



Reconstruction and Modeling of Integrated Metabolic Network of a Cyanobacterium to Increase the Production of Biofuels

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mohammadi R.* *PhD*,
Zahiri J.¹ *PhD*,
Niroomand M.J.² *MSc*

How to cite this article

Mohammadi R, Zahiri J, Niroomand M J. Reconstruction and Modeling of Integrated Metabolic Network of a Cyanobacterium to Increase the Production of Biofuels. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(2):193-199.

*Bioscience & Biotechnology Department, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

¹Biophysics Department, Biological Science Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Computer Engineering Department, Electrical & Computer Engineering Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Malek Ashtar University of Technology, Shabanloo Street, Shahi Babaei Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 22974609
Fax: +98 (21) 22974605
rezamohammadi@ut.ac.ir

Article History

Received: August 11, 2016

Accepted: September 8, 2017

ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims The production of biofuels has been one of the promising efforts in biotechnology in the past decades. Unicellular cyanobacteria are widespread phototrophic microorganisms that can be suitable chassis for production of valuable organic materials like biofuels. The aim of this study was the reconstruction and modeling of integrated metabolic network of a cyanobacterium to increase the production of biofuels.

Materials & Methods In the present computational study, a software for integrating reconstructed metabolic networks was developed to optimize and increase their efficiency and was named as iMet. First, iMet was used to integrate the 3 pre-reconstructed metabolic networks of *Synechocystis* PCC6803. In the next step, the reconstructed network was modeled to produce 4 types of biofuels, including ethanol, propanol, butanol, and isobutanol.

Findings The new merged model had 808 reactions and 560 metabolites. The amount of flux or flow in the integrated model was calculated to be 0.0295 hours per hour. This showed a remarkable increase compared to the previous three models. The cells were divided once every 24 hours. The amount of flux of 4 types of alcohol and their maximum theoretical efficiency increased in the integrated model compared to the previous 3 models. The flux of ethanol production was greater in all models than flux of 3 other alcohols, and the ethanol production reactions were closer to the flow or the central flux of carbon.

Conclusion The analyses of flow equilibrium in the metabolic network coverage show an increase in the production of biofuels and a decrease in the number of blocked reactions in the new model, thereby the efficiency of the developed iMet software is proved.

Keywords Metabolic Network; Cyanobacteria; *Synechocystis* sp. PCC 6803; Algorithm

CITATION LINKS

[1] Land clearing and the biofuel carbon ... [2] Engineering cyanobacteria to generate high-value ... [3] Cyanobacterial biofuel ... [4] Engineering cyanobacteria for fuels and chemicals ... [5] Next generation biofuel engineering in ... [6] Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in ... [7] Cyanobacterial genomics for ecology ... [8] Cyanobacterial biofuels: New insights and strain design ... [9] Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism ... [10] Hydrogen production by ... [11] Ethanol synthesis by genetic engineering in ... [12] Characterization of an alcohol dehydrogenase from the Cyanobacterium ... [13] A computational analysis of stoichiometric constraints ... [14] Flux balance analysis of photoautotrophic ... [15] The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803: Systemic properties ... [16] Detailing the optimality of photosynthesis in cyanobacteria through ... [17] Critical assessment of genome-scale ... [18] Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship ... [19] Genome-scale modeling of ... [20] Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic ... [21] Reconstruction and verification of a genome-scale metabolic ... [22] Flux coupling and transcriptional regulation within the metabolic ... [23] Reconstruction and comparison of the metabolic potential of cyanobacteria ... [24] Optknock: A bilevel programming framework for ... [25] MetaMerge: Scaling up genome-scale metabolic reconstructions with ... [26] The SuBliMinaL Toolbox: Automating steps in the reconstruction ... [27] MIRAGE: A functional genomics-based approach ... [28] CASOP: A computational approach for strain ... [29] The systems biology markup language (SBML) ... [30] The systems biology markup ... [31] The ENZYME database ... [32] KEGG: Kyoto encyclopedia of genes ... [33] Ongoing and future developments at ... [34] Solve scientific information ... [35] ChEBI: A database and ontology for ... [36] Advances in record-linkage methodology as ... [37] The state of record linkage and current ... [38] What is flux balance ... [39] Quantitative prediction of cellular metabolism ... [40] A protocol for generating a high-quality ... [41] Succinate: Quinol oxidoreductases ... [42] BiGG Models: A platform ...

بازسازی و مدل سازی شبکه متابولیک تلفیقی از سیانوباکتر برای افزایش تولید سوخت زیستی

رضا محمدی* PhD

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

جواد ظهیری PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

محمد جواد نیرومند MSc

گروه مهندسی کامپیوتر، دانشکده برق و کامپیوتر، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: در چند دهه اخیر تولید سوخت های زیستی یکی از تلاش های امیدبخش در عرصه زیست فناوری بوده است. سیانوباکترهای تک سلولی، میکروارگانیسم های بسیار پراکنده و فتوتروفیکی هستند که قادرند به عنوان کارخانجات کوچک تولیدکننده سوخت های زیستی عمل کنند. هدف مطالعه حاضر بازسازی و مدل سازی شبکه متابولیکی تلفیقی از سیانوباکتر به منظور افزایش تولید سوخت زیستی بود.

