Functional Breakdown of *Azotobacter vinelandii* Respiratory Chain (with Terminal Oxidases bd, cbb_3, and aa_3-like) and its Effect on Growth using Flux Balance Analysis

Raheleh Ahmadi[1] & Fereshteh Naeimpoor[2*]

[1] M.Sc. Student of Chemical Engineering, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran
[2] Associate Professor of Chemical Engineering, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran

Corresponding author: fnaeim@iust.ac.ir

Abstract

Biological nitrogen fixation (diazotrophy) in aerobes is an issue due to the sensitivity of nitrogenase enzyme to oxygen. In this study, the respiratory system of *Azotobacter vinelandii* and its effects on growth, nitrogen fixation, and respiratory protection of nitrogenase were investigated by reconstructing two models (respiratory and growth) and applying flux balance analysis. Simulation of the respiratory system revealed a progressive increase in energy-conservation efficiency across the terminal oxidases in the order of bd, cbb_3 , and aa_3-like. In growth simulations performed with succinate uptake constrained at 3.5 mmol gDW^{-1} h^{-1}, the bd pathway resulted in the lowest specific growth rate (0.125 h^{-1}) and the highest oxygen uptake rate (6.168 mmol gDW^{-1} h^{-1}). In contrast, activation of the aa_3-like pathway yielded the highest specific growth rate (0.157 h^{-1}) and the lowest oxygen uptake rate (4.608 mmol gDW^{-1} h^{-1}). The elevated oxygen consumption associated with the bd pathway led to reduced growth rate while enhancing respiratory protection of nitrogenase. Within the constraints of the model, the distinct performance of the terminal oxidases reflects a trade-off among oxygen consumption, energy-conservation efficiency, and the availability of carbon substrates and reducing equivalents within the metabolic network.

Keywords: *Azotobacter vinelandii*; respiratory system; metabolic model; flux balance analysis; electron transport chain

بررسی تفکیکی عملکرد زنجیره تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* (با اکسیدازهای انتهایی bd، cbb_3 و aa_3-like) و اثر آن بر رشد با روش تحلیل موازنه شار

راحله احمدی[1] و فرشته نعیم‌پور[2*]

۱- دانشجوی ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران

۲- دانشیار مهندسی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران

پیام‌نگار: fnaeim@iust.ac.ir

چکیده

تثبیت نیتروژن (دیازوتروفی) در باکتری‌های هوازی به دلیل حساسیت آنزیم نیتروژناز به اکسیژن بسیار چالش برانگیز است. در این پژوهش، عملکرد سیستم تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* و اثر آن بر رشد، تثبیت نیتروژن و حفاظت تنفسی از نیتروژناز با بازسازی دو مدل (تنفس و رشد) و استفاده از تحلیل موازنه شار بررسی شدند. شبیه‌سازی سیستم تنفسی، افزایش بازده انرژی به‌ترتیب با اکسیدازهای انتهایی bd، cbb_3 و aa_3-like را نشان داد. در شبیه‌سازی رشد روی سوکسینات ($3/5\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) و در بین اکسیدازها، مسیر bd منجر به کمترین رشد ($0/125\ h^{-1}$) و بیشترین مصرف اکسیژن ($6/168\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) گردید، درحالی‌که بیشترین رشد ($0/157\ h^{-1}$) و کمترین مصرف اکسیژن ($4/608\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) با مسیر aa3-like بود. مصرف بالاتر اکسیژن در مسیر bd، باعث رشد کمتر ولی حفاظت بیشتر از آنزیم نیتروژناز می‌شود. در چارچوب قیود مدل، تفاوت عملکرد اکسیدازهای انتهایی حاصل موازنه میان مصرف اکسیژن، بازده انرژی‌زایی و دسترسی شبکه به کربن و عوامل احیاکننده است.

کلید واژگان: *ازتوباکتر وینلاندی*، سیستم تنفسی، مدل متابولیکی، تحلیل موازنه شار، سیستم انتقال الکترون

[*] تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده مهندسی شیمی نفت و گاز، آزمایشگاه بیوتکنولوژی

۱. مقدمه

تثبیت زیستی نیتروژن فرایندی است که طی آن برخی میکروارگانیسم‌های پروکاریوتی موسوم به دیازوتروف‌ها، نیتروژن مولکولی (N_2) را به آمونیاک تبدیل می‌کنند و از این طریق نیتروژن قابل‌استفاده را برای سامانه‌های زیستی فراهم می‌سازند [۱, ۲]. این فرایند یکی از اجزای کلیدی چرخه نیتروژن است و نقش مهمی در حفظ حاصلخیزی خاک و بهره‌وری سامانه‌های کشاورزی دارد. با توجه به هزینه بالای تولید کودهای نیتروژنی و پیامدهای زیست‌محیطی ناشی از مصرف آن‌ها، شناخت سازوکارهای تثبیت زیستی نیتروژن اهمیت ویژه‌ای دارد. احیای N_2 به آمونیاک توسط آنزیم نیتروژناز انجام می‌شود و فرایندی پرهزینه از نظر انرژی است که به مصرف حداقل ۱۶ مول آدنوزین تری‌فسفات[۱](ATP) به‌ازای هر مول N_2 نیاز دارد [۳].

$$16\,\mathrm{AT}P + 8\,H^+ + 8\,e^- + N_2 \longrightarrow 16\,ADP + 2\,NH_3 + H_2 + 16\,Pi \qquad (1)$$

این آنزیم به دلیل ماهیت فلزی-پروتئینی خود به اکسیژن (O_2) حساس است و در حضور O_2 می‌تواند از نظر ساختاری و عملکردی غیرفعال شود [۱, ۲, ۴]. بنابراین، دیازوتروف‌ها برای حفظ فعالیت نیتروژناز از سازوکارهای مختلفی مانند جداسازی مکانی، جداسازی زمانی، تولید اگزوپلی‌ساکاریدهایی مانند آلژینات و تشکیل کمپلکس‌های حفاظتی نظیر کمپلکس شتنا[۲] و کاهش مقدار O_2 از طریق تنفس سریع آن استفاده می‌کنند [۴, ۵]. در دیازوتروف‌های هوازی مانند *ازتوباکتر وینلاندی*[۳]، شاخه‌های تنفسی و سیتوکروم اکسیدازها می‌توانند با کاهش O_2 در محیط اطراف آنزیم نیتروژناز، به ایجاد یک میکرومحیط کم‌اکسیژن کمک کنند [۶-۸].

ازتوباکتر وینلاندی یکی از دیازوتروف‌های خاکزی است که با وجود حساسیت نیتروژناز به O_2، قادر به تثبیت N_2 در شرایط هوازی است. زنجیره تنفسی این میکروارگانیسم شامل اکسیداز انتهایی bd و اکسیدازهای وابسته به سیتوکروم c است [۱, ۶, ۹]. مصرف سریع O_2 در زنجیره انتقال الکترون یکی از مهم‌ترین سازوکارهای محافظت از آنزیم نیتروژناز در شرایط هوازی در این باکتری است [۶, ۸]. بررسی فیزیولوژی تنفسی این باکتری نشان داده است که نرخ بالای تنفس، می‌تواند در ایجاد شرایط میکروهوازی درون‌سلولی کمک کند [۱۰]. مسیر اکسیداز انتهایی bd به‌عنوان اکسیدازی با بازده پروتونی کمتر، اما توان پشتیبانی از نرخ بالای تنفس و مصرف O_2 در پاسخ به تنش O_2 شناخته شده است [۶, ۸, ۱۲, ۱۸]. در مقابل، اکسیدازهای وابسته به سیتوکروم c (از جمله cbb_3 و aa_3-like) از نظر بازده انرژی و سازگاری با شرایط اکسیژنی ویژگی‌های متفاوتی دارند [۶, ۱۱]. سیتوکروم اکسیداز cbb_3 در میکروارگانیسم‌های مختلف دارای میل ترکیبی بالایی نسبت به O_2 بوده و در شرایط میکروهوازی فعال می‌شود و این ویژگی آن را به یک اکسیداز سازگار با محیط‌های با O_2کم تبدیل می‌کند [۶, ۱۳]. نتایج این مطالعات نشان می‌دهند که سیستم تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* ارتباط

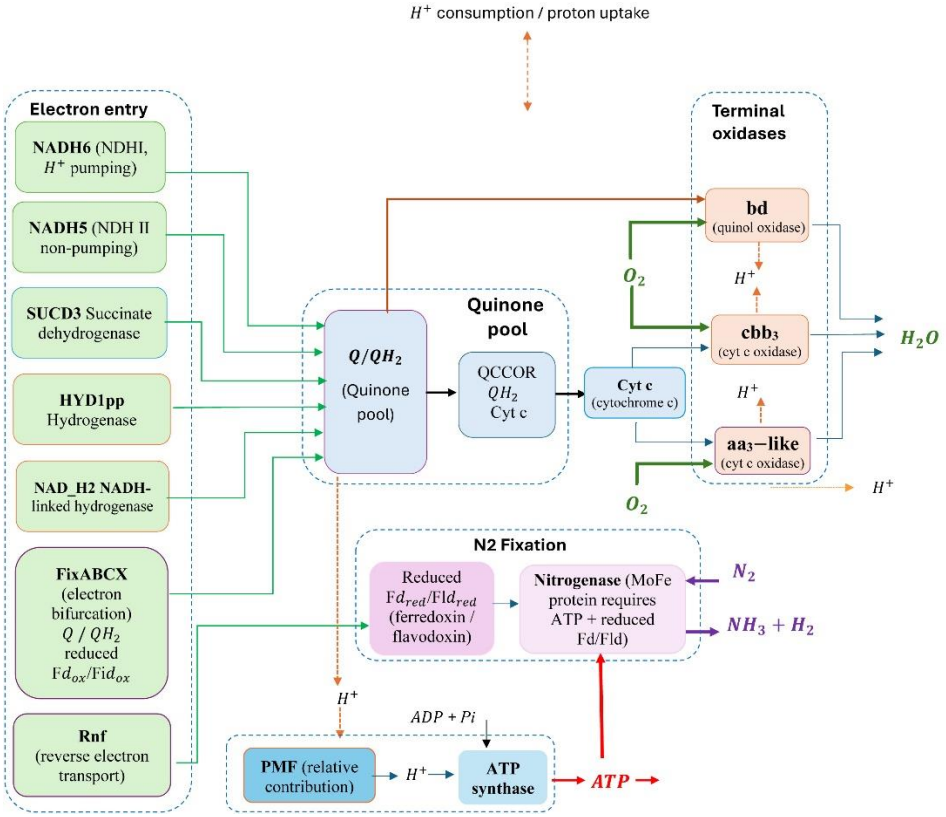
[۱] Adenosine triphosphate

[۲] Shethna

[۳] *Azotobacter vinelandii*

نزدیکی با حفظ فعالیت نیتروژناز دارد. در این حالت، زنجیره تنفسی فقط نقش تولید انرژی را ندارد، بلکه به‌عنوان بخشی از سازوکار حفاظت از نیتروژناز نیز عمل می‌کند [۱, ۶, ۸].

شکل ۱ شماتیکی از سیستم‌های مختلف تنفسی (اکسیدازهای انتهایی)، تثبیت N_2 و تولید انرژی از طریق نیروی محرکه پروتونی (PMF)[۱] به‌همراه مسیرهای مختلف ورود عوامل احیاکننده به زنجیره تنفسی و مسیر تامین الکترون‌های کم‌پتانسیل برای فعالیت آنزیم نیتروژناز در *ازتوباکتر وینلاندی* را نشان می‌دهد.



شکل ۱: ارتباط عملکردی مصرف O_2، تولید انرژی و پشتیبانی از فعالیت نیتروژناز در *ازتوباکتر وینلاندی* به‌همراه مسیرهای برخی از عوامل احیاکننده ورودی به زنجیره تنفسی، اکسیدازهای انتهایی و ایجاد PMF و مسیر تامین الکترون‌های کم‌پتانسیل برای تثبیت نیتروژن. شناسه‌ها مطابق جدول ۱

Figure 1. Functional interplay among O_2 consumption, energy conservation, and the maintenance of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*, including selected pathways for the entry of reducing equivalents into the respiratory chain, terminal oxidases, proton-motive force generation, and the supply of low-potential electrons required for nitrogen fixation. Reaction identifiers correspond to those listed in Table 1.

