مدل‌سازی شبکه‌ی متابولیکی میکروارگانیسم *سودوموناس ائروجینوزا*

رضا قشلاقی*+، 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 ائروجینوزا در شرایط بی‌هوازی ارایه شده است. به منظور تأیید دقت مدل، پیش بینی‌های مدل با نتیجه‌های تجربی به دست آمده از کار دیگر پژوهشگران مقایسه شده است. برای دست یابی به این مهم، از برنامه ریزی خطی برای بهینه سازی معادله‌های حاکم بر سامانه استفاده شد. تابع هدف برای بررسی درستی مدل، نرخ ویژه رشد این میکروارگانیسم بوده است. طبق پیش بینی های مدل با این تابع هدف، مسیرهای انتنردودورف و پنتوز فسفات برای فروساخت گلوکز فعال بودند. هم چنین چرخه ی تری کربوکسیلیک اسید به طور کامل انجام نمی‌شد. در صورتی که مقدارهای 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 انتنردودورف مسیرفعال می‌باشد. پیش بینی‌های مدل در مقایسه با اندازه‌گیری‌های آزمایشی دارای خطای نسبی کمتر از ۱۰ درصد بوده است. این میزان خطای کم، نشان دهنده ی قابل اعتماد بودن مدل بوده و امکان کاربرد آن را در پژوهش‌های آتی فراهم می‌کند.*

واژه‌های کلیدی: *شبکه های متابولیکی، آنالیز شار متابولیکی ، سودوموناس ائروجینوزا، بهینه‌سازی نرخ رشد ویژه.*

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

مقدمه

سودوموناس با دارا بودن بیش از هشتاد گونه‌ی شناخته شده، یکی از بزرگترین خانواده‌ها در باکتری‌ها می‌باشد که جزء میکروارگانیسم‌های گرم منفی دسته‌بندی می‌شوند. گونه‌های *سودوموناس* نیاز غذایی بسیار ساده‌ای دارند و در شرایط آزمایشگاهی در محیط‌های حاوی مقداری ماده آلی در pH خنثی به‌خوبی رشد می‌کنند (به تقریب همه‌ی *سودوموناس*ها با نمک‌های آمونیم به همراه یک منبع کربن قادر به ادامه‌ی زندگی هستند) [۱]. یکی از گونه‌های *سودوموناس*، *سودوموناس ائروجینوزا* است که به فراوانی در پساب‌ها یافت می‌شود و به دلیل مقاوم بودن در برابر گستره‌ی گسترده‌ای از آنتی بیوتیک‌ها عامل بارز عفونت‌های *سودوموناسی* در انسان می‌باشد [۲].

سودوموناس ائروجینوزا 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 میکروارگانیسم (به ویژه در پساب) و قابلیت زنده ماندن در شرایط بی هوازی (که شرایط حاکم

*عهده دار مکاتبات

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

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* به‌عنوان 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 الکتریسیته 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 کمّی، که قادر به شبیه‌سازی رفتار میکروارگانیسم هاست، استفاده نمود.

آنالیز شار متابولیکی[۱] اطلاعات مهمی همچون بیشینه 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 به‌دست 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 متابولیکی میکروارگانیسم *سودوموناس ائروجینوزا* در شرایط هوازی توسط تعدادی از پژوهشگران بررسی شده است. به عنوان مثال *اوبرهاردت*[۲] در سال ۲۰۰۸ میلادی [۹] به بررسی شبکه‌ی متابولیکی این میکروارگانیسم در شرایط هوازی در مقیاس ژنوم پرداخت و در سال ۲۰۱۰ میلادی [۱۰] این شبکه را به‌منظور بررسی مسیرهایی که این میکروارگانیسم در عفونت‌هایی که در بیماران سیستیک فیبروزیس[۳] طی می‌کند، مدل‌سازی کرد. همچنین *پوچالکا*[۴] و *همکاران* [۱۱] در سال ۲۰۰۸ میلادی به بررسی و مدل‌سازی شبکه‌های متابولیکی گونه‌ی دیگری از *سودوموناس به نام سودوموناس پوتیدا*[۵] پرداختند. *ویرکس*[۶] و *همکاران* [۱۲] در سال ۲۰۰۹ میلادی از آنالیز شار متابولیکی به عنوان ابزاری برای بررسی اصلاح‌های ژنتیکی انجام شده در *سودوموناس پوتیدا* پرداختند. در سال ۲۰۱۰ میلادی نیز *جیانگ*[۷] [۱۳] از این روش تجزیه برای بررسی تولید پلیمر PHA[۸] و افزایش بازده آن استفاده کرد. همچنین *ونگ*[۹] و *همکاران* [۱۴] در سال ۲۰۱۲ میلادی از آنالیز شار متابولیکی برای پیش‌بینی رفتار *سودوموناس دنیتریفیکنز*[۱۰] در شرایط گوناگون استفاده کردند.