مواد و روش ها: در مطالعه محاسباتی حاضر یک نرم افزار برای ادغام شبکه های متابولیکی بازسازی شده، به منظور بهینه سازی و افزایش کارایی آنها توسعه یافت و به اسم iMet نام گذاری شد. ابتدا از iMet برای ادغام سه شبکه متابولیکی از قبل بازسازی شده سینکوسیستیس PCC ۶۸۰۳ (Synechocystis PCC6803) استفاده شد. در مرحله بعد، شبکه بازسازی شده به دست آمده، برای تولید چهار نوع سوخت زیستی شامل اتانول، پروپانول، بوتانول و ایزوبوتانول مدل سازی شد.

یافته ها: مدل جدید ادغام شده ۸۰۸ واکنش و ۵۶۰ متابولیت داشت. مقدار فلاکس یا جریان آن در مدل ادغام شده، ۰/۰۲۹۵ بر ساعت محاسبه شد. این عدد نسبت به سه مدل قبلی افزایش قابل توجهی نشان داد. سلول ها تقریباً هر ۲۴ ساعت، یک بار تقسیم شدند. میزان فلاکس چهار نوع الکل و حداکثر بازده تنوری آنها در مدل ادغام شده نسبت به سه مدل قبلی افزایش نشان داد. فلاکس تولید اتانول در تمامی مدل ها از فلاکس سه الکل دیگر بزرگ تر و واکنش های تولید اتانول به جریان یا فلاکس مرکزی کربن از همه نزدیک تر بود.

نتیجه گیری: آنالیزهای تعادل جریان افزایش پوشش شبکه متابولیک، افزایش تولید سوخت های زیستی و کاهش تعداد واکنش های بلوکه شده را در مدل جدید نشان می دهد و از این طریق کارایی نرم افزار توسعه یافته iMet اثبات می شود.

کلیدواژه ها: شبکه متابولیک، سیانوباکتری، سینکوسیستیس PCC ۶۸۰۳، الگوریتم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۷

* نویسنده مسئول: rezamohammadi@ut.ac.ir

مقدمه

تولید سوخت های زیستی قابل مصرف در صنعت یک گام بسیار مهم به منظور پیدا کردن راه حل برای چالش های جهانی روزافزون زیست محیطی و انرژی در سال های گذشته بوده است [1]. همچنین زمان محدودی برای استفاده از سوخت های فسیلی به دلیل منابع رو به اتمام آنها وجود دارد [2]. برای غلبه بر این مشکلات و کاهش وابستگی به سوخت های فسیلی، نیاز به تولید سوخت ها و مواد شیمیایی صنعتی از منابع زیستی تجدیدپذیر بسیار احساس می شود [3, 4]. سوخت های زیستی متنوعی در دهه های گذشته از محصولات کشاورزی تولید شده اند، هر چند تحقیقات برای یافتن سوخت های مناسب تر و با بهره وری بالاتر ادامه دارد [5].

با استفاده از روش های کنونی، گستره زیادی از زمین های کشاورزی و حجم بالایی از آب تازه مورد نیاز است تا زیست توده (بیومس) اولیه برای تولید سوخت های زیستی جایگزین فراهم شود. این امر با نیاز روزافزون جامعه انسانی برای تولید مواد غذایی تداخل پیدا کرده است [6]. تبدیل انرژی از نور به سوخت مایع توسط فتوسنتز، به ویژه توسط میکروارگانیسم های فتوسنتزکننده مانند سیانوباکترها

می تواند منافع فراوانی در جهت حفظ زمین های کشاورزی و آب مصرفی همراه با بهره وری بالا داشته باشد [7, 8]. سیانوباکترها میکروارگانیسم های بسیار پراکنده ای هستند که قادرند در خلال فتوسنتز دی اکسید کربن هوا را گرفته و اکسیژن آزاد کنند، همچنین در بسیاری از چرخه های ژئوشیمیایی نقش دارند [9]. در این راستا از سیانوباکترها به منظور تولید انواع سوخت های زیستی مانند هیدروژن، اتانول و ایزوبوتانول استفاده شده، اگر چه بهره وری این فرایندها پایین بوده است [10-12].

برای بهره مندی کامل از انرژی خورشیدی برای تولید سوخت زیستی، به شناخت کامل و جامع تمامی واکنش های رخ داده در شبکه متابولیک نیاز است [13]. بازسازی و مدل سازی شبکه های متابولیک می توانند این فرایند را انجام دهند [14-16].

