواند بیشترین انرژی را تولید کند. در این بهینه سازی تمامی گلوکز از مسیر پنتوز فسفات عبور کرده و تولید فروکتوز ۶ فسفات و گلیسر آلدهید ۳ فسفات می‌کند، سپس به طرف واکنش‌های کربس و مسیر گلی اکسیلات پیش می‌رود. اما در تولید NADPH، سلول تمامی خوراک را به سمت مسیر پنتوز فسفات می‌برد، مسیری که قادر به تولید NADPH است. مانند قبل، از این روش فروکتوز ۶ فسفات و گلیسر آلدهید ۳ فسفات تولید می‌شود و به سمت واکنش‌های چرخه‌ی کربس برای تولید NADPH، از روش شاخه تولید آلفاکتوگلوکوتارات می‌رود، شایان گفتن است که مسیر انتردودورف و گلی اکسیلات اصلاً طی نمی‌شود و مقدار ۰,۸۳ مول آلفاکتوگلوکوتارات از سامانه خارج می‌شود. به عنوان مقایسه بین این ۳ ماده در درصد عبوری از گلوکونات ۶ فسفات به عنوان درصد عبوری از مسیر پنتوز فسفات در نظر گرفته شده و نتیجه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۳- میزان زیست توده تولیدی و درصد خطای ایجاد شده با ۱۰٪ تغییر در هریک از ضریب‌های مواد حاضر در فرمول تشکیل زیست توده جداگانه، مقدار زیست توده بدون تغییر ضریب‌ها  $0.495 \text{ h}^{-1}$  می‌باشد.

ماده موجود در بایو مس	مقدار بایومس تولیدی با ۱۰٪ تغییر ضریب‌ها ( $\text{h}^{-1}$ )	درصد تغییر ایجاد شده
ATP	۰.۴۶۷	۵.۶۵۶
NADPH	۰.۴۹۵	۰.۱۰۰
G6P	۰.۴۹۵	۰.۱۰۰
F6P	۰.۴۹۵	۰.۱۰۰
R5P	۰.۴۹۳	۰.۴۰۰
E4P	۰.۴۹۴	۰.۲۰۰
DHAP	۰.۴۹۵	۰.۱۰۰
GA3P	۰.۴۹۲	۰.۶۰۰
PEP	۰.۴۹۵	۰.۱۰۰
Pyr	۰.۴۹۳	۰.۴۰۰
AcCoA	۰.۴۹۳	۰.۴۰۰
OA	۰.۴۹۳	۰.۴۰۰
aKG	۰.۴۹۳	۰.۴۰۰
NADH	۰.۴۹۵	۰.۱۰۰

## نتیجه‌گیری

طبیعی است که میکروارگانیسم *سودوموناس اتروچینوزا* در روبه‌رو شدن با شرایط بی‌هوازی مسیرهای گوناگونی را نسبت به شرایط هوازی طی می‌کند. مدل ارائه شده در این مقاله، مسیرهای متابولیکی اصلی طی شده توسط این میکروارگانیسم را در شرایط بی‌هوازی بیان می‌کند. البته خوراک ورودی به مدل می‌تواند مواد دیگری مانند لاکتات، استات، آلفاکتوگلوکوتارات و یا هر ماده‌ی میانی دیگری که در این مدل وجود دارد باشد. با توجه به شواهدی که مبنی بر درستی شبکه‌ی ارائه شده وجود دارد می‌توان به مقدار زیادی نسبت به درستی این شبکه اطمینان داشت. هدف بعدی استفاده از این شبکه، به منظور پیشینه کردن میزان الکترون‌های انتقالی توسط این میکروارگانیسم، به منظور استفاده در پیل‌های سوختی میکروبی و بالا بردن بازدهی این پیل‌ها می‌باشد. هم‌چنین این شبکه دید خوبی را در مورد شار تولید موادی که در شبکه‌ی انتقال الکترون نقش مثبتی دارند (مانند NADH و  $\text{FADH}_2$ ) به ما می‌دهد.

## قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله قدردانی خود را از شورای پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد برای حمایت از این پروژه توسط طرح شماره‌ی ۱۳۱۹۴ تاریخ ۱۳۸۸/۱۲/۱۲ اعلام می‌دارند.