هدف اصلی در این پژوهش، مدل‌سازی شبکه‌ی متابولیکی میکروارگانیسم *سودوموناس ائروجینوزا* در شرایط بی‌هوازی بوده است. برای دستیابی به این هدف، ابتدا با جمع آوری اطلاعات از مقاله‌ها و منابع در دسترس، شبکه‌ی متابولیکی مربوطه به‌دست آمد و سپس با استفاده از آنالیز شار متابولیکی مقدار بهینه‌ی رشد و شارهای مربوط به واکنش‌ها پیش‌بینی شد. از این مدل می‌توان در پژوهش‌های بعدی برای پیش بینی میزان الکترون انتقالی از این سلول و همچنین چگونگی بس‌فرآوری[۱۱] استفاده کرد، چرا که این بس فرآوری می‌تواند نقش به‌سزایی در بهبود عملکرد پیل‌های سوختی میکروبی داشته باشد.

بخش تجربی

شبکه متابولیکی

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

(۱) Metabolic flux analysis
(۲) Oberhardt
(۳) Cystic fibrosis
(۴) Puchalka
(۵) *Pseudomonas putida*
(۶) Wierckx
(۷) Jiang
(۸) Poly 3-hydroxy alkanoates
(۹) Wang
(۱۰) *Pseudomonas denitrificans*
(۱۱) Over production

