

УДК 577.121

## К ВОПРОСУ О МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ СТОИМОСТИ ОСНОВНЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В *Escherichia coli*

© 2022 г. Л. И. Голубева<sup>1</sup>, Е. С. Ковалева<sup>1</sup>, \*, С. В. Машко<sup>1</sup><sup>1</sup>АО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»), Москва, 117545 Россия

\*e-mail: ekaterina\_kovaleva@agri.ru

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.

После доработки 16.03.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Для оценки затрат энергии при биосинтезе веществ в разных условиях роста или клетками различных видов часто применяют понятие метаболической стоимости (metabolic cost, MC). Посредством определенного алгоритма MC метаболита рассчитывают в обобщенных единицах «~P», кратных гидролизу молекулы АТР до АДФ и P<sub>i</sub>. В результате проведенного нами анализа литературы выявлены значительные расхождения в интерпретации понятия и алгоритмов расчета MC разными авторами. В связи с тем, что MC часто используют при рассмотрении вопросов системного уровня, таких как анализ распределения метаболических потоков, механизмы естественного отбора, представляется целесообразным детально охарактеризовать это понятие. В представленной работе дана четкая формулировка понятия MC, которая была использована для расчета энергетических затрат на синтез 13 метаболитов-предшественников биомассы *Escherichia coli* на основании современной модели центрального метаболизма этой бактерии. Установлено, что на величину MC в единицах запасенных или гидролизованных молекул АТР, «~P», влияют особенности метаболизма клеток конкретного организма, условия культивирования, а также значение соотношения P/O, характеризующего число молекул АТР, образующихся при переносе одной пары электронов на один атом кислорода в процессе окислительного фосфорилирования.

**Ключевые слова:** метаболическая стоимость, биосинтетическая сложность, метаболиты-предшественники, потенциал фосфорилирования, комплексы окислительного фосфорилирования, коэффициент P/O

DOI: 10.56304/S023427582202003X

### ВВЕДЕНИЕ

В фундаментальных исследованиях отдельных метаболитов, их групп и клеточного метаболизма в целом при количественном анализе распределения метаболических потоков в клетках организма

дикого типа и искусственно сконструированных продуцентов биологически активных веществ [1, 2] неоднократно поднимался вопрос о метаболической стоимости (metabolic cost, MC) тех или иных клеточных процессов, интермедиатов [3], аминокислот (АК), кофакторов [4, 5] и других соединений. Понятие MC используется для оценки энергии, затраченной клеткой на биосинтез конкретного метаболита при ее культивировании в определенных условиях (например, при аэробном росте на минимальной среде с глюкозой). Несмотря на то, что метаболизм основных объектов биологических исследований (в частности, *Escherichia coli*) изучен в настоящее время достаточно подробно, в работах различных авторов звучат иногда декларативные, но ошибочные утверждения, сделанные на основе неверного толкования и, как следствие, неверного расчета MC. В этой публикации нам хотелось вернуться к исходному определению MC и привести расчет этого параметра для основных метаболитов-предшественников (МП) в условиях аэробного роста

**Список сокращений:** АК – аминокислота; БС – биосинтетическая сложность; ЛПС – липополисахариды; МП – метаболит-предшественник; MC – метаболическая стоимость; СФ/ОФ/ЭТФ – субстратное/окислительное/электронтранспортное фосфорилирование; ЦМ – центральный метаболизм; ЭТ-цепь – электронтранспортная цепь; <sup>13</sup>C-MFA (<sup>13</sup>C-metabolic flux analysis) – анализ метаболических потоков с использованием изотопа <sup>13</sup>C; EMP-путь (путь Embden–Meyerhof–Parnas) – путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса; [H<sup>-</sup>] – гидрид-ион; «H» – энергия, запасенная в восстановленных формах NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub>; ОХPHOS-комплексы – комплексы окислительного фосфорилирования; ~P – фосфорильная группа; «~P» – энергия, запасенная в виде молекулы АТР; коэффициент P/O – число молекул АТР, образующихся при переносе одной пары электронов на один атом кислорода в процессе окислительного фосфорилирования; PP-путь (pentose phosphate путь) – пентозофосфатный путь; TCA (tricarboxylic acids) – трикарбоновые кислоты.

**Таблица 1.** Предшественники основных компонентов биомассы *E. coli*  
**Table 1.** The precursors of major components of *E. coli* biomass

