

شماره ۱۲۱، زمستان ۱۳۹۷

ص: ۱۰۳-۱۱۶

بازسازی و آنالیز شبکه متابولیکی مبتنی بر

ژنوم باکتری استرپتوکوکوس بویس B315 دخیل در تولید اسید لاکتیک در محیط شکمبه

- **صابر جلوخانی نیارکی** (نویسنده مسئول)
دانش آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
 - **مجتبی طهمورث پور**
استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
 - **زرین مینوچهر**
دانشیار، گروه زیست فناوری سامانه ای، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
 - **احسان معتمدیان**
استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
 - **محمد رضا نصیری**
استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
- تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۷۰۸۲۶۶۸
Email: s.jelokhani6@gmail.com

چکیده

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.116808.1595

استرپتوکوکوس بویس یکی از باکتری های مصرف کننده نشاسته و تولیدکننده اسید لاکتیک در شکمبه است. با توجه به نقش استرپتوکوکوس بویس در تولید اسید لاکتیک، اطلاعات زیستی وسیعی از این گونه منتشر شده است. اما تا به حال، خصوصیات و توانمندی های متابولیکی این باکتری در سطح یک سیستم تجزیه و تحلیل نشده است. در پژوهش حاضر، مدل متابولیکی مبتنی بر ژنوم باکتری استرپتوکوکوس بویس (iStr472) برای اولین بار بر اساس اطلاعات ژنومی بدست آمده از سویه استرپتوکوکوس بویس B315 ساخته شد. مدل iStr472 با اهداف مختلف نظیر استواری، توپولوژی و توانایی های مدل در مصرف سوسترهای دیگر آنالیز گردید. مدل بازسازی شده تعداد ۶۹۴ واکنش، ۶۲۶ متابولیت و ۴۷۲ ژن را شامل گردید. بیشترین واکنش ها در مسیر متابولیکی نوکلئوتیدها قرار داشتند. ژن های متابولیکی مدل ۲۷/۶ درصد از کل ژن های رمزگذارنده را شامل شد. مقایسه دو مدل (iStr472 و ModelSEED) نشان داد که مدل iStr472 از دقت و صحت بالاتری نسبت به مدل دیگر برخوردار است. شازده متابولیت با درجه اتصال بالا در مدل شناسایی گردید. حذف واکنش ها نشان داد که مدل ۱۲۶ واکنش حیاتی برای رشد را شامل می شود. بر اساس پیش بینی مدل، تولید زیست توده استرپتوکوکوس بویس تحت تأثیر لاکتات تولیدی قرار می گیرد. مدل همچنین قادر است از فروکتوز به عنوان منبع کربنی استفاده کند. روی هم رفته، از پیش بینی های مدل iStr472 می توان به عنوان ابزاری برای درک بهتر متابولیسم و همچنین مهندسی متابولیک استرپتوکوکوس بویس به منظور تولید لاکتات کمتر در محیط شکمبه بهره برد.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 121 pp: 103-116

Reconstruction and analysis of the genome-scale metabolic network of *Streptococcus bovis* B315 involved in lactic acid production in the rumen

By: Saber Jelokhani-Niaraki^{1*}, Mojtaba Tahmoorespur², Zarrin Minuchehr³, Ehsan Motamedian⁴, MohammadReza Nassiri²

1-PhD Alumnus, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2-Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3-Associate professor, Department of Systems Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

4-Assistant professor, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: January 2018

Accepted: March 2018

Streptococcus bovis has been considered to be one of the starch utilizers and lactate producers in the rumen. By considering the role of *S. bovis* as main lactic acid producer, a large amount of biological information about this strain has been published. But there has not been a systematic analysis of metabolic capabilities for *S. bovis* so far. In the present study, the first genome-scale metabolic model of *S. bovis* (iStr472) was reconstructed based on the genome annotation of *S. bovis* B315. The model was analyzed in terms of sensitivity, topology and capabilities for utilization of other substrates. Results revealed that iStr472 comprises 694 reactions, 626 metabolites and 472 genes. The majority of reactions were located on the nucleotides metabolic pathway. The metabolic genes of model estimated as 27.6 % of all coding genes. Comparison of two models (iStr472 and ModelSEED) indicated that iStr472 has a higher accuracy and validity than the ModelSEED. The 16 highly connected metabolites were found in the model. The results of reaction deletion presented that the model has 126 vital reactions essential for the organism's growth. According to the model prediction, production of biomass was inversely influenced by lactate production. The iStr472 is also capable of utilizing fructose as carbon source. Taken together, it would be possible to use the predictions of iStr472 as a tool for better understanding the metabolism and metabolic engineering of *S. bovis* for reduced lactate production in the rumen.

Key words: *Streptococcus bovis*, genome-scale metabolic model, iStr472, rumen, COBRA

مقدمه

هایی با نشاسته بالا غالب می باشد (Jouany, ۲۰۰۶). زمانی که نشخوارکنندگان با جیره هایی غنی از کنسانتره تغذیه می شوند، فعالیت تولید لاکتات در آن افزایش می یابد (Hungate و همکاران، ۱۹۵۲؛ Marounek and Bartos, 1987). به دنبال تخمیر سریع کنسانتره در شکمبه، اسید لاکتیک تولید و تجمع می یابد که منجر به افت pH شکمبه می شود. اختلال اسیدوز سالانه خسارات فراوانی را به صنعت پرورش حیوانات نشخوارکننده نظیر گاو شیری، گاو گوشتی و گوسفند وارد می سازد. به عنوان مثال

میکروب های موجود در اکوسیستم میکروبی شکمبه نشخوارکنندگان که مجموعه پیچیده ای از گروه های مختلف میکروبی را تشکیل می دهند، به عنوان دستگاه های متابولیک انجام وظیفه می کنند. استرپتوکوکوس بویس باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری می باشد (Romero-Hernández و همکاران، ۲۰۱۳) که جزء فلور طبیعی شکمبه به شمار می رود. این گونه یکی از باکتری های مصرف کننده کارآمد نشاسته و تولیدکننده لاکتات است که رشد آن خیلی سریع بوده و در جیره

سؤالات مختلف در مورد توانایی های متابولیکی موجودات زنده و وضعیت های فنوتیپی محتمل آنها مورد استفاده قرار گیرند (Palsson, 2006؛ Orth و همکاران، 2010). مدل های متابولیکی مبتنی بر ژنوم به عنوان ابزاری کارآمد برای تجزیه و تحلیل یکپارچه متابولیسم میکروبی معرفی شده اند (Liu و همکاران، 2010). نقطه آغاز برای بازسازی شبکه متابولیکی مبتنی بر ژنوم، در دست داشتن یک توالی ژنومی تفسیرنویسی شده می باشد که با اطلاعات بدست آمده از منابع علمی و پایگاه های اطلاعاتی دربرگیرنده مسیرهای متابولیکی و واکنش ها ترکیب می گردد (Thiele and Palsson, 2010). در طی سال های اخیر، شبکه متابولیکی شمار زیادی از ارگانیسم های مختلف بازسازی شده اند، اما مطالعات مرتبط با میکروب های شکمبه کمتر انجام شده است. شمار ارگانیسم هایی که شبکه متابولیکی آنها بازسازی شده است به طور موازی با توالی یابی کامل ژنومی افزایش یافته است، به عنوان مثال چند مورد از گونه هایی که شبکه های متابولیکی آنها بازسازی شده اند شامل باکتری *اشرشیاکلی* (Feist و همکاران، 2007)، مخمر *ساکارومایسس سروزیه* (Mo و همکاران، 2009)، مخمر *پیچیا پاستوریس* (Chung و همکاران، 2010)، باکتری *باسیلوس ساتیلیس* (Oh و همکاران، 2007)، باکتری *کروموهالوباکتر سالکسیترنز DSM* (Ates و همکاران، 2011)، باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* (Kjeldsen and Nielsen, 2009) و باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (Oberhardt و همکاران، 2008) می باشند.