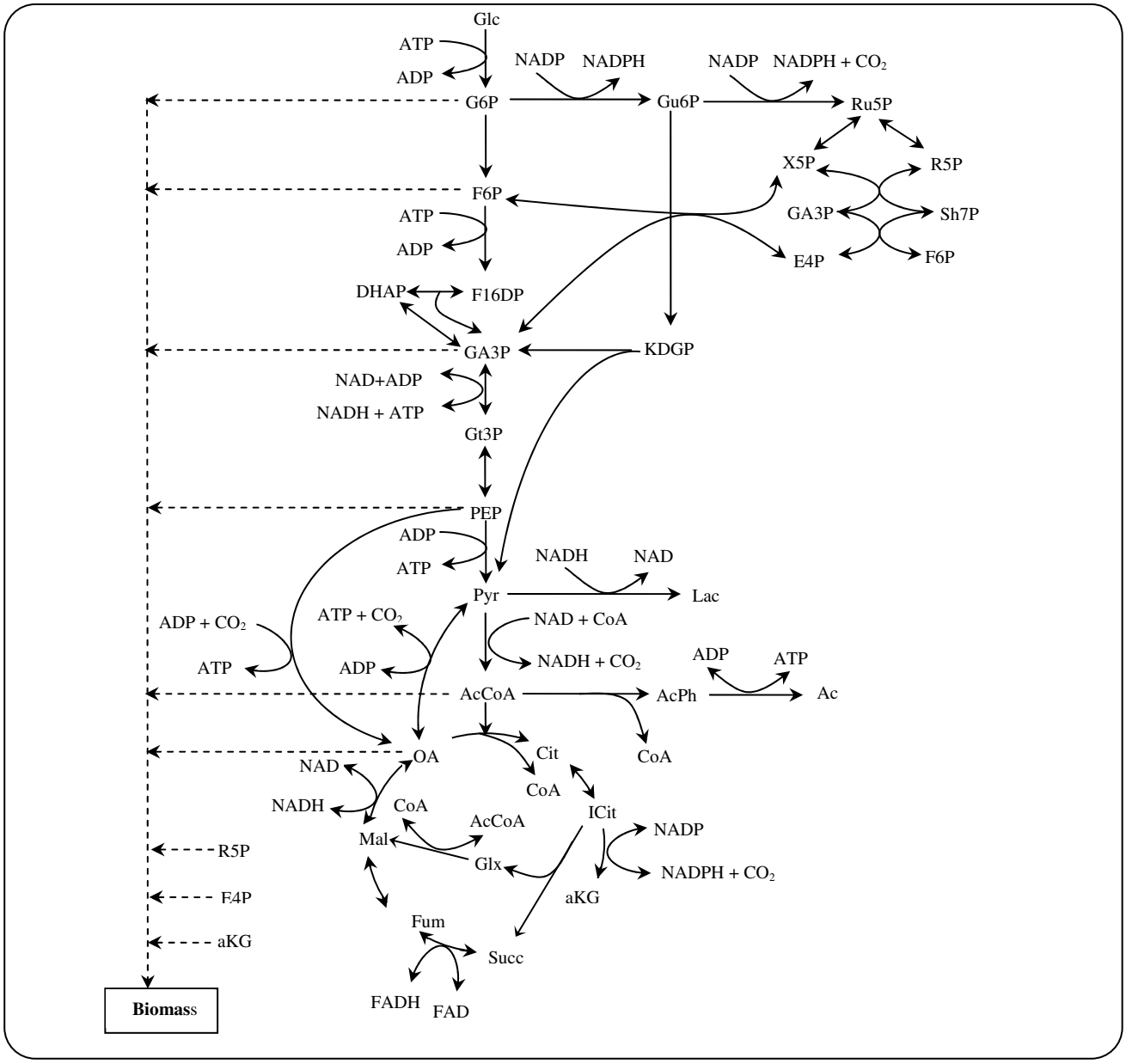
در آن‌ها حضور دارند، تهیه کرد. متأسفانه منبعی که تمام اطلاعات مربوط به مسیرهای بی‌هوازی فعال در *سودوموناس ائروجینوزا* را به صورت یکجا و طبقه بندی شده در اختیار قرار دهد، وجود ندارد. پس اولین قدم به دست آوردن واکنش‌های مربوطه و ساختن شبکه‌ی استوکیومتری با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی [۱۷ ـ ۱۵] و نشریه‌های 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 ائروجینوزا* استفاده شده است. شبکه‌ی واکنش‌های این میکروارگانیسم به صورت چکیده در ادامه آورده شده است. این شبکه شامل مسیرهای گلیکولیز(۱)، پنتوز فسفات(۲)، انتنردودورف(۳) و چرخه‌ی تری کربوکسیلیک اسید(۴) و واکنش های مربوط به مسیر گلی اکسیلات(۵) می‌باشد. درستی توالی واکنش‌ها در طول مسیر بسیار مهم است زیرا که تمامی آنالیزها بر پایه‌ی آن‌هاست. مسیر متابولیکی 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 متابولیکی اصلی *سودوموناس ائروجینوزا* را نشان می‌دهد. واکنش ها در پیوست ۲ ارایه شده اند. مسیر گلایکولیز یا امبدن- میرهوف- پارناس(۶)، مجموعه‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی است که در طی آن گلوکز به پیروات تبدیل می‌شود. در شرایط بی‌هوازی این مسیر در *سودوموناس ائروجینوزا* فعال می‌باشد [۱۷]. مسیر جانبی تجزیه‌ی گلوکز که در شرایط بی هوازی فعال است مسیر تبدیل گلوکز به گلوکز۶ فسفات و سپس به گلوکونات۶ فسفات می‌باشد، برخلاف رشد هوازی این تبدیل از روش گلوکونات انجام نمی‌گیرد [۲۰ ـ ۱۸]. مسیر انتنردودورف به طور ویژه برای این میکروارگانیسم، به منظور تبدیل گلوکز و دیگر قندها استفاده می‌شود [۲۳ ـ ۲۱]. این مسیر برای اولین بار برای نشان دادن مسیر فعال در *سودوموناس ساکاروفیلا*(۷) استفاده شد. این مسیر به ازای هر مول گلوکز تنها یک مول ATP تولید می‌کند و برخلاف مسیر EMP فقط تعداد محدودی از میکروارگانیسم‌ها که گرم منفی هستند، به‌طور عموم از خانواده‌ی *سودوموناس*ها، از این مسیر استفاده می‌کنند [۲۵ ، ۲۴]. مسیر پنتوز فسفات و یا هگزوز یک فسفاته(۸)، با تبدیل گلوکز ۶ فسفات به پنتوز فسفات‌ها، سرانجام به تولید فروکتوز۶ 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(۹) یا کربس(۱۰) 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 ـ 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 ـ ۲۹]. در شکل ۱ قسمت فعال این چرخه کشیده شده است. در شرایط بی‌هوازی میکروارگانیسم می‌تواند بعد از تبدیل پیروات به استیل کوآنزیم- آ، آلفاکتوگلوتارات را تولید کند و یا با تبدیل به اگزالواستات، 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 میکروارگانیسم فعال می‌باشد [۳۳].