بازسازی شبکه های متابولیک یک فرایند بسیار سخت و زمان بر بوده که گاهی ممکن است از چند ماه تا چند سال طول بکشد [17]. در این میان روش های آنالیز و بازسازی براساس محدودیت (COBRA) که بر مبنای محدودیت های فیزیکی شیمیایی هستند توانسته پاسخگوی نیازهای محققین در این عرصه باشد [18]. در سال های اخیر چندین شبکه متابولیک از سیانوباکتر سینکوسیستیس PCC ۶۸۰۳ (Synechocystis PCC6803) بازسازی و برای مصارف گوناگون مدل سازی شده اند [8, 9, 15, 19-23]. فرایند بازسازی و مدل سازی شبکه های متابولیک یک فرایند رو به تکامل است، بنابراین هیچ کدام از شبکه های بازسازی شده تا به امروز کامل نبوده اند و هر یک کاستی هایی دارند. در این راستا محققین زیادی سعی کرده اند با توسعه نرم افزارهای گوناگون فرایند سخت و زمان بر بازسازی را آسان تر کنند [24-28].

مطالعه حاضر با هدف بازسازی و مدل سازی شبکه متابولیک تلفیقی از سیانوباکتر به منظور افزایش تولید سوخت زیستی انجام شد.

مواد و روش ها

در مطالعه محاسباتی حاضر یک نرم افزار با رابط کاربری آسان و بر پایه جاوا برای ادغام شبکه های متابولیک بازسازی شده، به منظور بهینه سازی و افزایش کارایی آنها توسعه یافت و به اسم iMet نام گذاری شد. در ابتدا از iMet برای ادغام سه شبکه متابولیک از قبل بازسازی شده سینکوسیستیس PCC ۶۸۰۳ استفاده شد. در مرحله بعد، شبکه بازسازی شده، برای تولید چهار نوع از سوخت زیستی شامل اتانول، پروپانول، بوتانول و ایزوبوتانول مدل سازی شد.

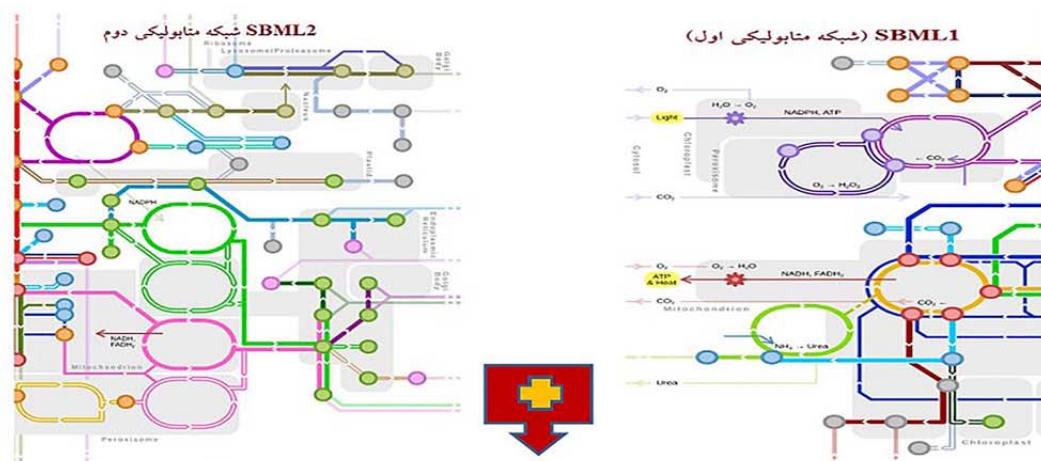
نرم افزار iMet طبق سه مرحله اصلی زیر عمل می کند. شکل ۱ شمای کلی الگوریتم نرم افزار را نشان می دهد.

استخراج اطلاعات: در اولین مرحله مدل های وارد شده در قالب فایل SBML (زبان نشانه گذاری زیست شناسی سیستم ها) [29, 30]، تجزیه و سپس اطلاعات متابولیت ها و واکنش ها استخراج شدند. برای هر متابولیت پنج معرف شامل موارد شناسه ژن (Gene ID)، E.C. Number [31]، KEGG ID [32]، شناسه پروتئین (protein ID) و Uniprot ID [33] در نظر گرفته شد. همچنین برای واکنش ها، معرف های دیگری مانند CAS Number [34] و ChEBI ID [35] مد نظر قرار گرفت.

محاسبه تشابه ها: در این مرحله براساس اطلاعات حاصل از مرحله قبل دو جدول مشابهت شامل جدول مشابهت متابولیت و جدول مشابهت واکنش، محاسبه شد. هر خانه از این دو جدول

بازسازی و مدل سازی شبکه متابولیک تلفیقی از سیانوباکتر برای افزایش تولید سوخت زیستی ۱۹۵ واکنش هایی در نظر گرفته شدند که بین دو شبکه متابولیک پل ارتباطی برقرار می کنند. با داشتن چنین واکنش هایی یک شبکه ادغام شده با پوشش بیشتر و با دقت بالا تولید شد (شکل ۱).