№	Название метаболита	Обозначение	Производный компонент биомассы <sup>a, b</sup>
1	D-глюкозо-6-фосфат	G6P	Гликоген, ЛПС
2	D-фруктозо-6-фосфат	F6P	ЛПС, пептидогликан
3	Глицеральдегид-3-фосфат	GAP	Липиды
4	3-Фосфоглицерат	3PG	Cys, Ser, Gly, Trp, липиды, ЛПС, ДНК, РНК
5	Фосфоенолпируват	PEP	Phe, Trp, Tyr, пептидогликан, ЛПС
6	Пируват	PYR	Ala, Ile, Leu, Lys, Val, пептидогликан
7	Ацетил-КоА	Ac-CoA	Leu, липиды, ЛПС, пептидогликан
8	Оксалоацетат	OA	Asn, Asp, Ile, Lys, Met, Thr, пептидогликан, ДНК, РНК
9	Сукцинил-КоА	Suc-CoA	Гем <sup>c</sup>
10	α-Кетоглутарат	AKG	Arg, Gln, Glu, Pro, пептидогликан
11	Рибозо-5-фосфат	R5P	His, Trp, ДНК, РНК, ЛПС
12	Эритрозо-4-фосфат	E4P	Phe, Trp, Tyr
13	Седогептулозо-7-фосфат	S7P	ЛПС

*Примечание:* <sup>a</sup> Список компонентов биомассы *E. coli* и их биосинтетические пути реконструированы по данным из работ [8, 10, 13] и с использованием базы данных EcoCyc (<https://ecocyc.org/>). <sup>b</sup> Клеточный белок представлен в виде составляющих его аминокислот. <sup>c</sup> Suc-CoA участвует в синтезе гема у млекопитающих, дрожжей и некоторых бактерий [14]. Мы не обнаружили, что это достоверно подтверждается в случае *E. coli*. С другой стороны, succinyl-CoA включен в уравнение, описывающее синтез биомассы в полногеномной метаболической модели *E. coli* [15]. По этой причине succinyl-CoA включен в список МП компонентов биомассы *E. coli*.

*Note:* <sup>a</sup> A list of *E. coli* biomass components and their biosynthetic pathways were reconstructed using [8, 10, 13] and EcoCyc database (<https://ecocyc.org/>). <sup>b</sup> Cellular protein is represented in the form of proteinogenic amino acids. <sup>c</sup> Suc-CoA is used for heme synthesis in mammals, yeast and some bacteria [14]. We have not found confirmation that this is true for *E. coli*. On the other hand, succinyl-CoA is included in equation, describing biomass synthesis as a part of genome-scale *E. coli* metabolic model [15]. Therefore, succinyl-CoA was kept in the list of MPs for *E. coli* biomass synthesis.

клеток *Escherichia coli* (на минимальной среде с глюкозой), опираясь на современные метаболические модели этого организма, применяемые для анализа внутриклеточных потоков углерода с использованием изотопа <sup>13</sup>C (<sup>13</sup>C-metabolic flux analysis; <sup>13</sup>C-MFA) [6, 7].

На стыке реакций катаболизма и анаболизма в центральном метаболизме (ЦМ) прокариот в результате ферментативных реакций, происходящих в процессах гликолиза<sup>1</sup> и цикла трикарбоновых кислот (ТСА), из сахаров образуются МП. Они используются для строительства различных низкомолекулярных структурных блоков, таких как АК, нуклеотиды, жирные кислоты, простетические группы, коэнзимы и др., для последующего синтеза белков, нуклеиновых кислот, липидов, липополисахаридов (ЛПС), пептидогликана кле-

точной стенки и остальных компонентов биомассы [8, 10, 11]. Редко к числу МП относят также метаболиты, которые могут быть окислены с непосредственным образованием АТР (например, 1,3-дифосфоглицерат; 13DPG) [11].

Как правило, набор биохимических реакций ЦМ оптимален для данного организма с точки зрения минимального числа ферментативных стадий, обеспечивающих последовательный синтез всех МП, необходимых для синтеза биомассы и образования положительного баланса АТР в гликолизе [11]. Для прототрофных клеток *E. coli*, аэробно растущих на минимальной среде с глюкозой, ранее был известен перечень из 12 МП [8, 11]. Однако относительно недавно, для адекватного описания состава биомассы в рамках полногеномного моделирования, к этому списку добавили еще один метаболит — седогептулозо-7-фосфат (S7P) — в качестве предшественника биосинтеза ЛПС [12]. Принято считать, что эта группа из 13 МП одинакова для всех живых организмов [10] (табл. 1).

Под МС каждого из МП принято понимать [4, 5] условное количество энергии, которое было недополучено клеткой за счет прерывания стандартного для данного организма катаболизма конкретного субстрата (например, глюкозы, глицерина, ацетата и др. [2, 4]) до CO<sub>2</sub>, в результате изъятия этого

<sup>1</sup>В строгом смысле под гликолизом понимают весь набор биохимических реакций данного организма, вовлеченных в преобразование глюкозы в пируват. Так, в клетках *E. coli*, как правило, реализуется три гликолитических пути: Эмдена–Мейергофа–Парнаса (Embden–Meyerhof–Parnas, EMP), пентозо-фосфатный (pentose-phosphate, PP) и Энтнера–Дудорова (Entner–Doudoroff, ED) [8], а в присутствии пирролохинолинхинона (pyrroloquinoline quinone, PQQ) в качестве кофактора глюкозодегидрогеназы может быть также активирован еще один гликолитический путь — через глюконат [9].