موازنه‌ی مواد

برای نمایش ریاضی شبکه های متابولیکی 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. درایه‌ی s_{ij} در این ماتریس ضریب استوکیومتری متابولیت iام در واکنش jام را نشان می‌دهد. ضریب استوکیومتری برای واکنش دهنده‌ها منفی و برای فراورده‌ها مثبت است، اگر متابولیتی در واکنشی حضور نداشته باشد درایه‌ی متناظر آن صفر قرار داده می‌شود. اگر موازنه‌ی جرم دینامیکی پیرامون کلیه‌ی متابولیت‌های موجود در سامانه نوشته شود، معادله‌ی (۱) در شکل ماتریسی به‌دست می‌آید.

(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 ۱ـ شمای کلی مسیر متابولیکی *سودوموناس ائروجینوزا* در شرایط بی‌هوازی و گلوکز به عنوان خوراک.
(در پیوست ۱ نام کامل متابولیت ها و در پیوست ۲ شکل کامل واکنش‌ها را می‌توان دید.)

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

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

$$S \cdot V = ۰ \qquad (۲)$$

از آن جا که بیشتر شارهای واکنش های موجود در این شبکه مجهول می‌باشند، درجه‌ی آزادی بالا بوده و سامانه معادله‌ها، یک سامانه نامعین[۱] خواهد بود و حل یگانه‌ای برای آن وجود ندارد. برای غلبه بر این مشکل می‌توان با اندازه‌گیری تعدادی از شارهای تبدیل، درجه ی آزادی سامانه را کم کرد و حل معادله‌های جبری را ساده تر نمود. بدین منظور بردار شارها

(۱) Underdetermined

به سه دسته تقسیم می‌شوند: V_u^I بردار شارهای درونی مجهول، V_u^E 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 واکنش ها انتخاب شده است. پس از آن ماتریس S به S_u^I ، S_u^E و S_k^E تقسیم می‌شود پس معادله‌ی (۲) را می‌توان این گونه نوشت:

$$S \cdot V = S_k^E V_k^E + V_u^E S_u^E + S_u^I V_u^I = 0 \qquad (۳)$$

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^I و n_u^E 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:

$$V_u^E S_u^E + S_u^I V_u^I = b \qquad (۴)$$

برنامه‌ریزی خطی

همان گونه که پیشتر گفته شد به دلیل بیشتر بودن تعداد شارهای مجهول (n_u) از رنک[۱] 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[۲] 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]:

$$\begin{aligned} Z &= \sum \varpi_j v_j && \text{تابع هدف} \\ S_u^I V_u^I + V_u^E S_u^E &= b && \text{محدودیت‌ها} \end{aligned} \qquad (۵)$$

تابع تعریف شده‌ی Z تابع هدف مسئله است و عنصر وزنی ϖ_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 هریک از شارها یک حد بالا و یک حد پایین تعریف کرد تا مقدارهای به دست آمده فقط در این بازه بتوانند 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[۳]، 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 دست‌آمد، شبکه‌ی متابولیکی این میکروارگانیسم با فرض گلوکز به عنوان سابستریت 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 ارایه می‌دهد علاوه بر بیشینه‌ی مقدار تابع هدف، مقدارهای مجهول شارها (شامل مصرف سابستریت و یا تولید فراورده) نیز خواهد بود. این مقدارها، 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

