

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

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

*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

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 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68053858>];

Cyanobacteria [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000458>];

Synechocystis sp. PCC 6803 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67413659>];

Algorithm [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000465>]

*Corresponding Author

Tel: +98 (21) 22974609

Fax: +98 (21) 22974605

Post Address: Malek Ashtar University of Technology, Shabanloo Street, Shahi Babaei Highway, Tehran, Iran

rezamohammadi@ut.ac.ir

Received: August 11, 2016

Accepted: September 8, 2017

ePublished: June 21, 2018

بازسازی و مدل‌سازی 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 زیست‌شناسی، 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 سوخت‌های زیستی یکی از تلاش‌های امیدبخش در عرصه زیست‌فناوری بوده است. سیانوباکترهای تک‌سلولی، میکروارگانیسم‌های بسیار پراکنده و فتوتروفیکی هستند که قادرند به‌عنوان کارخانجات کوچک تولیدکننده سوخت‌های زیستی عمل کنند. هدف مطالعه حاضر بازسازی و مدل‌سازی شبکه متابولیکی تلفیقی از سیانوباکتر به‌منظور افزایش تولید سوخت زیستی بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه محاسباتی حاضر یک نرم‌افزار برای ادغام شبکه‌های متابولیکی بازسازی‌شده، به‌منظور بهینه‌سازی و افزایش کارایی آنها توسعه یافت و به اسم iMet نام‌گذاری شد. ابتدا از iMet برای ادغام سه شبکه متابولیکی از قبل بازسازی‌شده سینکوسیستیس PCC ۶۸۰۳ (Synecocystis PCC6803) استفاده شد. در مرحله بعد، شبکه بازسازی‌شده به‌دست‌آمده، برای تولید چهار نوع سوخت زیستی شامل اتانول، پروپانول، بوتانول و ایزوبوتانول مدل‌سازی شد.

یافته‌ها: مدل جدید ادغام‌شده ۸۰۸ واکنش و ۵۶۰ متابولیت داشت. مقدار فلاکس یا جریان آن در مدل ادغام‌شده، ۰/۰۲۹۵ بر ساعت محاسبه شد. این عدد نسبت به سه مدل قبلی افزایش قابل توجهی نشان داد. سلول‌ها تقریباً هر ۲۴ ساعت، یک‌بار تقسیم شدند. میزان فلاکس چهار نوع الکل و حداکثر بازده تنوری آنها در مدل ادغام‌شده نسبت به سه مدل قبلی افزایش نشان داد. فلاکس تولید اتانول در تمامی مدل‌ها از فلاکس سه الکل دیگر بزرگ‌تر و واکنش‌های تولید اتانول به جریان یا فلاکس مرکزی کربن از همه نزدیک‌تر بود.

نتیجه‌گیری: آنالیزهای تعادل جریان افزایش پوشش شبکه متابولیک، افزایش تولید سوخت‌های زیستی و کاهش تعداد واکنش‌های بلوکه‌شده را در مدل جدید نشان می‌دهد و از این طریق کارایی نرم‌افزار توسعه‌یافته iMet اثبات می‌شود. **کلیدواژه‌ها:** 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 سوخت‌های زیستی قابل مصرف در صنعت یک گام بسیار مهم به‌منظور پیدا کردن راه حل برای چالش‌های جهانی روزافزون زیست‌محیطی و انرژی در سال‌های گذشته بوده است [1]. همچنین زمان محدودی برای استفاده از سوخت‌های فسیلی به‌دلیل منابع رو به اتمام آنها وجود دارد [2]. برای غلبه بر این مشکلات و کاهش وابستگی به سوخت‌های فسیلی، نیاز به تولید سوخت‌ها و مواد شیمیایی صنعتی از منابع زیستی تجدیدپذیر بسیار احساس می‌شود [3, 4]. سوخت‌های زیستی متنوعی در دهه‌های گذشته از محصولات کشاورزی تولید شده‌اند، هر چند تحقیقات برای یافتن سوخت‌های مناسب‌تر و با بهره‌وری بالاتر ادامه دارد [5].