МП. В свою очередь, МС любого интермедиата клеточного метаболизма складывается из цены его МП и изменения энергии в анаболических реакциях его дальнейшего биосинтеза из этого/этих МП при продолжении роста организма на том же субстрате [16–20]. При этом для любых клеточных интермедиатов, например АК, часто используют также понятие биосинтетическая сложность (biosynthetic complexity; БС) [4, 5], имея в виду минимальное общее число метаболических реакций, которые необходимы для биосинтеза целевого соединения из всех его МП.

Особо отметим, что в случае существования альтернативных путей биосинтеза целевого метаболита для определения его МС и БС надо учитывать экспериментальные данные о распределении потоков внутриклеточных интермедиатов, типичном для данного организма и условий его культивирования, а не некие потенциально возможные, но практически нереализуемые метаболические пути. Это замечание актуально, так как в настоящее время для расчетов все шире используют полногеномные модели, выявляя, в том числе, и совершенно необычные метаболические пути, реально не используемые при росте на выбранном субстрате в стандартных условиях [19]. Истинная активность того или иного метаболического пути, в конечном счете, должна быть установлена экспериментально, например в результате идентификации ауксотрофных мутантов, использования субстратов, меченных изотопами, возможно, с последующим анализом метаболических потоков с применением изотопа  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis,  $^{13}\text{C}$ -MFA) высокого разрешения [7] и др.

Таким образом, для строгого расчета и сравнения МС МП и клеточных интермедиатов необходимо определить в условных единицах изменение количества клеточной энергии, израсходованной/накопленной в ходе определенных метаболических превращений.

Хорошо известно, что главной энергетической “валютой” клетки является АТФ (и его аналоги, например GTP), который синтезируется за счет сопряжения окислительно-восстановительных реакций с фосфорилированием (субстратным, СФ; окислительным, ОФ, или электронтранспортным, ЭТФ), что обеспечивает запасание части выделяющейся в этих реакциях свободной энергии субстрата в результате переноса фосфорильной группы ( $\sim\text{P}$ ), образующейся из неорганического фосфата ( $\text{P}_i$ ), на ADP. Остальная высвобождающаяся энергия превращается в тепло. При анаболизме запасенная в АТФ энергия выделяется при гидролизе этого нуклеотида, как правило, до ADP и реже до AMP (см. Приложение 1). В связи с этим естественно оценивать изменение клеточной энергии в единицах запасенных/гидролизированных групп  $\sim\text{P}$ .

Однако в метаболизме синтез АТФ реализуется различными способами. При СФ происходит перенос фосфорильной группы в состав богатого энергией метаболического интермедиата (например, PEP, 13DPG), с которого далее  $\sim\text{P}$  переносится на молекулу ADP с образованием АТФ. Изменение клеточной энергии в реакциях с непосредственным образованием или гидролизом АТФ легко учитывается.

В процессах ОФ/ЭТФ АТФ образуется более сложным образом. Первоначально при участии доноров электронов образуются отрицательно заряженные высокоэнергетические гидрид-ионы ( $[\text{H}^-]$ ) восстановительных (редокс-) эквивалентов и происходит их передача на специфические цитоплазматические переносчики. Последние, окисляясь, передают пару электронов на акцепторы многоферментной электронтранспортной цепи (ЭТ-цепи), входящие в состав различных комплексов окислительного фосфорилирования (OXPHOS-комплексов). В качестве цитоплазматических переносчиков ионов  $[\text{H}^-]$  выступают восстановленные формы никотинамидадениндинуклеотида: NADH, NADPH – и флавинадениндинуклеотида,  $\text{FADH}_2$ . Так, восстановление NAD(P)H происходит в результате реакции:  $\text{NAD(P)}^+ + [\text{H}^-] \rightarrow \text{NAD(P)H}$ . Известно, что в аэробных условиях пара электронов из  $[\text{H}^-]$  передается с NADH на свободный кислород по ЭТ-цепи несколькими возможными путями, с последовательным образованием различных OXPHOS-комплексов с выделением энергии (например, для прокариот энергия Гиббса реакции,  $\Delta_r G^\circ$ , составляет  $-52.6$  ккал/моль [21]), которая лишь частично может быть сохранена клеткой и запасена в форме нескольких групп  $\sim\text{P}$  в процессе ОФ (см. ниже). Действительно, перенос электронов по ЭТ-цепи в каждом OXPHOS-комплексе может сопровождаться упорядоченным выбросом определенного числа протонов из цитоплазмы через бактериальную мембрану. Это приводит к повышению протонного потенциала мембраны и обеспечивает, в свою очередь, синтез АТФ ассоциированной с мембраной АТФ-синтазой за счет протондвижущей силы обратного переноса протонов через мембрану в цитоплазму. Заметим, что при этом в активном центре АТФ-синтазы из  $\text{P}_i$  в качестве интермедиата образуется  $\sim\text{P}$ .