الکترون‌ها می‌توانند از مسیرهای مختلفی مانند NADH-دهیدروژناز پمپ‌کننده (NADH6) و غیرپمپ‌کننده پروتون (NADH5)، سوکسینات دهیدروژناز (SDH) و هیدروژنازها (HYD, NDH-H_2) وارد مخزن کوئینون/کوئینول (Q/QH_2) شوند و سپس از طریق شاخه‌های تنفسی متفاوت به اکسیدازهای انتهایی برسند [۶, ۱۱]. در انتهای این مسیرها، O_2 به آب (H_2O) احیا می‌شود و با مصرف O_2 شرایط مناسب‌تری برای حفظ

[۱] Proton-motive Force

فعالیت نیتروژناز ایجاد می‌شود. هم‌زمان، انتقال الکترون در زنجیره تنفسی به ایجاد PMF و در نتیجه تولید ATP کمک می‌کند موضوعی که برای نیتروژناز، به دلیل نیاز بالای آن به انرژی، اهمیت زیادی دارد. از سوی دیگر، کمپلکس‌های آنزیمی مانند Fix و Rnf می‌توانند در تامین و تنظیم الکترون‌های کم‌پتانسیل مورد نیاز نیتروژناز نقش داشته باشند و از این طریق بخشی از ارتباط میان زنجیره تنفسی، تعادل اکسایش-کاهش سلول و تثبیت N_2 را برقرار کنند [۱۶-۱۴].

اگر چه مصرف O_2 نشان‌دهنده فعالیت مسیرهای تنفسی و انتقال الکترون به اکسیدازهای انتهایی است، تفاوت میان اکسیدازها فقط به مقدار مصرف O_2 مربوط نیست، بلکه مسیر دریافت الکترون و میزان مشارکت هر مسیر در ایجاد PMF نیز اهمیت دارد [۱۷, ۱۸]. تنفس از یک طرف با مصرف O_2 در حفاظت از نیتروژناز مشارکت دارد و از طرف دیگر با تولید ATP و تنظیم جریان الکترون، شرایط لازم برای ادامه فعالیت این آنزیم را فراهم می‌کند. منظور از تغییر توزیع الکترون یا عوامل احیاکننده، تغییر شار واکنش‌هایی است که متابولیت‌هایی مانند نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید احیاشده (NADH)، کوئینول (QH_2)، فرودوکسین احیاشده (Fd_{red}) و هیدروژن (H_2) را تولید یا مصرف می‌کنند.

با توجه به پیچیدگی تعامل میان مصرف O_2، تولید انرژی و تثبیت N_2، رویکردهای مدل‌سازی مبتنی بر قیود[۱] ابزار مناسبی برای تحلیل کمی این سامانه بوده و توسط برخی محققین مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از رویکردهای کمی برای مطالعه متابولیسم *ازتوباکتر وینلاندی* پیش از توسعه مدل‌های ژنوم‌مقیاس آغاز شد. کاستیلو و همکاران[۲] (۲۰۱۳) با تحلیل شار متابولیکی (MFA)[۳]، اثر هوادهی را بر توزیع شارهای متابولیسم مرکزی و تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB)[۴] و آلژینات بررسی کردند [۱۹]. اینومورا و همکاران[۵] (۲۰۱۷) نیز با ارائه یک مدل مکانیسمی مبتنی بر موازنه کربن، نیتروژن، الکترون و انرژی، هزینه‌های متابولیکی تثبیت N_2 و حفاظت تنفسی را بررسی کردند [۲۰]. این مدل در مطالعه بعدی اینومورا و همکاران (۲۰۱۸) توسعه یافت و در قالب مدلی شامل ۳۳ واکنش و ۱۷ متابولیت، استفاده از N_2 و آمونیوم را در شرایط مختلف دسترسی به کربن، نیتروژن و O_2 ارزیابی کرد [۳۳]. در همان سال، گارسیا و همکاران[۶] (۲۰۱۸) با استفاده از MFA و شبکه‌ای شامل ۴۶ واکنش و ۳۹ متابولیت، اثر O_2 را بر شارهای متابولیسم مرکزی، موازنه اکسایش-کاهش و تولید PHB و آلژینات ارزیابی کردند [۲۱]. وو و همکاران[۷] (۲۰۱۹) نیز با با استفاده از تحلیل شار متابولیکی مبتنی بر کربن-۱۳ (C^{13}-MFA) ارتباط میان متابولیسم مرکزی و تثبیت N_2 را بررسی کردند و نشان دادند که افزایش فعالیت نیتروژناز با افزایش نیاز به انرژی و عوامل احیاکننده و تغییر شارهای متابولیکی همراه است [۲۲].

---

۱ Constraint-Based Modeling

۲ Castillo et al.

۳ Metabolic Flux Analysis

۴ Polyhydroxybutyrate

۵ Inomura et al.

۶ García et al.

۷ Wu et al.

در کنار این مدل‌های اختصاصی، بازسازی‌های خودکار ژنوم‌مقیاس ModelSEED و CarveMe نیز برای *ازتوباکتر وینلاندی* در دسترس بودند. مدل حاصل از ModelSEED شامل ۱۵۷۰ واکنش، ۱۴۱۶ متابولیت و ۹۰۳ ژن و مدل CarveMe شامل ۲۴۲۲ واکنش، ۱۹۷۸ متابولیت و ۱۳۹۵ ژن بود [۲۳]. اگرچه این بازسازی‌ها پوشش گسترده‌ای از شبکه متابولیکی فراهم می‌کردند، مدل‌های اختصاصی ژنوم‌مقیاس با توسعه iDT1278 توسط تک-کامپوس و همکاران[۱] (۲۰۲۰) شکل کامل‌تری یافتند [۲۳]. iDT1278 شامل ۱۲۷۸ ژن، ۲۴۶۹ واکنش و ۲۰۰۳ متابولیت بود و با استفاده از تحلیل موازنه شار (FBA)[۲] برای بررسی رشد روی منابع مختلف کربن و نیتروژن، تثبیت N_2 و تولید PHB و آلژینات توسعه و اعتبارسنجی شد.

در ادامه، آلمن و همکاران[۳] (۲۰۲۱) با بازبینی iDT1278، مدل iAA1300 را با ۱۳۰۰ ژن، ۲۲۸۹ واکنش و حدود ۱۹۶۰ متابولیت ارائه کردند. این مدل بازنمایی کامل‌تری از سیستم انتقال الکترون و تثبیت N_2 فراهم کرد و با استفاده از FBA و تحلیل نمونه‌برداری شار[۴] برای بررسی پاسخ متابولیکی سلول به غلظت‌های مختلف O_2، انرژی نگهداری سلولی (ATPM)[۵]، دسترسی به فلزات، فعالیت نیتروژناز و تغییر مسیر جریان الکترون به‌کار رفت. برای بهبود پیش‌بینی رفتار فیزیولوژیکی مدل، از داده‌های تجربی رشد و ضرایب نگهداری اندازه‌گیری‌شده در غلظت‌های مختلف O_2 نیز استفاده شد [۶]. در تحلیل تنفسی، عملکرد شبکه بیشتر در قالب دو شاخه، یعنی شاخه با جفت‌شدگی کامل[۶] و شاخه با جفت‌شدگی جزئی[۷]، مقایسه شد. در این مقایسه، تغییر میان دو شاخه تنها به اکسیداز انتهایی محدود نبود و مسیر ورود و انتقال الکترون نیز هم‌زمان تغییر می‌کرد. اسمبایوا و همکاران[۸] (۲۰۲۶) در یک مرور جدید، iDT1278 و iAA1300 را به‌عنوان مدل‌های ژنوم‌مقیاس اختصاصی *ازتوباکتر وینلاندی* گزارش کرده‌اند [۲۴].

این مطالعات در مجموع نقش O_2، متابولیسم کربن، موازنه انرژی و تثبیت N_2 را در فیزیولوژی *ازتوباکتر وینلاندی* به‌خوبی روشن کرده‌اند. با این حال، مقایسه مستقیم اکسیدازهای انتهایی bd، cbb_3 و aa_3-like در یک چارچوب تنفسی کنترل‌شده و با فعال‌سازی جداگانه هر اکسیداز همچنان نیازمند بررسی بود. در نتیجه، مشخص نبود تفاوت استوکیومتری این اکسیدازها در تولید انرژی، به‌تنهایی تا چه اندازه می‌تواند بر مصرف O_2، رشد، تثبیت N_2 و توزیع شارهای متابولیکی اثر بگذارد.

بر این اساس، در پژوهش حاضر یک چارچوب تحلیلی دوسطحی به‌کار گرفته شد. در سطح نخست، یک مدل هدفمند تنفسی مستقل از رشد و تثبیت N_2 برای مقایسه شاخه‌های وابسته به bd، cbb_3 و aa_3-like از نظر

---

[۱] Tec-Campos et al.

[۲] Flux Balance Analysis

[۳] Alleman et al.

[۴] Flux Sampling

[۵] ATP Maintenance

[۶] Fully Coupled

[۷] Partially Coupled

[۸] Esembaeva et al.

انتقال پروتون و ظرفیت تولید ATP استفاده شد. در سطح دوم، همین شاخه‌های تنفسی در یک شبکه متابولیکی شامل رشد و تثبیت N_2 بررسی شدند و با فعال‌سازی جداگانه هر اکسیداز تحت ورودی کربن یکسان، اثر انتخاب مسیر تنفسی بر مصرف O_2، نرخ ویژه رشد[1]، شار ATP سنتاز، فعالیت نیتروژناز و توزیع شارهای متابولیکی تعیین شد. همچنین، تحلیل حساسیت نسبت به مصرف O_2 برای بررسی رفتار هر مسیر در سطوح مختلف تقاضای تنفسی انجام گرفت. بنابراین، تمایز اصلی این پژوهش در تفکیک سهم عملکردی اکسیدازهای انتهایی و پیوند دادن تفاوت استوکیومتری آن‌ها در تولید انرژی با پاسخ کل شبکه متابولیکی است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. بازسازی هدفمند شبکه واکنش‌های بیوشیمیایی *ازتوباکتر وینلاندی*

به‌منظور انجام شبیه‌سازی‌های مورد نیاز در این پژوهش دو مدل متابولیکی بازسازی گردید. مدل اول، به‌صورت اختصاصی برای بررسی سیستم تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* بدون در نظر گرفتن رشد و تثبیت N_2 بازسازی شده است. درحالی‌که در مدل دوم، شبکه واکنش‌های بیوشیمیایی مرتبط با رشد، تثبیت N_2 به‌همراه شاخه-های تنفسی مختلف در *ازتوباکتر وینلاندی* در نظر گرفته شده است. در ادامه مشخصات این دو مدل آورده شده است.

۲-۱-۱ مدل تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی*

برای مقایسه ظرفیت انرژی‌زایی شاخه‌های تنفسی، مدل تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* (مستقل از رشد و تثبیت N_2) شامل مسیرهای ورود الکترون از NADH به مخزن Q/QH_2 (NADH6, NADH5)، اکسیدازهای انتهایی و ATP سنتاز بازسازی شد. واکنش‌های تنفسی اختصاصی این باکتری شامل اکسیدازهای انتهایی bd، cbb_3 و aa_3-like از مدل iAA1300 گزارش‌شده توسط آلمن و همکاران استخراج شدند [۶]. این واکنش‌ها با اطلاعات موجود در پایگاه‌های BioCyc، KEGG و ModelSEED تطبیق داده شد و از نظر جهت واکنش، شناسه متابولیت‌ها و تراز جرمی مورد بازبینی قرار گرفتند. سپس واکنش‌های تاییدشده مطابق جدول ۱ (به‌جز واکنش‌های تثبیت N_2 و (HYD, NDH-H_2) به مدل تنفسی افزوده شدند. این مدل تنفسی با تعریف واکنش‌های تبادلی لازم برای ورود O_2، NADH و تنظیم موازنه متابولیت‌ها نهایتا شامل ۲۶ واکنش و ۲۴ متابولیت می‌باشد.