نشان دهنده امتیاز مشابهت هر جفت متابولیت یا واکنش است. **تولید شبکه بازسازی شده:** در مرحله نهایی با استفاده از جدول های مشابهت، واکنش های دارای امتیاز مشابهت بالا [36, 37] به عنوان



اعتبارسنجی و استخراج اطلاعات فایل های ورودی

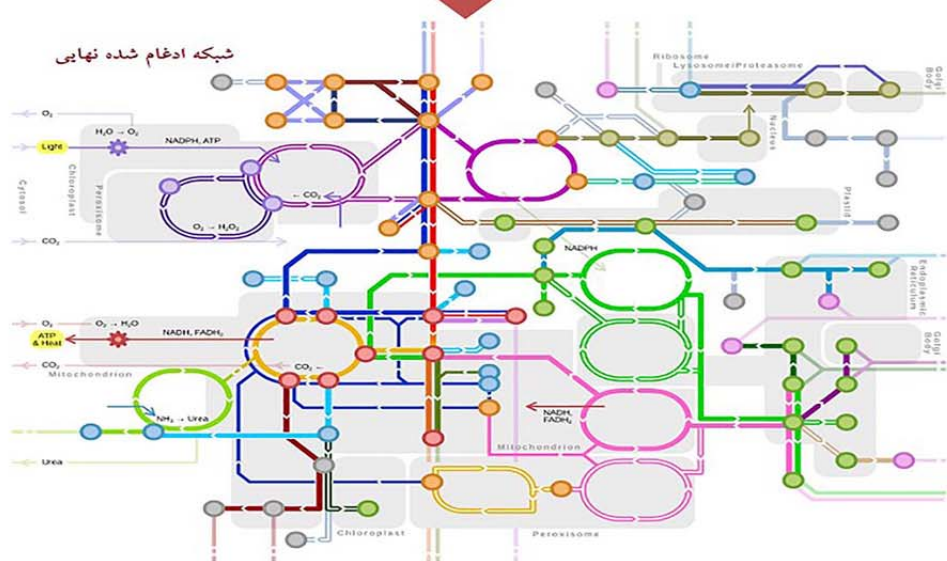
اصلاح فایل های ورودی به لحاظ واکنش ها، متابولیت ها، آنزیم ها، و ...

جمع آوری و تکمیل اطلاعات در مورد واکنش ها و متابولیت ها از پایگاه داده هایی نظیر KEGG

شناسایی واکنش ها و متابولیت های مشابه از طریق الگوریتم امتیازدهی

اصلاح واکنش ها و متابولیت های مشابه تشخیص داده شده به روش گرافیکی آسان

ساخت مدل ادغام شده



شکل ۱) شمای کلی از الگوریتم نرم افزار

شبکه‌های متابولیک سیانوباکترها: برای ارزیابی عملکرد نرم‌افزار، از سه شبکه متابولیک بازسازی شده سینکوسیتیس ۶۸۰۳ PCC در قالب فایل SBML استفاده شد [8, 9, 15]. تمامی اطلاعات این شبکه‌ها به صورت تجربی مورد آنالیز و تایید قرار گرفت (جدول ۱) [8, 9, 15].

در مرحله بعد این سه شبکه به کمک نرم‌افزار توسعه یافته iMet، ادغام شدند و نتیجه به صورت یک شبکه متابولیک بازسازی شده در قالب فایل SBML تولید شد.

جدول ۱) جزئیات پوشش شبکه متابولیکی سه شبکه یادشده

مطالعه	تعداد متابولیت‌ها	تعداد واکنش‌ها	سال انتشار
ناپ و همکاران [15]	۲۹۱	۳۸۰	۲۰۱۰
ناپ و همکاران [9]	۵۵۶	۷۵۹	۲۰۱۳
الدريج و همکاران [8]	۵۱۸	۶۰۰	۲۰۱۴

آنالیز تعادل جریان (FBA): آنالیز تعادل جریان یک روش بسیار پرکاربرد در زیست‌شناسی سامانه‌ها است که در سال‌های گذشته برای آنالیز شبکه‌های متابولیک بازسازی شده بسیار کاربرد داشته است. آنالیز تعادل جریان یک روش ریاضی برای شبیه‌سازی شبکه‌های متابولیک در مقیاس ژنوم است که بر پایه محدودیت‌های فیزیکیوشیمیایی و استوکیومتری عمل کرده و فنوتیپ‌های قابل محاسبه را برای پیدا کردن یک جواب بهینه محدود می‌سازد [38]. روش‌های COBRA روش‌هایی هستند که براساس رویکرد FBA طراحی شده‌اند. با همین نام جعبه ابزاری نیز وجود دارد که مختص نرم‌افزار MATLAB طراحی شده است [39]. تمامی آنالیزهای انجام شده در مطالعه حاضر به کمک همین جعبه ابزار COBRA و در محیط MATLAB 2014b صورت پذیرفت.