ОФ – это важный частный случай ЭТФ при аэробном культивировании – когда конечным акцептором транспорта электронов по ЭТ-цепи выступает молекулярный кислород. В конечном счете, свойства электронтранспортной системы конкретного организма определяют так называемый коэффициент P/O, характеризующий сколько молекул АТФ образуется в результате переноса пары электронов с одного иона  $[\text{H}^-]$  (например, переносимого в цитоплазме одной молекулой NADH)

по ЭТ-цепи и восстановления одного атома кислорода при аэробном ОФ. Коэффициент Р/О определяется двумя параметрами: (1) числом  $N$  в соотношении  $N\text{H}^+/2e^-$ , то есть общим числом протонов, выводимых из цитоплазмы на поверхность мембраны в ответ на перенос пары электронов из редокс-эквивалента по конкретному пути ЭТ-цепи на свободный кислород; и (2) так называемым  $\text{H}^+/\text{АТР}$ -отношением, определяющим число протонов на внешней поверхности цитоплазматической мембраны, прохождение которых через АТР-синтазу исследуемого организма необходимо для биосинтеза одной молекулы АТР [22, 23].

Учитывая различные механизмы синтеза АТР, достаточно строгий расчет изменения (накопления/расходования) клеточной энергии на отдельных участках метаболизма ведут, как правило, алгебраическим суммированием единиц АТР и его аналогов (например, GTP), синтезированных (“+”) или гидролизованных (“-”) непосредственно на анализируемом участке, а также единиц редокс-эквивалентов («Н»), запасенных (“+”) в редокс-формах или окисленных (“-”) из редокс-форм их цитоплазматических переносчиков ( $\text{NAD(P)H}$ ,  $\text{FADH}_2$ ). Кроме того, используют условные договоренности о конверсии между единицами «Н» и «~Р», основанные на современных представлениях о величине коэффициента Р/О для данного организма в аэробном ОФ.

Для описанных ОХРНОС-комплексов *E. coli* при окислении  $\text{NADH}$  в  $\text{NAD}^+$  суммарное число протонов  $N$ , выводимых на поверхность цитоплазматической мембраны, может варьировать от 0 (если используется путь через комплексы  $\text{NDHII}$  и  $\text{Cyt bd-II}$ ) до максимального значения 8 (в случае пути  $\text{NDHI/Cyt bo}$ ) [24, 25]. Согласно существовавшим ранее представлениям о стехиометрии реакции синтеза АТР АТР-синтазой в *E. coli* – от 2 [8] до 3 [26, 27]  $\text{H}^+/\text{АТР}$ , – окисление  $\text{NADH}$  при аэробном ОФ могло сопровождаться синтезом двух–трех молекул АТР из  $\text{ADP}$ , а окисление  $\text{FADH}_2$  – синтезом одной–двух молекул АТР. Условно считалось, что:

$$\begin{aligned} \langle \text{H} \rangle_{[\text{NADH}]} &= \langle \text{H} \rangle_{[\text{NADPH}]} = 3 \langle \sim \text{P} \rangle_{[\text{АТР}]}; \\ \langle \text{H} \rangle_{[\text{FADH}_2]} &= 2 \langle \sim \text{P} \rangle_{[\text{АТР}]} \end{aligned} \quad (1)$$

Эти же соображения позволяли принимать величину Р/О = 2 в *E. coli* [8], а, следовательно, в расчетах для прокариот вместо уравнения (1) принималось либо упрощенное предположение: «Н» =  $2 \times 2 \times \langle \sim \text{P} \rangle$  [4, 28, 29], – либо учитывали, что в реакции конверсии сукцината в малат происходит восстановление одной молекулы  $\text{FAD}^+$ , эквивалентное конверсии одной молекулы  $\text{ADP}$  в АТР в *E. coli*, на основании чего предлагали следующее [19]:

$$\begin{aligned} \langle \text{H} \rangle_{[\text{NADH}]} &= \langle \text{H} \rangle_{[\text{NADPH}]} = \\ &= 2 \langle \sim \text{P} \rangle_{[\text{АТР}]} = 2 \langle \text{H} \rangle_{[\text{FADH}_2]} \end{aligned} \quad (2)$$

Согласно этому предположению, при полном сгорании одного моля глюкозы до 6 молей  $\text{CO}_2$  образуется 26 молей АТР.

Однако учет относительно новых данных о функционировании АТР-синтазы в *E. coli* приводит к следующей стехиометрии синтеза АТР:  $4\text{H}^+/\text{АТР}$  [30, 31]. В связи с этим теоретическим максимальное значение коэффициента Р/О в этих бактериях может достигать величины, равной 2, а реально это  $1.49 \pm 0.26$  моль АТР/моль атома кислорода [23]. Этот факт уже нашел отражение в изменении записи реакций ОФ для модели *E. coli* K-12 [7], используемой для  $^{13}\text{C}$ -MFA и предполагавшей ранее договорные условия (1) [32, 33], а затем (2) [34–36], сделанные на основе  $3\text{H}^+/\text{АТР}$ -стехиометрии [26].