آنالیز مدل های متابولیکی مبتنی بر ژنوم با استفاده از روش هایی مثل آنالیز موازنه شار (FBA)^۴ (Orth و همکاران، 2010؛ Gianchandani و همکاران، 2010) می تواند جنبه های مهم متابولیسم و تنظیم آن را آشکار کرده (Stelling و همکاران، 2002) و کمک بسزایی به شناسایی ژن های ضروری (del Rio و همکاران، 2009؛ Martelli و همکاران، 2009) و نشانگاه های دارویی بالقوه (Navid، 2011) نماید. از ارگانیسم هایی که تا به حال از طریق ساخت شبکه متابولیکی مبتنی بر ژنوم آنالیز شده اند،

در ایالات متحده، خسارت اقتصادی که سالانه مستقیماً از اسیدوز شکمبه ای در صنعت پروراندی گاو گوشتی ناشی می شود برابر با ۰/۶ تا ۱ بلیون دلار برآورد شده است (Xue، 2011). محققین شرح داده اند که چگونه کاهش pH و تجمع میانجی های گلیکولیتیک (مثلاً پیروات، فروکتوز ۶، دی فسفات و غیره) از فعالیت آنزیم پیروات فورمات لیز (PFL) و در نهایت تشکیل فورمات و استات به نفع آنزیم لاکتات دهیدروژناز در باکتری *استرپتوکوکوس بویس* و بنابراین به نفع تولید لاکتات ممانعت می کنند (Russell and Hino, 1985).

توالی یابی متاژنومیک، بسترهای تحقیقاتی مناسبی را برای شمار زیادی از ارگانیسم ها تسهیل نموده است (Wooley و همکاران، 2010). امروزه، پایگاه های اطلاعاتی توالی های ژنومی که اطلاعات تفسیرشده ژنومی طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها را شامل می شوند با روند رو به رشدی گسترش پیدا کرده اند. به عنوان مثال، بر اساس گزارشی که در سال 2012 منتشر گردید، اطلاعات تفسیرشده ژنومی شمار زیادی از باکتری های توالی یابی شده (تقریباً ۴۶۵۰ ژنوم باکتریایی) در پایگاه داده IMG^۱ ذخیره گردیده و همچنین ژنوم ها بر روی تصاویر مسیرهای متابولیکی پایگاه اطلاعاتی KEGG^۲ نقشه یابی شده اند (Markowitz و همکاران، 2012). به دنبال پیشرفت های حاصله در زمینه ژنومیکس، زیست شناسی سامانه ها^۳ به عنوان یک شاخه تحقیقاتی میان رشته ای تظاهر پیدا کرده است. زیست شناسی سامانه ها، رشته های زیست شناسی، ریاضیات و محاسبات را به منظور مدل سازی روابط متقابل پویا باهم ترکیب می کند (Woelders و همکاران، 2011). در زمینه تحقیقاتی زیست شناسی سامانه ها، نوعی مدل سازی ریاضی وجود دارد تحت عنوان بازسازی مدل متابولیکی مبتنی بر ژنوم، که اختصاصاً برای آنالیز کلی متابولیسم به کار برده می شود (Nielsen and Vidal, 2010). این مدل ها شکل سازمان یافته ای از اطلاعات موجود در ژنوم هستند که می توانند برای گزارش گیری های محاسباتی و کمی در پاسخ به

¹Integrated Microbial Genomes

²Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

³Systems biology

⁴Flux balance analysis

مواد و روش ها

جمع آوری داده های ژنومی

در مطالعات متاژنومیکی که به خوبی طراحی می شوند، ارتولوژی KEGG⁵ (KO) (Kanehisa و همکاران، ۲۰۰۴) برای تفسیرنویسی وظایف ژنی (Qin و همکاران، ۲۰۱۰) به طور رایج مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین مطلوب است که مدل های متابولیکی مبتنی بر ژنوم با کیفیت بالا بر اساس KO تفسیرنویسی شده و بازسازی شوند (El-Semman و همکاران، ۲۰۱۴). برای ساخت شبکه متابولیکی مبتنی بر ژنوم باکتری ها لازم است که ابتدا ژنوم کامل آنها توالی یابی گردد و توالی کامل ژنومی تفسیرنویسی شود. از آنجایی که کیفیت و صحت تفسیرنویسی ژنومی تأثیر به سزایی بر روی کیفیت شبکه دارد، تهیه جدیدترین نسخه اطلاعات ژنومی از اهمیت بالایی برخوردار است تا اطمینان حاصل گردد که تصحیحات و به روز شدن های اطلاعات ژنومی انجام شده است. در تحقیق حاضر، توالی کامل ژنومی باکتری استرپتوکوکوس بویس B315 جدا شده از شکمبه گاو که از قبل توالی یابی شده و در پایگاه داده IMG نگهداری می شود مورد استفاده قرار گرفت. این توالی در سال ۲۰۱۳ با شماره ۱۲۸۰۶۹۰ ثبت و گزارش شده است (Kelly و همکاران، ۲۰۱۳). خصوصیات ژنتیکی باکتری استرپتوکوکوس بویس B315 در جدول ۱ آورده شده است (برداشت شده از پایگاه اطلاعاتی <https://img.jgi.doe.gov:IMG>).

باکتری اشیریشیاکلی می باشد که توجه زیادی را به عنوان یک ارگانسیم مدل به خود اختصاص داده است. Palsson و Feist (۲۰۰۸) به چندین مورد از کاربردهای مدل متابولیکی مبتنی بر ژنوم باکتری اشیریشیاکلی اشاره کرده اند. این باکتری یکی از مهمترین میکروارگانسیم های مدل در زیست شناسی می باشد و شبکه متابولیکی آن نقش مهمی را در توسعه زیست شناسی سامانه ها ایفا کرده است. مطالعات انجام شده در طی قرن گذشته یک درک مکانیکی از روابط ژنوتیپ-فنوتیپ در متابولیسم باکتری اشیریشیاکلی ایجاد کرده اند که پایه ای را برای تلاش های مشابه در گونه های میکروبی دیگر فراهم می سازد (McCloskey و همکاران، ۲۰۱۳). از زمانی که نقش استرپتوکوکوس بویس به عنوان باکتری اصلی تولیدکننده اسید لاکتیک در محیط شکمبه آشکار شده است، اطلاعات زیستی وسیعی از این گونه منتشر گردیده است. از طرف دیگر، خصوصیات فنوتیپی و توانمندی های متابولیکی این گونه تا به حال به لحاظ سیستمیک تجزیه و تحلیل نشده و شواهدی از پیش بینی رفتارهای متابولیکی آن موجود نمی باشد. این مسائل تا حدودی از نبود یک مدل متابولیکی برای مدل سازی محاسباتی و شبیه سازی های رایانه ای ناشی می گردند.