(۱) Rank

(۲) Objective function

(۳) Simplex algorithm

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

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

که شرایط حاکم بر مدل ارایه شده است- بسیار محدود می‌باشد. اما در بین آن‌ها می‌توان به مقاله‌ی *هانت*(۱) 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 ازسویه‌ی PA01 *سودوموناس ائروجینوزا* استفاده شد که در دمای ۳۷ °C روی محیط کشت مایع همراه با نمک های ضروری همراه با ۲۰٪ مخمر و KNO_3 به‌عنوان پذیرنده‌ی الکترون در شرایط بی‌هوازی، و گلوکز به‌عنوان سابستریت، 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(۲) (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(۳)) به عنوان پارامتر مبنا برای توصیف سرعت ویژه در نظر گرفته شد، بنابراین واحد سرعت دیگر واکنش‌ها $mmol\ (h.g_{DW})^{-1}$ می‌باشد. نتیجه‌ها در جدول ۱ قابل دیدن است.

هم چنین *کوبیک*(۴) 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 ۵ $mmol.L^{-1}$ در شرایط بی‌هوازی باعث رشد بیشتر شده و افزودن بیشتر آن سودمند نخواهد بود، بنابراین مقدار گلوتامات مورد استفاده 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 h^{-1} برای خوراک‌های گوناگون داده شده است که این میزان برای گلوتامات معادل ۰/۲ می‌باشد. درصد خطا را در هردو 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 *اشرشیاکلی* [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.

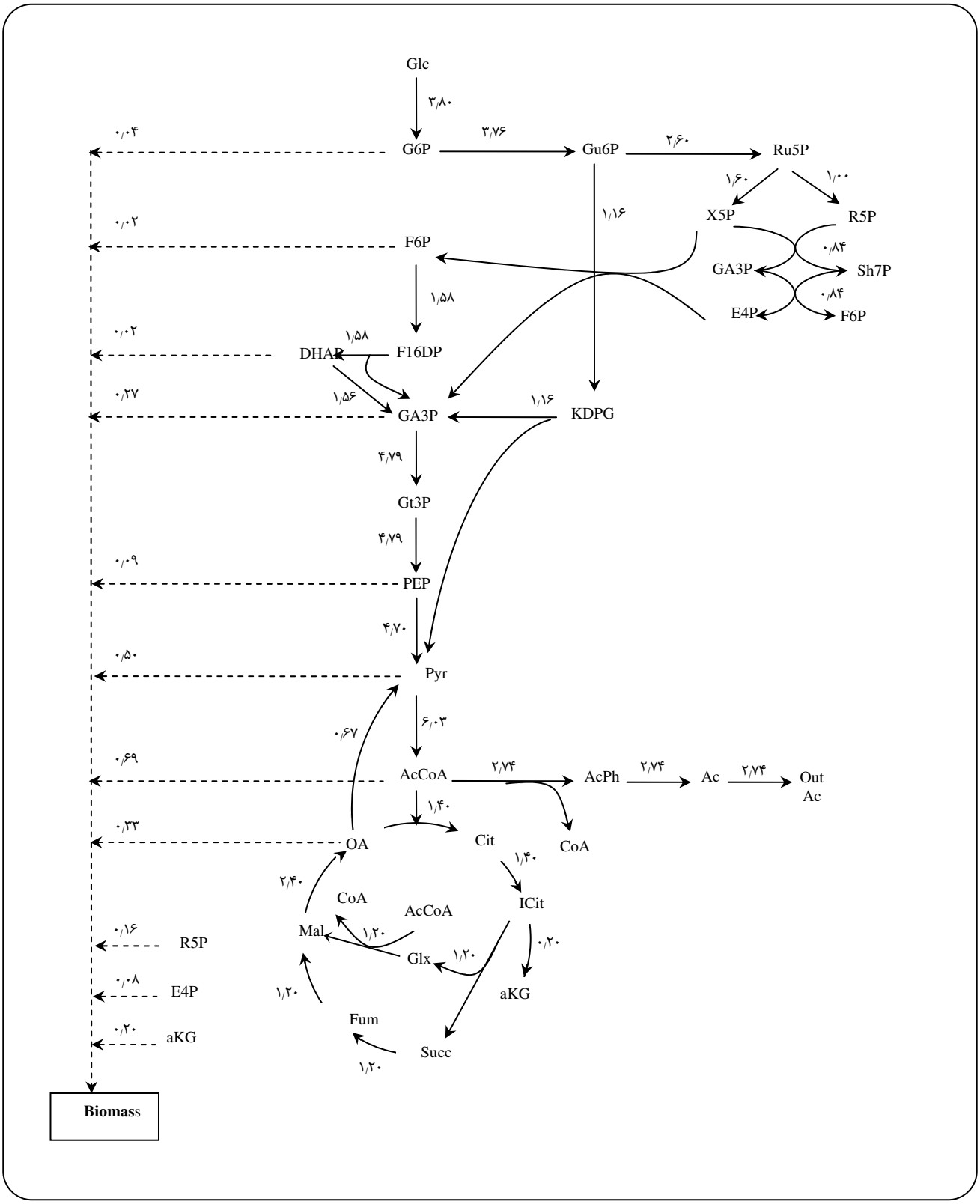
شکل ۲ توزیع شارها را (به صورت چکیده) برای بیشینه کردن