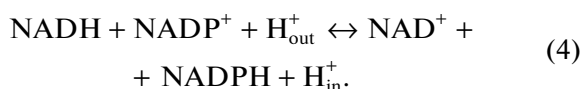
Это весомый аргумент для необходимости изменения современного представления о коэффициентах энергетической эквивалентности: «Н» и «~Р», – по крайней мере, для *E. coli*, которые теперь можно представить в следующем виде [7]:

$$\begin{aligned} \langle \text{H} \rangle_{[\text{NADH}]} &= \langle \text{H} \rangle_{[\text{NADPH}]} = 1.5 \langle \sim \text{P} \rangle_{[\text{АТР}]}; \\ \langle \text{H} \rangle_{[\text{FADH}_2]} &= 0.5 \langle \sim \text{P} \rangle_{[\text{АТР}]} \end{aligned} \quad (3)$$

что обеспечивает выход 20 моль АТР на один моль глюкозы (см. далее).

Для такого организма, как *Escherichia coli*, к настоящему времени построены подробные карты ЦМ и даже полногеномные модели [15, 26, 37]. Для большинства протекающих в клетке реакций изучены молекулярные механизмы и конкретные переходы атомов субстратов в атомы продуктов [38, 39]. В частности, установлено происхождение позиций всех атомов углерода протеиногенных АК из 8 их непосредственных МП и  $\text{C}_1$ -соединений [40], что с успехом используется при решении задач  $^{13}\text{C}$ -MFA [41–43]. Тем не менее, до сих пор в работах приводятся различающиеся значения МС как самих МП, так и синтезируемых из них АК в *E. coli* [4, 5, 17]. При сравнении данных, приводимых в различных источниках [4, 5, 19], расхождения наблюдаются не только в обобщенных величинах «~Р», зависящих от использованной в расчетах величины коэффициента Р/О, но и в конкретных числах «~Р» и «Н» компонентов МС для отдельных предшественников и АК и иногда даже в указании самих МП для некоторых АК. Забегая вперед, отметим, что в проанализированных работах и даже в специализированной обзорной литературе [44, 45] не всегда удается обнаружить достоверное значение алгебраической суммы МП триптофана, которое отражало бы современные представления о стадиях биосинтеза и формирования структуры этой АК (см., например, [33]).

Единственное, что оставалось неизменным на протяжении более 30 последних лет, это условная договоренность об энергетической эквивалентности «Н» в NADH и NADPH, а также самих этих кофакторов, несмотря на широко известные факты, свидетельствующие не в пользу этой эквивалентности. Действительно, во-первых, многие бактерии [46, 47] и дрожжи [48, 49] содержат NAD(H)-киназы, которые способны синтезировать NADP(H) из NAD(H) за счет сопряжения синтетической реакции с гидролизом АТР, что никак не соответствует представлению об энергетической эквивалентности NADH и NADPH. Во-вторых, в *E. coli* функционируют две изоформы трансгидрогеназ, способные потенциально переносить электроны с NADH на NADP<sup>+</sup> и обратно [50]. Энергозависимая протонтранслоцирующая мембрансвязанная трансгидрогеназа (PntAB) выполняет роль одного из основных источников NADPH в этих бактериях [50], катализируя образование NADPH, сопряженное с поступлением протона из периплазмы (H<sub>out</sub><sup>+</sup>) в цитоплазму (H<sub>in</sub><sup>+</sup>) через цитоплазматическую мембрану:



Для этой реакции  $\Delta_r G^m = -6.4$  ккал/моль.

В свою очередь, цитоплазматическая трансгидрогеназа (UdhA), необходимая для роста клеток в условиях повышенного образования NADPH, является энергонезависимой, так как катализирует обратную реакцию без затраты энергии.

Тем не менее, энергетическая эквивалентность редокс-коферментов NADH и NADPH условно принята, а вот значение коэффициента конверсии «Н» в «~Р», как уже отмечалось, неоднократно менялось в свете новейших экспериментальных данных и модификации их анализа. Следствием этого стало значительное изменение и величины МС, выраженной в обобщенных единицах «~Р».

В данном исследовании представляло интерес уточнить значения МС МП для прототрофных клеток *E. coli* К-12, аэробно растущих на среде с глюкозой, в свете современных данных о метаболизме *E. coli* и сравнить полученные величины с ранее опубликованными в литературе. В дальнейшие планы входит использование вычисленных значений МС МП для оценки МС АК и достоверности обнаруженных ранее корреляций и связей между МС, БС и другими свойствами АК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Метаболическая стоимость метаболитов-предшественников при аэробном росте E. coli на глюкозе*

В соответствии с определением МС, данным выше, необходимо сначала установить МС всех МП в изучаемом организме, растущем в определенных условиях и на конкретном субстрате. Среда и условия (например, аэробное или анаэробное) культивирования принципиально сказываются уже на величине МС, выраженной в «Н» и «~Р», а, имея в виду дальнейшее представление этого параметра только в обобщенных единицах «~Р» с учетом вклада редокс-эквивалентов согласно допущениям о коэффициентах конверсии, необходимо строго ограничивать использование термина МС в рамках его определения, не соблазняясь возможными усреднениями и обобщениями. В частности, не очень понятны попытки Akashi & Gojobori [4] сначала установить МС МП и АК в *E. coli*, растущей на трех различных источниках углерода (глюкозе, ацетате и малате), а затем использовать полученные значения для анализа усредненных величин МС. Дело в том, что такая постановка эксперимента приводит к различным значениям МС для каждого источника углерода. В отличие от этих авторов, мы использовали единицы «Н» и «~Р» для оценки МС МП в прототрофных клетках *E. coli*, аэробно растущих на глюкозе в качестве источника углерода.