## پیوست‌ها

### پیوست ۱: علائم اختصاری به کار رفته برای واکنش دهنده‌ها

Ac	Acetate
AcCoA	Acetyl Coenzyme A
AcPh	Acetyl phosphate
$\alpha$ KG	$\alpha$ -Ketoglutarate
ATP	Adenosine-5-triphosphate
Cit	Citrate
$\text{CO}_2$	Carbon dioxide
DHAP	Dihydroxy acetone phosphate
E4P	Erythrose-4-phosphate
F1,6DP	Fructose-1, 6-diphosphate
F6P	Fructose-6-phosphate
FAD	Flavine adenine dinucleotide (oxidized)

R1.8	$G1,3DP + ADP \rightleftharpoons Gt3P + ATP$
R1.9	$Gt3P \rightleftharpoons Gt2P$
R1.10	$Gt2P \rightleftharpoons PEP + H_2O$
R1.11	$PEP + ADP \Rightarrow Pyr + ATP$
R1.12	$Pyr + NADH \Rightarrow Lac + NAD$
Pentose Phosphate Pathway	
R2.1	$G6P + NADP + H_2O \Rightarrow Gu6P + NADPH + H$
R2.2	$Gu6P + NADP \Rightarrow Ru5P + NADPH + H + CO_2$
R2.3	$Ru5P \rightleftharpoons R5P$
R2.4	$Ru5P \rightleftharpoons X5P$
R2.5	$R5P + X5P \rightleftharpoons GA3P + Sh7P$
R2.6	$GA3P + Sh7P \rightleftharpoons E4P + F6P$
R2.7	$E4P + X5P \rightleftharpoons GA3P + F6P$
Tricarboxylic Cycle Pathway and Glyoxylate Shunt	
R3.1	$Pyr + CoA + NAD \Rightarrow AcCoA + NADH + H + CO_2$
R3.2	$AcCoA + P \Rightarrow AcPh + CoA$
R3.3	$AcPh + ADP \Rightarrow Ac + ATP$
R3.4	$AcCoA + OA + H_2O \Rightarrow Cit + CoA$
R3.5	$Cit \rightleftharpoons ICit$
R3.6	$ICit + NADP \Rightarrow \alpha KG + NADPH + H + CO_2$
R3.7	$Succ + FAD \rightleftharpoons Fum + FADH_2$
R3.8	$Fum + H_2O \rightleftharpoons Mal$
R3.9	$Mal + NAD \rightleftharpoons OA + NADH + H$
Entner-Doudoroff Pathway	
R4.1	$G6P + NADP + H_2O \Rightarrow Gu6P + NADPH + H$
R4.2	$Gu6P \Rightarrow KDPG + H_2O$
R4.3	$KDPG \Rightarrow Pyr + GA3P$
Anaplerotic reactions	
R5.1	$OA + ADP + P \rightleftharpoons Pyr + ATP + CO_2 + H_2O$
R5.2	$OA + ATP \Rightarrow PEP + ADP + CO_2$
R5.3	$ICit \Rightarrow Glx + Succ$
R5.4	$Glx + AcCoA \Rightarrow Mal + CoA$
Biomass Formation	
$41.3 ATP + 3.5 NAD + 18.2 NADPH + 0.2G6P + 0.1 F6P + 0.9 R5P + 0.4 E4P + 0.1 DHAP + 1.5 GA3P + 0.5 PEP + 2.8 PYR + 3.7 ACCOA + 1.8 OA + 1.1 AKG \Rightarrow 41.3 ADP + 41.3 PI + 3.5 NADH + 18.2 NADP + 3.7 COA + BIOMASS$	

FADH <sub>2</sub>	Flavine adenine dinucleotide (reduced)
Fum	Fumarate
G6P	Glucose-6-phosphate
GA3P	Glyceraldehyde-3-phosphate
Glc	Glucose
Glx	Glyoxylate
Gu6P	Gluconate-6-phosphate
Glu	Glutamate
H	Proton
H <sub>2</sub> O	Water
ICit	Isocitrate
KDPG	2Keto3deoxy-6PhosphoGluconate
Lac	Lactate
Mal	Malate
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
NH <sub>3</sub>	Ammonia
O <sub>2</sub>	Oxygen
OA	Oxaloacetate
P	Inorganic Orthophosphate
PEP	Phosphoenolpyruvate
Pyr	Pyruvate
R5P	Ribose- 5- phosphate
Ru5P	Ribulose-5-phosphate
SH7P	Sedoheptulose-7-phosphate
Succ	Succinate
SuccCoA	Succinyl Coenzyme A
X5P	Xylulose-5-phosphate

#### پیوست ۲: واکنش‌های انجام شده

Glycolysis	
R1.1	$Glc + ATP \Rightarrow G6P + ADP$
R1.2	$G_6P \rightleftharpoons F_6P$
R1.3	$F_6P + ATP \Rightarrow F1,6DP + ADP$
R1.4	$F1,6DP_c + H_2O_c \Rightarrow F6P_c + P_c$
R1.5	$F1,6DP \rightleftharpoons DHAP + GA3P$
R1.6	$DHAP \rightleftharpoons GA3P$
R1.7	$GA3P + NAD + P \rightleftharpoons G1,3DP + NADH + H$