با توجه به اهمیت استرپتوکوکوس بویس در تولید اسید لاکتیک و ایجاد اسیدوز شکمبه ای و همچنین نبود یک مدل متابولیکی برای پیش بینی رفتارهای متابولیکی آن، لازم است که شبکه متابولیکی آن بازسازی گردد. بدین منظور در پژوهش حاضر که به عنوان یکی از اولین مطالعات زیست شناسی سامانه ها در زمینه میکروب های شکمبه به شمار می رود، مدل متابولیکی مبتنی بر ژنوم باکتری استرپتوکوکوس بویس B315 بازسازی شد. به منظور ارزیابی توانایی های متابولیکی، مدل بازسازی شده با چندین رویکرد تحلیل گردید. همچنین در این مطالعه، پیش بینی های مدل در تولید لاکتات نیز مورد بررسی قرار گرفت.

⁵KEGG orthology

جدول ۱- خصوصیات ژنتیکی باکتری استرپتوکوکوس بویس B315

مشخصات ژنتیکی باکتری استرپتوکوکوس بویس B315 جدا شده از شکمبه گاو

٪۱۰۰	۱۷۸۶۶۷۳	تعداد بازهای DNA
٪۹۰/۲۸	۱۶۱۳۰۸۲	تعداد بازهای کدکننده
٪۳۷/۱۰	۶۶۲۹۳۹	تعداد بازهای G + C
٪۱۰۰	۱۷۶۲	کل تعداد ژن ها
٪۹۷/۱۱	۱۷۱۱	ژن های رمزگذارنده پروتئین
٪۰/۹۱	۱۶	شبه ژن ها
٪۰/۱۱	۲	ژن های 5S rRNA
٪۰/۱۱	۲	ژن های 16S rRNA
٪۰/۰۶	۱	ژن های 23S rRNA
٪۱/۷۰	۳۰	ژن های tRNA
٪۰/۹۱	۱۶	ژن های دیگر RNA ها
٪۸۷/۰۶	۱۵۳۴	ژن های رمزگذارنده پروتئین با پیش بینی عملکرد
٪۱۰/۰۵	۱۷۷	ژن های رمزگذارنده پروتئین بدون پیش بینی عملکرد
٪۳۲/۶۳	۵۷۵	ژن های رمزگذارنده پروتئین برای آنزیم ها
٪۰/۴۰	۷	ژن های رمزگذارنده پروتئین غیر آنزیمی اما کاندید برای آنزیم های مبتنی بر KO
٪۱۴/۶۴	۲۵۸	ژن های رمزگذارنده پروتئین ها که با دسته Transporter ها مرتبطند

ساخت شبکه متابولیکی اولیه

اطلاعات ژنوم (فایل اکسلی که از پایگاه IMG دانلود شده بود) استخراج شد و سپس از این اطلاعات به منظور استخراج واکنش ها از مجموعه واکنش ها استفاده گردید. مجموعه GK جمع آوری شده به منظور ساخت مدل اولیه مورد استفاده قرار گرفت. تابع دستوری buildDraftModel برای مجموعه GK به کار برده شد تا واکنش ها را با استفاده از شناسه های KO از مجموعه واکنش های مرجع استخراج کند. خروجی مدل اولیه یک فایل اکسل می باشد که توسط تابع saveDraftModel ایجاد می شود. روش به کار برده شامل استفاده از زبان برنامه نویسی متلب و برخی از جعبه ابزارها نظیر RAVEN و COBRA می باشد که کدهایی را برای جمع آوری واکنش ها و ساخت شبکه متابولیکی اولیه ارائه نموده اند.

اولین مرحله در بازسازی شبکه متابولیکی، ساخت یک شبکه اولیه بر اساس اطلاعات تفسیر شده ژنومی ارگانیزم هدف و پایگاه های داده بیوشیمیایی می باشد. شبکه بازسازی شده اولیه یا شبکه هایی که به طور خودکار بازسازی می شوند مجموعه ای از وظایف متابولیکی رمزگذاری شده توسط ژنوم می باشند و بایستی به شکل دستی بهبودبخشی شوند. در مطالعه حاضر، فرآیند ساخت شبکه اولیه مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط El-Semman و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد. در روش ارائه شده، مؤلفان مجموعه ای از واکنش ها را (حدوداً ۲۳۴۰ واکنش) از مدل های متابولیکی مبتنی بر ژنوم از قبل ساخته شده جمع آوری کرده اند، به شکلی که هر واکنش به یک KO اختصاص داده شده است. در پژوهش حاضر، ابتدا مجموعه ژن و KO (GK)^۶ برای هر باکتری از فایل

^۶Gene and Kegg Orthology

بهبود، تصحیح و پر نمودن شکاف های مدل

برای اینکه پیش بینی متابولیکی به صورت بهینه صورت گیرد، لازم است که مدل بهبودبخشی و تصحیح گردد و همچنین شکاف های موجود در شبکه متابولیکی پر شوند. برخی از وظایف متابولیکی ممکن است اشتباهاً در شبکه وارد شده باشند یا برخی از آنها که باید در شبکه وجود داشته باشند ممکن است اشتباهاً حذف شده باشند. برای هر ژن و واکنش دو سؤال مطرح می شود. (۱). آیا این واکنش باید در این محل باشد؟ (۲). آیا واکنشی وجود دارد که در شبکه وارد نشده باشد تا واکنش های شبکه را به یکدیگر متصل کند؟ به طور خاص، بهتر است که واکنش ها و وظایف متابولیکی جمع آوری شده در شبکه اولیه به شکل انفرادی در برابر اطلاعات منتشر شده خاص ارگانسیم هدف مورد ارزیابی قرار گیرند. اما از آنجایی که اطلاعات خاص ارگانسیم مورد مطالعه محدود است و پایگاه اطلاعاتی مرتبط با آن وجود ندارد، انجام این فرآیند مشکل است (Thiele and Palsson, 2010). در این پژوهش، شکاف های موجود در مدل به طور دستی توسط نقشه یابی مدل بر روی نقشه های پایگاه KEGG و وارد کردن واکنش های مورد نیاز پر شدند. همچنین از اطلاعات تفسیر شده ژنومی پایگاه های اطلاعاتی دیگر نیز برای تصحیح و پر نمودن شکاف های مدل استفاده گردید. یکی از منابع استفاده شده در این پژوهش ModelSEED (Henry و همکاران، ۲۰۱۰) بود. از طریق ModelSEED می توان توالی ژنومی باکتری را وارد کرده و مدل اولیه متابولیکی را دریافت نمود. اما از آنجایی که اینگونه مدل ها به صورت خودکار ساخته می شوند و از اعتبار پایینی برخوردار هستند، بایستی که حتماً به صورت دستی بهبودبخشی شوند. در این مطالعه، از مدل اولیه ای که به طور خودکار توسط این پایگاه ساخته شد، برای پر کردن و تصحیح شبکه اولیه استفاده گردید.

ترکیب زیست توده

در شبکه متابولیکی یک واکنش تحت عنوان زیست توده تعریف گردید که برای رشد سلول مورد نیاز می باشد. از آنجایی که واکنش اختصاصی زیست توده^۷ برای باکتری یافت نشد، سعی

گردید که از واکنش زیست توده باکتری دیگر بر اساس نوع گرم آن استفاده شود. اگرچه یک واکنش زیست توده جامع برای باکتری اشرشیاکلی گرم منفی منتشر شده است و از آن در مطالعات مختلف شبکه های متابولیکی استفاده می گردد، اما در تحقیق حاضر از اطلاعات گونه گرم مثبت برای ساخت فرمول زیست توده باکتری استریتوکوکوس بویس استفاده گردید. واکنش زیست توده فکالیباکتریوم پرازینتری A2-I65 (اقتباس شده از مدل متابولیکی مبتنی بر ژنوم iFap484 به عنوان الگو در ساخت فرمول واکنش زیست توده مورد استفاده قرار گرفت (-EI Semman و همکاران، ۲۰۱۴).