(۱) Hunt

(۲) Specific growth rate (μ)

(۳) Dry weight

(۴) Koike



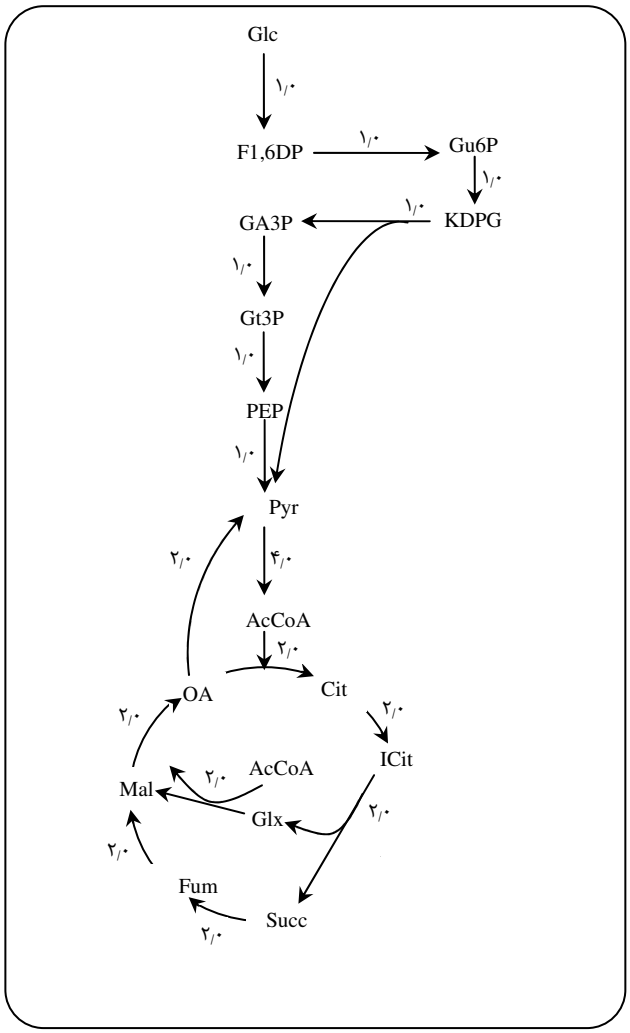
شکل ۲ـ شمای کلی از مسیرهای پیشنهادی برای *سودوموناس ائروجینوزا* با خوراک گلوکز (در پیوست ۱ علایم به کار رفته را می‌توان دید)، ورودی $۳٫۸\ mmol\ (h.g_{DW})^{-1}$ می‌باشد.

میزان تولید زیست توده، تحت شرایط بی هوازی و با ورودی خوراک گلوکز به مقدار $۳/۸\ mmol\ (h.g_{DW})^{-۱}$ (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 انتنردودورف و پنتوز فسفات هدایت می‌شود (حدود ٪۹۹.۶ از خوراک) زیرا این مسیرها اصلی‌ترین مسیر در متابولیسم *سودوموناس ائروجینوزا* ها می‌باشد [۲۳ ـ ۲۱] و هم چنین 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*(۱) و *همکاران* [۳۸] 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 آلفاکتوگلوتارات به سوکسینات صورت نمی‌گیرد، اما واکنش‌ها از یک طرف تا تولید آلفاکتوگلوتارات و از روش مسیر گلی اکسالات تا تولید مالات و اگزالواستات پیش می‌رود.