با استفاده از روش‌های کنونی، گستره زیادی از زمین‌های کشاورزی و حجم بالایی از آب تازه مورد نیاز است تا زیست‌توده (بیومس) اولیه برای تولید سوخت‌های 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، به‌ویژه توسط میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده مانند سیانوباکترها

می‌تواند منافع فراوانی در جهت حفظ زمین‌های کشاورزی و آب مصرفی همراه با بهره‌وری بالا داشته باشد [7, 8]. سیانوباکترها میکروارگانیسم‌های بسیار پراکنده‌ای هستند که قادرند در خلال فتوسنتز دی‌اکسیدکربن هوا را گرفته و اکسیژن آزاد کنند، همچنین در بسیاری از چرخه‌های ژئوشیمیایی نقش دارند [9]. در این راستا از سیانوباکترها به‌منظور تولید انواع سوخت‌های زیستی مانند هیدروژن، اتانول و ایزوبوتانول استفاده شده، اگر چه بهره‌وری این فرآیندها پایین بوده است [10-12].

برای بهره‌مندی کامل از انرژی خورشیدی برای تولید سوخت زیستی، به شناخت کامل و جامع تمامی واکنش‌های رخ داده در شبکه متابولیک نیاز است [13]. بازسازی و مدل‌سازی شبکه‌های متابولیک می‌توانند این فرآیند را انجام دهند [14-16].

بازسازی شبکه‌های متابولیک یک فرآیند بسیار سخت و زمان‌بر بوده که گاهی ممکن است از چند ماه تا چند سال طول بکشد [17]. در این میان روش‌های آنالیز و بازسازی براساس محدودیت (COBRA) که بر مبنای محدودیت‌های فیزیوشیمیایی هستند توانسته پاسخگوی نیازهای محققین در این عرصه باشد [18]. در سال‌های اخیر چندین شبکه متابولیک از سیانوباکتر سینکوسیستیس PCC ۶۸۰۳ (Synecocystis PCC6803) بازسازی و برای مصارف گوناگون مدل‌سازی شده‌اند [8, 9, 15, 19-23]. فرآیند بازسازی و مدل‌سازی شبکه‌های متابولیک یک فرآیند رو به تکامل است، بنابراین هیچ کدام از شبکه‌های بازسازی‌شده تا به امروز کامل نبوده‌اند و هر یک کاستی‌هایی دارند. در این راستا محققین زیادی سعی کرده‌اند با توسعه نرم‌افزارهای گوناگون فرآیند سخت و زمان‌بر بازسازی را آسان‌تر کنند [24-28].

مطالعه حاضر با هدف بازسازی و مدل‌سازی شبکه متابولیک تلفیقی از سیانوباکتر به‌منظور افزایش تولید سوخت زیستی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه محاسباتی حاضر یک نرم‌افزار با رابط کاربری آسان و بر پایه جاوا برای ادغام شبکه‌های متابولیک بازسازی‌شده، به‌منظور بهینه‌سازی و افزایش کارایی آنها توسعه یافت و به اسم iMet نام‌گذاری شد. در ابتدا از iMet برای ادغام سه شبکه متابولیک از قبل بازسازی‌شده سینکوسیستیس PCC ۶۸۰۳ استفاده شد. در مرحله بعد، شبکه بازسازی‌شده، برای تولید چهار نوع از سوخت زیستی شامل اتانول، پروپانول، بوتانول و ایزوبوتانول مدل‌سازی شد.