واکنش زیست توده در استریتوکوکوس بویس ۳۹ متابولیت را شامل گردید. تک تک متابولیت های واکنش مورد بررسی قرار گرفتند و تنها متابولیت هایی که در مدل وجود داشتند در فرمولاسیون واکنش زیست توده لحاظ گردیدند.

آنالیزها

آنالیزهای انجام شده شامل استواری مدل، اثر حذف واکنش ها در مدل و توانایی مدل در مصرف سوسترهای دیگر بود. تمام آنالیزها با استفاده از جعبه ابزار COBRA و حل کننده بهینه سازی خطی glpk در محیط نرم افزاری متلب صورت گرفت. جعبه ابزار COBRA بسته نرم افزاری است که کمک می کند تا رفتار سلولی با استفاده از روش های مبتنی بر محدودیت به شکل کمی پیش بینی شود (Becker و همکاران، ۲۰۰۷). با استفاده از دستورات موجود در جعبه ابزار، مدل در فرمت SBML وارد شد و محاسبات مورد نظر انجام گردید. نتایج محاسبات به صورت پیش بینی رفتارهای سلولی حاصل شد. از آنالیز استواری^۸ به منظور محاسبه و رسم ارزش تابع هدف مدل به عنوان تابعی از ارزش های شار برای یک واکنش معین استفاده شد. برای اجرای این آنالیز از تابع robustnessAnalysis موجود در جعبه ابزار COBRA استفاده گردید و نتایج به شکل یک پلات نمایش داده شدند. به منظور آنالیز متابولیت های متصل شده^۹ در شبکه، از ماتریس

^۸Robustness analysis

^۹Connected metabolites

^۷Biomass

هر متابولیسی که در یک واکنش خاص شرکت نکند، ضریب استوکیومتریکیک صفر استفاده می گردد. آنالیز موازنه شار برای این منظور هدفمند شده است که یک تابع هدف ($Z = c^T V$) را حداکثر یا حداقل کند، که می تواند هر ترکیب خطی از شارها را شامل شود. بردار C نشان می دهد که به چه میزان هر واکنش (مثل واکنش زیست توده، زمانی که حداکثر رشد شبیه سازی می شود) برای دستیابی به مقدار بهینه تابع هدف مشارکت می کند. در عمل، زمانی که تنها یک واکنش برای حداکثرسازی و حداقل سازی مورد نظر است، بردار C یک بردار صفر را شامل می شود با عدد ۱ در موقعیت واکنش هدف (Orth و همکاران، ۲۰۱۰). همانطور که در معادله موازنه شار نشان داده شده است، V یک بردار دربرگیرنده مقادیر مجهول شار برای تمام واکنش های شبکه می باشد و C یک بردار وزن برای هر شار در بردار V می باشد. به طور معمول تمام ضرایب در بردار C برابر با صفر می باشند به استثناء شار واکنش زیست توده ($V_{biomass}$) که برابر با ۱ در نظر گرفته شده است. نمادهای ^{11}UB و ^{11}LB به ترتیب نشاندهنده حد بالا و پایین شار می باشند. در پژوهش حاضر، در آنالیز موازنه شار فرض گردید که مدل در یک محیط رشدی (GM) که مجموعه ای از متابولیت ها (d) را در بر می گیرد (از قبیل منبع کربنی، آمونیاک، فسفات و سولفور) رشد می کند. واکنش های تبدیلی که شار را از محیط کشت به مدل حمل می کنند (Vd)، در نرخ مصرف مدل (gd) برای آن متابولیت (d) تثبیت شدند. به عنوان مثال، مصرف یک $^{13}mmol/gDW/h$ گلوکز برای شار V_{glc} (شاری که گلوکز را از محیط کشت به مدل منتقل می کند) تثبیت گردید.

با توجه به خطی بودن معادلات، از برنامه ریزی خطی برای بهینه سازی استفاده شد. خروجی آنالیز موازنه شار یک توزیع شار خاص می باشد که تابع هدف را حداکثر یا حداقل می کند. در این پژوهش، تابع 'optimizeCbModel' جعبه ابزار COBRA به منظور آنالیز موازنه شار مورد استفاده قرار گرفت.

¹¹Upper Bound

¹²Lower Bound

¹³Millimole per gram dry weight per hour

استوکیومتری (S) که در مدل فرموله می شود استفاده گردید. برای هر شبکه، اتصال متابولیسی به صورت شمار متابولیت هایی که در یک واکنش معین مشارکت می کنند تعریف می گردد (Klanchui و همکاران، ۲۰۱۲). در این تحقیق، فراوانی هر متابولیت برای شناسایی متابولیت های به شدت متصل شبکه محاسبه گردید. همچنین اثر حذف هر یک از واکنش ها به طور انفرادی بر روی رشد میکروب از طریق FBA مورد مطالعه قرار گرفت و توانایی های مدل در مصرف سوبستراهای دیگر نیز بررسی گردید.

آنالیز موازنه شار

در پژوهش حاضر از آنالیز موازنه شار به منظور ساخت و اعتبارسنجی مدل با استفاده از جعبه ابزار COBRA (Becker و همکاران، ۲۰۰۷) و حل کننده بهینه سازی خطی glpk در محیط متلب استفاده شد. برای انجام آنالیز موازنه شار لازم است که مدل متابولیکی به فرمت 'SBML' درآمده و توسط جعبه ابزار COBRA خوانده شود. نتایج محاسبات به صورت پیش بینی های رفتار سلولی حاصل می گردد. معادله زیر فرمولاسیون اصلی آنالیز موازنه شار را نشان می دهد (El-Semman و همکاران، ۲۰۱۴):

$$\begin{aligned} \text{Max } Z &= C^T V \\ \text{S.t.} & \\ S.V &= 0 \\ V &\leq UB \\ -V &\leq -LB \\ V_d &= gd, \quad \forall d \in GM \end{aligned}$$

در نرم افزار متلب، واکنش های متابولیکی به صورت یک ماتریس استوکیومتریکیک (S) با اندازه $m \times n$ نمایش داده می شوند. هر ردیف از این ماتریس یک ترکیب خاص (برای یک سلول با m ترکیب) و هر ستون برای یک واکنش (n واکنش) است. ورودی ها در هر ستون ضرایب استوکیومتریکیک متابولیت هایی هستند که در یک واکنش شرکت می کنند. برای هر متابولیت مصرف شده و تولید شده به ترتیب یک ضریب منفی و مثبت وجود دارد. برای