بعد از ادغام سه شبکه مذکور، چهار شبکه متابولیک در قالب SBML موجود بود. تمامی این چهار شبکه گرفته شدند و با اضافه کردن یک سری محدودیت‌ها و همچنین مسیرهای متابولیک تولید سوخت‌های زیستی، برای تولید چهار نوع الکل مدل‌سازی شدند. مسیر تولید اتانول از قبل در شبکه‌ها موجود بود و فقط برای آن واکنش‌های ترش‌ی اضافه شد. ولی برای سه نوع الکل دیگر، هم مسیرهای تولید و هم مسیرهای ترش‌ی اضافه شدند. منظور از واکنش‌های ترش‌ی، واکنش‌هایی هستند که متابولیت‌های تولید شده در سیتوپلاسم را به محیط خارج از سلول هدایت می‌کنند. برای مثال در پایین دو نمونه از محدودیت‌های اضافه شده ذکر شده است:

Model=changeRxnBounds (model,'R443', 18.7,'b');
Model=changeRxnBounds (model,'R147', 0.13,'b');

که در آنها R443 مربوط به جذب فوتون و مقدار آن ۱۸/۷ میلی‌مول بر گرم وزن خشک بر ساعت ($\text{mmol g}_{\text{DW}}^{-1}\text{h}^{-1}$) بود. همچنین R147 نیاز ATP سلول بوده که مقدار آن ۰/۱۳ میلی‌مول بر گرم وزن خشک بر ساعت است. در مرحله بعد با قراردادن بیومس و تک‌تک الکل‌ها به عنوان تابع هدف، فنوتیپ‌های مختلف سلولی شبیه‌سازی شدند.

با قراردادن بیومس به عنوان تابع هدف در آنالیز FBA مقدار فلاکس یا جریان آن در مدل ادغام شده به دست آمد. همچنین با استفاده از این عدد و با قراردادن آن در رابطه زیر، زمان تقسیم سلولی ۲۳/۵ ساعت محاسبه شد:

$$\text{زمان دوبرابرشدن} = \frac{\ln(2)}{\text{نرخ رشد}}$$

بازده تئوری: بازده تئوری یک واکنش، میزان محصولی است که اگر واکنش به سمت کامل شدن پیش رود، تولید می‌شود. این بازده براساس استوکیومتری واکنش و شرایط ایده‌آلی است که در آن مواد آغازگر به طور کامل مصرف شده، واکنش‌های نامطلوب جانبی و همچنین واکنش معکوسی نیز رخ ندهد. از آنجایی که در مدل‌های مطالعه حاضر، واکنش‌های اصلی مصرف دی‌اکسیدکربن و تولید سوخت زیستی بودند، برای محاسبه بازده تئوری، جرم هر الکل تولید شده به گرم بر جرم دی‌اکسیدکربن مصرف شده به گرم تقسیم شد.

یافته‌ها

مدل جدید ادغام شده توسط نرم‌افزار iMet، ۸۰۸ واکنش و ۵۶۰ متابولیت داشت که این امر افزایش پوشش شبکه در مدل جدید را نشان داد.

مقدار فلاکس یا جریان آن در مدل ادغام شده برابر ۰/۰۲۹۵ بر ساعت به دست آمد. این عدد نسبت به سه مدل قبلی افزایش قابل توجهی را نشان داد.

سلول‌ها تقریباً هر ۲۴ ساعت، یک‌بار تقسیم شدند.

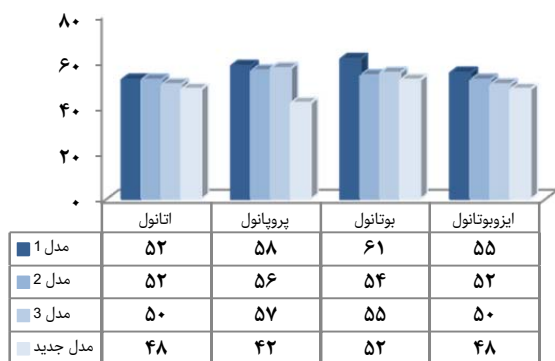
میزان فلاکس چهار نوع الکل و همچنین حداکثر بازده تئوری آنها در مدل ادغام شده نسبت به سه مدل قبلی افزایش نشان داد (جدول ۲). فلاکس تولید اتانول در تمامی مدل‌ها از فلاکس سه الکل دیگر بزرگ‌تر بود. واکنش‌های تولید اتانول به جریان یا فلاکس مرکزی کربن از همه نزدیک‌تر بود. به این مفهوم که رقابت کمتری برای استفاده از فلاکس کربن در تولید اتانول وجود داشت (جدول ۲).

تعداد واکنش‌های بلوکه شده در مسیرهای سنتز این چهار نوع الکل کاهش یافت (نمودار ۱).