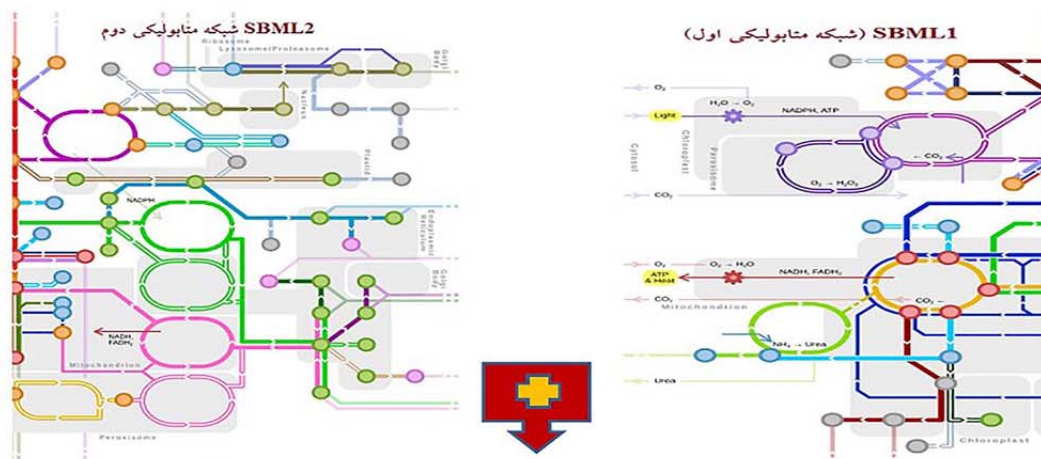
نرم‌افزار iMet طبق سه مرحله اصلی زیر عمل می‌کند. شکل ۱ شمای کلی الگوریتم نرم‌افزار را نشان می‌دهد.

استخراج اطلاعات: در اولین مرحله مدل‌های وارد شده در قالب فایل SBML (زبان نشانه‌گذاری زیست‌شناسی سیستم‌ها) [29, 30]، تجزیه و سپس اطلاعات متابولیت‌ها و واکنش‌ها 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 واکنش‌ها، معرف‌های دیگری مانند CAS Number [34] و ChEBI ID [35] مد نظر قرار گرفت.

محاسبه تشابه‌ها: 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 مدل‌سازی شبکه متابولیک تلفیقی از سیانوباکتر برای افزایش تولید سوخت زیستی ۱۹۵ واکنش‌هایی در نظر گرفته شدند که بین دو شبکه متابولیک پل ارتباطی برقرار می‌کنند. با داشتن چنین واکنش‌هایی یک شبکه ادغام شده با پوشش بیشتر و با دقت بالا تولید شد (شکل ۱).

نشان‌دهنده امتیاز مشابهت هر جفت متابولیت یا واکنش است. **تولید شبکه بازسازی شده:** در مرحله نهایی با استفاده از جدول‌های مشابهت، واکنش‌های دارای امتیاز مشابهت بالا [36, 37] به‌عنوان



اعتبارسنجی و استخراج اطلاعات فایل‌های ورودی

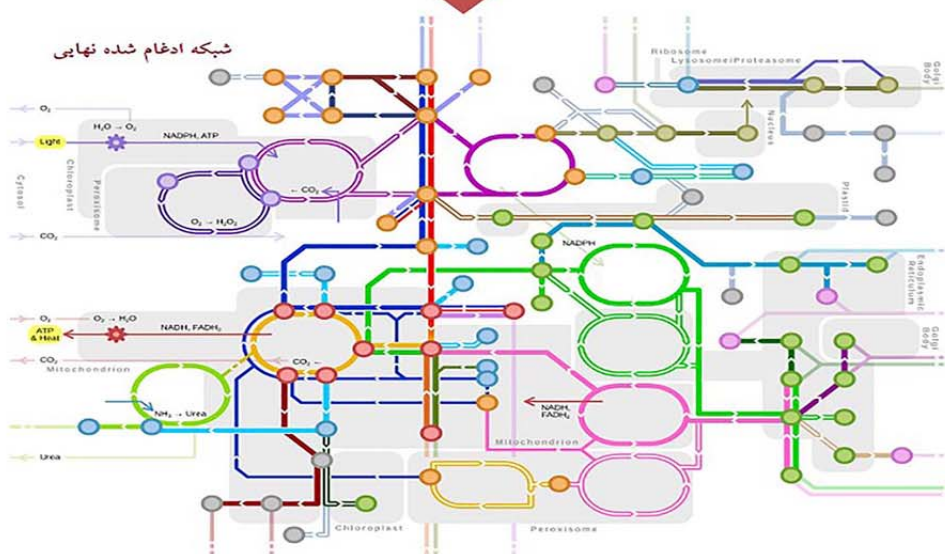
اصلاح فایل‌های ورودی به لحاظ واکنش‌ها، متابولیت‌ها، آنزیم‌ها، و ...