¹⁰Systems Biology Markup Language

نتایج و بحث

مطالعه حاضر با هدف ساخت شبکه متابولیکی مبتنی بر ژنوم باکتری *استریپتوکوکوس بویس* دخیل در متابولیسم اسید لاکتیک در محیط شکمبه برای اولین بار صورت گرفت. در این پژوهش، مدل متابولیکی اولیه باکتری بر اساس اطلاعات کامل ژنومی آن (Kelly و همکاران، ۲۰۱۳) که از قبل توالی یابی شده بود ساخته شد. در طی فرآیند ساخت شبکه، واکنش های مورد نیاز برای پر نمودن شکاف های مدل از پایگاه داده KEGG بر اساس اطلاعات تفسیر شده ژنومی خاص ارگانسیم اضافه شدند. لازم به ذکر است که برای این واکنش ها ژن های متناظر در پایگاه IMG جستجو شدند و به مدل اضافه گردیدند. اما با وجود این هنوز مدل، شکاف هایی را شامل می شد که برای بهبود آن از مدل های متابولیکی مبتنی بر ژنوم گونه های دیگر استفاده شد و برخی از واکنش های خودبخودی و کلیدی از شبکه آنها انتخاب و به مدل اضافه شدند. همچنین در این مطالعه، چندین واکنش خاص ارگانسیم نیز که در مطالعات تجربی و آزمایشگاهی شناسایی شده بودند و در مدل وجود نداشتند به مدل اضافه گردیدند. به منظور پر نمودن شکاف های مدل ۱۳ واکنش مورد نیاز بود و اضافه شدند که برای آنها ژنی یافت نشد. در مطالعه ای که توسط Lee و همکاران (۲۰۱۴) بر روی ساخت مدل متابولیکی مبتنی بر ژنوم باکتری *ترموس ترموفیلوس* صورت گرفته است، محققان ۷۴ واکنش جدید را برای ۶۳ آنزیم به منظور بهبود شبکه اضافه نمودند. در این مطالعه پر نمودن شکاف مدل اولیه با شناسایی شواهد ژنتیکی برای آنزیم های اضافه شده ادامه یافت. از ۶۳ آنزیم اضافه شده، محققین توانستند تنها مکان های ژنی احتمالی را برای ۱۰ مورد از آنها تعیین کنند. بنابراین ۵۳ واکنش بدون ژن به مدل اضافه گردید.

تا به حال هیچ ترکیب زیست توده کاملی برای گونه *استریپتوکوکوس بویس* منتشر نشده است. از آنجایی که گونه *استریپتوکوکوس بویس* گرم مثبت بوده، از واکنش زیست توده باکتری گرم مثبت در ساخت فرمول واکنش زیست توده استفاده شد (El-Semman و همکاران، ۲۰۱۴). استفاده از فرمول

واکنش زیست توده عمومی در شبیه سازی های آنالیز موازنه شار قبلاً توسط محققین مختلف مطالعه شده است. نتایج مطالعات پژوهشگران نشان داد که استفاده از واکنش زیست توده عمومی در مدل سازی های متابولیکی مبتنی بر ژنوم به پیش بینی های مناسب متابولیکی منجر شده است (Feist و همکاران، ۲۰۰۷؛ Puchalka, Becker and Palsson, 2005 و همکاران، ۲۰۰۸). مثلاً Becker و Palsson (۲۰۰۵) برای ساخت شبکه متابولیکی مبتنی بر ژنوم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس N315* فرمول واکنش زیست توده را بر اساس نوع گرم باکتری ها (مثبت و منفی) انتخاب نمودند. در مطالعه ایشان، تولید نسبی متابولیت های مورد نیاز برای رشد از فرمول زیست توده باکتری *باسیلوس سابیتیلیس* اقتباس شده است (Dauner and Sauer, 2001).

در مطالعه حاضر، مدل باکتری *استریپتوکوکوس بویس* تحت عنوان iStr472 نامیده شد. i از کلمه *In silico* Str از نام باکتری مورد نظر و ۴۷۲ از شمار ژن های مدل بر گرفته شده است. مدل iStr472 شامل ۶۹۴ واکنش، ۶۲۶ متابولیت و ۴۷۲ ژن می باشد. تعداد ژن های متابولیک این مدل ۲۷/۶ درصد از کل تعداد ژن های رمزگذارنده را شامل گردید. در این مطالعه مدل ساخته شده توسط پایگاه SEED (ModelSEED) با مدل ساخته شده در مطالعه حاضر مقایسه گردید. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، شمار واکنش ها، ژن ها و متابولیت ها در مدل ساخته شده ModelSEED بیشتر از مدل iStr472 می باشد. نتایج نشان داد که مدل iStr472 از دقت و صحت بالاتری نسبت به مدل ساخته شده ModelSEED برخوردار است. اعتبار و صحت بیشتر مدل ساخته شده نسبت به ModelSEED به این دلیل است که مدل ها در پایگاه SEED به طور خودکار از روی اطلاعات ژنوم ساخته می شوند و هیچگونه بهبودبخشی بر روی آنها صورت نمی گیرد.

جدول ۲- خصوصیات مدل iStr472 و مدل ساخته شده توسط ModelSEED

توصیف مدل ها	استرپتوکوکوس بویس B315	
	iStr472	مدل اولیه Seed
واکنش ها	۶۹۴	۸۵۲
متابولیت ها	۶۲۶	۸۱۳
ژن ها	۴۷۲	۵۵۷
واکنش های فاقد ژن		
واکنش های تبادل	۵۵	
واکنش های انتقال	۴۰	
واکنش های خودبخودی	۱	
واکنش های پرشده	۱۳	
ژن های رمز گذارنده	۱۷۱۱	

فروکتوز را دارا می باشد. با وجود اینکه FBA برای ساخت و اعتبارسنجی مدل مورد استفاده قرار گرفت، اما محدودیت هایی را نیز در بر می گیرد. FBA از پارامترهای کینتیک استفاده نمی کند و همچنین قادر نیست که غلظت های متابولیتی را پیش بینی کند. این آنالیز تنها برای تعیین شارها در وضعیت ثابت طراحی شده است. جز در شکل های تغییر یافته، FBA اثرات تنظیمی از قبیل فعال سازی آنزیم ها توسط پروتئین کینازها یا تنظیم بیان ژن را در نظر نمی گیرد (Orth و همکاران، ۲۰۱۰).

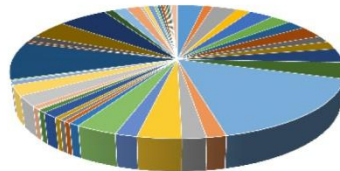
آنالیز توپولوژی شبکه های متابولیک می تواند در درک این موضوع که چگونه متابولیت ها و روابط متقابلشان عملکرد متابولیکی آنها را در سلول ها تعیین می کنند، مفید باشد (Triana و همکاران، ۲۰۱۴). شبکه های متابولیک به عنوان یک گراف متابولیتی در برگیرنده گره ها (متابولیت ها) و اتصالات (واکنش ها) نمایان می شوند. درجه اتصال به صورت شمار ممکن واکنش هایی که یک متابولیت در آن مشارکت می کند تعریف می شود، که این متابولیت ها اصطلاحاً متابولیت های به شدت متصل نامیده می شوند (Barabasi and Oltvai, 2004). در پژوهش حاضر، توزیع متابولیتی با فراوانی بالا در واکنش های مدل مطالعه گردید و در کنار چندین مدل متابولیکی دیگر شامل باکتری /شریشیاکلی (Feist و همکاران، ۲۰۰۷)، سینه کوکوس /الانگاتوس (Triana و همکاران، ۲۰۱۴)، بیفیدوباکتریوم /ادولستیس و فکالیباکتریوم پرازینتری (El-Semman و همکاران، ۲۰۱۴) نمایش داده شد (شکل ۲). همانطور که در شکل مشخص است، اتصال متابولیتی آب در شبکه های متابولیکی باکتری های گرم منفی بالاتر است. نقش آن به عنوان سوستر یا محصول در واکنش ها، از قبیل اکسیداسیون و احیا، هیدرولیز و غلظت به خوبی شناخته شده است (Triana و همکاران، ۲۰۱۴). در تحقیق حاضر (شکل ۲)، ۱۶ متابولیت به شدت متصل شامل Ammonium , Phosphate , H_2O , H^+ , ATP , ADP , Diphosphate , NADH , NAD^+ , Pyruvate , CO_2 , NADP^+ , NADPH , Coenzyme A و AMP و L-Glutamate در مدل iStr472 شناسایی گردید. این متابولیت

شکل ۱ پراکندگی واکنش های موجود در شبکه متابولیکی مبتنی بر ژنوم باکتری را نشان می دهد. همانطور که در شکل مشخص است، بیشترین واکنش ها در متابولیسم نوکلئوتیدها دخیل هستند. واکنش های دیگر مدل شامل واکنش های انتقال و تبادل بوده و در شکل نمایش داده نشده اند.