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۳

## مراجع

- [1] Topley W.W.C., Wilson S.G.S., "Microbiology and Microbial Infections", 9th ed., **2**, Hodder Arnold, UK (1998).
- [2] Boroumand, M.A., Esfahanifard P., Saadat S., Shekhvatan M., Hekmatyazdi, Saremi M., A Report of Pseudomonas Aeruginosa Antibiotic Resistance from a Multicenter Study in Iran. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **25**(4), p. 435 (2007).
- [3] Ochsner, U.A., Snyder A., Vasil A.I., Vasil M.L., Effects of the Twin-Arginine Translocase on Secretion of Virulence Factors, Stress Response, and Pathogenesis. *National Academy of Sciences*, **99**, p. 8312 (2002).
- [4] Gyamerah, M., Merichetti G., Adedayo O., Scharer J.M., M M.Y., Bioprocessing Strategies for Improving Hen Egg-White Lysozyme (HEWL) Production by Recombinant *Aspergillus Jiger* HEWL WT-13-16. *Applied Microbial Biotechnology*, **60**, p. 403 (2002).
- [5] Gheshlaghi R., Scharer J.M., Moo-Young M., Douglas P.L., Medium Optimization for Hen Egg White Lysozyme Production by Recombinant *Aspergillus Niger* Using Statistical Methods. *Biotechnology Bioengineering*, **90**, p. 754 (2005).
- [6] Alvarez-Vasquez F., C. Gonzalez-Alcon, Orres N.V., Metabolism of Citric Acid Production by *Aspergillus Niger*: Model Definition, Steady-State Analysis and Constrained Citric Acid Production Rate Optimization, *Biotechnol Bioengineering*, **70**, p. 82 (2000).
- [7] Nissen, T.L., Schulze U., Nielsen J., Villadsen J., Flux Distributions in Anaerobic, Glucose-Limited Continuous Cultures of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Journal of Microbiology*, **143**, p. 203 (1997).
- [8] Gheshlaghi R., Scharer J.M., Moo-Young M., Douglas P.L., Metabolic Flux Analysis for Optimizing the Specific Growth Rate of Recombinant *Aspergillus niger*, *Bioprocess Biosyst Engineering*, **30**, p. 398 (2007).
- [9] Oberhardt, M.A., Puchałka J., Fryer K.E., Genome-Scale Metabolic Network Analysis of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1, *Journal of Bacteriology*, **190**(8), p. 2790 (2008).
- [10] Oberhardt M.A., Goldberg J.M., Hogardt M., Papin J.A., Metabolic Network Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* During Chronic Cystic Fibrosis Lung Infection. *Journal of Bacteriology*, **192**(20), p. 5534 (2010).
- [11] Puchalka J., Oberhardt M.A., Godinho M., Bielecka A., Regenhardt D., Timmis K.N., Papin J.A., Santos V.A.P.M.D., Genome-Scale Reconstruction and Analysis of the *Pseudomonas Putida* KT2440 Metabolic Network Facilitates Applications in Biotechnology, *PLoS Computational Biology*, **4**(10), (2008).