Следует иметь в виду, что приведенные ниже реакции входят в структуру “коровой” модели ЦМ *E. coli*, которая используется в нашей лаборатории, в том числе для <sup>13</sup>С-MFA. “Коровая” модель метаболизма (core metabolic model) – модель, содержащая небольшое число биохимических реакций, описывающих, прежде всего, ЦМ. Ее часто противопоставляют полногеномным моделям метаболизма, поэтому для каждой приведенной реакции мы указываем порядок перехода атомов углерода (см., например, работу P. Ravikirithi и соавт. [38]), как это было впервые предложено Wiechert & de Graaf [51, 52] и теперь широко используется в работах по построению метаболических моделей для <sup>13</sup>С-MFA [33, 35, 53]. В представленной нами работе закономерности перехода атомов углерода в реакциях ЦМ были экстрагированы из работы [54]. В таком представлении становится наглядным, какие атомы углерода какого МП включаются в состав углеродного скелета целевого соединения и в какой позиции, а какие входят в состав побочных продуктов реакции. Это, в частности, позволяет объяснить, почему Suc-CoA иногда ошибочно включают в состав прямых МП для Lys и Met [11]: в процессе биосинтеза обеих АК все атомы углерода молекулы Suc-CoA оказываются, в конечном итоге, в молекулах сукцината и коэнзима А, а не в целевом продукте.

**Таблица 2.** Метаболическая модель EMP-пути в *E. coli*  
**Table 2.** The metabolic model of EMP-pathway in *E. coli*

Уравнение реакции (с указанием перестановок атомов углерода)	$[\Delta_r G^m]$ , ккал/моль
$0 \rightarrow -\text{Glc}_{\text{ext}} (\text{abcdef}) - \text{PEP} (\text{ghi}) + \text{G6P} (\text{abcdef}) + \text{PYR} (\text{ghi})$	-9.1
$0 \leftrightarrow -\text{G6P} (\text{abcdef}) + \text{F6P} (\text{abcdef})$	-0.8
$0 \rightarrow -\text{F6P} (\text{abcdef}) - \text{ATP} + \text{FBP} (\text{abcdef})$	-3.8
$0 \leftrightarrow -\text{FBP} (\text{abcdef}) + \text{DHAP} (\text{cba}) + \text{GAP} (\text{def})$	+0.1
$0 \leftrightarrow -\text{DHAP} (\text{abc}) + \text{GAP} (\text{abc})$	+1.4
$0 \leftrightarrow -2 \times \text{GAP} (\text{abc}) + \underline{2\text{NADH}} + 2 \times \text{13DPG} (\text{abc})$	+3.8
$0 \leftrightarrow -2 \times \text{13DPG} (\text{abc}) + 2 \times \text{3PG} (\text{abc}) + 2\text{ATP}$	-3.0
$0 \leftrightarrow -2 \times \text{3PG} (\text{abc}) + 2 \times \text{PEP} (\text{abc})$	-0.9
$0 \rightarrow -\text{PEP} (\text{abc}) + \text{PYR} (\text{abc}) + \text{ATP}$	-5.3

*Примечание:*  $\Delta_r G^m$  – энергия Гиббса реакции;  $\text{Glc}_{\text{ext}}$  – глюкоза в среде для культивирования; первое уравнение отражает PEP-зависимый транспорт глюкозы в клетку в виде G6P; DHAP – дигидроксиацетонфосфат; FBP – фруктозо-1,6-бисфосфат. Здесь и далее: жирным шрифтом выделены МП, подчеркнутым – редокс-эквиваленты. Для удобства суммирования все участники реакций перенесены в правую часть уравнения; при этом знак минус (–) обозначает субстраты реакции, знак плюс (+) – образующиеся в результате реакции продукты.

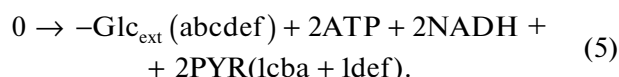
*Note:*  $\Delta_r G^m$  – Gibbs energy of the reaction;  $\text{Glc}_{\text{ext}}$ , glucose in the culture medium; the first equation reflects PEP-dependent transport of glucose into the cell as G6P; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; FBP, fructose-1,6-bisphosphate. Hereinafter: Metabolic precursors are shown in bold and redox-equivalents are underlined. For the convenience of summation, all the reaction participants were transferred to the right side of the equation; the minus (–) denotes the reaction substrates, while the plus (+) denotes the products formed as a result of the reaction.