جمع‌آوری و تکمیل اطلاعات در مورد واکنش‌ها و متابولیت‌ها از پایگاه داده‌هایی نظیر KEGG

شناسایی واکنش‌ها و متابولیت‌های مشابه از طریق الگوریتم امتیازدهی

اصلاح واکنش‌ها و متابولیت‌های مشابه تشخیص داده شده به روش گرافیکی آسان

ساخت مدل ادغام شده



شکل ۱) شمای کلی از الگوریتم نرم‌افزار

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 به‌طور 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 تولیدشده به گرم بر جرم دی‌اکسیدکربن مصرف‌شده به گرم تقسیم شد.

یافته‌ها

مدل جدید ادغام‌شده 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 ادغام‌شده برابر ۰/۰۲۹۵ بر ساعت به دست آمد. این عدد نسبت به سه مدل قبلی افزایش قابل توجهی را نشان داد.

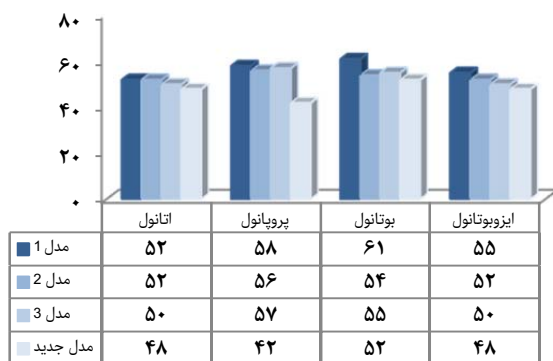
سلول‌ها تقریباً هر ۲۴ ساعت، یک‌بار تقسیم شدند. میزان فلاکس چهار نوع الکل و همچنین حداکثر بازده تئوری آنها در مدل ادغام‌شده نسبت به سه مدل قبلی افزایش نشان داد (جدول ۲). فلاکس تولید اتانول در تمامی مدل‌ها از فلاکس سه الکل دیگر بزرگ‌تر بود. واکنش‌های تولید اتانول به جریان یا فلاکس مرکزی کربن از همه نزدیک‌تر بود. به این مفهوم که رقابت کمتری برای استفاده از فلاکس کربن در تولید اتانول وجود داشت (جدول ۲).

تعداد واکنش‌های بلوکه‌شده 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	
	بازده فلاکس تئوری	بازده فلاکس تئوری	بازده فلاکس تئوری	بازده فلاکس تئوری	بازده فلاکس تئوری	بازده فلاکس تئوری	بازده فلاکس تئوری	
مدل ۱ [15]	۰/۴۶۲۶	۰/۳۰۷۴	۰/۱۲۴۳	۰/۱۲۶۲	۰/۲۲۴۵	۰/۳۰۴۲	۰/۲۸۹۴	۰/۲۳۷۷
مدل ۲ [9]	۰/۷۴۱۱	۰/۵۰۰۵	۰/۴۳۱۷	۰/۴۳۴۷	۰/۳۲۳۳	۰/۴۰۲۱	۰/۳۱۵۷	۰/۲۶۸۱
مدل ۳ [8]	۰/۷۵۲۴	۰/۵۲۰۸	۰/۴۲۸۵	۰/۴۲۹۲	۰/۳۱۷۴	۰/۳۹۱۱	۰/۳۲۳۴	۰/۲۸۱۵
مدل جدید تلفیقی	۰/۷۶۶۵	۰/۵۴۱۵	۰/۴۴۸۵	۰/۴۵۵۷	۰/۳۳۷۴	۰/۴۱۸۶	۰/۳۳۶۶	۰/۲۹۵۶

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



نمودار ۱ نتایج آنالیزهای pFBA برای تعداد واکنش‌های بلوکه‌شده برای مدل جدید به‌دست‌آمده در مقایسه با مدل‌های قبلی (مدل ۱) *ناپ* و همکاران [15]، مدل ۲) *ناپ* و همکاران [9]، مدل ۳) *آلدریچ* و همکاران [8]، مدل جدید) مدل ادغام‌شده توسط نرم‌افزار iMet

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

در مرحله بعد این سه شبکه به‌کمک نرم‌افزار توسعه‌یافته iMet، ادغام شدند و نتیجه به‌صورت یک شبکه متابولیک بازسازی‌شده در قالب فایل SBML تولید شد.