- [12] Wierckx N., Ruijsenaars H.J., Winde J.H.D., Schmid A., Blank L.M., Metabolic Flux Analysis of a Phenol Producing Mutant of *Pseudomonas putida* S12: Verification and Complementation of Hypotheses Derived from Transcriptomics, *Journal of Bacteriology*, **143**(2), p. 124 (2009).
- [13] Jiang, X., "Process Development for the Production and Separation of Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas Putida* KT2440", Queen's University: Kingston, Ontario, Canada. page. 155 (2010).
- [14] Wang Z.-J., Wang P., Liu Y.-W., Zhang Y.-M., Chu J., Huang M.-Z., Metabolic Flux Analysis of the Central Carbon Metabolism of the Industrial Vitamin B12 Producing Strain *Pseudomonas Denitrificans* Using <sup>13</sup>C-Labeled Glucose, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **43**(2), p. 181 (2012).
- [15] <http://www.brenda.uni-koeln.de>.
- [16] <http://www.kegg.com>.
- [17] <http://www.pseudomonas.com>.
- [18] Hunt, J.C., Phibbs P.V., JR, Regulation of Alternate Peripheral Pathways of Glucose Catabolism During Aerobic and Anaerobic Growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, **154**, p. 793 (1983).
- [19] Castillo T.d., Ramos J.L., Rodri Guez-Herva J.J., Fuhrer T., Sauer U., Duque E., Convergent Peripheral Pathways Catalyze Initial Glucose Catabolism in *Pseudomonas Putida*: Genomic and Flux Analysis, *Journal of Bacteriology*, **189**, p. 5142 (2007).
- [20] Cuskey, S.M., Wolff J.A., Phibbs P.V., Cloning of Genes Specifying Carbohydrate Catabolism in *Pseudomonas Aeruginosa* and *Pseudomonas Putida*, *Journal of Bacteriology*, **162**(3), p. 865 (1985).
- [21] Chia, M., Nguyen T.B.V., Choi W.J., DO-stat Fed-batch Production of 2-keto-D-gluconic Acid from Cassava Using Immobilized *Pseudomonas Aeruginosa*, *Applied Microbial Biotechnology*, **78**, p. 759 (2008).
- [22] Koike, I., Hattori A., Growth Yield of a Denitrifying Bacterium, *Pseudomonas Denitrzpcans*, under Aerobic and Denitrifying Conditions. *Journal of General Microbiology*, **88**, p. 1 (1975).
- [23] Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker J., " Brock Biology of Microorganisms", 8th ed., **8**, Simon & Schuster Custom (1977).
- [24] Daddaoua A., Krell T., Alfonso C., Morel B., Ramos J.-L., Compartmentalized Glucose Metabolism in *Pseudomonas Putida* Is Controlled by the PtxS Repressor, *Journal of Bacteriology*, **192**, p. 4357 (2010).
- [25] Dawes, E.A., Holmas W.H., Metabolism of *Sarcina Lutea* 1. Carbohydrate Oxidation and Terminal Respiration, *Journal of Bacteriology*, **75**, p. 390 (1957).
- [26] Slekar, K.H., Kosman D.J., Culotta T.J.O.B.C.V.C., The Yeast Copper/Zinc Superoxide Dismutase and the Pentose Phosphate Pathway Play Overlapping Roles in Oxidative Stress Protection, *The Journal of Biological Chemistry*, **271**(46), p. 28831 (1996).

- [27] Hamel, R.D., Appanna V.D., Modulation of TCA Cycle Enzymes and Aluminum Stress in *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **87**, p.1 (2001).
- [28] Shuler, M.L., Kargi F., "Bioprocess Engineering, Basic Concepts", 2nd ed., Prantice Hall (2002).
- [29] Moat, A.G., Foster J.W., Spector M.P., "Microbial Physiology", 4th ed., John Wiley & Sons, USA (2002).
- [30] Morgan, P., Kelly D.J., Dow C.S., The Tricarboxylic Acid Cycle of Heterogeneous and Swarmer Cell Populations of *Rhodospirillum rubrum* Rm5, *Journal of General Microbiology*, **12**, p. 931 (1986).
- [31] Prohl C., Wackwitz B., Vlad D., Uden G., Functional Citric Acid Cycle in an arcA Mutant of *Escherichia coli* During Growth with Nitrate under Anoxic Conditions. *Arch Microbiol*, **170**, p. 1 (1998).
- [32] Schobert M., Tielen P., Contribution of Oxygen-Limiting Conditions to Persistent Infection of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Future Medicine*, **5**, p. 603 (2010).
- [33] Kretschmar U., Khodaverdi V., Jeoung J.-H., Risch H.G., Function and Transcriptional Regulation of the Isocitrate Lyase in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Arch Microbiol*, **190**, p. 151 (2008).
- [34] Ward P.P., Lo J.-Y., Duke M., May G.S., Headon D.R., Conneely O.M., Production of Biologically Active Recombinant Human Lactoferrin in *Aspergillus oryzae*, *Biotechnology*, **10**, p. 784 (1992).
- [35] Kim S., Seol E., Ohb Y.-K., Wangc G.Y., Park S., Hydrogen Production and Metabolic Flux Analysis of Metabolically Engineered *Escherichia Coli* Strains, *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, p. 7417 (2009).
- [36] Lee D.Y., Fanc L.T., Parkb S., Lee S.Y., Shafie S., Bertokd B., Friedler F., D.Vicente A., Complementary Identification of Multiple Flux Distributions and Multiple Metabolic Pathways, *Metabolic Engineering*, **7**, p. 182 (2005).
- [37] Nogales, J., Palsson B.Ø., Thiele I., A Genome-Scale Metabolic Reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a Cell Factory, *BMC Systems Biology*, **2**, p. 79 (2008).
- [38] Spangler, W.J. and C.M. Gilmour, Biochemistry of Nitrate Respiration in *Pseudomonas Stutzeri* I. Aerobic and Nitrate Respiration Routes of Carbohydrate Catabolism, *Journal of Bacteriology*, **91**(1), p. 245 (1966).