هم چنین *اسپانگلر* و *همکاران* در ادامه‌ی گزارش‌های خود بیان می‌کنند که واکنش های گلی اکسیلات 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 به‌مقدار قابل توجهی تولید می‌شود [۲۱] در خروجی این برنامه نیز همان‌گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود حدود $۲/۷۴\ mmol\ (h.g_{DW})^{-۱}$ استات تولید شده است.

پیش بینی تولید کو فاکتورها

با تأیید شدن این شبکه توسط داده های آزمایشی می‌توان به پیش بینی شار مواد در شرایط گوناگون پرداخت. یکی از این شرایط پیش‌بینی چگونگی مسیر توزیع مواد در هنگام بیشینه‌سازی مواد موثر در رشد مانند کوفاکتورهای NADH، ATP 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 هم چنین مسیرهایی



شکل ۳ـ توزیع شار برای بیشینه تولید NADH. بیشترین مقدار تولید NADH، $۹\ mol(mol.glc)^{-1}$ در شراط بی هوازی می‌باشد.

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 می‌آید که منجر به تصمیم‌گیری روی فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. به بیان دیگر باید تصمیم گرفت فعالیت کدام آنزیم‌ها تغییر یابند تا مسیری که تولید ماده ی 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 بهینه سازی بیشینه تولید NADH را نشان می‌دهد. در واقع شکل ۳ بیان کننده‌ی بیشترین توانایی شبکه‌ی متابولیکی *سودوموناس ائروجینوزا* برای تولید انرژی لازم برای فسفریلاسیون و در مراحل بعد برای انتقال الکترون است.

(۱) Spangler

جدول ۲ـ بیشینه‌ی مقدار تولید کوفاکتورها با ورودی ۱ مول گلوکز به عنوان خوراک در شرایط بی هوازی

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

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. همان طور که پیش تر نیز ذکر شد مسیر انتنردودورف مسیر اصلی تبدیل گلوکز در *سودوموناس ائروجینوزا* هاست و در شکل ۳ دیده می‌شود که گلوکز ورودی برای تبدیل مسیر انتنردودورف 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 آلفاکتوگلوتارات می‌رود، شایان گفتن است که مسیر انتنردودورف و گلی‌اکسالات اصلاً طی نمی‌شود و مقدار ۰/۸۳ مول آلفاکتوگلوتارات 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.

بررسی یکی از عوامل ایجاد خطا

همان‌گونه که پیش تر 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 بازهم همپوشانی قابل قبولی با نتیجه‌ها دارند.

جدول ۳ـ 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 h^{-1} ۰/۴۹۵ می‌باشد.

ماده موجود در بایو مس	مقدار بایومس تولیدی با ٪۱۰تغییر ضریب‌ها (h^{-1})	درصد تغییر ایجاد شده
ATP	۰/۴۶۷	۵/۶۵۶
NADPH	۰/۴۹۵	۰/۰۰۰
G6P	۰/۴۹۵	۰/۰۰۰
F6P	۰/۴۹۵	۰/۰۰۰
R5P	۰/۴۹۳	۰/۴۰۰
E4P	۰/۴۹۴	۰/۲۰۰
DHAP	۰/۴۹۵	۰/۰۰۰
GA3P	۰/۴۹۲	۰/۶۰۰
PEP	۰/۴۹۵	۰/۰۰۰
Pyr	۰/۴۹۳	۰/۴۰۰
AcCoA	۰/۴۹۳	۰/۴۰۰
OA	۰/۴۹۳	۰/۴۰۰
aKG	۰/۴۹۳	۰/۴۰۰
NADH	۰/۴۹۵	۰/۰۰۰