جدول ۱ جزئیات پوشش شبکه متابولیکی سه شبکه یادشده

مطالعه	تعداد متابولیت‌ها	تعداد واکنش‌ها	سال انتشار
<i>ناپ</i> و همکاران [15]	۲۹۱	۳۸۰	۲۰۱۰
<i>ناپ</i> و همکاران [9]	۵۵۶	۷۵۹	۲۰۱۳
<i>آلدریچ</i> 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 بازسازی‌شده بسیار کاربرد داشته است. آنالیز تعادل جریان یک روش ریاضی برای شبیه‌سازی شبکه‌های متابولیک در مقیاس ژنوم است که بر پایه محدودیت‌های فیزیوشیمیایی 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 انجام‌شده در مطالعه حاضر به‌کمک 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 ترش‌شی اضافه شد. ولی برای سه نوع الکل دیگر، هم مسیرهای تولید و هم مسیرهای ترش‌شی اضافه شدند. منظور از واکنش‌های ترش‌شی، واکنش‌هایی هستند که متابولیت‌های تولیدشده در سیتوپلاسم را به محیط خارج از سلول هدایت می‌کنند. برای مثال در پایین دو نمونه از محدودیت‌های اضافه‌شده 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 به‌عنوان تابع هدف، فنوتیپ‌های مختلف سلولی شبیه‌سازی شدند.

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

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

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

از نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت مدل جدید ادغام‌شده توسط نرم‌افزار 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 شبکه‌های متابولیک، پوشش هر چه بیشتر شبکه‌ها به منظور مدل‌سازی دقیق‌تر و پیشگویانه‌تر است که در مطالعه حاضر به آن دست یافته شد. بدیهی است که هدف نهایی بازسازی شبکه‌های متابولیک در نهایت، مدل‌سازی آنها برای تولید متابولیت‌های دلخواه است؛ بنابراین هر اندازه که پوشش شبکه‌های متابولیک هنگام بازسازی بیشتر و دقیق‌تر باشد، توان و پتانسیل مدل‌سازی افزایش و رسیدن به این هدف مهم آسان‌تر خواهد بود [17, 18, 25, 39, 40].

مقدار فلاکس یا جریان آن در مدل ادغام‌شده، عدد ۰/۰۲۹۵ بر ساعت محاسبه شد. این عدد نسبت به سه مدل قبلی افزایش معنی‌داری را نشان داد. سلول‌ها تقریباً هر ۲۴ ساعت یک بار تقسیم شدند. زمان مورد نیاز برای تقسیم سیانوباکتر سینکوسیستیس در طبیعت در شرایط فتوتروفیک حدود ۱۲/۵±۱۲ 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 ادغام‌شده نسبت به سه مدل قبلی افزایش داشت. فلاکس تولید اتانول در تمامی مدل‌ها از فلاکس سه الکل دیگر بزرگ‌تر بود، ممکن است دلیل آن این باشد که مسیر سنتز اتانول بین این الکل‌ها از همه کوتاه‌تر است [11, 13]. همچنین در مطالعه حاضر واکنش‌های تولید اتانول به جریان یا فلاکس مرکزی کربن از همه نزدیک‌تر 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 واکنش‌های بلوکه‌شده در مسیرهای سنتز این چهار نوع الکل کاهش یافت. به عبارت دیگر ادغام‌شدن شبکه‌ها واکنش‌های مسدودشده را آزاد کرد. دلیل کاهش تعداد واکنش‌های بلوکه‌شده را می‌توان این طور توضیح داد که با افزایش تعداد واکنش‌ها و متابولیت‌ها از میزان محدودیت‌ها در شبکه کاسته می‌شود [25] و به دنبال آن تعداد واکنش‌های بلوکه‌شده بیشتری آزاد می‌شوند. این موضوع یکی از پارامترهای مهم سنجش کیفیت شبکه‌های بازسازی‌شده است که در مدل ادغام‌شده مطالعه حاضر این مساله اثبات شد [25, 26].