در این مطالعه، توانایی های پایه مدل iStr472 با استفاده از روش FBA مورد ارزیابی قرار گرفتند. این روش که بر اساس مدل سازی مبتنی بر محدودیت است به منظور پیش بینی کمی رشد تحت شرایط متابولیکی مختلف به کار برده شد. از آنجایی که در محیط شکمبه گلوکز ماده غذایی اولیه است که در اختیار باکتری استرپتوکوکوس بویس قرار می گیرد و همچنین این باکتری قادر است از این سوستر به عنوان منبع کربنی برای رشد استفاده کند، مدل بر اساس مصرف یک میلی مول گلوکز به عنوان منبع کربنی برای رشد تثبیت شد. میزان بهینه رشد iStr472 به ازای مصرف یک میلی مول گلوکز به عنوان منبع کربنی برابر با ۰/۰۵۲ حاصل شد. مدل iStr472 واکنش هایی را برای متابولیسم کربن مرکزی دارا می باشد و قادر است از منبع کربنی دیگر به غیر از گلوکز استفاده کند. نتایج نشان دادند که مدل iStr472 توانایی مصرف

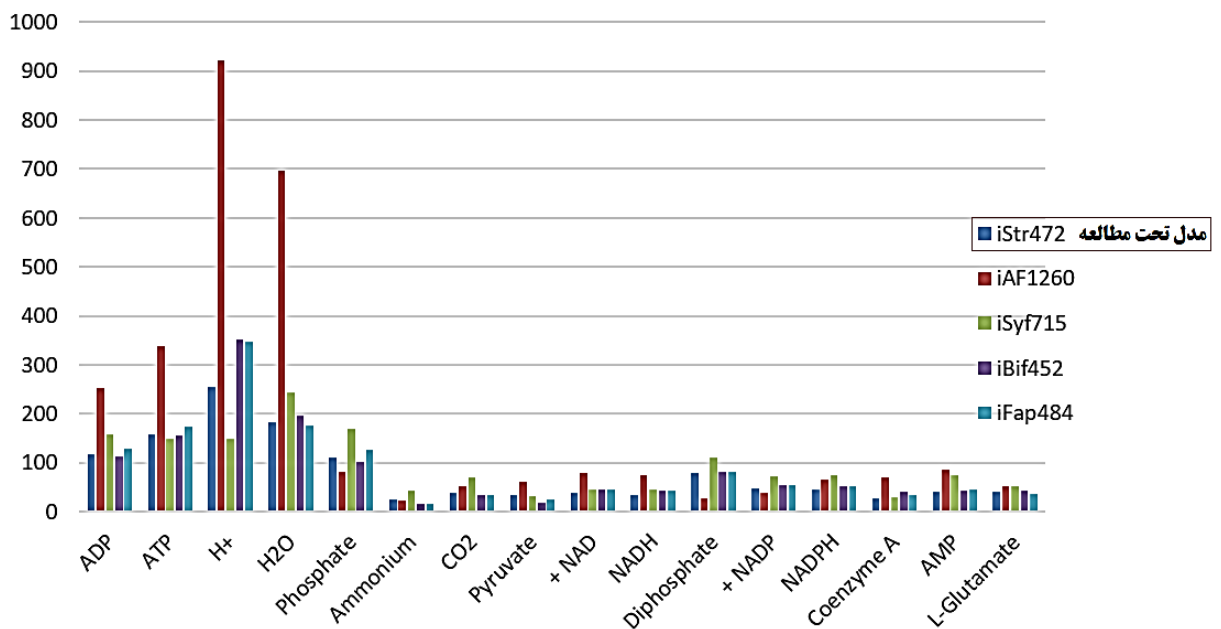
مثل گروه های فسفات، اکی والان های اکسیداسیون و احیا، گروه های آمینو و گروه های استیل نقش ایفا می کنند (Klanhui و همکاران، ۲۰۱۲).

ها که با فراوانی بالا در شبکه مورد استفاده قرار می گیرند، در متابولیسم انرژی از قبیل ATP و ADP و همچنین در متابولیسم اکسیداسیون و احیا از قبیل NADPH و NADP دخیل هستند. این قطب های متابولیکی به عنوان ترکیبات کلیدی مرتبط با متابولیسم مرکزی ارگانیسم در انتقال گروه های بیوشیمیایی خاص



- Glycolysis pathway
- Citrate cycle (TCA cycle)
- Pyruvate metabolism
- Pentose phosphate pathway
- Alanine, aspartate and glutamate metabolism
- Glycine, serine and threonine metabolism
- Arginine and proline metabolism
- Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
- Histidine metabolism
- Lysine biosynthesis
- Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis
- Cysteine and methionine metabolism
- Nucleotide (Purine and Pyrimidine metabolism)
- Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
- Terpenoid backbone biosynthesis
- Cell Wall

شکل ۱- پراکندگی واکنش های مدل در مسیرهای متابولیکی مختلف.



شکل ۲- توزیع متابولیت های با فراوانی بالا در واکنش های مدل های متابولیکی مبتنی بر ژنوم.

برآوردهای مدل iStr472 در وضعیت ثابت محیطی بدست آمده است، به طوری که هیچگونه شرایط محدودکننده محیطی برای مدل اعمال نشده است. اما در شرایط طبیعی اکوسیستم شکمبه عوامل محیطی زیادی وجود دارند که بر رفتار مدل اثر می گذارند، نظیر pH خارج سلولی که اثر فوق العاده ای بر پیش بینی های رفتار متابولیسی باکتری دارد. مدل های متابولیسی برخی از باکتری های اسید لاکتیک برای تولید لاکتات مورد مطالعه قرار گرفته اند و نتایج نشان داده است که این مدل ها نیز در پیش بینی تولید لاکتات ناتوان بوده اند (Teusink و همکاران، ۲۰۱۱). مثلاً برای غلبه بر این مسئله، Oliveira و همکاران (۲۰۰۵) واکنش پیرووات فورمات لیز را محدود کردند به یک بازه مقداری تا تولید لاکتات را در مدل متابولیسی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس^{۱۴} مورد مطالعه قرار دهند.