جدول ۲) نتایج فلاکس‌های آنالیز FBA و حداکثر بازده تئوری برای چهار نوع از الکل‌ها

مدل‌ها	اتانول	پروپانول	بوتانول	ایزوبوتانول
فلاکس	فلاکس	فلاکس	فلاکس	فلاکس
بازده	بازده	بازده	بازده	بازده
تئوری	تئوری	تئوری	تئوری	تئوری
مدل ۱ [15]	۰/۴۶۶۲	۰/۳۰۷۴	۰/۱۲۴۳	۰/۱۲۶۲
مدل ۲ [9]	۰/۶۴۱۱	۰/۵۰۰۵	۰/۴۳۱۷	۰/۴۳۴۷
مدل ۳ [8]	۰/۶۵۲۴	۰/۵۲۰۸	۰/۴۲۸۵	۰/۴۲۹۲
مدل جدید تلفیقی	۰/۶۶۴۵	۰/۵۴۱۵	۰/۴۴۸۵	۰/۴۵۴۷

فلاکس: میلی‌مول بر گرم وزن خشک سلولی بر ساعت (mmol/gDW/h)
مدل جدید تلفیقی (مدل ادغام شده توسط نرم‌افزار مطالعه حاضر)



نمودار ۱) نتایج آنالیزهای pFBA برای تعداد واکنش‌های بلوکه شده برای مدل جدید به دست آمده در مقایسه با مدل‌های قبلی (مدل ۱) ناپ و همکاران [15]، مدل ۲) ناپ و همکاران [9]، مدل ۳) الدريج و همکاران [8]، مدل جدید) مدل ادغام شده توسط نرم‌افزار iMet

مطالعه حاضر با هدف بازسازی و مدل سازی شبکه متابولیک تلفیقی از سیانوباکتر به منظور افزایش تولید سوخت زیستی انجام شد.

از نتایج مطالعه حاضر می توان گفت مدل جدید ادغام شده توسط نرم افزار iMet، ۸۰۸ واکنش و ۵۶۰ متابولیت داشت که این امر افزایش پوشش شبکه در مدل جدید را نشان داد. یکی از اهداف اصلی در بازسازی شبکه های متابولیک، پوشش هر چه بیشتر شبکه ها به منظور مدل سازی دقیق تر و پیشگوییانه تر است که در مطالعه حاضر به آن دست یافته شد. بدیهی است که هدف نهایی بازسازی شبکه های متابولیک در نهایت، مدل سازی آنها برای تولید متابولیت های دلخواه است؛ بنابراین هر اندازه که پوشش شبکه های متابولیک هنگام بازسازی بیشتر و دقیق تر باشد، توان و پتانسیل مدل سازی افزایش و رسیدن به این هدف مهم آسان تر خواهد بود [17, 18, 25, 39, 40].

مقدار فلاکس یا جریان آن در مدل ادغام شده، عدد ۰/۰۲۹۵ بر ساعت محاسبه شد. این عدد نسبت به سه مدل قبلی افزایش معنی داری را نشان داد. سلول ها تقریباً هر ۲۴ ساعت یک بار تقسیم شدند. زمان مورد نیاز برای تقسیم سیانوباکتر سینکوسیتیس در طبیعت در شرایط فتوتروفیک حدود $12/5 \pm 12$ ساعت است [41]. بنابراین یافته مطالعه حاضر برای زمان تقسیم منطبق بر واقعیت است، زیرا فعالیت باکتری ۱۲ ساعت در شرایط نوری و ۱۲ ساعت در شرایط تاریکی است.

در مطالعه حاضر آنالیزهای FBA نشان دادند که میزان فلاکس چهار نوع الکل و حداکثر بازده تئوری آنها در مدل ادغام شده نسبت به سه مدل قبلی افزایش داشت. فلاکس تولید اتانول در تمامی مدل ها از فلاکس سه الکل دیگر بزرگ تر بود، ممکن است دلیل آن این باشد که مسیر سنتز اتانول بین این الکل ها از همه کوتاه تر است [11, 13]. همچنین در مطالعه حاضر واکنش های تولید اتانول به جریان یا فلاکس مرکزی کربن از همه نزدیک تر است، به این مفهوم که رقابت کمتری برای استفاده از فلاکس کربن در تولید اتانول وجود داشت.

نتایج آنالیزهای pFBA (parsimonious FBA) نشان داد که تعداد واکنش های بلوکه شده در مسیرهای سنتز این چهار نوع الکل کاهش یافت. به عبارت دیگر ادغام شدن شبکه ها واکنش های مسدود شده را آزاد کرد. دلیل کاهش تعداد واکنش های بلوکه شده را می توان این طور توضیح داد که با افزایش تعداد واکنش ها و متابولیت ها از میزان محدودیت ها در شبکه کاسته می شود [25] و به دنبال آن تعداد واکنش های بلوکه شده بیشتری آزاد می شوند. این موضوع یکی از پارامترهای مهم سنجش کیفیت شبکه های بازسازی شده است که در مدل ادغام شده مطالعه حاضر این مساله اثبات شد [25, 26].

زیست شناسی سامانه ها یک رشته نوین علمی بین رشته ای است که سعی دارد به کمک الگوریتم ها و ابزارهای کامپیوتری، شبکه های زیستی موجودات زنده را شبیه سازی کند و در آینده بتواند فنوتیپ ها و در نهایت موجودات دلخواه را طراحی نماید. در مطالعه حاضر به عنوان نمونه سعی شد به کمک این علم، قدمی در مسیر حل چالش های ناشی از مصرف بی رویه سوخت های فسیلی برداشته شود.