زیست‌شناسی سامانه‌ها یک رشته نوین علمی بین‌رشته‌ای است که سعی دارد به کمک الگوریتم‌ها و ابزارهای کامپیوتری، شبکه‌های زیستی موجودات زنده را شبیه‌سازی کند و در آینده بتواند فنوتیپ‌ها و در نهایت موجودات دلخواه را طراحی نماید. در مطالعه حاضر به عنوان نمونه سعی شد به کمک این علم، قدمی در مسیر حل چالش‌های ناشی از مصرف بی‌رویه سوخت‌های فسیلی برداشته شود.

در مطالعه حاضر ابزاری توسعه داده شد تا مقداری از سختی‌های مسیر بازسازی و بهینه‌سازی شبکه‌های متابولیک بازسازی‌شده، کاهش یابد. در این راستا قبل از مطالعه حاضر یا همزمان با آن

نرم‌افزارهای مشابهی (به تعداد بسیار اندک) توسعه یافته‌اند که البته شبکه‌های به‌دست‌آمده حاصل از آنها هیچ یک برای تولید سوخت زیستی مدل‌سازی نشده‌اند [25, 26, 42]. همچنین iMet در برخی از زمینه‌ها مزایایی نسبت به نرم‌افزارهای یادشده دارد که می‌توان 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 نرم‌افزار را تایید کردند [39]. از موارد بسیار مهم در بازسازی و مدل‌سازی شبکه‌های متابولیک می‌توان به پوشش هر چه بیشتر مسیرهای متابولیک، افزایش تولید یا راندمان محصولات متابولیک دلخواه و کاهش هر چه بیشتر واکنش‌های متابولیک بلوکه‌شده اشاره کرد، که در مطالعه حاضر به این موارد مهم دست یافته شد. بی‌تردید پوشش کامل شبکه‌های متابولیک حین بازسازی، ادغام داده‌های توان بالا نظیر داده‌های بیانی و مدل‌سازی شبکه‌های تنظیم بیان ژنی به عنوان چشم‌انداز آینده می‌تواند در افزایش کارایی این گونه مدل‌ها تاثیر بسزایی داشته باشد. در حال حاضر این نرم‌افزار برای بهینه‌کردن انواع شبکه‌های متابولیک بازسازی‌شده برای مصارف علمی قابل دسترس است.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به طور کلی به کمبودن شبکه‌های متابولیکی بازسازی‌شده 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 می‌شود که در عرصه نوین تولید فرآورده‌های زیستی و زیست‌فناوری، محققین حوزه زیست‌شناسی سامانه‌ها، بخشی از توان و انرژی خود را صرف تولید، بازسازی و مدل‌سازی هر چه بهتر شبکه‌های متابولیکی ارگانیسم‌های هدف نمایند.

نتیجه‌گیری

آنالیزهای تعادل جریان افزایش پوشش شبکه متابولیک، افزایش تولید سوخت‌های زیستی و کاهش تعداد واکنش‌های بلوکه‌شده را در مدل جدید به‌دست‌آمده نشان می‌دهد و از این طریق کارایی نرم‌افزار توسعه‌یافته iMet اثبات می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر برای فراهم آوردن زمینه‌ها و امکانات این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی میان نویسندگان وجود نداشت.

سهم نویسندگان: رضا محمدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۶۰٪)؛ جواد ظهیری (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰٪)؛ محمدجواد نیرومند (نویسنده سوم)، روش‌شناس/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, Zeleznik 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- Erdrich 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, Pálsson 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:

Archive of SID