[1] Specific growth rate

جدول ۱: واکنش‌های اختصاصی *ازتوباکتر وینلاندی* شامل سیستم تنفسی، انتقال الکترون و تثبیت N_2

Table 1. Reactions specific to *Azotobacter vinelandii* involved in respiration, electron transfer, and nitrogen fixation

Group	Reactions	
	ID	**Description**
Quinol	NADH5	$H_{[c]} + NADH_{[c]} + Q_{[c]} \rightarrow NAD_{[c]} + QH_{2[c]}$
	NADH6	$\mathbf{5}\ H_{[c]} + Q_{[c]} + NADH_{[c]} \rightleftharpoons \mathbf{4}\ H_{[e]} + NAD_{[c]} + QH_{2[c]}$
	HYD1pp	$\mathbf{2}\ H_{[c]} + Q_{[c]} + H_{2[c]} \longrightarrow \mathbf{2}\ H_{[e]} + QH_{2[c]}$
Cytochrome c	QCCOR	$\mathbf{2}\ H_{[c]} + QH_{2[c]} + \mathbf{2}\ FicytC_{[c]} \rightleftharpoons \mathbf{4}\ H_{[e]} + Q_{[c]} + \mathbf{2}\ FocytC_{[c]}$
Respiration by cytochrome oxidases	CYOO2pp	$\mathbf{4}\ H_{[c]} + \mathbf{0.5}\ O_{2[c]} + \mathbf{2}\ FocytC_{[c]} \longrightarrow \mathbf{2}\ H_{[e]} + H_2\mathbf{O}_{[c]} + \mathbf{2}\ FicytC_{[c]}$
	CYTCBB3pp	$\mathbf{3}\ H_{[c]} + \mathbf{0.5}\ O_{2[c]} + \mathbf{2}\ FocytC_{[c]} \longrightarrow H_{[e]} + H_2\mathbf{O}_{[c]} + \mathbf{2}\ FicytC_{[c]}$
	CYTBDpp	$\mathbf{2}\ H_{[c]} + QH_{2[c]} + \mathbf{0.5}\ O_{2[c]} \longrightarrow \mathbf{2}\ H_{[e]} + Q_{[c]} + H_2\mathbf{O}$
H_2 transfer and exchange	NAD_H2	$H_{[c]} + NADH_{[c]} \rightleftharpoons NAD_{[c]} + H_{2[c]}$
	EX_h2_e	$H_{2[e]} \longrightarrow$
	H2tex	$H_{2[c]} \rightleftharpoons H_{2[e]}$
ATP production	ATPS4rpp	$\mathbf{4}\ H_{[e]} + ADP_{[c]} + Pi_{[c]} \rightleftharpoons \mathbf{3}\ H_{[c]} + ATP_{[c]} + H_2\mathbf{O}_{[c]}$
Nitrogen fixation	NIT1b	$\mathbf{16}\ ATP_{[c]} + \mathbf{16}\ H_2\mathbf{O}_{[c]} + \mathbf{8}\ Fd_{red[c]} + N_{2[c]} \longrightarrow \mathbf{6}\ H_{[c]} + \mathbf{16}\ ADP_{[c]} + \mathbf{16}\ Pi_{[c]} + \mathbf{2}\ NH_{4[c]} + H_{2[c]} + \mathbf{8}\ Fd_{ox[c]}$
	FIX	$2\ Fd_{ox[c]} + \mathbf{2}\ NADH_{[c]} + Q_{[c]} \longrightarrow \mathbf{2}\ Fd_{red[c]} + \mathbf{2}\ NAD_{[c]} + QH_{2[c]}$
	Rnf	$2\ Fd_{ox[c]} + \mathbf{6}\ H_{[e]} + NADH_{[c]} \longrightarrow \mathbf{2}\ Fd_{red[c]} + \mathbf{7}\ H_{[c]} + NAD_{[c]}$

در جدول ۱ انتساب CYOO2pp به سیتوکروم‌اکسیداز aa_3-like بر اساس استوکیومتری و الکترون‌دهنده آن (FocytC) انجام شد. مسیر QCCOR-CYOO2pp نشان می‌دهد که ابتدا الکترون‌ها از QH_2 به سیتوکروم c منتقل شده و سپس سیتوکروم c احیا شده در CYOO2pp برای احیا کردن O_2 مصرف می‌شود. بنابراین مسیر QCCOR-CYOO2pp در مدل به عنوان یک سیتوکروم c اکسیداز انتهایی با عملکرد مشابه Cytochrome c oxidase aa_3-type تفسیر شد [۶, ۲۵, ۲۶]. این نام‌گذاری به معنای انتساب قطعی ژنی یا ساختاری به یک اکسیداز aa_3 نمی‌باشد.

۲-۱-۲ مدل رشد، تثبیت N_2 و سیستم‌های مختلف تنفسی در *ازتوباکتر وینلاندی*

از آنجا که هدف این پژوهش بررسی و مقایسه تفکیکی عملکرد اکسیدازهای انتهایی سیستم تنفسی در رشد *ازتوباکتر وینلاندی* با استفاده از FBA می‌باشد، یک مدل متابولیکی با شبکه مناسبی از واکنش‌های بیوشیمیایی مرتبط بازسازی گردید. از آنجا که مدل‌های متابولیکی اختصاصی *ازتوباکتر وینلاندی* موجود در منابع مانند iDT1278 و iAA1300 مدل‌هایی در مقیاس ژنوم با تعداد واکنش‌های بیوشیمیایی بسیار زیاد

می‌باشند، از مدل مشابه ولی ساده‌تر مربوط به باکتری هوازی تثبیت کننده N_2 *ریزوبیوم اتلی*[۱] (iOR363newbiomass030609) پس از حذف واکنش‌های مرتبط با سیستم تنفسی و زنجیره انتقال الکترون به‌عنوان یک چارچوب استوکیومتریک پایه در بازسازی مسیرهای متابولیسم مرکزی *ازتوباکتر وینلاندی* استفاده شد. این مدل نسخه‌ای توسعه‌یافته بر پایه مدل iOR363 سویه CFN42 با تعداد ۴۹۲ واکنش و ۴۵۷ متابولیت است [۲۳, ۲۷, ۲۸]. برای سازگاری بیشتر متابولیسم کربن این مدل با *ازتوباکتر وینلاندی*، مسیر انتنر-دودروف[۲] (ED)، (مسیر شکست گلوکز گزارش شده در این باکتری) در مدل پایه جایگزین شد [۲۲]. از آنجا که تمرکز این پژوهش بر مقایسه عملکرد شاخه‌های تنفسی وابسته به اکسیدازهای انتهایی *ازتوباکتر وینلاندی* می‌باشد واکنش‌های تنفسی اختصاصی این باکتری (شامل اکسیدازهای انتهایی bd، cbb_3 و aa_3-like) مطابق بخش ۲-۱-۱ به مدل پایه اضافه شدند. واکنش‌های تثبیت N_2 *ازتوباکتر وینلاندی* نیز از مدل iAA1300 گزارش‌شده توسط آلمن و همکاران استخراج و مطابق با ردیف آخر جدول ۱ به مدل اضافه شدند [۶].

مدل نهایی شامل ۵۰۰ واکنش و ۴۱۳ متابولیت است و علاوه بر مسیرهای متابولیسم مرکزی، واکنش‌های اختصاصی مرتبط با زنجیره انتقال الکترون، تثبیت N_2 و تبادل متابولیت‌ها را در بر می‌گیرد. در این شبکه، ۱۵ واکنش مربوط به زنجیره انتقال الکترون، ۱۱ واکنش مرتبط با متابولیسم نیتروژن و ۳۸ واکنش انتقالی و تبادلی در نظر گرفته شده است. همچنین، واکنش تشکیل زیست‌توده به‌عنوان تابع هدف و واکنش ATPM در مدل لحاظ شدند.

۲-۲ روش حل

جهت شبیه‌سازی‌ها و تحلیل‌ها از MATLAB با ورژن R۲۰۱۶ b، جعبه ابزار COBRA با ورژن ۲۰۱۷ و ویرایش ساختار مدل، تنظیم کران واکنش‌ها و بررسی خروجی‌های عددی با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel با ورژن ۲۰۱۳ استفاده شد. برای بهینه‌سازی خطی از حل‌گر GLPK[۳] استفاده شد. همچنین در کلیه محاسبات از دستگاه کامپیوتر شخصی با پردازشگر (Intel Pentium P6200) با فرکانس ۲/۱۳ GHz و حافظه (RAM 4 GB) استفاده شد.

۲-۳. آزمایش‌های کامپیوتری

دو سری شبیه‌سازی با استفاده از دو مدل بازسازی شده انجام شد. در سری اول، مدل تنفسی زنجیره انتقال الکترون برای مقایسه ظرفیت استوکیومتری تولید انرژی در شاخه‌های تنفسی مورد استفاده قرار گرفت. سپس، عملکرد اکسیدازهای انتهایی هنگام رشد با استفاده از مدل رشد بازسازی‌شده برای *ازتوباکتر وینلاندی* مورد بررسی قرار گرفت.

---

[۱] *Rhizobium etli*

[۲] Entner Doudoroff

[۳] GNU Linear programming Kit

تمام شبیه‌سازی‌ها مربوط به رشد *ازتوباکتر وینلاندی* در شرایط هوازی و با مقدار مصرف سوکسینات برابر ۳/۵ میلی‌مول به‌ازای هرگرم وزن خشک سلولی در ساعت[۱] ($mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) در راستای مقایسه عملکرد سیستم تنفسی در میزان کربن ورودی یکسان انجام شد. استفاده از سوکسینات به‌عنوان منبع کربن، با توانایی گزارش‌شده *ازتوباتر وینلاندی* برای رشد دیازوتروفی با سوکسینات به عنوان منبع کربن و انرژی سازگار است [۲۹]. در هر شبیه‌سازی، فقط یک سیتوکروم اکسیداز انتهایی فعال نگه داشته شد و به‌منظور غیرفعال کردن دو اکسیداز دیگر کران بالا و پایین شار آن‌ها برابر صفر قرار داده شد. در تمام شبیه‌سازی‌ها واکنش سنتز زیست‌توده (نرخ ویژه رشد) به‌عنوان تابع هدف انتخاب شد تا مدل بر مبنای بیشینه‌سازی نرخ رشد حل شود. انتقال الکترون از NADH به مخزن Q/QH_2 نیز از طریق واکنش‌های NADH6 و NADH5 در تمام شبیه‌سازی‌های مربوط به بررسی عملکرد اکسیدازها و تحلیل حساسیت بدون محدودیت در نظر گرفته شد تا مسیر انتخاب‌شده شبکه برای تامین QH_2 مشخص شود. همچنین، شار نیتروژناز، ATP سنتاز و سایر واکنش‌های کلیدی به‌عنوان خروجی‌های مدل ثبت و تحلیل شدند. واکنش‌های تبادلی اصلی از جمله دی‌اکسید کربن (CO_2) و نیتروژن، در کنار واکنش‌های کلیدی داخلی مانند ATP سنتاز و نیتروژناز، با بازه شار آزاد (بین $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ ۱۰۰۰- تا ۱۰۰۰+) در نظر گرفته شدند تا شار آنها در شبکه بر اساس قیود استوکیومتری محاسبه شوند.

۲-۳-۱. بررسی تولید انرژی در سیستم‌های تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* و تاثیر مسیرهای تولید QH_2

برای مقایسه ظرفیت انرژی‌زایی شاخه‌های تنفسی، مدل تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* مورد استفاده قرار گرفت. این مدل فقط ظرفیت استوکیومتری و بازده پروتونی زنجیره تنفسی برای تولید ATP را ارزیابی می‌نماید. در هر اجرا، یکی از اکسیدازهای انتهایی bd، cbb_3 و aa_3-like فعال و دو اکسیداز دیگر غیرفعال شدند و تولید ATP به‌عنوان تابع هدف بیشینه شد. علاوه بر اثر اکسیدازهای مختلف، اثر مسیرهای پمپ‌کننده و غیرپمپ‌کننده پروتون در تامین QH2 و ایجاد PMF مورد بررسی قرار گرفت.

شار مصرف O_2 برابر با $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ ۱ قرار داده شد. از آنجا که مصرف O_2 در واکنش اکسیدازهای انتهایی با ضریب استوکیومتری $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ ۰/۵ تعریف شده بودند بنابراین، خروجی‌های مربوط به انتقال پروتون و تولید ATP برای گزارش بر مبنای یک واحد شار واکنش اکسیدازها، بر ۲ تقسیم و نسبت به مصرف O_2 برابر با $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ ۰/۵ نرمال شدند. HYD و $NDH\text{-}H_2$ در ساختار این مدل حضور نداشتند و نقش این واکنش‌ها به‌طور جداگانه در مدل متابولیکی بازسازی‌شده بررسی گردید.