Также в уравнениях реакций, где встречаются пары кофакторов (например, ATP/ADP,  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  или THF/MET-THF) с одинаковыми по величине стехиометрическими коэффициентами, но с разными знаками (что отражает тесное сцепление кофакторов и постоянство их суммарной концентрации), для отражения факта взаимоконверсии связанной пары в ходе реакции в уравнение, как правило [1, 2], включают только один из двух кофакторов [8]. Это сокращает запись и в частности предотвращает технические проблемы решения стехиометрических задач с помощью матричных математических методов [8]. Однако тут надо учитывать и нетривиальные случаи. Например, если из ATP, вместо обычно образующегося ADP, в реакции появляется AMP, то при расчете МС в качестве основы следует брать переход  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ , то есть расщепление ATP до AMP эквивалентно двум переходам  $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$ .

На основании вышесказанного уравнения реакций катаболизма глюкозы на EMP-пути можно представить в виде, представленном в табл. 2, если принять, что внутриклеточный транспорт и фосфорилирование глюкозы из культуральной жидкости ( $\text{Glc}_{\text{ext}}$ ) осуществляется за счет фосфоенолпируватной транспортной системы (phosphoenolpyruvate transport system; PTS). На основании данных, приведенных в работе [8], можно легко установить, что при использовании для аэробного катаболизма глюкозы EMP-пути в сочетании с циклом ТСА и последующим ОФ энергетическая эффектив-

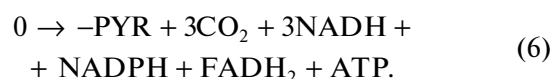
ность выхода ATP максимальна при величине коэффициента P/O в интервале 1.5–2.0.

Проводя суммирование этих реакций с учетом их стехиометрии и сокращая интермедиаты с разными знаками, получим:



Окончательно окисление углерода глюкозы, трансформированной по EMP-пути в PYR, до  $\text{CO}_2$  происходит в реакциях ТСА-цикла (табл. 3).

Суммируя, получим уравнение:



Следовательно, величина МС PYR при аэробном росте *E. coli* на глюкозе ( $\text{MC}_{[\text{PYR}]}$ ) может быть определена в единицах «~P» и «H» как:

$$\text{MC}_{[\text{PYR}]} = 3\langle\text{H}\rangle_{[\text{NADH}]} + \langle\text{H}\rangle_{[\text{NADPH}]} + \text{H}_{[\text{FADH}_2]} + \langle\sim\text{P}\rangle_{[\text{ATP}]}. \quad (7)$$

Тогда из уравнений (6) и (7) МС для глюкозы составит:

$$\text{MC}_{[\text{Glc-D}]} = 8\langle\text{H}\rangle_{[\text{NADH}]} + 2\langle\text{H}\rangle_{[\text{NADPH}]} + 2\text{H}_{[\text{FADH}_2]} + 4\langle\sim\text{P}\rangle_{[\text{ATP}]}, \quad (8)$$

где Glc-D – D-глюкоза.

Как отмечалось выше, принимая коэффициенты конверсии между «H» и «~P» согласно уравнению (2) или (3), мы получим значение  $\text{MC}_{[\text{Glc-D}]}$  соответственно 26 или 20 «~P».

**Таблица 3.** Метаболическая модель цикла ТСА в *E. coli*  
**Table 3.** The metabolic model of TCA cycle in *E. coli*

Уравнение реакции (с указанием перестановок атомов углерода)	$[\Delta_r G^m]$ , ккал/моль
$0 \rightarrow -\text{PYR} (abc) + \text{Ac-CoA} (bc) + \text{CO}_2 (a) + \text{NADH}$	-8.3
$0 \rightarrow -\text{OA} (abcd) - \text{Ac-CoA} (ef) + \text{CIT} (dcbfea)$	-8.9
$0 \leftrightarrow -\text{CIT} (abcdef) + \text{ICIT} (abcdef)$	+1.3
$0 \leftrightarrow -\text{ICIT} (abcdef) + \text{AKG} (abcde) + \text{CO}_2 (f) + \text{NADPH}$	-1.0
$0 \leftrightarrow -\text{AKG} (abcde) + \text{Suc-CoA} (bcde) + \text{CO}_2 (a) + \text{NADH}$	-8.3
$0 \leftrightarrow -\text{Suc-CoA} (abcd) + \text{SUC} (1/2 abcd + 1/2 dcba) + \text{ATP}$	-0.9
$0 \leftrightarrow -\text{SUC} (1/2 abcd + 1/2 dcba) + \text{FUM} (1/2 abcd + 1/2 dcba) + \text{FADH}_2$	-2.1
$0 \leftrightarrow -\text{FUM} (1/2 abcd + 1/2 dcba) + \text{MAL} (abcd)$	-0.6
$0 \leftrightarrow -\text{MAL} (abcd) + \text{OA} (abcd) + \text{NADH}$	+6.1

*Примечание:* CIT – цитрат, FUM – фумарат, ICIT – изоцитрат, MAL – малат, SUC – сукцинат.  
*Note:* CIT – citrate, FUM – fumarate, ICIT – isocitrate, MAL – malate, SUC – succinate.