در مطالعه حاضر ابزاری توسعه داده شد تا مقداری از سختی های مسیر بازسازی و بهینه سازی شبکه های متابولیک بازسازی شده، کاهش یابد. در این راستا قبل از مطالعه حاضر یا همزمان با آن

نرم افزارهای مشابهی (به تعداد بسیار اندک) توسعه یافته اند که البته شبکه های به دست آمده حاصل از آنها هیچ یک برای تولید سوخت زیستی مدل سازی نشده اند [25, 26, 42]. همچنین iMet در برخی از زمینه ها مزایایی نسبت به نرم افزارهای یاد شده دارد که می توان به مواردی مانند عدم وابستگی به شبکه جهانی اینترنت (به عنوان یک گزینه)، داشتن ساختار یکپارچه بر مبنای جاوا و به دنبال آن قابلیت گرافیکی بالا اشاره کرد. در این راستا، نتایج حاصل از آنالیزهای FBA و pFBA کارایی این نرم افزار را تایید کردند [39]. از موارد بسیار مهم در بازسازی و مدل سازی شبکه های متابولیک می توان به پوشش هر چه بیشتر مسیرهای متابولیک، افزایش تولید یا راندمان محصولات متابولیک دلخواه و کاهش هر چه بیشتر واکنش های متابولیک بلوکه شده اشاره کرد، که در مطالعه حاضر به این موارد مهم دست یافته شد. بی تردید پوشش کامل شبکه های متابولیک حین بازسازی، ادغام داده های توان بالا نظیر داده های بیانی و مدل سازی شبکه های تنظیم بیان ژنی به عنوان چشم انداز آینده می تواند در افزایش کارایی این گونه مدل ها تاثیر بسزایی داشته باشد. در حال حاضر این نرم افزار برای بهینه کردن انواع شبکه های متابولیک بازسازی شده برای مصارف علمی قابل دسترس است.

از محدودیت های مطالعه حاضر می توان به طور کلی به کم بودن شبکه های متابولیکی بازسازی شده با کیفیت و در دسترس اشاره کرد که این امر در مورد میکروارگانیسم انتخابی در مطالعه حاضر هم کم و بیش صادق بود؛ بنابراین پیشنهاد می شود که در عرصه نوین تولید فرآورده های زیستی و زیست فناوری، محققین حوزه زیست شناسی سامانه ها، بخشی از توان و انرژی خود را صرف تولید، بازسازی و مدل سازی هر چه بهتر شبکه های متابولیکی ارگانیسم های هدف نمایند.

نتیجه گیری

آنالیزهای تعادل جریان افزایش پوشش شبکه متابولیک، افزایش تولید سوخت های زیستی و کاهش تعداد واکنش های بلوکه شده را در مدل جدید به دست آمده نشان می دهد و از این طریق کارایی نرم افزار توسعه یافته iMet اثبات می شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر برای فراهم آوردن زمینه ها و امکانات این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

تاییدیه اخلاقی: نویسندگان ابراز می دارند که در پژوهش حاضر آزمایشی روی انسان یا حیوان صورت نگرفته و هیچ گونه آسیبی به محیط زیست وارد نشده است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافع میان نویسندگان وجود نداشت.

سهم نویسندگان: رضا محمدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۶۰٪)؛ جواد ظهیری (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ محمدجواد نیرومند (نویسنده سوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر توسط دانشگاه صنعتی مالک اشتر حمایت مالی شده است.

منابع

1- Fargione J, Hill J, Tilman D, Polasky S, Hawthorne P. Land clearing and the biofuel carbon debt. Science.