۲-۳-۲. بررسی عملکرد سیتوکروم اکسیدازها هنگام رشد *ازتوباکتر وینلاندی*

با استفاده از مدل رشد، سه شبیه‌سازی مجزا با فعالیت هر یک اکسیدازهای انتهایی bd، cbb_3 و aa_3-like در مقدار کربن ورودی یکسان انجام گرفت. در این شبیه‌سازی‌ها مصرف O_2 به‌صورت آزاد در محدوده کلی mmol

[۱] Millimoles per gram dry weight per hour

$gDW^{-1}h^{-1}$ ۱۰۰۰- تا ۱۰۰۰در نظر گرفته شد و شار مصرف O_2 که منجر به حداکثر نرخ ویژه رشد می‌گردد، هنگام فعالیت هر یک از اکسیدازها بصورت جداگانه محاسبه گردید. این بررسی تحلیل تفکیکی عملکرد هر اکسیداز انتهایی در *ازتوباکتر وینلاندی* را امکان‌پذیر می‌نماید.

۲-۳-۳. تحلیل حساسیت عملکرد سیتوکروم اکسیدازها نسبت به مصرف O_2

در تحلیل حساسیت، اثر تغییر شار مصرف O_2 بر عملکرد سیستم تنفسی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، مقدار مصرف O_2 از مقدار اولیه ۲ $mmol\ gDW^{-1}h^{-1}$ آغاز شد و با گام‌های ۰/۱ $mmol\ gDW^{-1}h^{-1}$ در جهت افزایش مصرف O_2 تغییر یافت. در هر گام، کران پایین و بالای واکنش تبادل O_2 (EX_O_2) برابر قرار داده شد تا مصرف O_2 به مدل تحمیل شود. این فرایند تا نرخ مصرف O_2 برابر ۱۲/۲ $mmol\ gDW^{-1}h^{-1}$ ادامه یافت. این محدوده، بازه مشترک امکان‌پذیری در شبیه‌سازی سه اکسیداز بود که پس از آن مدل از حالت امکان‌پذیر خارج شد. خروجی‌های اصلی شامل شار نرخ ویژه رشد، نیتروژناز بودند. همچنین برای تکمیل تحلیل پاسخ شبکه به تغییر مصرف O_2، شارهای خروجی H_2 و CO_2 نیز بررسی شدند.

۲-۳-۴. مقایسه توزیع شارهای متابولیکی با اکسیداز bd در حضور و غیاب آنزیم NADH6

مسیر اکسیداز bd در *ازتوباکتر وینلاندی* به‌عنوان یک مسیر تنفسی با بازده کم پروتون و انرژی شناخته می‌شود و در مطالعات پیشین، تامین QH_2 آن با NADH5 مرتبط دانسته شده است [۱۸, ۳۲]. همچنین در واکنش‌های تنفسی برگرفته از مدل آلمن، مسیر NADH5-bd به‌عنوان شاخه‌ای کم‌بازده‌تر از نظر پروتونی در نظر گرفته شده است [۶]. در مقابل، مسیر اکسیدازهای cbb_3 و aa_3-like بخشی از مسیرهای تنفسی با بازده بالای پروتونی و ظرفیت بیشتر تولید انرژی هستند [۶, ۳۰]. بر این اساس، غیرفعال‌سازیNADH6 فقط برای مسیر اکسیداز bd انجام شد تا حالت کم‌بازده آن بازنمایی و حد پایین بازده پروتونی این شاخه تحت قیود مدل برآورد شود. اعمال این محدودیت برای دو شاخه دیگر ضروری نبود، زیرا هدف تحلیل، بررسی اختصاصی مسیر کم‌بازده bd بود.

برای این منظور، یک تحلیل تکمیلی برای بررسی نقش NADH6 در عملکرد اکسیداز bd و امکان بازآرایی مسیرهای تامین QH_2 پس از غیر فعال‌سازی آن طراحی شد. کران پایین و بالای واکنش NADH6 برای مسیر اکسیداز انتهایی bd برابر صفر قرار گرفت. سایر مسیرهای تامین QH_2، نرخ مصرف سوکسینات، تابع هدف و قیود مدل بدون تغییر باقی ماندند و تحلیل حساسیت O_2 با همان بازه و گام قبلی تکرار شد. پس از اعمال این محدودیت، شارهای نرخ ویژه رشد، نیتروژناز، ATP سنتاز و واکنش‌های تامین QH_2 شامل NADH5، SDH، HYD و $NDH\text{-}H_2$ بررسی شدند.

۲-۳-۵. تحلیل تغییرپذیری شارها با اکسیداز bd در غیاب آنزیم NADH6

برای بررسی انعطاف‌پذیری شبکه متابولیکی در شرایط غیرفعال‌سازی NADH6، تحلیل تغییرپذیری شارها (FVA)[1] انجام شد. در این تحلیل، حداقل و حداکثر شار واکنش‌های کلیدی مرتبط با تامین عوامل احیاکننده و QH_2 در فضای جواب‌های بهینه محاسبه شد. با توجه به جواب‌های بهینه متعدد[2] در شبکه، تحلیل FVA امکان بررسی تغییرپذیری شار واکنش‌ها و ارزیابی نقش احتمالی NADH5 پس از غیرفعال‌سازی NADH6 را فراهم می‌نماید.

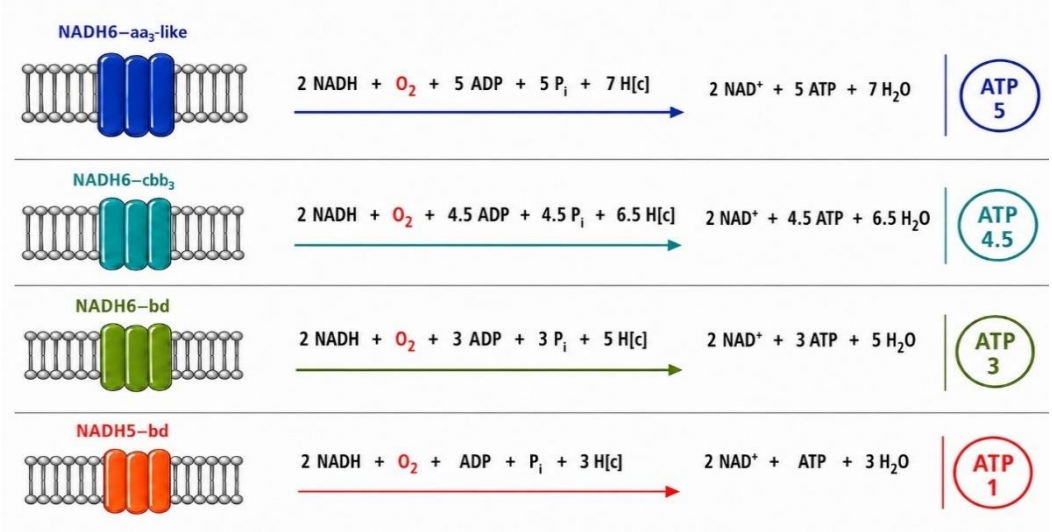
۳- بحث و یافته‌ها

۳-۱. بررسی تولید انرژی در سیستم‌های تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* و تاثیر مسیرهای تولید QH_2

از آنجا که سیستم تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* در تامین انرژی و محافظت از سلول در مواجهه با O_2 اهمیت به‌سزایی دارد، این سیستم مستقل از رشد با استفاده از مدل تنفسی بازسازی‌شده مورد بررسی قرار گرفت. شبیه‌سازی‌ها نشان داد که ظرفیت انرژی‌زایی شاخه‌های تنفسی، علاوه بر نوع اکسیداز انتهایی به مسیر ورود الکترون به مخزن Q/QH_2 نیز وابسته است.

واکنش‌های کلی حاصل از این شبیه‌سازی‌ها در شکل ۲ و مقایسه مقدار استوکیومتری پروتون‌های موثر و شار ATP سنتاز در جدول ۲ ارائه شده است. در واکنش‌های کلی مبنا مصرف O_2 برابر با $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ ۱ می‌باشد، درحالی‌که مقادیر جدول ۲ برای انطباق با ضریب استوکیومتری اکسیدازهای انتهایی، نسبت به مصرف O_2 برابر $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ ۰/۵ نرمال شده‌اند. بازده نظری ATP نیز بر اساس استوکیومتری واکنش ATP سنتاز در مدل و با درنظرگرفتن چهار پروتون موثر برای تولید یک واحد ATP محاسبه شده است. مقادیر حاصل در تمامی مسیرهای تنفسی به‌طور دقیق با شار ATP سنتاز پیش‌بینی‌شده توسط مدل مطابقت داشتند. این تطابق نشان می‌دهد که رابطه میان انتقال پروتون و تولید ATP در مدل به‌درستی برقرار شده است.

[1] Flux Variability Analysis
[2] Multiple Optimal Solutions



شکل ۲: واکنش‌های کلی حاصل از نتایج مدل تنفسی برای اکسیدازهای aa_3-like، cbb_3 و bd.

Figure 2. Overall reactions derived from the respiratory model results for the aa_3-like, cbb_3, and bd terminal oxidases.

مقایسه مسیرهای تنفسی، بیشترین ظرفیت تولید انرژی را برای مسیر NADH6-aa_3-like و پس از آن برای NADH6-cbb_3 نشان می‌دهد، درحالی‌که مسیر اکسیداز NADH5-bd کمترین بازده را دارد. اگرچه در مراجع گزارش شده است که شاخه های تنفسی aa_3-like و cbb_3 از آنزیم NADH6 استفاده می نمایند [۶, ۱۸]، شبیه‌سازی‌ها با استفاده از NADH5 برای این دو مسیر نشان از کاهش بازده انرژی دارد. در مورد اکسیداز bd، با اینکه استفاده از NADH6 به‌جای NADH5 ظرفیت انرژی‌زایی این مسیر را افزایش می‌دهد، منجر به بازده انرژی کمتر از دو مسیر اکسیدازی دیگر می‌شود. این الگو با نقش شناخته‌شده مسیر bd به‌عنوان یک مسیر با ظرفیت بالاتر مصرف O_2 و بازده انرژی کمتر سازگار است [۶, ۸, ۱۸]. مسیر سیتوکروم اکسیداز cbb_3 نیز از نظر شاخص‌های بررسی‌شده، رفتاری میانی بین دو اکسیداز aa_3-like و bd را نشان می‌دهد. این نتایج مشابه با تفاوت بازده انرژی در شاخه‌های مختلف در پژوهش‌های قبلی می‌باشد [۶, ۳۱]. بنابراین، بازده پایین اکسیداز bd تنها ناشی از نوع NADH–دهیدروژناز نبوده و استوکیومتری کل مسیر انتقال الکترون به‌ویژه عدم وجود واکنش کوئینول: سیتوکروم c اکسیدورودوکتاز (شناسه QCCOR) نیز در ظرفیت کمتر انرژی آن نقش دارد.

جدول ۲: مقایسه ظرفیت نظری ایجاد PMF و شار نرمال‌شده ATP سنتاز در مسیرهای اکسیداز انتهایی aa_3-like، cbb_3 و bd بر مبنای مصرف O_2 برابر با ۰/۵ mmol $gDW^{-1} h^{-1}$

Table 2. Comparison of the theoretical capacity for PMF generation and the normalized ATP synthase flux among the aa_3 -like, cbb_3, and bd terminal oxidase pathways, based on an O_2 uptake rate of 0.5 mmol $gDW^{-1} h^{-1}$

Terminal oxidase pathway	**Effective proton stoichiometry**	**ATP synthase flux (mmol $gDW^{-1} h^{-1}$)**
NADH6-aa_3-like	10 H^+	2.50
NADH6-cbb_3	9 H^+	2.25

NADH6-bd	6 H^+	1.50
NADH5-bd	2 H^+	0.50

واکنش‌های کلی شکل ۲ همچنین نشان می‌دهند که بر اساس موازنه الکترونی، مقدار NADH مورد نیاز برای احیای O_2 دو برابر مقدار O_2 مصرفی است. ازاین‌رو، افزایش شار مصرف O_2 با افزایش متناسب تقاضا برای NADH و گردش الکترون در زنجیره تنفسی همراه خواهد بود. این رابطه استوکیومتری، مبنایی برای تفسیر مصرف بیشتر O_2 و تغییر توزیع کربن در نتایج شبیه‌سازی‌های بعدی را فراهم می‌کند. با این حال، خروجی‌های سیستم فقط بیانگر ظرفیت نظری شاخه‌های تنفسی هستند، زیرا واکنش‌های زیست‌توده، نیتروژناز، هیدروژنازها و سایر مسیرهای متابولیکی در آن حضور نداشتند. بنابراین، ارتباط میان بازده نظری سیستم تنفسی و عملکرد واقعی هر شاخه در شبکه متابولیکی بازسازی‌شده، بر اساس نتایج شبیه‌سازی پایه در بخش بعد بررسی شد.

۲-۳. بررسی عملکرد سیتوکروم اکسیدازهای انتهایی هنگام رشد *ازتوباکتر وینلاندی*

در این بخش، یافته‌های اصلی از FBA برای ارزیابی کمی و مقایسه عملکرد اکسیدازهای انتهایی bd, cbb_3, aa_3-like هنگام رشد *ازتوباکتر وینلاندی* گزارش می‌شود. در هر شبیه‌سازی، یک اکسیداز انتهایی فعال‌سازی شده و مصرف O_2، نرخ ویژه رشد، شار نیتروژناز و ATP سنتاز بررسی می‌شوند. در این بررسی مقدار مصرف O_2 به مدل تحمیل نشده و واکنش تبادل O_2 در بازه ۱۰۰۰- تا ۱۰۰۰ $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ آزاد گذاشته شده است تا مصرف O_2 بر اساس قیود استوکیومتری و تابع هدف نرخ ویژه رشد محاسبه شوند. جدول ۳ مقادیر شار محاسبه شده برخی از واکنش‌ها به‌همراه نرخ ویژه رشد در شبیه‌سازی برای سه اکسیداز مختلف را نشان می‌دهد.

جدول ۳: نتایج تحلیل کمی عملکرد سیتوکروم اکسیدازها در شرایط مصرف ثابت و یکسان سوکسینات (۳/۵ $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$)

Table 3. Comparison of the quantitative performance of terminal oxidases at a fixed succinate uptake rate of (3.5 $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$)

Terminal oxidase	**Fluxes ($mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$)**				**Specific growth rate (h^{-1})**
	Oxygen uptake	**CO_2 exchange**	**Nitrogenase**	**ATP synthase**	
bd	6.168	8.802	0.495	12.507	0.125
cbb_3	5.686	8.391	0.534	14.162	0.135
aa_3-like	4.608	7.470	0.622	16.897	0.157

جدول ۳ نشان می‌دهد که فعال‌سازی جداگانه اکسیدازهای انتهایی، الگوهای متفاوتی از مصرف O_2 و خروجی‌های متابولیکی ایجاد می‌نماید. در بین اکسیدازهای مورد بررسی، مسیر aa_3-like بیشترین نرخ ویژه رشد و شارهای نیتروژناز و ATP سنتاز را نشان می‌دهد، درحالی‌که مسیر اکسیداز bd با وجود مصرف O_2 بالاتر، بازده کمتری دارد. مسیر cbb_3 نیز رفتاری میانی بین این دو مسیر را نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها بیانگر

آن است که مقدار مصرف O_2 به‌تنهایی برای تفسیر عملکرد مسیرهای تنفسی کافی نیست و باید در کنار بازده تولید انرژی و نقش آن‌ها در ایجاد PMF بررسی شود.

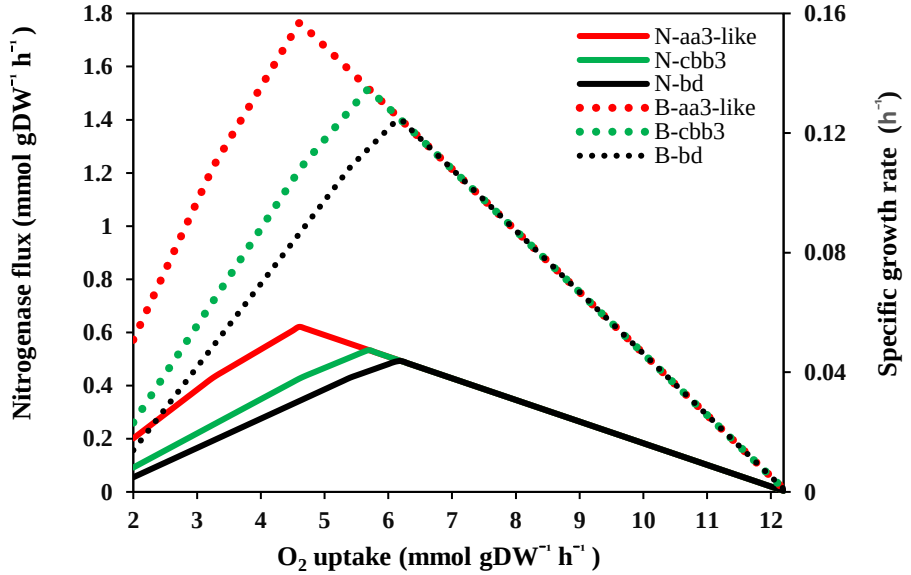
بررسی شار واکنش‌های NADH-دهیدروژناز نشان می‌دهد که در هر سه شبیه‌سازی، با وجود در دسترس بودن NADH5 و NADH6، انتقال الکترون از NADH به‌واسطه آنزیم NADH6 انجام می‌شود و NADH5 غیرفعال باقی می‌ماند. ازاین‌رو، برای تفسیر نتایج این شبیه‌سازی، مسیرهای NADH6-aa_3-like، NADH6-cbb_3 و NADH6-bd با نتایج مدل تنفسی مقایسه می‌شوند.

الگوی عملکرد این سه مسیر با ترتیب بازده پروتونی به‌دست‌آمده از مدل تنفسی سازگار است. تفاوت در استوکیومتری انتقال پروتون موجب می‌شود هر مسیر ظرفیت متفاوتی برای ایجاد و حفظ PMF داشته باشد. در چارچوب قیود مدل، مسیر سیتوکروم اکسیداز aa_3-like به دلیل ظرفیت بالاتر برای ایجاد PMF، بیشترین شار ATP سنتاز، نرخ ویژه رشد و نیتروژناز را پشتیبانی می‌نماید. در مقابل، مسیر اکسیداز bd با وجود مصرف O_2 بالاتر، به دلیل بازده پروتونی پایین‌تر، کم‌ترین نرخ ویژه رشد، نیتروژناز و ATP سنتاز را نشان می‌دهد. بنابراین، مسیر اکسیداز bd برای تامین سطح مشابهی از انرژی، نیاز به عبور عوامل احیاکننده و مصرف O_2 بیشتری در زنجیره انتقال الکترون دارد. به عبارت دیگر، مصرف بالاتر O_2 در اکسیداز bd را می‌توان به‌عنوان پاسخ شبکه، برای جبران بازده پروتونی پایین مطرح کرد.

پیامد متابولیکی این تفاوت در بازده انرژی، تغییر در نحوه تخصیص کربن در شبکه است. تشکیل زیست‌توده تنها به مقدار کربن در دسترس وابسته نیست، بلکه هم‌زمان با تامین انرژی و عوامل احیاکننده مرتبط است. بنابراین، در شرایط نرخ مصرف ثابت و یکسان سوکسینات در هر سه شبیه‌سازی، هرچه بازده تولید انرژی کمتر باشد، شبکه سهم بیشتری از کربن ورودی را برای تامین نیازهای انرژی در مسیرهای کاتابولیکی اکسید می‌کند. این افزایش هزینه کاتابولیکی، خروج بیشتر کربن به‌صورت CO_2 و در مقابل، کاهش بازده تبدیل کربن ورودی به زیست‌توده را به‌همراه دارد. بر این اساس، مسیر bd به دلیل هزینه کاتابولیکی بیشتر، بیشترین خروج CO_2 و کمترین بازده تبدیل کربن به زیست‌توده را نشان می‌دهد، مسیر aa_3-like با تولید موثرتر انرژی، کربن بیشتری را به تشکیل زیست‌توده اختصاص می‌دهد و مسیر اکسیداز cbb_3 رفتاری میانی دارد. بنابراین، افزایش CO_2 و کاهش رشد، هر دو بازتاب تخصیص متفاوت کربن در پاسخ به بازده انرژی شاخه‌های تنفسی هستند.

۳-۳. تحلیل حساسیت عملکرد سیتوکروم اکسیدازهای انتهایی نسبت به مصرف O_2

پاسخ سه مسیر تنفسی (به صورت مجزا) به افزایش گام به گام مصرف O_2 در حضور اکسیدازهای aa_3-like, cbb_3, bd مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۳ آورده شده است.

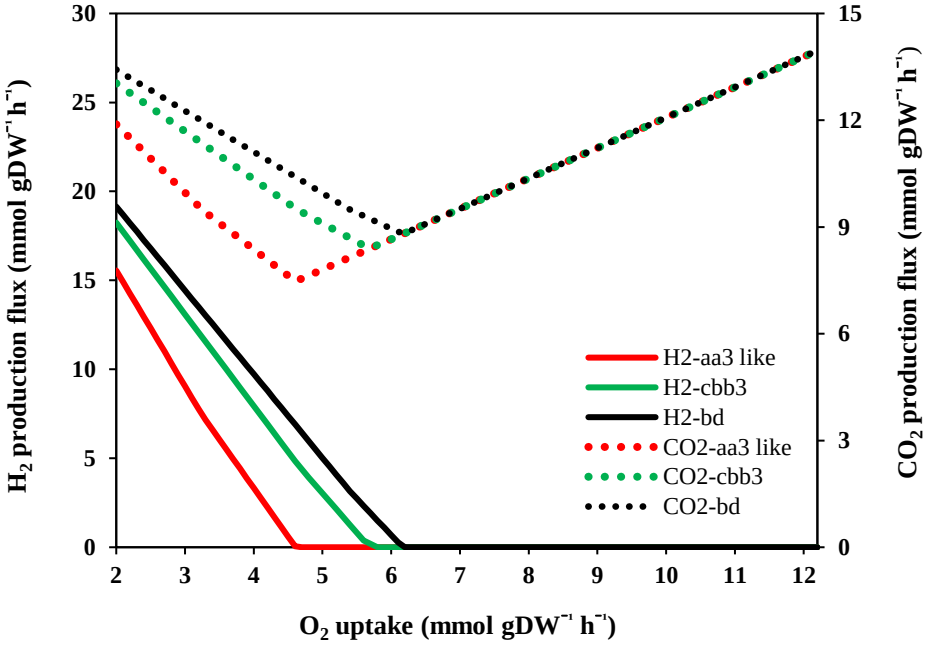


شکل ۳: اثر نرخ مصرف O_2 بر شار نیتروژناز (N) و نرخ ویژه رشد (B) در مسیرهای تنفسی وابسته به سه اکسیداز انتهایی aa_3-like، cbb_3 و bd.

Figure 3. Effect of O_2 uptake rate on nitrogenase flux (N) and specific growth rate (B) in respiratory pathways associated with the terminal oxidases aa_3-like, cbb_3, and bd.

در شکل ۳ مشاهده می‌شود که با افزایش مصرف O_2، نرخ ویژه رشد و شار نیتروژناز در هر سه مسیر ابتدا افزایش و پس از رسیدن به نقطه بهینه کاهش می‌یابد. در نقطه بهینه میان دسترسی به O_2، تولید انرژی و تامین عوامل احیاکننده برای رشد و نیتروژناز تعادل نسبی برقرار شده است. قبل از رسیدن به نقطه بهینه هر مسیر تنفسی، افزایش مصرف O_2 با افزایش نرخ ویژه رشد و نیتروژناز همراه است، زیرا افزایش نرخ مصرف O_2 می‌تواند به‌واسطه اکسیداسیون عوامل احیاکننده، ایجاد PMF و تامین انرژی، از نرخ ویژه رشد و فعالیت نیتروژناز پشتیبانی کند. در این ناحیه تفاوت تولید زیست‌توده با اکسیدازهای aa_3-like، cbb_3 و bd به دلیل استوکیومتری و بازده پروتونی متفاوت هر مسیر می‌باشد. با افزایش بیشتر نرخ O_2 و ورود به ناحیه بعد از نقطه بهینه مصرف O_2، این رفتار تغییر نموده و نرخ ویژه رشد و نیتروژناز کاهش یافته و پس از مصرف O_2 با مقدار ۶/۲ mmol gDW^{-1} h^{-1} مقادیر مذکور برای هر سه اکسیداز برابر می‌شوند. از آنجا که در تحلیل حساسیت، میزان مصرف O_2 در هر مرحله به‌صورت یک قید مشخص به شبکه اعمال می‌شود، افزایش این قید شبکه را ملزم به جریان بیشتری از عوامل احیاکننده جهت مصرف و حذف O_2 می‌نماید، درحالی‌که مصرف سوکسینات ثابت باقی می‌ماند.

به‌منظور تکمیل تحلیل حساسیت سیستم تنفسی به میزان O_2 مصرفی، تولید CO_2 و H_2 به‌عنوان محصولات خروجی از شبکه نیز مورد بررسی قرار گرفتند. H_2 با فعالیت نیتروژناز، هیدروژنازها و بازتوزیع عوامل احیاکننده ارتباط دارد، درحالی‌که تغییرات شار CO_2 می‌تواند نحوه مصرف کربن میان مسیرهای آنابولیک، اکسیداسیون و تشکیل زیست‌توده را نشان دهد. شکل ۴ تغییرات شار خروج CO_2 و H_2 در دامنه در نظر گرفته‌شده برای مصرف O_2 را نشان می‌دهد.



شکل ۴: اثر نرخ مصرف O_2 بر شارهای خروج H_2 و CO_2 در مسیرهای تنفسی وابسته به اکسیداز انتهایی aa_3-like، cbb_3 و bd.

Figure 4. Effect of O_2 uptake rate on H_2 and CO_2 export fluxes in respiratory pathways associated with the terminal oxidases aa_3-like, cbb_3, and bd.

در مقادیر پایین مصرف O_2، H_2 به‌عنوان محصول تولید و از سلول خارج می‌شود. اما با افزایش مصرف O_2، H_2 خروجی از سلول به‌تدریج کاهش یافته و در ناحیه بعد از نقطه بهینه مصرف O_2 به صفر می‌رسد. این کاهش در راستای افزایش استفاده داخلی از H_2 و مشارکت در مسیرهای بازیافت آن در بازتوزیع و تامین عوامل احیاکننده مورد نیاز شبکه است. در ناحیه قبل از نقطه بهینه، مسیر bd بیشترین، cbb_3 مقدار میانی و aa_3-like کمترین شار خروج H_2 از سلول را نشان می‌دهد. این تفاوت با بازده پروتونی و شار ATP سنتاز پایین‌تر در اکسیداز bd و در نتیجه نرخ ویژه رشد و فعالیت آنابولیک کمتر هم‌خوانی دارد، شرایطی که با هدایت سهم بیشتری از شار NADH به مسیر تولید H_2 همراه شده است. در مقابل، در مسیر aa_3-like بازده انرژی و رشد بالاتر با مصرف بیشتر عوامل احیاکننده در فرایندهای آنابولیک و خروج کمتر H_2 از سلول همراه است.

شار CO_2 نیز در هر سه مسیر اکسیدازی الگویی دو مرحله‌ای را نشان می‌دهد. تولید وخروج CO_2 از سلول در محدوده قبل از نقطه بهینه با افزایش O_2 و نرخ ویژه رشد کاهش می‌یابد و در نقطه بهینه به کمینه مقدار خود می‌رسد، درحالی‌که پس از نقطه بهینه روند افزایشی نشان می‌دهد. در O_2 مصرفی، بعد از نقطه بهینه مصرف O_2، الگوی توزیع الکترون و عوامل احیاکننده تغییر می‌کند به‌طوری که سهم بیشتری به سمت زنجیره تنفسی و احیای O_2 هدایت می‌شود. در نتیجه با توجه به ثابت بودن مصرف سوکسینات، افزایش خروج CO_2 هم‌زمان با کاهش نرخ ویژه رشد اتفاق می‌افتد. در ناحیه قبل از نقطه بهینه، بیشترین مقدار خروج CO_2 در مسیر bd، مقدار میانی در مسیر cbb_3 و کمترین مقدار در مسیر aa_3-like مشاهده می‌شود. نرخ ویژه رشد کمتر در مسیر bd با ورود کمتر کربن به فرایندهای تشکیل زیست‌توده و خروج بیشتر آن به‌صورت CO_2

همراه است، درحالی‌که در مسیر aa_3-like رشد بالاتر با مصرف بیشتر کربن در فرایندهای آنابولیک و خروج کمتر CO_2 همراه می‌باشد. لازم به ذکر است که جریان‌های آنابولیک (مسیرهای تامین‌کننده اجزای زیست‌توده مانند اسیدهای آمینه، PHB، لیپیدها و ...) و همچنین فعالیت نیتروژناز متناسب با میزان نرخ ویژه رشد تغییر می‌نمایند. در مجموع نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که پس از نقطه بهینه، نحوه تخصیص منابع در شبکه واکنش‌های متابولیکی تغییر می‌کند و افزایش فعالیت اکسیداتیو همواره به افزایش عملکرد آنابولیک تبدیل نمی‌شود.

به‌منظور بررسی دقیق‌تر تفاوت‌های عملکردی سه اکسیداز پس از نقاط بهینه و بررسی دلیل مشابه شدن نرخ ویژه رشد در این ناحیه، توزیع شار واکنش‌های بیوشیمیایی شبکه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که تفاوتی در شار واکنش‌های اصلی مربوط به سه اکسیداز به دلیل استوکیومتری مشابه از نظر O_2 وجود ندارد. اما واکنش‌های مرتبط با سیستم تولید و مصرف انرژی که مرتبط با عوامل احیاکننده و پروتون‌های ایجاد شده در سیستم تنفسی می‌باشند تفاوت‌های قابل توجهی نشان می‌دهند. بررسی بیشتر این واکنش‌ها فعال شدن چرخه‌های بیهوده[1] انرژی برای تلف نمودن انرژی اضافه تولیدشده را نشان داد. به‌منظور تجمیع و محاسبه دقیق انرژی اضافه در شبیه‌سازی هر یک از اکسیدازها و مقایسه عملکرد آنها، بیشینه کردن شار واکنش ATPM در مقدار ثابت نرخ رشد پیشنهاد شد. بیشینه‌سازی شار واکنش ATPM تحت مقادیر معین منبع کربنی، O_2 و نرخ ویژه رشد، یک معیار مشترک برای مقایسه ظرفیت باقی‌مانده سه مسیر تنفسی در تامین انرژی را فراهم می‌کند. با استفاده از این روش ATPهای تلف‌شده در تمام چرخه‌های بیهوده در مقدار شار آزاد واکنش ATPM قابل مشاهده می‌باشد. از آنجا که شار این واکنش در همه شبیه‌سازی‌های اصلی برابر ۱ $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ ثابت در نظر گرفته شده بود، این مقدار باید از حداکثر به‌دست‌آمده در این روش کسر گردد تا مقدار انرژی اضافه‌ای که لازم است در مورد هر اکسیداز در مقادیر بالای O_2 تلف شود بدست آید.

در ادامه، عملکرد سه اکسیداز در مصرف O_2 برابر ۸ $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ و سوکسینات برابر $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ ۳/۵ در ناحیه بعد از نقطه بهینه مصرف O_2 که منجر به نرخ ویژه رشد برابر ۰/۰۸۷۳۶ h^{-1} شده است با روش فوق مورد بررسی قرار گرفت. در این شبیه‌سازی‌ها بیشینه شار ATPM در مسیر اکسیدازهای aa_3-like، cbb_3 و bd به‌ترتیب برابر ۲۷/۰۵۰، ۱۵/۰۷۳ و ۱۱/۰۸۰ $mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$ به‌دست آورده شد. بنابراین، با وجود مشابه بودن نرخ ویژه رشد و نیتروژناز، مسیر اکسیداز aa_3-like منجر به بیشترین اتلاف انرژی، cbb_3 مقدار میانی و bd کمترین اتلاف را نشان می‌دهد. این تفاوت در ظرفیت قابل پشتیبانی ATPM بیانگر آن است که همگرایی خروجی نرخ ویژه رشد و نیتروژناز ناشی از برابر شدن ظرفیت انرژی مسیرها نیست و ظرفیت تولید انرژی ناشی از بازده متفاوت پروتونی اکسیدازها همچنان حفظ می‌شود. نکته مهم آن است که تفاوت در بازده پروتونی نباید به‌صورت یک رابطه مستقیم و یک‌به‌یک میان پروتون بیشتر و ATP بیشتر تفسیر شود. در چارچوب مدل استوکیومتری، پیامد این تفاوت در سطح شبکه از طریق تغییر در توزیع شارهای مرتبط با موازنه انرژی، پروتون و اکسایش-کاهش بازتاب می‌یابد. بنابراین، هدف از کنترل ATPM بررسی مصرف

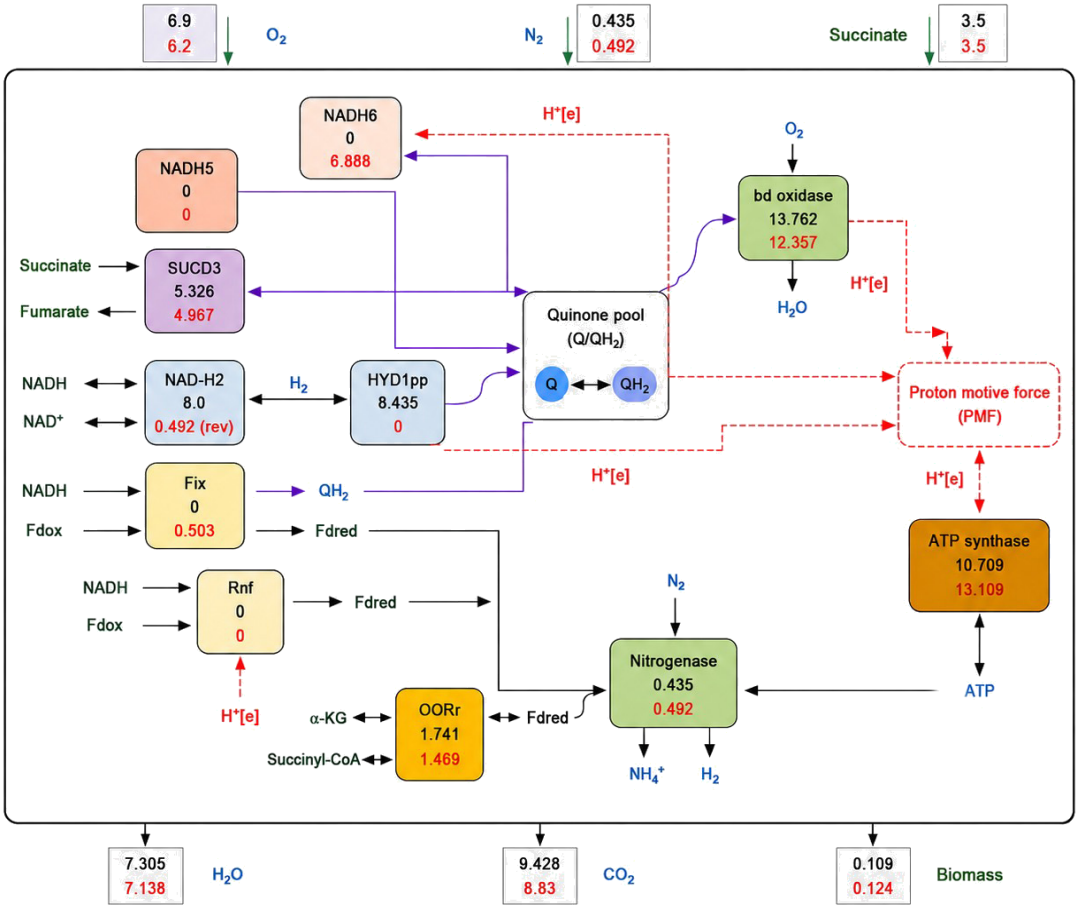
[1] Futile cycle

پروتون‌ها نبود بلکه این کنترل برای مقایسه یکپارچه ظرفیت انژی‌زایی سه مسیر اکسیدازی تحت شرایط یکسان انجام شد.

درکل، نتایج به‌دست آمده یک تفسیر منسجم از رفتار شبکه را امکان‌پذیر می‌نماید. در مصرف ثابت سوکسینات پس از نقطه بهینه، تامین انرژی دیگر تنها عامل تعیین‌کننده تولید زیست‌توده نمی‌باشد. اگر چه سه مسیر تنفسی از نظر ظرفیت تولید انرژی متفاوت‌اند، مواردی مانند افزایش مصرف O_2، قیود مشترک مربوط به تخصیص کربن، دسترسی به عوامل احیاکننده، تامین پیش‌سازهای آنابولیک و موازنه اکسایش-کاهش وجود دارند که ظرفیت تولید زیست‌توده و فعالیت نیتروژناز را محدود می‌کنند. بنابراین، مشابه شدن تولید زیست‌توده در مقادیر بالای O_2 مصرفی برای سه اکسیداز باید به‌عنوان همگرایی زیست‌توده تحت قیود مشترک شبکه تفسیر شود و به معنای یکسان شدن عملکرد تنفسی یا ظرفیت انرژی‌زایی یکسان اکسیدازهای aa_3-like، cbb_3 و bd نمی‌باشد.

۳-۴. مقایسه توزیع شارها هنگام رشد با اکسیداز bd در حضور و غیاب آنزیم NADH6

برای بررسی اثر نقطه ورود عوامل احیاکننده به زنجیره انتقال الکترون در مسیر وابسته به اکسیداز bd، واکنش NADH6 غیرفعال شد. اگرچه انتظار می‌رفت که در عدم فعالیت این مسیر پمپ کننده پروتون، مسیر جایگزین NADH5 فعال شود، نتایج نشان داد که شبکه به‌جای فعال‌سازی NADH5، از مسیرهای جایگزین شامل SDH، HYD و NDH-H_2 برای تامین QH_2 و عوامل احیاکننده مورد نیاز مسیر bd استفاده می‌نماید. این نتیجه از نظر متابولیکی قابل توجه است، زیرا SDH و HYD می‌توانند بدون فعال‌شدن NADH5، QH_2 و عوامل احیاکننده لازم برای ادامه فعالیت مسیر bd را تامین کنند. بنابراین، هنگام غیرفعال‌سازی NADH6، مسیر NADH5 جایگزین نشده و بازتوزیع شار میان چند مسیر تامین کننده الکترون دیگر نمایان شده است. این یافته ها با گزارش‌های پیشین درباره نقش این مسیرها در تامین الکترون، حفظ تعادل اکسایش-کاهش و پشتیبانی از موازنه انرژی شبکه همخوانی دارد [۶, ۲۶]. این انتخاب می‌تواند ناشی از مزیت استوکیومتری مسیرهای جایگزین باشد، زیرا این مسیرها علاوه بر تامین QH_2، در حفظ تعادل پروتونی و انرژی شبکه نیز نقش دارند، در مقابل، NADH5 نقش محدودتری در پشتیبانی از PMF دارد. شکل ۵ تغییر مسیرهای تامین QH_2 و عوامل احیاکننده را در حضور و عدم حضور NADH6 در نقاط بهینه شبیه‌سازی‌ها را نشان می‌دهد.



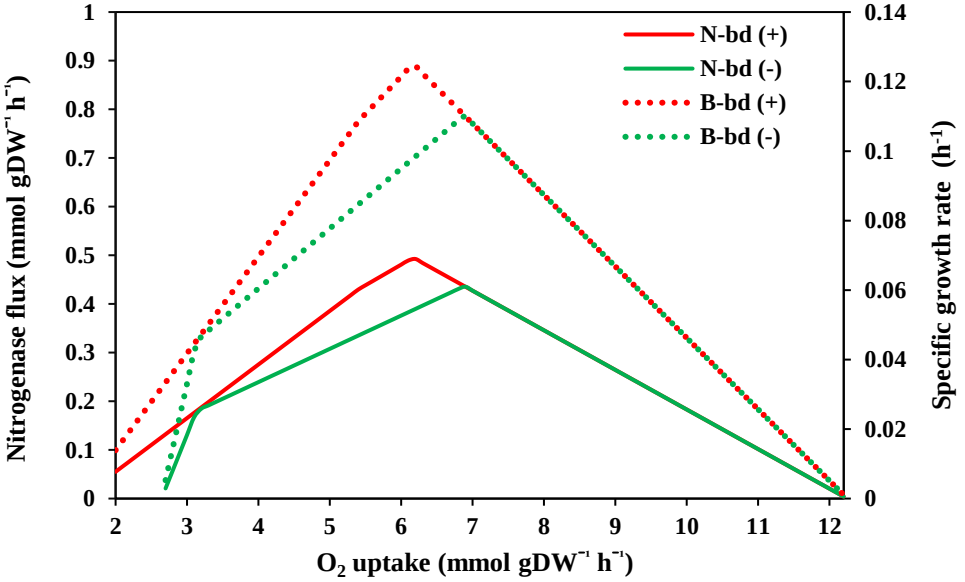
شکل ۵: مقایسه شار برخی از واکنش‌ها هنگام رشد در حضور (اعداد قرمز پایین) و غیاب (اعداد مشکی بالا) واکنش NADH6.

Figure 5. Comparison of selected reaction fluxes during growth in the presence (red values shown below) and absence (black values shown above) of the NADH6 reaction.

تحلیل حساسیت رشد به مصرف O_2 در حضور و غیاب آنزیم NADH6 در شکل ۶ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در حضور NADH6، مسیر bd در مصرف O_2 پایین‌تری (۶/۲ mmol gDW^{-1} h^{-1}) به بیشینه نرخ ویژه رشد برابر ۰/۱۲۴ h^{-1} و فعالیت نیتروژناز برابر ۰/۴۹۲ mmol gDW^{-1} h^{-1} می‌رسد. در مقابل، در حالت غیرفعال‌سازی NADH6، فعالیت موثر شبکه از O_2 بالاتری (۶/۹ mmol gDW^{-1} h^{-1}) آغاز شده درحالی‌که نقطه بیشینه نرخ ویژه رشد (۰/۱۱۰ h^{-1}) و فعالیت نیتروژناز (۰/۴۳۵ mmol gDW^{-1} h^{-1}) کاهش می‌یابند. این جابه‌جایی نشان می‌دهد که در غیاب مسیر پمپ‌کننده پروتونی، شبکه برای دستیابی به بیشینه رشد به مصرف O_2 بیشتری نیاز دارد، اما این افزایش مصرف O_2 با بهبود بازده زیستی همراه نیست.

لازم به ذکر است، به دلیل کم بودن تقاضای زنجیره تنفسی برای عوامل احیاکننده، بخشی از NADH می تواند از طریق واکنش NAD_H_2 به H_2 تبدیل شود (قابل مشاهده در شکل۵). نیتروژناز نیز هم‌زمان با تثبیت N_2، H_2 تولید می‌کند. بخشی از این H_2 می‌تواند توسط HYD مصرف شود و به‌طور غیرمستقیم در تولید QH_2 و ورود عوامل احیاکننده به زنجیره تنفسی نقش داشته باشد، بخش دیگر نیز به صورت محصول جانبی

از شبکه خارج می‌شود. بنابراین، در عدم فعالیت NADH6، مسیر وابسته به H_2 بخشی از جریان الکترون را بدون وابستگی مستقیم به NADH5 پشتیبانی می‌کند.



شکل ۶: اثر نرخ مصرف O_2 بر شارهای نیتروژناز (N) و نرخ ویژه رشد (B) در مسیر تنفسی وابسته به اکسیداز انتهایی bd در حضور (+) و عدم حضور (-) NADH6.

Figure 6. Effect of O_2 uptake rate on nitrogenase flux (N) and specific growth rate (B) in the bd-dependent respiratory pathway in the presence (+) and absence (−) of the NADH6 reaction.

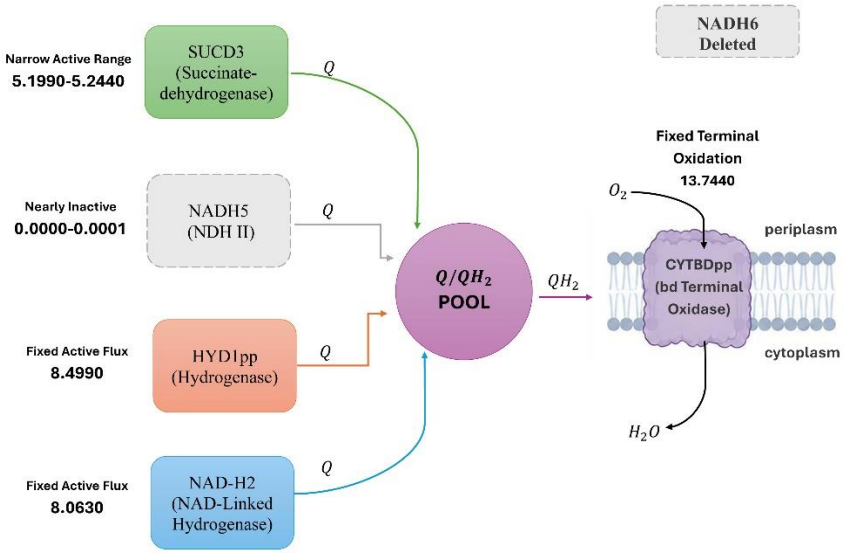
کاهش نرخ ویژه رشد و نیتروژناز پس از غیرفعال‌سازی NADH6 نشان می‌دهد که مسیرهای جایگزین، اگرچه می‌توانند جریان عوامل احیاکننده به زنجیره تنفسی را حفظ کنند، از نظر بازده انرژی جایگزینی معادل با NADH6 نیستند. با افزایش مصرف O_2، تقاضای مسیر bd برای عوامل احیاکننده بیشتر می‌شود و بخش بیشتری از عوامل به سمت احیای O_2 هدایت می‌شود. در نتیجه، سهم الکترون و ATP قابل تخصیص به رشد و نیتروژناز کاهش می‌یابد و بیشینه شار این دو خروجی نسبت به حالت حضور NADH6 پایین‌تر باقی می‌ماند.

با افزایش مصرف O_2، نیاز مسیر اکسیداز bd به عوامل احیاکننده بیشتر شده و شبکه به دلیل ثابت بودن نرخ مصرف منبع کربنی، با محدودیت تامین این عوامل مواجه می‌شود. در این شرایط، جهت برخی واکنش‌های اکسایش-کاهش تغییر می‌کند، به‌طوری‌که H_2 تولید شده فقط محصول جانبی نیست، بلکه برای بازتولید NADH به‌کار می‌رود. هم‌زمان، مسیر تامین Fd_{red} نیز تغییر می‌کند. در مصرف پایین O_2، واکنش ۲-اکسوگلوتارات سنتاز (2-OGS) می‌تواند بدون مصرف NADH، Fd_{red} تولید کند، اما در مصرف بالاتر O_2، جهت شار آن معکوس شده و Fd_{red} مصرف می‌شود. در این حالت، آلفا-کتوگلوتارات (α-KG) تولیدشده می‌تواند وارد مسیرهای تولیدکننده NADH، به‌ویژه واکنش ۲-اکسوگلوتارات دهیدروژناز (2-OGD) شده و مخزن NADH را تقویت کند. در مقابل، Fd_{red} مورد نیاز بیشتر از طریق مسیرهای Fix و Rnf بازتولید می‌شود، مسیرهایی که بازتوزیع عوامل احیاکننده میان NADH، QH2 و Fd_{red} را امکان‌پذیر می‌کنند [۱۴, ۱۵].

در مجموع، غیرفعال‌سازی NADH6 فقط باعث کاهش بازده انرژی نمی‌شود، بلکه مسیرهای ورود و توزیع عوامل احیاکننده در مسیر bd را نیز تغییر می‌دهد. این بازآرایی در Fd_{red} پایین، عمدتا با مسیرهای وابسته به H_2 انجام می‌شود، اما در O_2 بالاتر با بازتولید NADH، تغییر جهت واکنش‌های اکسایش-کاهش و مشارکت Fix/Rnf همراه می‌شود.

۵-۳. تحلیل تغییرپذیری شارها با اکسیداز bd در غیاب آنزیم NADH6

نتایج تحلیل FVA برای واکنش‌های کلیدی مسیر bd در غیاب NADH6 در شکل ۵ آورده شده است. این تحلیل نشان می‌دهد که صفر بودن شار NADH5 فقط به یک جواب یکتا محدود نیست، زیرا در فضای جواب‌های بهینه نیز شار این واکنش نزدیک به صفر باقی می‌ماند. در مقابل، SDH و HYD بازه شار محدودی داشته و مقادیر آن‌ها در جواب‌های بهینه به صورت تقریبی ثابت می‌ماند. بنابراین، در شرایط غیرفعال‌سازی NADH6، شبکه بیشتر از مسیرهای جایگزین تامین عوامل احیاکننده و QH_2 استفاده می‌کند. در نتیجه، فعال نشدن NADH5 به معنای ناتوانی استوکیومتری یا ناکارآمدی ذاتی این واکنش نیست. در چارچوب قیود مدل، مسیرهای جایگزین برای دستیابی به جواب بهینه کافی بوده‌اند.



شکل ۷: نتایج تحلیل FVA برای واکنش‌های کلیدی مسیر اکسیداز bd در غیاب NADH6.

Figure 7. Flux variability analysis (FVA) results for key reactions in the bd oxidase pathway in the absence of NADH6.