نتیجه‌گیری

طبیعی است که میکروارگانیسم *سودوموناس ائروجینوزا* در روبه‌رو شدن با شرایط بی هوازی مسیرهای گوناگونی را نسبت به شرایط هوازی طی می‌کند. مدل ارایه شده در این مقاله، مسیرهای متابولیکی اصلی طی شده توسط این میکروارگانیسم را در شرایط بی هوازی بیان می‌کند. البته خوراک ورودی به مدل می‌تواند مواد دیگری مانند لاکتات، استات، آلفاکتوگلوتارات و یا هر ماده‌ی میانی دیگری که در این مدل وجود دارد باشد. با توجه به شواهدی که مبنی بر درستی شبکه‌ی ارایه شده وجود دارد می‌توان به مقدار زیادی نسبت به درستی این شبکه اطمینان داشت. هدف بعدی استفاده از این شبکه، به منظور بیشینه کردن میزان الکترون‌های انتقالی توسط این میکروارگانیسم، به منظور استفاده در پیل‌های سوختی میکروبی و بالا بردن بازده‌ی این پیل‌ها می‌باشد. هم چنین این شبکه دید خوبی را در مورد شار تولید موادی که در شبکه ی انتقال الکترون نقش مثبتی دارند (مانند NADH و $FADH_2$) 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.

پیوست ها

پیوست ۱: علایم اختصاری به کار رفته برای واکنش دهنده ها

Ac	Acetate
AcCoA	Acetyl Coenzyme A
AcPh	Acetyl phosphate
αKG	α-Ketoglutarate
ATP	Adenosine-5-triphosphate
Cit	Citrate
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)

$FADH_2$	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_2O	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_3	Ammonia
O_2	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 ⇒ G6P + ADP
R1.2	G_6P ⇔ F_6P
R1.3	F_6P + ATP ⇒ F1,6DP + ADP
R1.4	$F1,6DP_c + H_2O_c \Rightarrow F6P_c + P_c$
R1.5	F1,6DP ⇔ DHAP + GA3P
R1.6	DHAP ⇔ GA3P
R1.7	GA3P + NAD + P ⇔ G1,3DP + NADH + H
R1.8	G1,3DP + ADP ⇔ Gt3P + ATP
R1.9	Gt3P ⇔ Gt2P
R1.10	Gt2P ⇔ PEP + H_2O
R1.11	PEP + ADP ⇒ Pyr +ATP
R1.12	Pyr + NADH ⇒ Lac + NAD
Pentose Phosphate Pathway	
R2.1	G6P + NADP + H_2O ⇒ Gu6P + NADPH + H
R2.2	Gu6P + NADP ⇒ Ru5P + NADPH + H + CO_2
R2.3	Ru5P ⇔ R5P
R2.4	Ru5P ⇔ X5P
R2.5	R5P + X5P ⇔ GA3P + Sh7P
R2.6	GA3P + Sh7P ⇔ E4P + F6P
R2.7	E4P + X5P ⇔ GA3P + F6P
Tricarboxylic Cycle Pathway and Glyoxylate Shunt	
R3.1	Pyr + CoA + NAD ⇒ AcCoA + NADH + H + CO_2
R3.2	AcCoA + P ⇒ AcPh + CoA
R3.3	AcPh + ADP ⇒ Ac + ATP
R3.4	AcCoA + OA + H_2O ⇒ Cit + CoA
R3.5	Cit ⇔ 1Cit
R3.6	1Cit + NADP ⇒ αKG + NADPH + H + CO_2
R3.7	Succ +FAD ⇔ Fum + $FADH_2$
R3.8	Fum + H_2O ⇔ Mal
R3.9	Mal + NAD ⇔ OA + NADH + H
Entner-Doudoroff Pathway	
R4.1	G6P + NADP + H_2O ⇒ Gu6P + NADPH + H
R4.2	Gu6P ⇒ KDPG + H_2O
R4.3	KDPG ⇒ Pyr + GA3P
Anaplerotic reactions	
R5.1	OA + ADP + P ⇔ Pyr + ATP + CO_2 + H_2O
R5.2	OA + ATP ⇒ PEP + ADP + CO_2
R5.3	1Cit ⇒ Glx + Succ
R5.4	Glx + AcCoA ⇒ 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 ⇒ 41.3 ADP + 41.3 PI + 3.5 NADH + 18.2 NADP + 3.7 COA + BIOMASS	

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., Sheikhvatan 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 Engneering*, **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., Ruijssenaars 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 13C-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 Rhodomicrobium Vannielii Rm5, *Journal of General Microbiology*, **12**, p. 931 (1986).

[31] Prohl C., Wackwitz B., Vlad D., Unden 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] Kretzschmar 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 (1922).

[35] Kim S., Seol E., Ohb Y.-K., Wangc G.Y., Park S., Hydrogen Production and Metabolic Fux 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 Fux Distributions and uMltiple 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).