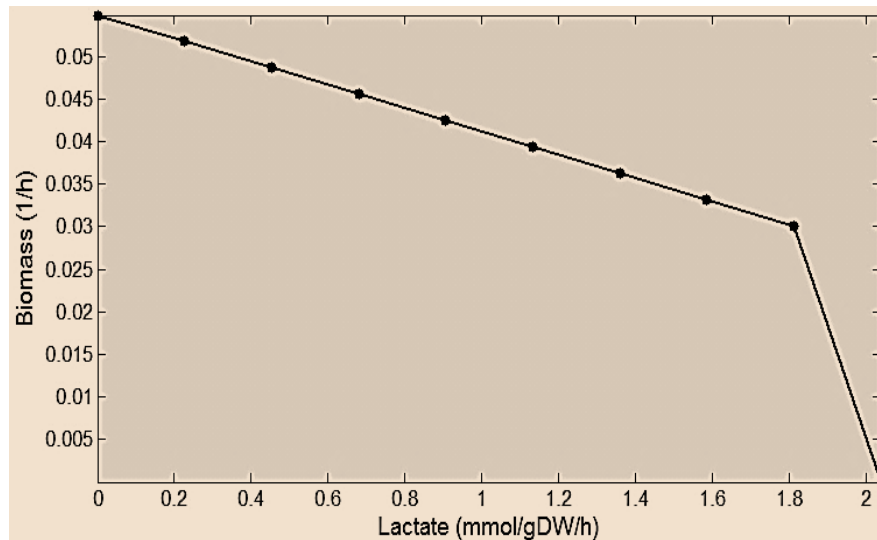
به منظور آزمودن اثرگذاری تولید متابولیت لاکتات بر تولید زیست توده باکتری، آنالیز استواری بر روی مدل انجام شد. شکل ۳ اثر تولید لاکتات را بر زیست توده مدل زمانی که زیست توده به عنوان تابع هدف در نظر گرفته شد نشان می دهد. همانطور که در شکل مشخص است، مدل بیشترین مقدار زیست توده را زمانی بدست آورد که هیچ لاکتاتی تولید نشد. به عبارت دیگر با افزایش تولید لاکتات میزان تولید زیست توده کاهش یافت. زمانی که تولید لاکتات در مدل حدوداً نزدیک به ۲ میلی مول شد، میزان تولید زیست توده با افت ناگهانی صفر گردید.

زمانی که رابطه تولید لاکتات با تولید متابولیت های استات، اتانول و فورمات در مدل بررسی شد، آشکار گردید که با افزایش تولید لاکتات، میزان تولید استات، اتانول و فورمات کاهش می یابد. در مدل، تولید متابولیت های استات و اتانول الگوی مشابهی را نشان می دهند (شکل ۴). از آنجایی که نهایتاً استیل کوآنزیم آ به استات و اتانول تبدیل می شود (Russell and Hino, 1985)، روند تولیدی این دو متابولیت در مدل مشابه می باشد.

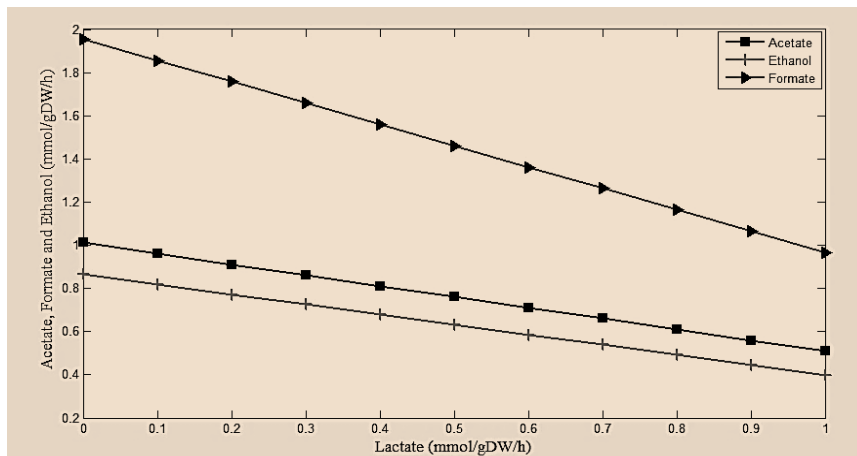
اثر حذف هر یک از واکنش ها به طور انفرادی بر روی رشد میکروب ها از طریق FBA مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیز حذف واکنش های مدل نشان داد که ۱۲۶ واکنش در این مدل وجود دارند که در صورت حذف آنها رشد مدل صفر می گردد. این تعداد واکنش ۱۸/۱۶ درصد از کل واکنش های شبکه متابولیسی باکتری را به خود اختصاص می دهد. همچنین نتایج آشکار کرد که کل واکنش های برخی از مسیرهای متابولیسی برای رشد مورد نیاز می باشند. این مسیرها شامل Histidine Phenylalanine, tyrosine and metabolism tryptophanbiosynthesis (به استثناء یک واکنش) و Arginine and proline metabolism (به استثناء دو واکنش) می باشند.

زمانی که واکنش تولید زیست توده در مدل بهینه گردید، متابولیت لاکتات تولید نشد. در صورتی که باکتری استریپتوکوکوس بویس در شرایط درون تنی متابولیت های لاکتات، استات، فورمات و اتانول را تولید می کند. نکته قابل توجه در رفتار مدل این است که زمانی که مدل برای تولید استات به میزان ۰/۸ میلی مول به ازای مصرف ۱ میلی مول گلوکز محدود گردید، میزان رشد کاهش یافت و لاکتات به میزان ۰/۱۶ میلی مول تولید گردید. در پژوهش حاضر سعی شد که تولید لاکتات با تغییرات حد بالا و پایین برخی از واکنش ها آزمون گردد. زمانی که حد بالا و پایین واکنش تبادل استات برابر با صفر در نظر گرفته شد، لاکتات به میزان ۱/۸۷ میلی مول، اتانول به میزان ۰/۰۶ و فورمات به میزان ۰/۱ تولید شد. ارزشی برابر با ۰/۰۲۷ برای تابع هدف زیست توده محاسبه گردید. همچنین زمانی که حد بالا و پایین واکنش تبادل فورمات برابر با صفر در نظر گرفته شد، لاکتات به میزان ۱/۹۴ میلی مول تولید گردید و تولید اتانول و فورمات متوقف شد. زمانی که مدل محدود شد که ۱ میلی مول لاکتات را به ازای مصرف ۱ میلی مول گلوکز تولید کند، مقدار تابع هدف زیست توده برابر با ۰/۳۸۸ محاسبه شد. در این حالت، مدل به ازای مصرف هر میلی مول گلوکز ۰/۵ میلی مول استات، ۰/۳۹ میلی مول اتانول و ۰/۹۷ میلی مول فورمات تولید کرد.

¹⁴Lactococcuslactis



شکل ۳- اثر تولید لاکتات بر تولید زیست توده باکتری استرپتوکوکوس بویس.



شکل ۴- اثر تولید لاکتات بر تولید استات، فورمات و اتانول در باکتری استرپتوکوکوس بویس.

نتیجه گیری

بینی مدل نشان داد که تولید زیست توده باکتری تحت تأثیر لاکتات قرار می گیرد. با توجه به اینکه مطالعه حاضر در نوع خود جزء اولین مطالعات زیست شناسی سامانه ها در زمینه میکروبی های شکمبه به شمار می رود، بستری را فراهم می سازد تا از طریق آن بتوان زمینه تحقیقاتی بیشتری را در این حوزه ایجاد کرد. از مدل بازسازی شده می توان به عنوان چهارچوبی برای ساخت مدل های متابولیسی سوبه های دیگر و همچنین تکمیل و بهبود مدل موجود استفاده نمود.