- Hirasawa T, Shimizu H. Reconstruction and verification of a genome-scale metabolic model for *Synechocystis* sp. PCC6803. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;92(2):347-58.
- 22- Montagud A, Zelezniak A, Navarro E, De Córdoba PF, Urchueguía JF, Patil KR. Flux coupling and transcriptional regulation within the metabolic network of the photosynthetic bacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol J*. 2011;6(3):330-42.
- 23- Saha R, Verseput AT, Berla BM, Mueller TJ, Pakrasi HB, Maranas CD. Reconstruction and comparison of the metabolic potential of cyanobacteria *Cyanothece* sp. ATCC 51142 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One*. 2012;7(10):e48285.
- 24- Burgard AP, Pharkya P, Maranas CD. OptKnock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnol Bioeng*. 2003;84(6):647-57.
- 25- Chindelevitch L, Stanley S, Hung D, Regev A, Berger B. MetaMerge: Scaling up genome-scale metabolic reconstructions with application to *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Biol*. 2012;13(1):r6.
- 26- Swainston N, Smallbone K, Mendes P, Kell D, Paton N. The SubliMinaL Toolbox: Automating steps in the reconstruction of metabolic networks. *J Integr Bioinform*. 2011;8(2):186.
- 27- Vitkin E, Shlomi T. MIRAGE: A functional genomics-based approach for metabolic network model reconstruction and its application to cyanobacteria networks. *Genome Biol*. 2012;13(11):R111.
- 28- Hädicke O, Klamt S. CASOP: A computational approach for strain optimization aiming at high productivity. *J Biotechnol*. 2010;147(2):88-101.
- 29- Hucka M, Finney A, Sauro HM, Bolouri H, Doyle JC, Kitano H, et al. The systems biology markup language (SBML): A medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics*. 2003;19(4):524-31.
- 30- Chaouiya C, König M, Le Novère N, Zhang F, editors. The systems biology markup language [Internet]. Tokyo: SBML; 2015 [cited 2016 Jul 5]. Available from: http://sbml.org/Main_Page.
- 31- Bairoch A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):304-5.
- 32- Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):27-30.
- 33- UniProt Consortium. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D214-9.
- 34- Chemical Abstracts Service (CAS). Solve scientific information challenges [Internet]. Ohio: CAS; 2015 [cited 2016 May 25]. Available from: <https://www.cas.org/>.
- 35- Degtyarenko K, De Matos P, Ennis M, Hastings J, Zbinden M, McNaught A, et al. ChEBI: A database and ontology for chemical entities of biological interest. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D344-50.
- 36- Jaro MA. Advances in record-linkage methodology as applied to matching the 1985 census of Tampa, Florida. *J Am Stat Assoc*. 1989;84(406):414-20.
- 37- Winkler W. The state of record linkage and current research problems [Internet]. Maryland: Statistical Research Division, U S Bureau of the Census; 1999 [cited 2016 Feb 11]. Available from: https://www.bibsonomy.org/bibtex/18abfbb3ca7affa51548ca3fd5cc9f85a/sam_chapman.
- 38- Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. What is flux balance analysis?. *Nat Biotechnol*. 2010;28(3):245-8.
- 2008;319(5867):1235-8.
- 2- Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol*. 2011;29(2):95-103.
- 3- Machado IM, Atsumi S. Cyanobacterial biofuel production. *J Biotechnol*. 2012;162(1):50-6.
- 4- Zhou J, Li Y. Engineering cyanobacteria for fuels and chemicals production. *Protein Cell*. 2010;1(3):207-10.
- 5- Gronenberg LS, Marcheschi RJ, Liao JC. Next generation biofuel engineering in prokaryotes. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17(3):462-71.
- 6- Rosgaard L, De Porcellinis AJ, Jacobsen JH, Frigaard NU, Sakuragi Y. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. *J Biotechnol*. 2012;162(1):134-47.
- 7- Hess WR. Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(5):608-14.
- 8- Erdreich P, Knoop H, Steuer R, Klamt S. Cyanobacterial biofuels: New insights and strain design strategies revealed by computational modeling. *Microb Cell Fact*. 2014;13:128.
- 9- Knoop H, Gründel M, Zilliges Y, Lehmann R, Hoffmann S, Lockau W, et al. Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(6):e1003081.
- 10- Dutta D, De D, Chaudhuri S, Bhattacharya SK. Hydrogen production by Cyanobacteria. *Microb Cell Fact*. 2005;4:36.
- 11- Deng MD, Coleman JR. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(2):523-8.
- 12- Vidal R, López-Maury L, Guerrero MG, Florencio FJ. Characterization of an alcohol dehydrogenase from the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. strain PCC 6803 that responds to environmental stress conditions via the Hik34-Rre1 two-component system. *J Bacteriol*. 2009;191(13):4383-91.
- 13- Knoop H, Steuer R. A computational analysis of stoichiometric constraints and trade-offs in cyanobacterial biofuel production. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:47.
- 14- Shastri AA, Morgan JA. Flux balance analysis of photoautotrophic metabolism. *Biotechnol Prog*. 2005;21(6):1617-26.
- 15- Knoop H, Zilliges Y, Lockau W, Steuer R. The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803: Systemic properties of autotrophic growth. *Plant Physiol*. 2010;154(1):410-22.
- 16- Nogales J, Gudmundsson S, Knight EM, Palsson BO, Thiele I. Detailing the optimality of photosynthesis in cyanobacteria through systems biology analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2678-83.
- 17- Ravikrishnan A, Raman K. Critical assessment of genome-scale metabolic networks: The need for a unified standard. *Brief Bioinform*. 2015;16(6):1057-68.
- 18- Lewis NE, Nagarajan H, Palsson BO. Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):291-305.
- 19- Fu P. Genome-scale modeling of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and prediction of pathway insertion. *J Chem Technol Biotechnol*. 2009;84(4):473-83.
- 20- Montagud A, Navarro E, Fernández De Córdoba P, Urchueguía JF, Patil KR. Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic model of a photosynthetic bacterium. *BMC Syst Biol*. 2010;4:156.
- 21- Yoshikawa K, Kojima Y, Nakajima T, Furusawa C,

Quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *synechocystis* sp. strain PCC 6803: Presence and function in metabolism and electron transport. *J Bacteriol.* 2000;182(3):714-22.

42- King ZA, Lu J, Dräger A, Miller P, Federowicz S, Lerman JA, et al. BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D515-22.

39- Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: The COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc.* 2011;6:1290-307.

40- Thiele I, Palsson BØ. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc.* 2010;5(1):93-121.

41- Cooley JW, Howitt CA, Vermaas WF. Succinate: