

УДК 57:51-76

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СИНТЕЗА БИОЭТАНОЛА И МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ТЕРМОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *GEOBACILLUS*

© 2013 г. М.А. Нуриддинов¹, Ф.В. Казанцев¹, А.С. Розанов¹,
К.Н. Козлов², С.Е. Пельтек¹, Н.А. Колчанов^{1,3}, И.Р. Акбердин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: akberdin@bionet.nsc.ru

² Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 15 августа 2013 г. Принята к публикации 5 сентября 2013 г.

В работе представлена разработанная и адаптированная к имеющимся экспериментальным данным математическая модель биосинтеза биоэтанола и молочной кислоты в клетках *Geobacillus* spp. Показано, что математическая модель позволяет осуществлять *in silico* планирование экспериментов с бактерией *Geobacillus* spp. методами молекулярно-генетической инженерии, предсказывать динамику изменения концентрации синтезируемых биоэтанола и молочной кислоты в зависимости от молекулярно-генетических манипуляций с активностью ферментов метаболической системы.

Ключевые слова: математическое моделирование, кинетические данные, молочная кислота, биоэтанол, *Geobacillus*.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все большее внимание исследователей и биотехнологических компаний привлекают возобновляемые источники энергии. Предполагается, что наиболее перспективным источником для получения энергии и материалов в ближайшее время станут сахара из лигноцеллюлозной биомассы растений (Kasi, Ragauskas, 2010). В результате гидролиза лигноцеллюлозной биомассы могут быть получены сахара, до 50 % массы которых составляют пентасахара. Это значительная часть сырья, которой нельзя пренебрегать при разработке новой технологии переработки. Использование смеси сахаров предполагает возможность их утилизации микроорганизмами-продуцентами. Большинство продуцентов, используемых в настоящее время, разрабатывались для переработки крахмала и зачастую не способны перерабатывать пентасахара. В результате возникла потребность в поиске новых микроорганизмов, способных их заменить.

Еще одной тенденцией современной биотехнологии является использование термофильных бактерий в качестве продуцентов спиртов и органических кислот. Их использование позволяет получить ряд технологических преимуществ: облегчение поддержания температурных характеристик, снижение вязкости используемых в производстве жидкостей, снижение вероятности контаминации в результате взаимодействия с внешней средой, высокая скорость роста и процессов, которые катализируют микроорганизмы (Sonnleitner *et al.*, 1982).

Существует достаточно широкий круг микроорганизмов, обитающих в геотермальных источниках, способных к гетеротрофному питанию. В основном это прокариотические живые организмы. Среди микроорганизмов, способных жить при температуре выше 60 °С, широко распространены бактерии и археи (Cavicchioli *et al.*, 2011). Представители отдела *Fermicutes* широко распространены в термальных источниках. Среди них встречаются как полностью, так

и факультативно анаэробные микроорганизмы. Термофильные представители этого отдела хорошо культивируются в лабораторных условиях, в том числе и *Geobacillus* spp. – грамположительные, спорообразующие аэробные или факультативно анаэробные, широко представленные в термальных местах обитания микроорганизмы. Представители рода *Geobacillus* способны жить в температурном диапазоне от 40 до 75 °С. Большинство видов этого рода способны перерабатывать такие сахара, как D-глюкоза, D-ксилоза и L-арабиноза, в диапазоне температур 55–70 °С до смеси продуктов, содержащей лактат, формиат, ацетат и этанол. Первоначально представители этого рода относились к роду *Bacillus*, но в 2001 г. они были переклассифицированы в отдельный род ввиду наличия большого числа метаболических признаков, отличающих их от рода *Bacillus* (Nazina *et al.*, 2001). Часть представителей этого рода обладает хорошо развитым комплексом ферментов гидролиза гемицеллюлозы, что можно видеть в результате исследования аннотированных геномов этих микроорганизмов (Wu *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2012). Благодаря возможностям утилизации широкого круга сахаров, эти микроорганизмы являются перспективными продуцентами, способными использовать в качестве субстрата сахара, источником накопления которых является гидролиз лигноцеллюлозной биомассы. В литературе описаны случаи модификации представителей рода *Geobacillus* экзогенной ДНК, что делает его перспективным для применения методов направленного мутагенеза с целью получения термофильных продуцентов (Cripps *et al.*, 2009).

Бактерии широко используются в современной биотехнологии для наработки белков и метаболитов. Первоначально для этого применялись природные продуценты. Такой подход требовал широкомасштабных исследований методами скрининга природных популяций бактерий. После открытия явления мутагенеза в результате химических или физических воздействий на клетку его стали применять для изменения свойств микроорганизмов. Использование методов статистического мутагенеза позволило достичь значительных результатов по наработке целевых продуктов, как белков, так и метаболитов (Parekh *et al.*, 2000). Во второй половине XX столетия происходило

поступательное развитие методов исследования и модификации генетического материала как прокариотических, так и эукариотических организмов (Kuipers *et al.*, 1999), в результате чего появились предпосылки, позволяющие направленно изменять генетический материал микроорганизмов, а вместе с ним и их метаболические свойства. Более того, значительный скачок в накоплении знаний о процессах, происходящих внутри клетки, произошел за счет создания и применения методов секвенирования геномов микроорганизмов (Keasling, 2012). Стоит отметить, что молекулярно-генетические процессы осуществляются при участии огромного количества взаимосвязанных компонентов этих систем: ферментов, регуляторных элементов, низкомолекулярных соединений и кофакторов. Выявление закономерностей, поиск новых биологических знаний на основе анализа таких объемных разнородных и разномасштабных экспериментальных данных требуют использования современных теоретических подходов, в частности метода математического моделирования. Математическая модель позволяет описывать динамику изменений внутри- и внеклеточных метаболитов в ответ на генетическую модификацию и/или изменение условий внешней среды. Такая модель позволяет предсказать *in silico* фенотипическое проявление конкретной генетической модификации (нокаут гена, модификация промотора) с целью увеличения выхода конечного продукта. На данный момент уже созданы математические модели, описывающие центральный метаболизм глюкозы для *Saccharomyces cerevisiae* (Rizzi *et al.*, 1997; Smallbone *et al.*, 2010) и *Escherichia coli* (Chassagnole *et al.*, 2002; Kadir *et al.*, 2010; Peskov *et al.*, 2012), а также метаболизм ксилулозы для *Lactococcus lactis* (Oshiro *et al.*, 2009), которые были успешно экспериментально верифицированы.

Объектом данного исследования является центральный метаболизм бактерии *Geobacillus* spp. Особенностью бактерий данного вида является их высокий оптимум роста, а также способность потреблять ксилозу, что делает их использование более предпочтительным в ряде технологических процессов (Tang *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2010). Для бактерий данного рода экспериментально показан синтез

таких внеклеточных метаболитов, как лактат (из пирувата), ацетат и этанол (из ацетил-КоА) (Cripps *et al.*, 2009).

Анализ путей центрального метаболизма глюкозы для 10 штаммов разных видов бактерий рода *Geobacillus*, представленных в базе данных KEGG, показал их сходство с метаболическими путями *E. coli*, что делает возможным использование уже построенных моделей для относительно хорошо исследованного модельного объекта в качестве стартового приближения кинетики молекулярно-генетических процессов в клетке представителя рода *Geobacillus*. Однако в ходе детального анализа данных, представленных в базе KEGG, также была выявлена и вариабельность в метаболизме пирувата у представителей этого рода. Так, для штаммов *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus* sp. WCH70 и *Geobacillus* sp. Y4.1MC1 показано участие фермента формат ацетилтрансферазы в пути превращения пирувата в ацетил-КоА (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=gwc&mapno=00620&mapscale=1.0&show_description=hide, [EC:2.3.1.54]), а у *Geobacillus thermodenitrificans* присутствует пируват ферродоксин оксидоредуктаза (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?gtn00620, [EC:1.2.7.1]). Для штаммов *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermo-levorans*, *Geobacillus* sp. WCH70 показано отсутствие ацетальдегиддегидрогеназы на пути превращения ацетил-КоА в ацетальдегид (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=gka&mapno=00620&mapscale=1.0&show_description=hide, [EC:1.2.1.10]). Таким образом, в нескольких узловых точках центрального метаболизма глюкозы – метаболизме пирувата и ацетил-КоА – наблюдаются существенные различия в строении метаболических путей по сравнению со структурно-функциональной организацией одноименного пути у *E. coli*, что не может не сказаться на наработке экстраклеточных метаболитов – лактата, этанола и ацетата. Безусловно, ряд ферментативных реакций в центральном метаболизме в клетке *Geobacillus* sp. остаются пока экспериментально неидентифицированными. Также относительно недавно были опубликованы результаты экспериментального исследования структурно-функциональной организации метаболических путей и динамики

потоков веществ в них при культивировании клеток *Geobacillus thermoglucosidasius* M10EX в аэробных, микроаэробных и анаэробных условиях (Tang *et al.*, 2009). Полученные результаты позволяют предположить, что существующие изменения в структурно-функциональной организации центрального метаболизма в клетке *Geobacillus* sp. по сравнению как с аналогичными процессами в клетке *E. coli*, так и между различными видами рода *Geobacillus* могут быть связаны и с особенностями условий культивирования клеток.

В соответствии с этим математическая модель центрального метаболизма бактерии *Geobacillus* spp. может позволить учесть указанные выше изменения в структурно-функциональной организации метаболического пути, выявить ключевые гены-мишени, внесение генно-инженерных модификаций в последовательности которых приводит к изменению динамики синтеза конечных продуктов, и на основе сравнительного анализа с экспериментальными кинетическими данными предсказать вариант структурно-функциональной организации метаболического пути, реализуемого у представителей этого рода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В результате интеграции данных из KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) и экспериментальных фактов об особенностях функционирования геномной сети метаболизма пирувата в клетке *Geobacillus* spp. (Cripps *et al.*, 2009) была создана структурная модель биосинтеза этанола, лактата и ацетата в клетке *Geobacillus* spp. (рис. 1). В работе Криппса с соавторами был использован метод метаболической инженерии для оптимизации сети биосинтеза этанола штаммами *Geobacillus thermoglucosidasius*, мутантными по *ldh* (лактатдегидрогеназа) и *pflB* (пируват формат лиаза) генам, и с повышенной экспрессией гена, кодирующего пируватдегидрогеназу.

В качестве субстратов «на входе» в систему используются такие метаболиты, как глюкоза и ксилоза. Структурная модель включает в себя следующие метаболические процессы: гликолиз, метаболизм пирувата, пентозофосфатный шунт и в обобщенном виде – цикл трикарбоновых кислот (рис. 2).

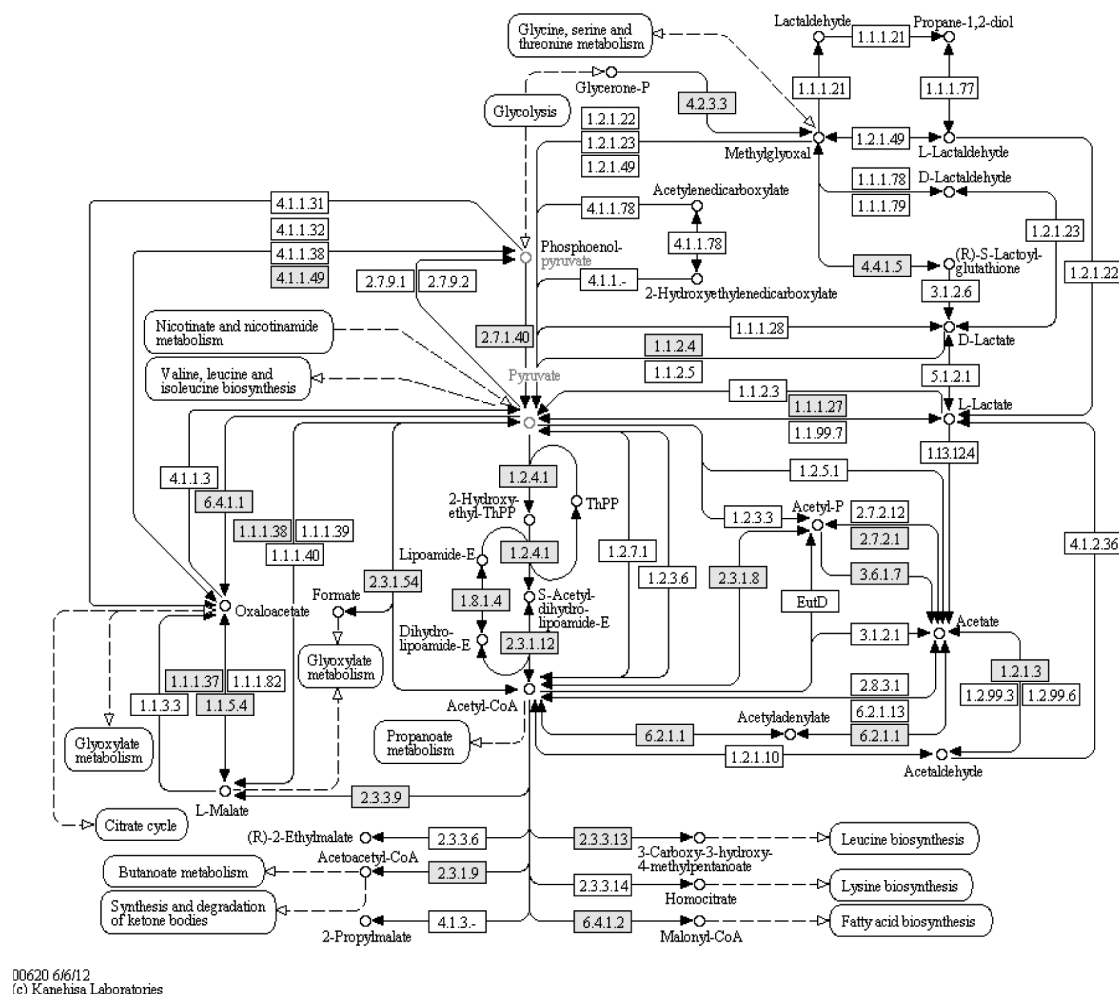


Рис. 1. Генная сеть метаболизма пирувата в клетке *Geobacillus* spp., реконструированная в системе KEGG.

Прямоугольник обозначает фермент, катализирующий конкретную реакцию в метаболизме пирувата для всех типов бактерий, а выделенные прямоугольники – именно в клетке *Geobacillus* spp. Цифры в прямоугольнике обозначают ЕС номер данного фермента, например [ЕС:1.2.4.1] – пируватдегидрогеназа.

На основе полученной структурной модели и опубликованных ранее математических моделей (Chassagnole *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2009; Kadir *et al.*, 2010; Peskov *et al.*, 2012) была реконструирована интегрированная кинетическая модель биосинтеза этанола, лактата и ацетата в клетке *Geobacillus* spp. Интегрированная кинетическая модель разработана на основе обобщенного химико-кинетического подхода с использованием обобщенных функций Хилла (Likhoshvai, Ratushny, 2007), который позволяет описывать молекулярно-генетические процессы, связывающие компоненты генной сети, системой дифференциальных уравнений, в том числе в формате компьютерной среды SciLab (<https://www.scilab.org/>). SciLab – свободное программное обеспе-

чение с открытым кодом, предназначенное для реконструкции и исследования математических моделей. Данный инструмент обладает богатой функциональностью, и для него существуют версии для разных операционных систем (ОС). Таким образом, реконструированная в данном инструменте модель однозначно воспроизводит результаты на любом компьютере без применения сторонних программ конвертеров для разных ОС. Модель включает 22 переменные, одна из которых характеризует рост биомассы (формула 2.1), остальные уравнения описывают динамику изменения концентрации метаболитов (формулы 2.2–2.22), представленных на рис. 2 (например концентрацию глюкозы, пирувата, этанола), а также 127 параметров (табл. 1).

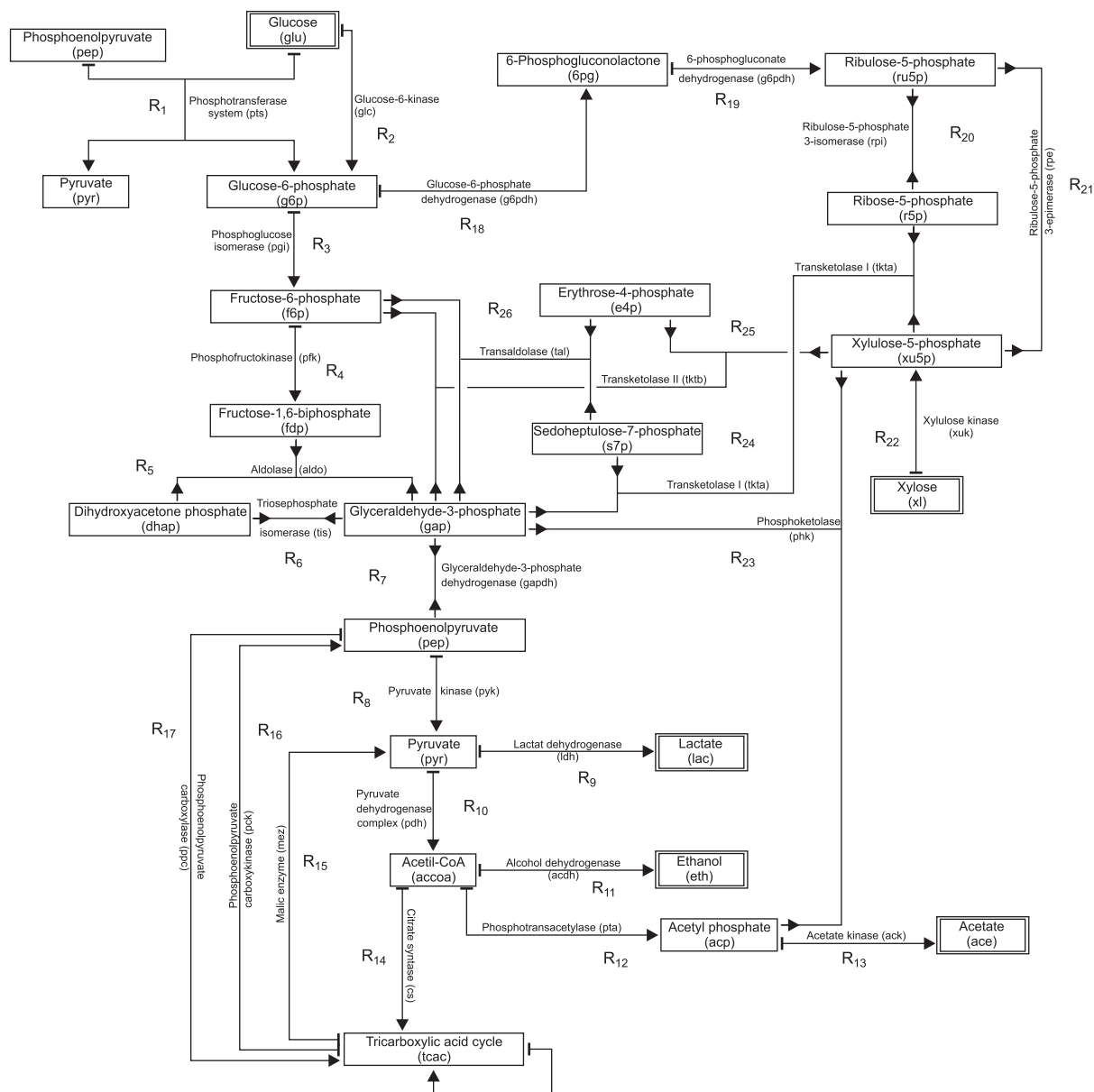


Рис. 2. Структурная модель биосинтеза этанола, лактата и ацетата в клетке *Geobacillus* spp.

Прямоугольник – конкретный метаболит; над каждой стрелкой указано полное и сокращенное название фермента, катализирующего конкретную реакцию. Двойными прямоугольниками обозначены начальные субстраты в метаболической системе (глюкоза и ксилоза) и конечные продукты (лактат, этанол и ацетат). Тупой конец стрелки (—) обозначает, где начинается ферментативная реакция, острый конец стрелки (→) обозначает, во что метаболизируются субстраты реакции; острые стрелки на обоих концах – реакция обратима. R_i – порядковый номер ферментативной реакции R.

Задача поиска параметров модели, которые позволяют адекватно экспериментальным данным воспроизвести кинетику метаболических процессов, была решена с помощью интеграции SciLab и программного комплекса DEEP (<http://urchin.spbcas.ru/trac/DEEP>) на высокопроизводительном кластере ЦКП «Биоинформатика».

Программный комплекс DEEP был разработан и успешно применен в Санкт-Пе-

тербургском политехническом университете для решения задачи выявления генетических взаимодействий в клетках эмбриона на его ранних стадиях развития у дрозофилы (Kozlov, Samsonov, 2011). Основой комплекса является модифицированный метод дифференциальной эволюции – стохастический итеративный алгоритм многомерной математической оптимизации с применением идей генетических

Таблица 1

Параметры интегрированной кинетической модели биосинтеза
этанола, лактата и ацетата в клетке *Geobacillus* spp.

Процесс	Параметр, размерность	Значение перед адаптацией модели	Значение после адаптации модели в программном комплексе DEEP
Рост культуры	m	0,6	0,6
	X_m	40	42
	V_x	1,7	1,7
	K_x	8,3	7,7
	K_{xs}	5	4,5
PTS-транспорт глюкозы	V_{pts}^* , mmol/gDCW h	26	103
	K_{pts1} , mM	1	1
	K_{pts2} , mM	0,01	0,01
	K_{pts3} , mM	1	1
	K_{pts4} , mM	0,5	0,5
Не PTS-транспорт глюкозы (фосфорилирование глюкозы)	V_{glk}^* , mmol/gDCW h	4,5	1,5
	K_{glkm} , mM	0,12	0,12
	K_{glkl} , mM	0,5	0,5
Глюкозофосфатизомераза	V_{pgi}^* , mmol/gDCW h	26,4	167,4
	K_{pgieq} , mM	0,43	0,43
	K_{pgi1} , mM	2,5	2,5
	K_{pgi2} , mM	0,2	0,2
	K_{pgi3} , mM	0,2	0,2
Фосфофруктокиназа	K_{pgi4} , mM	0,2	0,2
	V_{pfk}^* , mmol/gDCW h	25	154
	L_{pfk}	1000	1000
	K_{atp1} , mM	4,3	4,3
	K_{atp2} , mM	4,7	4,7
Альдолаза	K_{adp1} , mM	1	1
	K_{adp2} , mM	99	99
	K_{pfk1} , mM	0,15	0,15
	K_{pfk2} , mM	3,3	3,3
	V_{aldo}^* , mmol/gDCW h	2,8	0,1
Триозофосфатизомераза	$K_{alldoeq}$, mM	0,14	0,14
	V_{blf}	2	2
	K_{aldo1} , mM	0,133	0,133
	K_{aldo2} , mM	0,01	0,01
	K_{aldo3} , mM	0,01	0,01
Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	K_{aldo4} , mM	0,6	0,6
	V_{tis}^* , mmol/gDCW h	200	685
	K_{tiseq}	1,39	1,39
	K_{tis1} , mM	2,8	2,8
	K_{tis2} , mM	0,3	0,3
Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	V_{gapdh}^* , mmol/gDCW h	121	55
	$K_{gapdheq}$	0,6	0,6
	K_{gapdh1} , mM	0,15	0,15

Продолжение таблицы 1

Процесс	Параметр, размерность	Значение перед адаптацией модели	Значение после адаптации модели в программном комплексе DEEP
Фосфоенолпируваткарбоксилаза	K_{gapdh2} , mM	0,1	0,1
	K_{gapdh3} , mM	0,45	0,45
	K_{gapdh4} , mM	0,02	0,02
	V_{ppc}^* , mmol/gDCW h	0,19	63,5
	K_{ppcm} , mM	0,3	0,3
	K_{ppc1} , mM	0,03	0,03
	K_{ppc2} , mM	1,3	1,3
	K_{ppc3} , mM	0,05	0,05
	K_{ppc4} , mM	0,8	0,8
	K_{ppc5} , mM	0,09	0,09
Фосфоенолпируваткарбоксикиназа	K_{ppc6} , mM	0,27	0,27
	V_{pck}^* , mmol/gDCW h	4,5	80
	K_{pckm1} , mM	0,67	0,67
	K_{pckm2} , mM	0,07	0,07
	K_{pcki1} , mM	0,04	0,04
	K_{pcki2} , mM	0,04	0,04
	K_{pcki3} , mM	0,67	0,67
	K_{pcki4} , mM	0,06	0,06
	V_{mez}^* , mmol/gDCW h	0,07	4,2
	K_{mezeq}	0,1	0,1
Малатдегидрогеназа	K_{mez1} , mM	0,37	0,37
	V_{pyk}^* , mmol/gDCW h	1	5
Пируваткиназа	L_{pyk}	1000	1000
	K_{pyk1} , mM	0,3	0,3
	K_{pyk2} , mM	0,2	0,2
	K_{pyk3} , mM	22,5	22,5
	K_{pyk4} , mM	0,26	0,26
	K_{pyk5} , mM	0,2	0,2
	V_{pdh}^* , mmol/gDCW h	27171	957
	K_{pdh1} , mM	46	46
	K_{pdh2} , mM	1	1
	K_{pdh3} , mM	0,4	0,4
Пируватдегидрогеназный комплекс	K_{pdh4} , mM	0,015	0,015
	K_{pdh5} , mM	0,1	0,1
	K_{pdh6} , mM	0,01	0,01
	V_{ldh2}^* , mmol/gDCW h	2,5	2
	K_{ldh2m} , mM	0,1	0,1
	K_{ldh2a} , mM	6,4	6,4
	K_{ldh2i} , mM	3,6	3,6
	V_{pta}^* , mmol/gDCW h	12,6	10,6
	K_{ptaeq}	0,03	0,03
	K_{ptai1} , mM	0,2	0,2
Лактатдегидрогеназа	K_{ptai2} , mM	0,2	0,2
	K_{ptai3} , mM	0,03	0,03
Фосфотрансацетилаза			

Окончание таблицы 1

Процесс	Параметр, размерность	Значение перед адаптацией модели	Значение после адаптации модели в программном комплексе DEEP
Алькогольдегидрогеназа	K_{ptam} , mM	0,7	0,7
	K_{ptapm} , mM	2,6	2,6
	K_{ptapi} , mM	2,6	2,6
	V_{acdh}^* , mmol/gDCW h	5	190
	K_{acdhm} , mM	0,1	0,1
Ацетаткиназа	V_{ack}^* , mmol/gDCW h	2865	39
	K_{ackeq}	174	174
	K_{ack1} , mM	0,16	0,16
	K_{ack2} , mM	7	7
	K_{ack3} , mM	0,07	0,07
Цитратсинтаза	K_{ack4} , mM	0,5	0,5
	V_{cs}^* , mmol/gDCW h	17,36	1000
	K_{csm1} , mM	0,04	0,04
	K_{csm2} , mM	0,18	0,18
	K_{csd} , mM	0,1	0,1
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа	K_{csi1} , mM	0,00033	0,00033
	K_{csi2} , mM	0,0084	0,0084
	V_{g6pdh}^* , mmol/gDCW h	1	980
	K_{g6pdh1} , mM	1	1
	K_{g6pdh2} , mM	0,18	0,18
6-фосфоглюканат дегидрогеназа	K_{g6pdh3} , mM	0,015	0,015
	K_{g6pdh4} , mM	0,01	0,01
	V_{6pdh}^* , mmol/gDCW h	1,8	423
	K_{6pdh1} , mM	0,1	0,1
	K_{6pdh2} , mM	0,03	0,03
Пентозофосфатэпимераза	K_{6pdhi1} , mM	0,01	0,01
	K_{6pdhi2} , mM	3	3
	V_{rpe}^* , mmol/gDCW h	18,5	166
	K_{rpeeq} , mM	1,4	1,4
Пентозофосфатизомераза	V_{rpi}^* , mmol/gDCW h	13,3	537
	K_{rpieq} , mM	4	4
Транскетолаза А	V_{tkta}^* , mmol/gDCW h	29	0,1
	K_{tktaeq} , mM	1,1	1,1
Транскетолаза В	V_{tktb}^* , mmol/gDCW h	316	228
	K_{tktbek} , mM	10	10
Трансальдолаза	V_{tal}^* , mmol/gDCW h	24,5	11,3
	K_{taleq} , mM	1	1
Ксилотакиназа	V_{xuk} , mmol/gDCW h	88	0,1
	K_{xukm} , mM	19	19
	K_{xuki} , mM	0,25	0,25
Фосфокетолаза	V_{phk}^* , mmol/gDCW h	20	66
	K_{phkm} , mM	0,19	0,19

Примечание. Использованы значения параметров, полученные в работах ряда авторов (Chassagnole *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2009; Kadir *et al.*, 2010) для соответствующих реакций R_1 – R_{26} (рис. 2 и см. формулы 1.1–1.26).

алгоритмов (Storn, Price, 1997). В программном комплексе DEEP реализована многопоточная версия метода, обеспечивающая высокую скорость решения на многоядерных вычислительных узлах.

На первом шаге метод генерирует фиксированное количество случайных векторов параметров как начальное условие в первом поколении «популяции». После этого вычисляется вес функционала для каждой «популяции». На каждом последующем шаге происходит «скрещивание» параметров векторов как аналог обмена генами между популяциями с получением новых векторов-«популяций». Если новый вектор параметров имеет меньший вес функционала, чем родительский, то он заменяет родительский вектор в следующем поколении. Вычисления останавливаются при преодолении заданной границы функционала за фиксированное количество итераций. В качестве функции минимизации использовано евклидово расстояние теоретических расчетов

от экспериментальных, опубликованных Cripps с соавт. (2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начальные значения переменных и значения параметров перед адаптацией модели к экспериментальным данным были взяты из данных ряда авторов (Chassagnole *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2009; Kadir *et al.*, 2010; Peskov *et al.*, 2012), в которых эти значения оценены или выявлены в экспериментах на клетках *Escherichia coli* и *Lactococcus lactis*. Математическая модель была адаптирована к экспериментальным данным (Cripps *et al.*, 2009, рис. 1, а): временная кинетика потребления глюкозы клеткой *Geobacillus thermoglucosidasius* и синтеза конечных продуктов (рис. 3) с помощью варьирования нескольких параметров (табл. 1, указаны*) в программном комплексе DEEP.

Начальные значения переменных (концентрации метаболитов) представлены в табл. 2.

Таблица 2

Начальные значения переменных модели биосинтеза этанола, лактата и ацетата в клетке *Geobacillus* spp. (Chassagnole *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2009; Kadir *et al.*, 2010)

Название метаболита	Сокращенное название метаболита в модели	Начальная концентрация, mM	Название метаболита	Сокращенное название метаболита в модели	Начальная концентрация, mM
АТФ	C _{atp}	4	Фосфоенол пируват	C _{rep}	3
АДФ	C _{adp}	0,6	Пируват	C _{pyr}	3
АМФ	C _{amp}	1	Лактоза	C _{laci}	0
НАД+	C _{nad}	1,5	Ацетил-CoA	C _{accoa}	0,1
НАДН	C _{nadh}	0,1	Оксалоацетат	C _{oaa}	0,1
НАДР+	C _{nadp}	0,2	Ацетилфосфат	C _{acp}	0,1
НАДРН	C _{nadph}	0,06	Ацетат	C _{ace}	0
КоА	C _{coa}	0,001	6-фосфоглюконат	C _{6pg}	0,1
Фосфат	C _p	10	Рубило-5-зофосфат	C _{ru5p}	0,1
Концентрация клеток в культуре	X	0,1	Рибозо-5-фосфат	C _{r5p}	0,1
Глюкоза экстраклеточная	C _{glc}	190	Ксилоза экстраклеточная	C _{xl}	0
Глюкоза-6-фосфат	C _{g6p}	0,1	Ксилоза внутриклеточная	C _{xli}	0,1
Фруктоза-6-фосфат	C _{f6p}	0,1	Ксилулоза-5-фосфат	C _{xu5p}	0,1
Фруктоза-1,6-дифосфат	C _{fdp}	0,1	Седогептулоза-7-фосфат	C _{s7p}	0,1
Глицеральдегид фосфат	C _{gap}	0,1	Эритроза-4-фосфат	C _{e4p}	0,1
Дегидроксиацетон фосфат	C _{dhap}	0,1	Этанол	C _{eth}	0

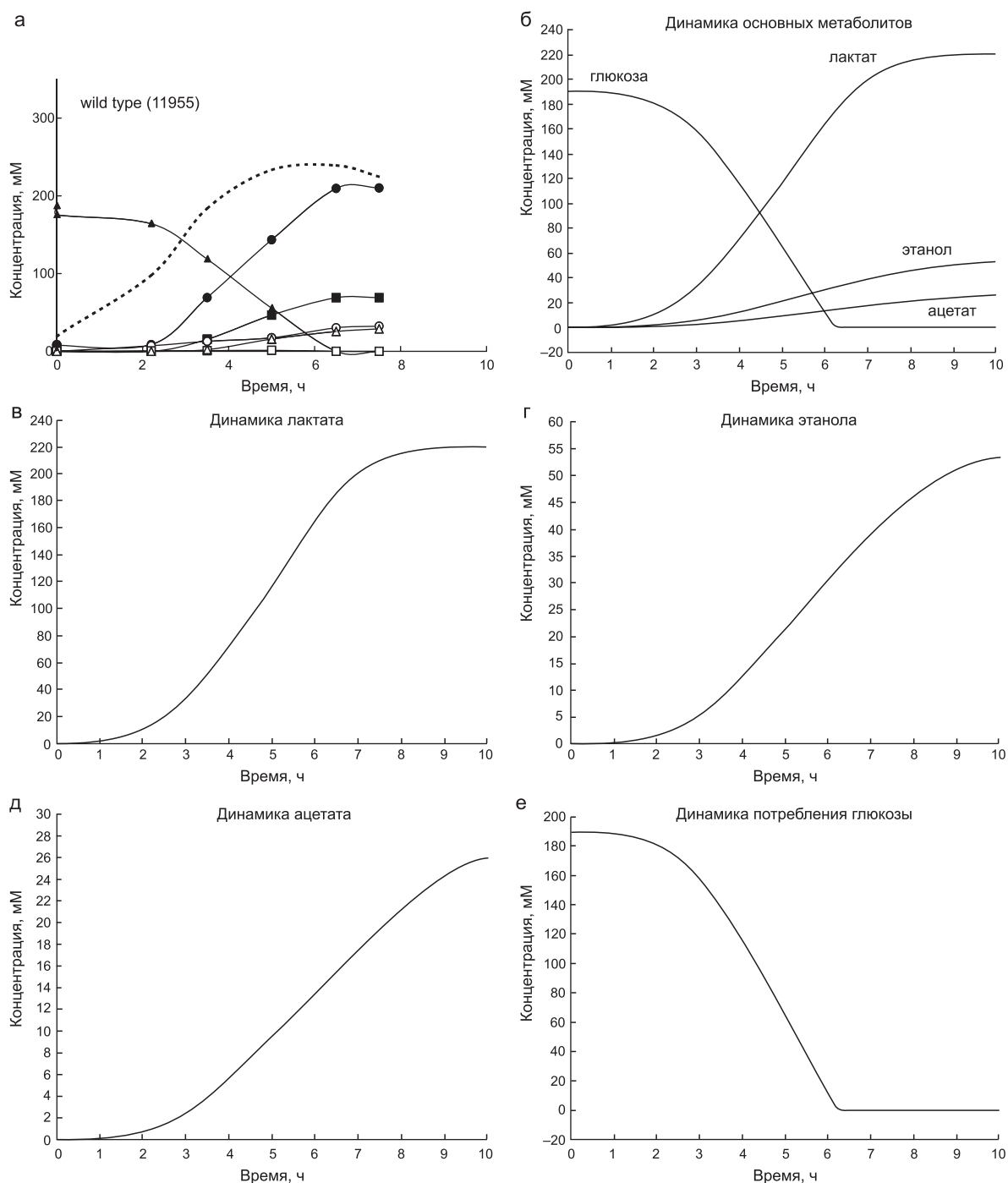


Рис. 3. Кинетика потребления глюкозы клеткой дикого типа *G. thermoglucosidasius* и синтеза конечных продуктов.

а – ось X – время (ч), ось Y – концентрация метаболита (mM); глюкоза (темные треугольники), этанол (темные квадраты), молочная кислота (темные кружки), уксусная кислота (светлые кружки), муравьиная кислота (светлые треугольники) и пировиноградная кислота (светлые квадраты). Пунктиром обозначена динамика изменения плотности культуры (OD 600) (Cripps *et al.*, 2009); б – рассчитанные в модели кинетики потребления глюкозы и синтеза конечных продуктов в клетке *Geobacillus* sp., ось X – время (ч), ось Y – концентрация метаболита (mM); в – рассчитанная в модели кинетика биосинтеза молочной кислоты клеткой *Geobacillus* sp., ось X – время (ч), ось Y – концентрация метаболита (mM); г – рассчитанная в модели кинетика биосинтеза этанола клеткой *Geobacillus* sp., ось X – время (ч), ось Y – концентрация метаболита (mM); д – рассчитанная в модели кинетика биосинтеза уксусной кислоты клеткой *Geobacillus* sp., ось X – время (ч), ось Y – концентрация метаболита (mM); е – рассчитанная в модели кинетика потребления глюкозы клеткой *Geobacillus* sp., ось X – время (ч), ось Y – концентрация метаболита (mM).

Уравнения скоростей ферментативных реакций (обозначения-сокращения в нижнем регистре констант соответствуют обозначениям-сокращениям на рис. 2; графическое соответствие указанных скоростей реакций R представлено на рис. 2):

$$R_1 = \frac{V_{pts} \cdot C_{glc} \cdot C_{pep}}{C_{pyr} \cdot \left(1 + \frac{C_{g6p}}{K_{pts4}}\right) \cdot \left(\frac{C_{glc} \cdot C_{pep}}{C_{pyr}} + C_{glc} \cdot K_{pts3} + \frac{C_{pep} \cdot K_{pts2}}{C_{pyr}} + K_{pts1}\right)} \quad (1.1)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_2 = \frac{V_{glk} \cdot C_{atp} \cdot C_{glc}}{(C_{atp} + K_{glk1}) \cdot (C_{glc} + K_{glkm})} \quad (1.2)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_3 = \frac{V_{pgi} \cdot \left(C_{g6p} - \frac{C_{f6p}}{K_{pgieq}}\right)}{K_{pgi1} \cdot \left(1 + \frac{C_{g6p}}{K_{pgi3}} + \frac{C_{f6p}}{K_{pgi2} \cdot \left(1 + \frac{C_{f6p}}{K_{pgi4}}\right)}\right) + C_{g6p}} \quad (1.3)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_4 = \frac{V_{pfk} \cdot C_{f6p} \cdot K_{atp1}}{K_{atp2} \cdot \left(C_{f6p} + \frac{K_{pfk1} \cdot \left(K_{adp2} + \frac{C_{pep}}{K_{pfk2}}\right)}{K_{adp1}}\right) \cdot \left(1 + \frac{L_{pfk}}{\left(1 + \frac{C_{f6p} \cdot K_{adp1}}{K_{pfk1} \cdot \left(K_{adp2} + \frac{C_{pep}}{K_{pfk2}}\right)}\right)^4}\right)} \quad (1.4)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002; Kadir *et al.*, 2010);

$$R_5 = \frac{V_{aldo} \cdot \left(C_{fdp} - \frac{C_{dhap} \cdot C_{gap}}{K_{aldoeq}}\right)}{K_{aldo1} + C_{fdp} + \frac{C_{dhap} \cdot C_{gap}}{K_{aldoeq} \cdot V_{blf}} + \frac{C_{dhap} \cdot K_{aldo2}}{K_{aldoeq} \cdot V_{blf}} + \frac{C_{fdp} \cdot C_{gap}}{K_{aldo4}} + \frac{C_{gap} \cdot K_{aldo3}}{K_{aldoeq} \cdot V_{blf}}} \quad (1.5)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_6 = \frac{V_{tis} \cdot \left(C_{dhap} - \frac{C_{gap}}{K_{tiseq}}\right)}{K_{tis1} \cdot \left(1 + \frac{C_{gap}}{K_{tis2}}\right) + C_{dhap}} \quad (1.6)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_7 = \frac{V_{gapdh} \cdot \left(C_{gap} - \frac{C_{nad} \cdot C_{pep}}{K_{gapdheq}}\right)}{\left(C_{gap} + K_{gapdh1} \cdot \left(1 + \frac{C_{pep}}{K_{gapdh2}}\right)\right) \cdot \left(1 + \frac{K_{gapdh3} \cdot \left(1 + \frac{C_{nad}}{K_{gapdh4}}\right)}{C_{nad}}\right)} \quad (1.7)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_8 = \frac{V_{\text{pyk}} \cdot C_{\text{adp}} \cdot C_{\text{pep}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{pep}}}{K_{\text{pyk1}}}\right)^3}{K_{\text{pyk1}} \cdot (C_{\text{adp}} + K_{\text{pyk3}}) \cdot \left(L_{\text{pyk}} \cdot \left(\frac{1 + \frac{C_{\text{atp}}}{K_{\text{pyk2}}}}{1 + \frac{C_{\text{amp}}}{K_{\text{pyk4}}} + \frac{C_{\text{fdp}}}{K_{\text{pyk5}}}} \right)^4 + \left(1 + \frac{C_{\text{pep}}}{K_{\text{pyk1}}}\right)^4 \right)} \quad (1.8)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_9 = \frac{V_{\text{ldh2}} \cdot C_{\text{pyr}}}{C_{\text{pyr}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{laci}}}{K_{\text{ldh2i}}}\right) + K_{\text{ldh2m}} \cdot \left(1 + \frac{K_{\text{ldh2a}}}{C_{\text{xli}}}\right)} \quad (1.9)$$

(Oshiro *et al.*, 2009);

$$R_{10} = \frac{V_{\text{pdh}} \cdot C_{\text{coa}} \cdot C_{\text{pyr}}}{\left(C_{\text{nad}} \cdot K_{\text{pdh2}} \cdot K_{\text{pdh3}} \cdot K_{\text{pdh4}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{nad}} \cdot K_{\text{pdh1}}}{C_{\text{nad}}}\right) \right) \cdot \left(\left(1 + \frac{C_{\text{pyr}}}{K_{\text{pdh2}}}\right) \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{coa}}}{K_{\text{pdh4}}} + \frac{C_{\text{accoa}}}{K_{\text{pdh6}}}\right) \cdot \left(\frac{1}{C_{\text{nad}}} + \frac{1}{K_{\text{pdh3}}} + \frac{C_{\text{nad}}}{C_{\text{nad}} \cdot K_{\text{pdh5}}} \right) \right)} \quad (1.10)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_{11} = \frac{V_{\text{acdh}} \cdot C_{\text{accoa}}}{C_{\text{accoa}} + K_{\text{acdhm}}} \quad (1.11)$$

(Oshiro *et al.*, 2009);

$$R_{12} = \frac{V_{\text{pta}} \cdot \left(C_{\text{accoa}} \cdot C_{\text{p}} - \frac{C_{\text{acp}} \cdot C_{\text{coa}}}{K_{\text{ptaeq}}} \right)}{K_{\text{ptai1}} \cdot K_{\text{ptapm}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{accoa}} \cdot C_{\text{p}}}{K_{\text{ptai1}} \cdot K_{\text{ptapm}}} + \frac{C_{\text{acp}} \cdot C_{\text{coa}}}{K_{\text{ptai3}} \cdot K_{\text{ptam}}} + \frac{C_{\text{accoa}}}{K_{\text{ptai1}}} + \frac{C_{\text{acp}}}{K_{\text{ptai2}}} + \frac{C_{\text{coa}}}{K_{\text{ptai3}}} + \frac{C_{\text{p}}}{K_{\text{ptapi}}} \right)} \quad (1.12)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_{13} = \frac{V_{\text{ack}} \cdot \left(C_{\text{acp}} \cdot C_{\text{adp}} - \frac{C_{\text{ace}} \cdot C_{\text{atp}}}{K_{\text{ackeq}}} \right)}{K_{\text{ack1}} \cdot K_{\text{ack4}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{ace}}}{K_{\text{ack2}}} + \frac{C_{\text{acp}}}{K_{\text{ack1}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{adp}}}{K_{\text{ack4}}} + \frac{C_{\text{atp}}}{K_{\text{ack3}}} \right)} \quad (1.13)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_{14} = \frac{V_{\text{cs}} \cdot C_{\text{accoa}} \cdot C_{\text{oa}}}{K_{\text{csd}} \cdot K_{\text{csm1}} + C_{\text{oa}} \cdot K_{\text{csm2}} + C_{\text{accoa}} \cdot K_{\text{csm1}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{nad}}}{K_{\text{csi1}}} \right) + C_{\text{accoa}} \cdot C_{\text{oa}} \cdot \left(1 + \frac{C_{\text{nad}}}{K_{\text{csi2}}} \right)} \quad (1.14)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_{15} = \frac{V_{\text{mez}} \cdot C_{\text{nadp}} \cdot C_{\text{oa}}}{(C_{\text{nadp}} + K_{\text{mezeq}}) \cdot (C_{\text{oa}} + K_{\text{mez1}})} \quad (1.15)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_{16} = \frac{V_{\text{pck}} \cdot C_{\text{atp}} \cdot C_{\text{oa}}}{C_{\text{adp}} \cdot \left(\frac{C_{\text{atp}} \cdot C_{\text{oa}}}{C_{\text{adp}}} + \frac{C_{\text{atp}} \cdot C_{\text{pep}} \cdot K_{\text{pcki1}} \cdot K_{\text{pckm1}}}{C_{\text{adp}} \cdot K_{\text{pcki1}} \cdot K_{\text{pcki4}}} + \frac{C_{\text{atp}} \cdot K_{\text{pckm1}}}{C_{\text{adp}}} + \frac{C_{\text{oa}} \cdot K_{\text{pcki1}} \cdot K_{\text{pckm1}}}{K_{\text{pcki2}} \cdot K_{\text{pcki3}}} + \frac{C_{\text{pep}} \cdot K_{\text{pcki1}} \cdot K_{\text{pckm1}}}{K_{\text{pcki2}} \cdot K_{\text{pckm2}}} + \frac{K_{\text{pcki1}} \cdot K_{\text{pckm1}}}{K_{\text{pcki2}}} \right)} \quad (1.16)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_{17} = \frac{V_{\text{ppe}} \cdot C_{\text{pep}} \cdot (K_{\text{ppc1}} + C_{\text{accoa}} \cdot K_{\text{ppc2}} + C_{\text{fdp}} \cdot K_{\text{ppc3}} + C_{\text{accoa}} \cdot C_{\text{fdp}} \cdot K_{\text{ppc4}})}{(C_{\text{pep}} + K_{\text{ppcm}}) \cdot (1 + C_{\text{accoa}} \cdot K_{\text{ppc5}} + C_{\text{fdp}} \cdot K_{\text{ppc6}})} \quad (1.17)$$

(Kadir *et al.*, 2010);

$$R_{18} = \frac{V_{g6pdh} \cdot C_{g6p}}{(C_{g6p} + K_{g6pdh1}) \cdot \left(1 + \frac{C_{nadph}}{K_{g6pdh2}}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_{g6pdh3} \cdot \left(1 + \frac{C_{nadph}}{K_{g6pdh4}}\right)}{C_{nadp}}\right)} \quad (1.18)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_{19} = \frac{V_{6pgdh} \cdot C_{6pg}}{(C_{6pg} + K_{6pgdh1}) \cdot \left(1 + \frac{K_{6pgdh2} \cdot \left(1 + \frac{C_{nadph}}{K_{6pgdh1}}\right) \cdot \left(1 + \frac{C_{atp}}{K_{6pgdh2}}\right)}{C_{nadp}}\right)} \quad (1.19)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_{20} = V_{rpi} \cdot \left(C_{ru5p} - \frac{C_{r5p}}{K_{rpieq}}\right) \quad (1.20)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_{21} = V_{rpe} \cdot \left(C_{ru5p} - \frac{C_{xu5p}}{K_{rpee}}\right) \quad (1.21)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_{22} = \frac{V_{xuk} \cdot C_{xl}}{C_{xl} \cdot \left(1 + \frac{C_{laci}}{K_{xuki}}\right) + K_{xukm} \cdot \left(1 + \frac{C_{laci}}{K_{xuki}}\right)} \quad (1.22)$$

(Oshiro *et al.*, 2009);

$$R_{23} = \frac{V_{phk} \cdot C_{xu5p}}{C_{xu5p} + K_{phkm}} \quad (1.23)$$

(Oshiro *et al.*, 2009);

$$R_{24} = V_{tkta} \cdot \left(C_{r5p} \cdot C_{xu5p} - \frac{C_{gap} \cdot C_{s7p}}{K_{tktaeq}}\right) \quad (1.24)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_{25} = V_{tktb} \cdot \left(C_{e4p} \cdot C_{xu5p} - \frac{C_{gap} \cdot C_{f6p}}{K_{tktbeq}}\right) \quad (1.25)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002);

$$R_{26} = V_{tal} \cdot \left(C_{gap} \cdot C_{s7p} - \frac{C_{e4p} \cdot C_{f6p}}{K_{taleq}}\right) \quad (1.26)$$

(Chassagnole *et al.*, 2002).

Система обыкновенных дифференциальных уравнений (расшифровка обозначений концентраций метаболитов генной сети (рис. 2) дана в табл. 2):

$$\frac{dX}{dt} = \frac{V_x \cdot C_{glc} \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{K_x}\right)}{C_{glc} + K_{xs}}. \quad (2.1)$$

$$\frac{dC_{glc}}{dt} = -X \cdot (R_1 + R_2). \quad (2.2)$$

$$\frac{dC_{pep}}{dt} = R_7 + R_{16} - R_1 - R_8 - R_{17} - m \cdot C_{pep}. \quad (2.3)$$

$$\frac{dC_{g6p}}{dt} = R_1 + R_2 - R_3 - R_{18} - m \cdot C_{g6p}. \quad (2.4)$$

$$\frac{dC_{pyr}}{dt} = R_1 + R_8 + R_{15} - R_9 - R_{10} - m \cdot C_{pyr}. \quad (2.5)$$

$$\frac{dC_{f6p}}{dt} = R_3 + R_{25} + R_{26} - R_4 - m \cdot C_{f6p}. \quad (2.6)$$

$$\frac{dC_{fdp}}{dt} = R_4 - R_5 - m \cdot C_{fdp}. \quad (2.7)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{gap}}{dt} = & R_5 + R_6 - R_7 - R_{26} + \\ & + R_{23} + R_{24} + R_{25} - m \cdot C_{gap}. \end{aligned} \quad (2.8)$$

$$\frac{dC_{dhap}}{dt} = R_5 - R_6 - m \cdot C_{dhap} \quad (2.9)$$

$$\frac{dC_{lac}}{dt} = R_9 \cdot X. \quad (2.10)$$

$$\frac{dC_{accoa}}{dt} = R_{10} - R_{11} - R_{12} - R_{14} - m \cdot C_{accoa} \quad (2.11)$$

$$\frac{dC_{eth}}{dt} = R_{11} \cdot X. \quad (2.12)$$

$$\frac{dC_{acp}}{dt} = R_{12} + R_{23} - R_{13} - m \cdot C_{acp} \quad (2.13)$$

$$\frac{dC_{ace}}{dt} = R_{13} \cdot X. \quad (2.14)$$

$$\frac{dC_{oaa}}{dt} = R_{17} - R_{15} - R_{16} - m \cdot C_{oaa} \quad (2.15)$$

R_{14} не учитывается в уравнении концентрации dC_{oaa} , поскольку: сколько молекул АССОА поступает в качестве субстрата в цикле трикарбоновых кислот, столько же за один цикл и образуется продукта АССОА по стехиометрии).

$$\frac{dC_{6pg}}{dt} = R_{18} - R_{19} - m \cdot C_{6pg} \quad (2.16)$$

$$\frac{dC_{ru5p}}{dt} = R_{19} - R_{20} - R_{21} - m \cdot C_{ru5p} \quad (2.17)$$

$$\frac{dC_{r5p}}{dt} = R_{20} - R_{24} - m \cdot C_{r5p} \quad (2.18)$$

$$\frac{dC_{xu5p}}{dt} = R_{21} + R_{22} - R_{23} - R_{24} - R_{25} - m \cdot C_{xu5p} \quad (2.19)$$

$$\frac{dC_{xl}}{dt} = -R_{22} \cdot X. \quad (2.20)$$

$$\frac{dC_{s7p}}{dt} = R_{24} - R_{26} - m \cdot C_{s7p} \quad (2.21)$$

$$\frac{dC_{e4p}}{dt} = R_{26} - R_{25} - m \cdot C_{e4p} \quad (2.22)$$

где X – концентрация клеток в культуре, C_i – концентрация метаболита в реакции, катализируемой i -м ферментом ($i = glc, pts...acp$ – совпадает с обозначениями на рис. 2); V_i – максимальная скорость ферментативной реакции, катализируемой i -м ферментом ($i = glc, pts...acp$ – совпадает с обозначениями на рис. 2); R_j – скорость j -й ферментативной реакции ($j = 1...26$).

Как видно из табл. 1, для воспроизведения имеющихся кинетических данных для клеток дикого типа *Geobacillus* spp. необходимо изменять активности практически всех ферментов центрального метаболизма: в большинстве ферментативных реакций гликолиза (кроме

реакций, катализируемых глюкокиназой, альдолазой, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназой, пируватдегидрогеназного комплекса (в его ферментативную активность также включена активность пируватформатлиазы, катализирующей аналогичную реакцию в клетке *Geobacillus* spp.), фосфотрансацетилазой, ацетаткиназой) необходимо увеличивать их значения по сравнению с аналогичными показателями в клетках *Escherichia coli* и *Lactococcus lactis*. Необходимо отметить, что в большинстве случаев увеличение/уменьшение констант скорости реакций происходит на один и тот же порядок. По-видимому, выявленное «синхронное» изменение ферментативных активностей связано с совершенно другими оптимальными условиями роста культуры *Geobacillus thermoglucosidasius* по сравнению с *Escherichia coli*, что подтверждается и экспериментально (Tang et al., 2009).

Более того, как было указано во введении, метаболизм *E. coli* отличается от метаболизма представителей отдела Firmicutes. В частности, существенным отличием является отсутствие лактатдегидрогеназы в геноме *E. coli*, в то время как молочная кислота является основным продуктом метаболизма большинства представителей *Bacilli*. Возможно, это в совокупности со значительной филогенетической удаленностью представителей двух бактериальных родов связано с тем, что в ходе эволюции прокариот возникли несколько различающиеся последовательности реакций и ветви центрального метаболизма у разных видов бактерий, в то же время обеспечивающих жизнедеятельность клетки. Кроме этого, можно добавить, что представители *Bacilli* как свободноживущие организмы в качестве источников углерода и энергии часто используют пентасакхара, и изменение скоростей некоторых реакций может быть связано с обеспечением их успешного усвоения.

Результаты параметрической адаптации математической модели методом DEEP (Kozlov, Samsonov, 2011) к экспериментальным данным (Cripps et al., 2009) приведены на рис. 3. Графики наглядно демонстрируют, что полученные расчеты не только качественно отражают экспериментальную динамику изменения концентрации конечных продуктов (этанол, молочная кислота и ацетат), потребления глюкозы клеткой дикого типа *G. thermoglucosidasius*, но и коли-

чественно воспроизводят значения стационарных концентраций измеренных метаболитов.

Для исследования прогностических возможностей математической модели, адаптированной к экспериментальным данным, были проведены эксперименты *in silico*: 1) «выключение» активности одного из ферментов (например, *ldh*⁻) метаболического пути за счет обнуления константы максимальной скорости; 2) обнуление константы максимальной скорости одной

из ферментативных реакций метаболического пути с одновременным повышением («up») активности фермента *pdh* (т. е. *pdh*^{up}); 3) одновременное повышение активностей ферментов *pdh* и *phk*; *pdh* и *pta*. В результате были рассмотрены несколько мутантных вариантов клетки *Geobacillus* spp.: *ldh*⁻; *ldh*⁻ *pdh*^{up}; *pdh*⁻; *pdh*^{up}; *pta*⁻; *pta*⁻ *pdh*^{up}; *pta*^{up} *pdh*^{up}; *phk*^{up} *pdh*^{up} (рис. 4).

Как видно из графиков, наибольшие изменения (как увеличение, так и уменьшение) ста-

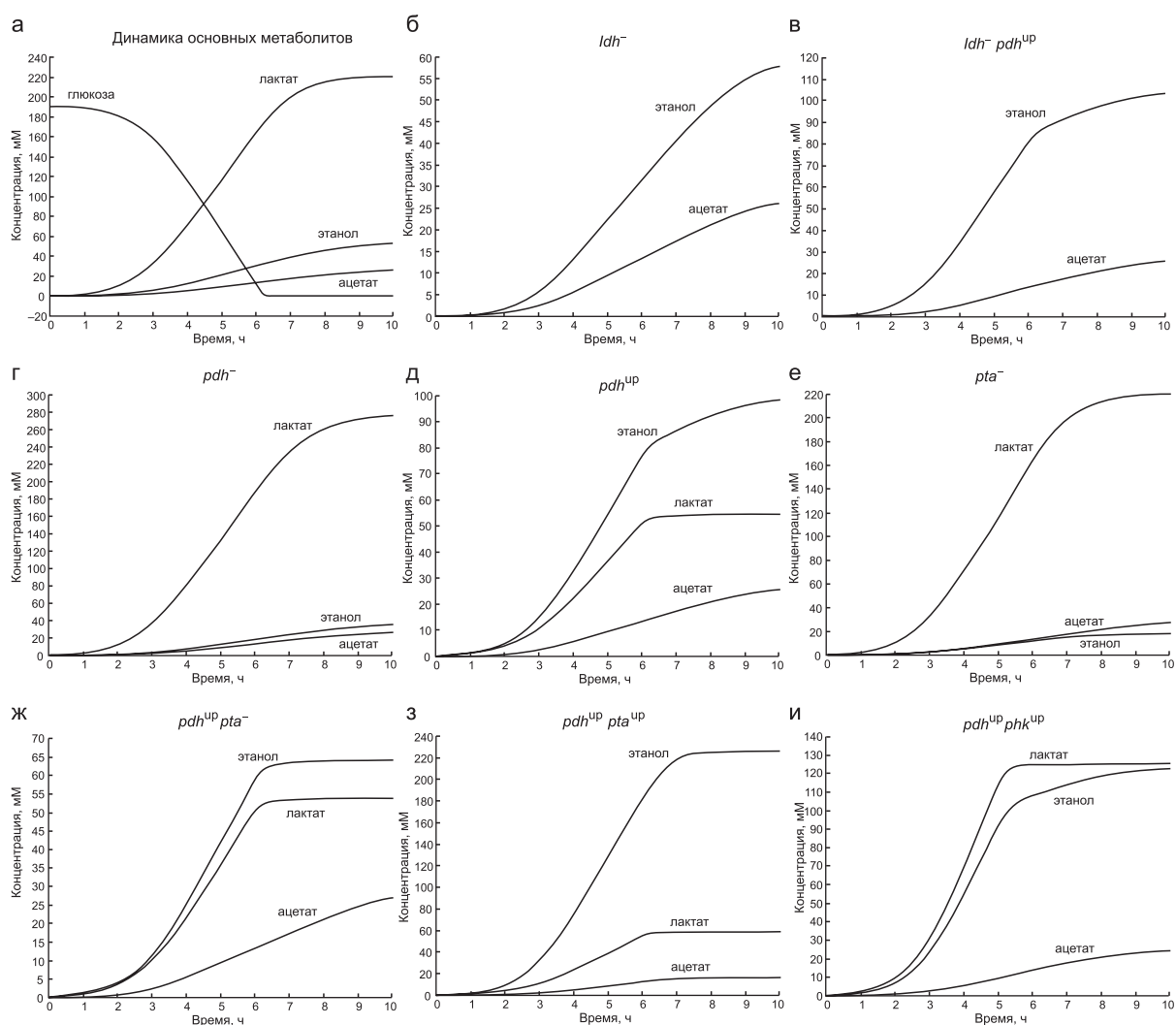


Рис. 4. Кинетика синтеза конечных продуктов клеткой дикого типа и мутантных вариантов *G. thermoglucosidasius*.

В клетке дикого типа: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (а); в клетке *ldh*⁻: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (б); в клетке *ldh*⁻ *pdh*^{up}: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (в); в клетке *pdh*⁻: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (г); в клетке *pdh*^{up}: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (д); в клетке *pta*⁻: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (е); в клетке *pta*⁻ *pdh*^{up}: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (ж); в клетке *pta*^{up} *pdh*^{up}: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (з); в клетке *phk*^{up} *pdh*^{up}: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (и).

ционарной концентрации этанола происходят при манипуляциях (при увеличении, нокауте) с активностью трех ферментов метаболического пути: лактатдегидрогеназы (*ldh*), пируватдегидрогеназного комплекса (*pdh*) и фосфотрансацетилазы (*pta*). Более того, динамика изменения концентрации этанола в мутантных *in silico* вариантах *Geobacillus* spp. в точности отражает результаты аналогичных экспериментов, полученные при культивировании в хемостате культуры клеток *G. thermoglucosidasius* двух мутантных штаммов, TM89 (*ldh*⁻) и TM180 (*ldh*⁻ *pdh*^{up}) (Cripps *et al.*, 2009). Модель также предсказывает значительное повышение стационарной концентрации этанола при увеличении ферментативной активности фосфотрансацетилазы (рис. 4, 3). Несмотря на то что этот фермент катализирует реакцию, в результате которой происходит отток ацетил-КоА – субстрата для синтеза этанола – в сторону наработки другого конечного продукта – ацетата, стационарная концентрация этанола в такой генномодифицированной культуре клеток будет повышена по сравнению с диким фенотипом. Полученный контринтуитивный результат можно объяснить усилением потока субстратов в метаболическом цикле через *gapdh-pyk-pdh-pta-phk* ферментативные реакции (рис. 1), в результате которого в конечном счете увеличивается и скорость синтеза этанола.

Для планирования направленных экспериментов молекулярно-генетической инженерии с бактерией *Geobacillus* spp. по оптимизации синтеза молочной кислоты с помощью разработанной и адаптированной математической модели был также проведен численный анализ экспериментов *in silico* (рис. 5): 1) «выключение» активности одного из ферментов (например *acdH*⁻; *acdH* – алкогольдегидрогеназа) метаболического пути за счет обнуления константы максимальной скорости; 2) повышение («up») активности фермента системы, например *ldh* (т. е. *ldh*^{up}; *ldh* – лактатдегидрогеназа); 3) одновременное повышение активности ферментов, например *pdh* (пируватдегидрогеназный комплекс) и *pyk* (пируваткиназа).

На графике представлены только те примеры расчетов модели, в которых получено значительное изменение динамики синтеза молочной кислоты (лактата, рис. 5). Так, например, нокаут-мутации или увеличение активности

ферментов *pta* (фосфат-ацетилтрансфераза), *ack* (ацетаткиназа) и *cs* (цитратсинтаза) практически не влияют на биосинтез молочной кислоты (изменение стационарной концентрации молочной кислоты для клеток мутантных фенотипов по сравнению со стационарной концентрацией лактата в клетке дикого типа составляет 1–2 %) в отличие от изменения динамики синтеза этанола, например, при увеличении активности фосфатацетилтрансферазы *pta* (рис. 4).

График наглядно демонстрирует, что как при уменьшении оттока пирувата в сторону образования этанола через ферментативную реакцию, катализируемую алкогольдегидрогеназой, так и при увеличении активности фермента лактатдегидрогеназы происходит значительное увеличение (~ в 1,5 раза) стационарной концентрации молочной кислоты. Однако увеличение активности пируватдегидрогеназного комплекса приводит к уменьшению концентрации лактата практически в два раза. В результате молекулярно-генетических манипуляций, приводящих к увеличению активности пируваткиназы, согласно экспериментам *in silico*, будет наблюдаться увеличение концентрации молочной кислоты в клетках *Geobacillus* spp., что может нивелироваться при одновременном увеличении активности пируватдегидрогеназного комплекса.

Полученные данные демонстрируют, что метаболиты, которые производят микроорганизмы в результате жизнедеятельности, зависят не только от каталитических свойств ферментов, участвующих в их получении из веществ основного гликолитического пути, но и от концентраций конкретных метаболитов. В частности, фермент лактатдегидрогеназа использует в качестве субстрата пируват. Как можно видеть из представленных данных, динамическое изменение его концентрации в результате изменения активности комплекса *pdh* сильно сказывается на синтезе конечного продукта – молочной кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые разработана и адаптирована к имеющимся экспериментальным данным интегрированная кинетическая модель биосинтеза этанола, молочной кислоты и ацетата в клетках *Geobacillus* spp. Рассчитанная в мо-

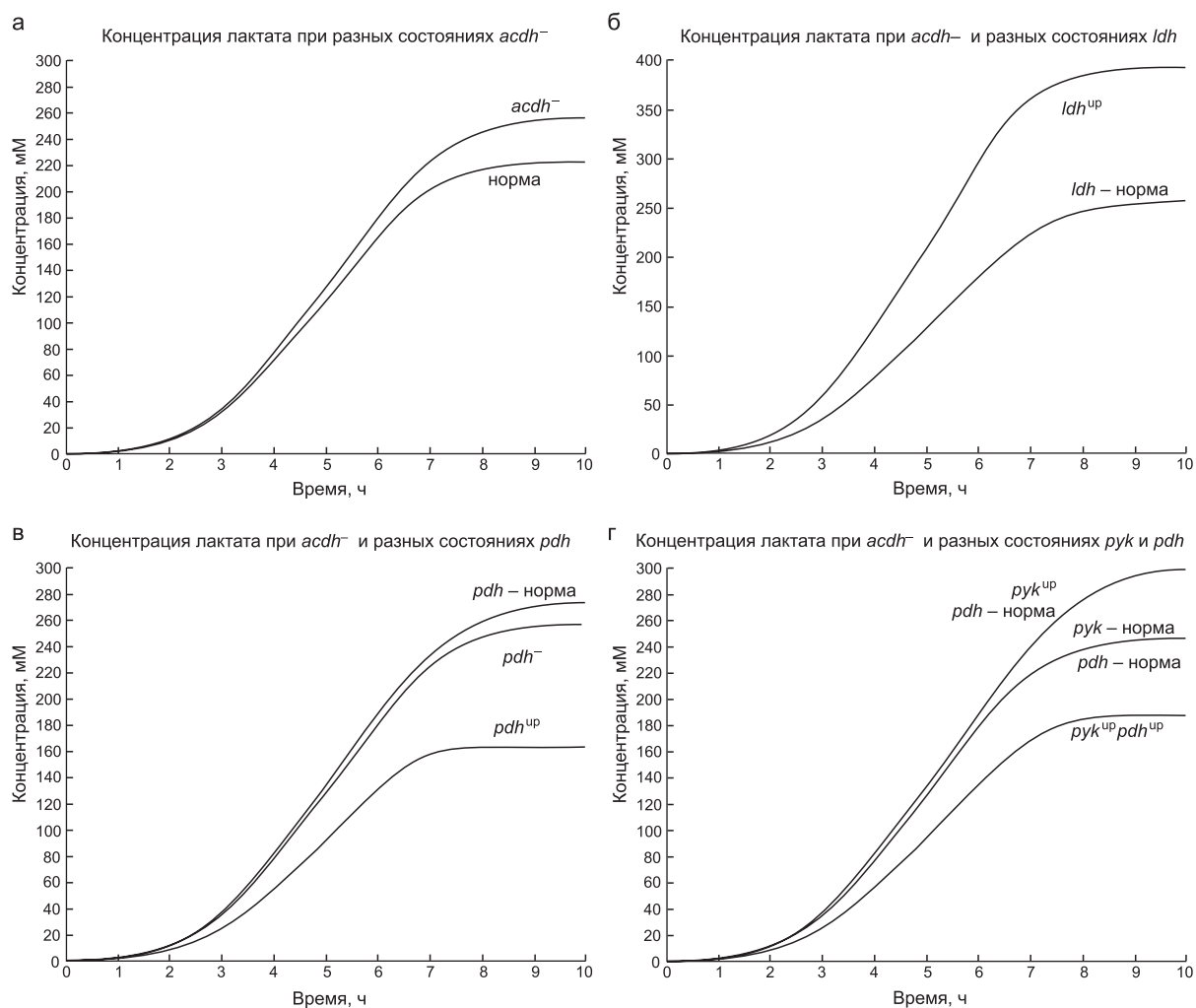


Рис. 5. Кинетика синтеза молочной кислоты (лактата) клеткой дикого типа и мутантных вариантов *G. thermoglucosidasius*.

В клетке дикого типа и в клетке *acdh*⁻: ось X – время (ч); ось Y – концентрация лактата (mM) (а); в клетке дикого типа и в клетке *ldh*^{up}: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (б); в клетке *pdh*⁻, *pdh*, *pdh*^{up}: ось X – время (ч); ось Y – концентрация метаболита (mM) (в); в клетке дикого типа, в клетке *pdh pyk*^{up} и в клетке *pdh*^{up} *pyk*^{up}: ось X – время (ч) (г).

дели кинетика биосинтеза конечных продуктов воспроизводит экспериментальные данные на качественном и количественном уровнях. Более того, эксперименты *in silico* по созданию мутантных вариантов *Geobacillus* spp. по ферментам метаболического пути синтеза этанола показали, что для повышения выхода биоэтанола в результате культивирования *Geobacillus* spp., в первую очередь, необходимо нокаутировать ген фермента лактатдегидрогеназы, который обеспечивает основной поток катаболизма в направлении молочной кислоты. Вторым геном, который необходимо нокаутировать в геноме *Geobacillus* spp. для сверхпродукции этанола,

является ген фермента пируват формиат лиазы. Нокаутирование этого гена важно, так как в результате работы этого фермента образуется формиат, ингибирующий рост культуры клеток. Значительное увеличение концентрации нарабатанного этанола клетками *Geobacillus* spp. также предсказано при увеличении активности или скорости синтеза ферментативных комплексов: пируватдегидрогеназного комплекса и фосфотрансацетилазы.

Численный анализ модели также показал, что перспективными молекулярно-генетическими экспериментами для увеличения стационарной концентрации лактата в бактериальной клетке

являются те, которые приводят к увеличению ферментативной активности лактатдегидрогеназы или пируваткиназы, либо же нокаут-мутация (или миссенс-мутации, приводящие к резкому уменьшению активности фермента) по гену, кодирующему алкогольдегидрогеназу.

Таким образом, разработанная математическая модель не только позволяет воспроизводить имеющиеся экспериментальные данные по динамике функционирования центрального метаболизма бактериальной клетки *Geobacillus* spp., но также является мощным *in silico* инструментом (Акбердин и др., 2013) для исследования режимов функционирования и метаболических потоков при «компьютерном создании» мутантных генотипов соответствующей бактерии. Безусловно, предложенная интегральная кинетическая модель центрального метаболизма *Geobacillus* spp. является «отправной точкой» в исследовании структурно-функциональных и динамических свойств метаболизма этой бактерии, поскольку при комплексном исследовании необходимо учитывать функционирование метаболических подсистем клетки в условиях повышенных температур, свойственных жизнедеятельности термофильных микроорганизмов; описывать участие промежуточных метаболитов в других ферментативных реакциях, подсистемах метаболизма клетки, что сказывается и на синтезе кофакторов – ключевых элементов для функционирования некоторых ферментов, и на росте бактериальной культуры клеток в целом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена в рамках Государственного контракта № 14.512.11.0050 «Создание методов метаболической инженерии термофильных микроорганизмов для получения штаммов-продуцентов молочной кислоты».

ЛИТЕРАТУРА

- Акбердин И.Р., Казанцев Ф.В., Ермак Т.В. и др. «Электронная клетка»: проблемы и перспективы // Мат. биол. биоинф. 2013. Т. 8. № 1. С. 295–315.
- Cavicchioli R., Amils R., Wagner D., McGenity T. Life and applications of extremophiles // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. No. 8. P. 1903–1907.
- Chassagnole C., Noisommit-Rizzi N., Schmid J.W. *et al.* Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli* // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 79. No. 1. P. 53–73.
- Cripps R.E., Eley K., Leak D.J. *et al.* Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production // Metab. Eng. 2009. V. 11. No. 6. P. 398–408.
- Feng L., Wang W., Cheng J. *et al.* Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. No. 13. P. 5602–5607.
- Kadir T.A., Mannan A.A., Kierzek A.M. *et al.* Modeling and simulation of the main metabolism in *Escherichia coli* and its several single-gene knockout mutants with experimental verification // Microb. Cell Fact. 2010. V. 9. P. 88.
- Kasi D., Ragauskas A.J. Switchgrass as an energy crop for biofuel production: A review of its ligno-cellulosic chemical properties // Energy Environ. Sci. 2010. V. 3. No. 9. P. 1182–1190.
- Keasling J.D. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering // Metab. Eng. 2012. V. 14. No. 3. P. 189–195.
- Kozlov K., Samsonov A. DEEP – differential evolution entirely parallel method for gene regulatory networks // J. Supercomputing. 2011. V. 57. P. 172–178.
- Kuipers O.P. Genomics for food biotechnology: prospects of the use of high-throughput technologies for the improvement of food microorganisms // Curr. Opin. Biotechnol. 1999. V. 10. No. 5. P. 511–516.
- Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized Hill function method for modeling molecular processes // J. Bioinform. Computat. Biol. 2007. V. 5. No. 2b. P. 521–531.
- Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B. *et al.* Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 433–446.
- Oshiro M., Shinto H., Tashiro Y. *et al.* Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1 // J. Biosci. Bioeng. 2009. V. 108. No. 5. P. 376–384.
- Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J. Improvement of microbial strains and fermentation processes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 54. No. 3. P. 287–301.
- Peskov K., Mogilevskaya E., Demin O. Kinetic modelling of central carbon metabolism in *Escherichia coli* // FEBS J. 2012. V. 279. No. 18. P. 3374–3385.
- Rizzi M., Baltes M., Theobald U., Reuss M. *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model // Biotechnol. Bioeng. 1997. V. 55. No. 4. P. 592–608.
- Smallbone K., Simeonidis E., Swainston N., Mendes P. Towards a genome-scale kinetic model of cellular metabolism // BMC Systems Biol. 2010. V. 4. No. 1. P. 6.
- Sonnleitner B., Comet S., Fiechter A. Equipment and growth

- inhibition of thermophilic bacteria // *Biotechnol. Bioeng.* 1982. V. 24. No. 11. P. 2597–2599.
- Storn R., Price K. Differential evolution—a simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces // *J. Global Optimization.* 1997. V. 11. No. 4. P. 341–359.
- Tang Y.J., Sapra R., Joyner D. *et al.* Analysis of metabolic pathways and fluxes in a newly discovered thermophilic and ethanol-tolerant *Geobacillus* strain // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. V. 102. No. 5. P. 1377–1386.
- Weber C., Farwick A., Benisch F. *et al.* Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 87. No. 4. P. 1303–1315.
- Wu S., Liu B., Zhang X. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. No. 6. P. 1210–1216.
- Zhao Y., Caspers M.P., Abee T. *et al.* Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidans* TNO-09.020, a thermophilic sporeformer associated with a dairy-processing environment // *J. Bacteriol.* V. 194. 2012. No. 15. P. 4118–4118.

MATHEMATICAL MODELING OF ETHANOL AND LACTIC ACID BIOSYNTHESIS BY THERMOPHILIC *GEOBACILLUS* BACTERIA

M.A. Nuriddinov¹, F.V. Kazantsev², A.S. Rozanov¹, K.N. Kozlov², S.E. Peltek¹,
I.R. Akberdin¹, N.A. Kolchanov^{1,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: akberdin@bionet.nsc.ru;

² St-Petersburg State Polytechnical university, St-Petersburg, Russia;

³ Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

A mathematical model of the ethanol and lactic acid biosynthesis in the cells of *Geobacillus* spp. developed and adapted to the available experimental data is presented. It is shown that the mathematical model allows *in silico* design of genetic engineering experiments with the *Geobacillus* spp. bacterium and prediction of the dynamics of changes in synthesized ethanol and lactic acid concentrations depending on the molecular manipulations with the activity of enzymes of the metabolic system.

Key words: mathematical model, kinetic data, lactic acid, bioethanol, *Geobacillus*.