۴. نتیجه‌گیری

شبیه‌سازی سیستم تنفسی *ازتوباکتر وینلاندی* در این پژوهش نشان داد که هنگام فعالیت آنزیم NADH6 با مسیرهای aa3-like، cbb_3 و bd، بازده‌های تولید انرژی (به ازای ۰/۵ مول مصرف O_2) متفاوت و به‌ترتیب برابر ۲/۵۰، ۲/۲۵ و ۱/۵۰ مول ATP می‌باشد. در نتیجه، بکارگیری شاخه‌های مختلف تنفسی در مدل رشد

می‌تواند بر کارایی مصرف کربن، موازنه اکسایش-کاهش، رشد، مصرف O_2 و تثبیت N_2 اثر بگذارد. در شبیه-سازی رشد با مصرف یکسان منبع کربنی (سوکسینات) در شرایط مصرف آزاد O_2، مسیر aa3-like در بین اکسیدازها بیشترین نرخ ویژه رشد ($0/157\ h^{-1}$)، شار نیتروژناز ($0/622\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) و ATP سنتاز ($16/897\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) همراه با کمترین مصرف O_2 ($4/608\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) را نشان می‌دهد. در مقابل، مسیر bd منجر به کمترین نرخ ویژه رشد ($0/125\ h^{-1}$)، شار نیتروژناز ($0/495\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) و ATP سنتاز ($12/507\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) و بیشترین مصرف O_2 ($6/168\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) می‌گردد و مسیر cbb_3 نیز عملکردی میانی دارد. این نتایج نشان می‌دهد که مسیر کم‌بازده bd از نظر تولید انرژی، توانایی بیشتری در حفاظت از آنزیم نیتروژناز در برابر O_2 دارد. اما این توانایی با هزینه کردن بیشتر منبع کربنی برای تولید عوامل احیاکننده لازم در سیستم تنفسی و در نتیجه کاهش رشد میکروارگانیسم همراه می‌شود. آنالیزهای تحلیل حساسیت رشد (نسبت به O_2) نشان‌دهنده تقویت انتقال الکترون و تامین انرژی با افزایش O_2 تا یک نقطه بهینه می‌باشد، اما بعد از این نقطه به دلیل مقدار ثابت کربن ورودی، کربن بیشتری صرف تولید عوامل احیاکننده لازم برای احیای O_2 در سیستم تنفسی شده و در نتیجه نرخ ویژه رشد کاهش می‌یابد، درحالی‌که رشد برای هر سه مسیر یکسان می‌شود. غیرفعال‌سازی آنزیم NADH6 در مسیر کم‌بازده bd، منجر به کاهش نرخ ویژه رشد به ($0/110\ h^{-1}$) و افزایش مصرف O_2 به ($6/9\ mmol\ gDW^{-1}\ h^{-1}$) می‌گردد، اما NADH5 فعال نبوده و SDH، HYD و $NDH\text{-}H_2$ بخشی از جریان الکترون مورد نیاز شبکه را جبران می‌نمایند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان‌دهنده تطبیق‌پذیری سیستم تنفسی با توجه به شرایط محیطی برای حفاظت از آنزیم نیتروژناز می‌باشد. از آنجا که مدل حاضر بر قیود استوکیومتری استوار است و تنظیم بیان ژن، سینتیک آنزیمی و اثر مستقیم O_2 بر آنزیم نیتروژناز را بازنمایی نمی‌کند، نتایج باید به‌عنوان پیش‌بینی ظرفیت‌های عملکردی شبکه تفسیر شوند. این پیش‌بینی‌ها می‌توانند مبنایی برای طراحی آزمایش‌های هدفمند و بررسی تجربی نقش شاخه‌های تنفسی در رشد و تثبیت N_2 باشند.

۵. تشکر و قدردانی: از راهنمایی‌های سرکار خانم دکتر مریم آفرین در مبحث مدل‌سازی تثبیت N_2 تشکر و قدردانی می‌شود.

۶. مشارکت نویسندگان: این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول تحت راهنمایی نویسنده دوم انجام شده است.

۷. منابع

[1] Barron, S., Mus, F., & Peters, J. W. (2024). Nitrogen-fixing gamma proteobacteria Azotobacter vinelandii—A blueprint for nitrogen-fixing plants? *Microorganisms*, *12*(10), 2087. https://doi.org/10.3390/microorganisms12102087.

[2] Martin del Campo, J. S., Rigsbee, J., Bueno Batista, M., Mus, F., Rubio, L. M., Einsle, O., ... & Dos Santos, P. C. (2022). Overview of physiological, biochemical, and regulatory aspects of nitrogen fixation in Azotobacter vinelandii. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *57*(5-6), 492-538. https://doi.org/10.1080/10409238.2023.2181309.

[3] Harris, D. F., Rucker, H. R., Garcia, A. K., Yang, Z.-Y., Chang, S. D., Feinsilber, H., ... & Seefeldt, L. C. (2024). Ancient nitrogenases are ATP dependent. *mBio*, *15*(7), e01271-24. https://doi.org/10.1128/mbio.01271-24.

[4] Franke, P., Freiberger, S., Zhang, L., & Einsle, O. (2025). Conformational protection of molybdenum nitrogenase by Shethna protein II. *Nature*, *637*(8047), 998-1004. https://doi.org/10.1038/s41586-024-08355-3.

[5] Sabra, W., Zeng, A.-P., Lünsdorf, H., & Deckwer, W.-D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of Azotobacter vinelandii alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9), 4037-4044. https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000.

[6] Alleman, A. B., Mus, F., & Peters, J. W. (2021). Metabolic model of the nitrogen-fixing obligate aerobe Azotobacter vinelandii predicts its adaptation to oxygen concentration and metal availability. *mBio*, *12*(6), e02593-21. https://doi.org/10.1128/mBio.02593-21.

[7] Kelly, M. J., Poole, R. K., Yates, M. G., & Kennedy, C. (1990). Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome bd terminal oxidase complex in Azotobacter vinelandii: Mutants deficient in the cytochrome d complex are unable to fix nitrogen in air. *Journal of Bacteriology*, *172*(10), 6010-6019. https://doi.org/10.1128/jb.172.10.6010-6019.1990.

[8] Poole, R. K., & Hill, S. (1997). Respiratory protection of nitrogenase activity in Azotobacter vinelandii—Roles of the terminal oxidases. *Bioscience Reports*, *17*(3), 303-317. https://doi.org/10.1023/A:1027336712748.

[9] Rey, L., & Maier, R. J. (1997). Cytochrome c terminal oxidase pathways of Azotobacter vinelandii: Analysis of cytochrome c4 and c5 mutants and up-regulation of cytochrome c-dependent pathways with N2 fixation. *Journal of Bacteriology*, *179*(22), 7191-7196. https://doi.org/10.1128/jb.179.22.7191-7196.1997.

[10] Oelze, J. (2000). Respiratory protection of nitrogenase in Azotobacter species: Is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(4), 321-333. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00545.x.

[11] Bertsova, Y. V., & Bogachev, A. V. (2002). Operation of the cbb3-type terminal oxidase in Azotobacter vinelandii. *Biochemistry (Moscow)*, *67*(6), 622-626. https://doi.org/10.1023/A:1016185919112.

[12] Borisov, V. B., Giardina, G., Pistoia, G., & Forte, E. (2025). Cytochrome bd-type oxidases and environmental stressors in microbial physiology. *Advances in Microbial Physiology*, *86*, 199-255. https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2024.05.001.

[13] Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C. A., & Hennecke, H. (1996). A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of Bradyrhizobium japonicum. *Journal of Bacteriology*, *178*(6), 1532-1538. https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1532-1538.1996.

[14] Alleman, A. B., Garcia Costas, A., Mus, F., & Peters, J. W. (2022). Rnf and Fix have specific roles during aerobic nitrogen fixation in Azotobacter vinelandii. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(17), e01049-22. https://doi.org/10.1128/aem.01049-22.

[15] Alleman, A. B., & Peters, J. W. (2023). Mechanisms for generating low potential electrons across the metabolic diversity of nitrogen-fixing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(5), e00378-23. https://doi.org/10.1128/aem.00378-23.

[16] Ledbetter, R. N., Garcia Costas, A. M., Lubner, C. E., Mulder, D. W., Tokmina-Lukaszewska, M., Artz, J. H., ... & Seefeldt, L. C. (2017). The electron bifurcating FixABCX protein complex from Azotobacter vinelandii: Generation of low-potential reducing equivalents for nitrogenase catalysis. *Biochemistry*, *56*(32), 4177-4190. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00389.

[17] Belevich, I., Bloch, D. A., Belevich, N., Wikström, M., & Verkhovsky, M. I. (2007). Exploring the proton pump mechanism of cytochrome c oxidase in real time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(8), 2685-2690. https://doi.org/10.1073/pnas.0608794104.

[18] Bertsova, Y. V., Bogachev, A. V., & Skulachev, V. P. (1998). Two NADH:ubiquinone oxidoreductases of Azotobacter vinelandii and their role in the respiratory protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1363*(2), 125-133. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00094-7.

[19] Castillo, T., Heinzle, E., Peifer, S., Schneider, K., & Peña M, C. F. (2013). Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in Azotobacter vinelandii. *Process Biochemistry*, *48*(7), 995-1003. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.014.

[20] Inomura, K., Bragg, J., & Follows, M. J. (2017). A quantitative analysis of the direct and indirect costs of nitrogen fixation: A model based on Azotobacter vinelandii. *The ISME Journal*, *11*(1), 166-175. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.97.

[21] García, A., Ferrer, P., Albiol, J., Castillo, T., Segura, D., & Peña, C. (2018). Metabolic flux analysis and the NAD(P)H/NAD(P)+ ratios in chemostat cultures of Azotobacter vinelandii. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 10. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0860-8.

[22] Wu, C., Herold, R. A., Knoshaug, E. P., Wang, B., Xiong, W., & Laurens, L. M. L. (2019). Fluxomic analysis reveals central carbon metabolism adaptation for diazotroph Azotobacter vinelandii ammonium excretion. *Scientific Reports*, *9*(1), 13209. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49717-6.

[23] Tec-Campos, D., Zuñiga, C., Passi, A., Del Toro, J., Tibocha-Bonilla, J. D., Zepeda, A., ... & Zengler, K. (2020). Modeling of nitrogen fixation and polymer production in the heterotrophic diazotroph Azotobacter vinelandii DJ. *Metabolic Engineering Communications*, *11*, e00132. https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00132.

[24] Esembaeva, M. A., Melikhova, E. V., Kachnov, V. A., & Kulyashov, M. A. (2026). From single organisms to communities: Modeling methanotrophs and their satellites. *Microorganisms*, *14*(1), 3. https://doi.org/10.3390/microorganisms14010003.

[25] Ludwig, B., & Schatz, G. (1980). A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa3) from Paracoccus dentrificans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(1), 196-200. https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.196.

[26] Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., ... & Wood, D. (2009). Genome sequence of Azotobacter vinelandii, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, *191*(14), 4534-4545. https://doi.org/10.1128/JB.00504-09.

[27] Alleman, A. B. (2021). *Insights into mechanisms of redox homeostasis in nitrogen-fixing Azotobacter vinelandii* (Doctoral dissertation, Washington State University).

[28] Resendis-Antonio, O., Reed, J. L., Encarnación, S., Collado-Vides, J., & Palsson, B. Ø. (2007). Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation in Rhizobium etli. *PLoS Computational Biology*, *3*(10), e192. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030192.

[29] Knutson, C. M., & Barney, B. M. (2026). Azotobacter vinelandii gene fitness following carbon shift from sucrose to acetate, succinate and glycerol. *Microbiology*, *172*(1), 001643. https://doi.org/10.1099/mic.0.001643.

[30] Rauhamäki, V., Bloch, D. A., & Wikström, M. (2012). Mechanistic stoichiometry of proton translocation by cytochrome cbb3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(19), 7286-7291. https://doi.org/10.1073/pnas.1202151109.

[31] Castillo, T., García, A., Padilla-Córdova, C., Díaz-Barrera, A., & Peña, C. (2020). Respiration in Azotobacter vinelandii and its relationship with the synthesis of biopolymers. *Electronic Journal of Biotechnology*, *48*, 36-45. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.08.001.

[32] Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., & Verkhovsky, M. I. (2011). The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1807*(11),1398-1413. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.06.016.

[33] Inomura, K., Bragg, J., Riemann, L., & Follows, M. J. (2018). A quantitative model of nitrogen fixation in the presence of ammonium. *PLOS ONE*, *13*(11), e0208282. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208282.