در پژوهش حاضر برای اولین بار مدل متابولیسی مبتنی بر ژنوم باکتری استرپتوکوکوس بویس بر اساس توالی کامل ژنومی آن ساخته شد. شبکه متابولیسی این باکتری، ۶۹۴ واکنش، ۶۲۶ متابولیت و ۴۷۲ ژن را شامل گردید. پراکندگی واکنش های شبکه نشان داد که بیشترین تعداد واکنش ها در مسیر متابولیسی نوکلئوتیدها قرار دارند. ۱۶ متابولیت به شدت متصل در مدل شناسایی شد. ۱۲۶ واکنش حیاتی در مدل شناسایی شد که در صورت حذف آنها رشد مدل صفر می گردد. نشان داده شد که مدل قادر است از فروکتوز نیز به عنوان سوبسترا استفاده کند. پیش

- Ates, O., Oner, E.T. and Arga, K.Y. (2011). Genome-scale reconstruction of metabolic network for a halophilic extremophile, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043. *BMC Systems Biology*. 5(1), 12.
- Barabasi, A.L. and Oltvai, Z.N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews. Genetics*. 5: 101-113.
- Becker, S.A. and Palsson, B.O. (2005). Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Staphylococcus aureus* N315: an initial draft to the two-dimensional annotation. *BMC microbiology*. 5: 8.
- Becker, S.A., Feist, A.M., Mo, M.L., Hannum, G., Palsson, B.O. and Herrgard, M.J. (2007). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. *Nature protocols*. 2: 727-738.
- Chung, B.K., Selvarasu, S., Andrea, C., Ryu, J., Lee, H., Ahn, J., Lee, H. and Lee, D.Y. (2010). Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement. *Microbial Cell Factories*. 9: 50.
- Dauner, M. and Sauer, U. (2001). Stoichiometric growth model for riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 76: 132-143.
- Del Rio, G., Koschutski, D. and Coello, G. (2009). How to identify essential genes from molecular networks?. *BMC systems biology*. 3: 102.
- El-Semman, I.E., Karlsson, F.H., Shoaie, S., Nookaew, I., Soliman, T.H. and Nielsen, J. (2014). Genome-scale metabolic reconstructions of *Bifidobacterium adolescentis* L2-32 and *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 and their interaction. *BMC systems biology*. 8: 41.
- Feist, A.M. and Palsson, B.O. (2008). The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*. 26: 659-667.
- Feist, A.M., Henry, C.S., Reed, J.L., Krummenacker, M., Joyce, A.R., Karp, P.D., Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V. and Palsson, B.O. (2007). A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Molecular Systems Biology*. 3, 121.
- Gianchandani, E.P., Chavali, A.K. and Papin, J.A. (2010). The application of flux balance analysis in systems biology. *Wiley interdisciplinary reviews, Systems biology and medicine*. 2: 372-382.
- Henry, C.S., DeJongh, M., Best, A.A., Frybarger, P.M., Linsay, B. and Stevens, R.L. (2010). High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nature biotechnology*. 28: 977-982.
- Hungate, R.E., Dougherty, R.W., Bryant, M.P. and Cello, R.M. (1952). Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. *The Cornell Veterinarian*. 42(4): 423-449.
- Jouany, J.P. (2006). Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Animal Reproduction Science*. 96: 250-264.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y. and Hattori, M. (2004). The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*. 32: D277-280.
- Kelly, W., Huntemann, M., Han, J., Chen, A., Kyrpides, N., Mavromatis, K., Markowitz, V., Palaniappan, K., Ivanova, N., Schaumberg, A., Pati, A., Liolios, K., Nordberg, H.P., Cantor, M.N., Hua, S.X. and Woyke, T. (2013). *Streptococcus equinus* B315, whole genome shotgun sequencing. Submitted (02-JUL-2013) DOE Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA 94598-1698, USA.
- Kjeldsen, K. R. and Nielsen, J. (2009). In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnology and Bioengineering*. 102(2): 583-597.
- Klanchui, A., Khannapho, C., Phodee, A., Cheevadhanarak, S. and Meechai, A. (2012). iAK692: a genome-scale metabolic model of *Spirulina platensis* C1. *BMC systems biology*. 6: 71.
- Lee, N.R., Lakshmanan, M., Aggarwal, S., Song, J.W., Karimi, I.A., Lee, D.Y. and Park, J.B. (2014). Genome-scale metabolic network reconstruction and in silico flux analysis of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *Microbial cell factories*. 13: 61.
- Liu, L., Agren, R., Bordel, S. and Nielsen, J. (2010). Use of genome-scale metabolic models for understanding microbial physiology. *FEBS Letters*. 584(12): 2556-2564.
- Markowitz, V.M., Chen, I.M., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N.N. and Kyrpides, N.C. (2012). IMG: the Integrated Microbial Genomes

- database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Research*. 40(Database issue): D115-122.
- Marounek, M. and Bartos, S. (1987). Interactions between rumen amylolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. *Journal of Applied Bacteriology*. 63: 233-238.
- Martelli, C., De Martino, A., Marinari, E., Marsili, M. and Perez Castillo, I. (2009). Identifying essential genes in *Escherichia coli* from a metabolic optimization principle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 2607-2611.
- McCloskey, D., Palsson, B.O. and Feist, A.M. (2013). Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Molecular systems biology*. 9: 661.
- Mo, M.L., Palsson, B.O. and Herrgard, M. J. (2009). Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. *BMC Systems Biology*. 3: 37.
- Navid, A. (2011). Applications of system-level models of metabolism for analysis of bacterial physiology and identification of new drug targets. *Briefings in functional genomics*. 10: 354-364.
- Nielsen, J. and Vidal, M. (2010). Systems biology of microorganisms. *Current opinion in microbiology*. 13: 335-336.
- Oberhardt, M.A., Puchalka, J., Fryer, K.E., Martins dos Santos, V.A. and Papin, J.A. (2008). Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. 190(8): 2790-2803.
- Oh, Y.K., Palsson, B.O., Park, S.M., Schilling, C.H. and Mahadevan, R. (2007). Genome-scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data. *Journal of Biological Chemistry*. 282(39): 28791-28799.
- Oliveira, A.P., Nielsen, J. and Forster, J. (2005). Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC microbiology*. 5: 39-39.
- Orth, J.D., Thiele, I. and Palsson, B.O. (2010). What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*. 28: 245-248.
- Palsson, B.O. (2006). *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*: Cambridge University Press.
- Puchalka, J., Oberhardt, M.A., Godinho, M., Bielecka, A., Regenhardt, D., Timmis, K.N., Papin, J.A. and Martins dos Santos, V.A. (2008). Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS computational biology*. 4: e1000210.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E. et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464: 59-65.
- Romero-Hernández, B., del Campo, R. and Canton, R. (2013). *Streptococcus bovis*, situación taxonómica, relevancia clínica y sensibilidad antimicrobiana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31: 14-19.
- Russell, J.B. and Hino, T. (1985). Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *Journal of Dairy Science*. 68(7): 1712-1721.
- Stelling, J., Klamt, S., Bettenbrock, K., Schuster, S. and Gilles, E.D. (2002). Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. *Nature*. 420: 190-193.
- Teusink, B., Bachmann, H. and Molenaar, D. (2011). Systems biology of lactic acid bacteria: a critical review. *Microbial cell factories*. 10 Suppl 1: S11.
- Thiele, I. and Palsson, B.O. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*. 5: 93-121.
- Triana, J., Montagud, A., Siurana, M., Fuente, D., Urchueguia, A., Gamermann, D., Torres, J., Tena, J., de Cordoba, P.F. and Urchueguia, J.F. (2014). Generation and evaluation of a genome-scale metabolic network model of *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Metabolites*. 4: 680-698.
- Woelders, H., Te Pas, M.F., Bannink, A., Veerkamp, R.F. and Smits, M.A. (2011). Systems biology in animal sciences. *Animal*. 5: 1036-1047.
- Wooley, J.C., Godzik, A. and Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *Plos Computational Biology*. 6(2): e1000667.
- Xue, y. (2011). Development of Microecologic Preparation for Subacute Ruminant Acidosis of Beef Cattle and Its Effects. *Jilin University*.