МС оставшихся 9 из 13 МП, получаемых в реакциях EMP-пути и цикла ТСА, легко определить из уже представленных уравнений. Действительно, известно, что глюкозо-6-фосфат, Г6Р, может быть синтезирован из внутриклеточной глюкозы в реакции, катализируемой глюкокиназой за счет энергии гидролиза АТФ до АДФ, то есть  $MC_{[G6P]} = MC_{[Glc-D]} + \langle \sim P \rangle_{[ATP]}$ .

Заметим, что:  $MC_{[G6P]} = MC_{[F6P]}$ ; поэтому справедливы следующие уравнения:

$$MC_{[F6P]} = MC_{[F6P]} + \langle \sim P \rangle_{[ATP]}, \quad (9)$$

$$MC_{[GAP]} = 1/2 MC_{[F6P]}, \quad (10)$$

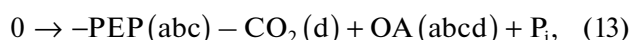
$$MC_{[3PG]} = MC_{[GAP]} - \langle \sim P \rangle_{[ATP]} - \langle H \rangle_{[NADH]}, \quad (11)$$

$$MC_{[PEP]} = MC_{[3PG]}, \quad (12)$$

или  $\langle MC \rangle_{[PEP]} = MC_{[PYR]} + \langle \sim P \rangle_{[ATP]}$ .

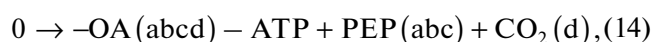
Таким способом мы определили величину МС в единицах  $\langle \sim P \rangle$  и  $\langle H \rangle$  для всех 6 МП из EMP-пути превращения глюкозы.

При оценке величины МС МП из цикла ТСА к ранее представленной группе реакций ТСА необходимо добавить одну из анаэробных реакций, входящих в “коровую” модель ЦМ *E. coli*:



для которой  $\Delta_r G^m = -7.2$  ккал/моль.

В ходе этой реакции не происходит синтеза/гидролиза АТФ, а также синтеза/окисления редокс-эквивалентов. Следовательно, в соответствии с определением МС, необходимо принять, что  $MC_{[PEP]} = MC_{[OA]}$  при аэробном росте на глюкозе, несмотря на экзотермический характер приведенной реакции и необходимость гидролиза АТФ для синтеза PEP из OA в “обратной” амфиболической реакции, которая не описывает катаболизм глюкозы:



и для которой  $\Delta_r G^m = -3.6$  ккал/моль.

МС PYR и Ac-CoA связаны уравнением  $MC_{[PYR]} = MC_{[Ac-CoA]} + \langle H \rangle_{[NADH]}$ , а потому:

$$MC_{[Ac-CoA]} + MC_{[OA]} + \langle H \rangle_{[NADPH]} = MC_{[AKG]}, \quad (15)$$

$$MC_{[AKG]} + \langle H \rangle_{[NADH]} = MC_{[Suc-CoA]}, \quad (16)$$

что позволяет однозначно определить МС этих четырех МП в единицах  $\langle \sim P \rangle$  и  $\langle H \rangle$ .

Для установления МС трех последних МП из PP-пути мы представили соответствующие реакции в том же формате, что и для других метаболических превращений, но с учетом пинг-понгового механизма реакций, катализируемых транскедолазой (ТК; ЕС 2.2.1.1) и трансальдозой (ТА; ЕС 2.2.1.2) в неоксидативной ветке (нов-) PP-пути [55, 56] (табл. 4). Напомним, что традиционно в литературе при анализе этих реакций подразумевали упорядоченно-последовательный механизм действия ТК и ТА [55]; при этом схема реакций нов-PP-пути не была установлена экспериментально, а предложена на основе красивого математического решения логической задачи о превращении шести коробок с пятью шарами в каждой в пять коробок с шестью шарами в каждой за счет последовательного переноса либо 2, либо 3 шаров из любой коробки в любую коробку при каждом переносе. В этой “математической” задаче моделировали активности ТК и ТА по переносу групп атомов углерода; так коробки имитировали 5- или 6-углеродные сахара, а шары в них – атомы углерода [57].

Последняя реакция, приведенная в табл. 4, называется “экстратранскедолазной” (extra transketolase reaction) [58], которая обусловлена обратимым пинг-понговым механизмом реакций, катализируемых ТК и ТА [55, 56]. Для аккуратного учета

**Таблица 4.** Метаболическая модель PP-пути в *E. coli*  
**Table 4.** The metabolic model of PP-pathway in *E. coli*

Уравнение реакции (с указанием перестановок атомов углерода)	$[\Delta_r G^m]$ , ккал/моль
$0 \rightarrow -\mathbf{G6P}$ (abcdef) + 6PG (abcdef) + <u>NADPH</u>	-7.6
$0 \rightarrow -6\mathbf{PG}$ (abcdef) + Ru5P (bcdef) + CO <sub>2</sub> (a) + <u>NADPH</u>	-3.5
$0 \leftrightarrow -\mathbf{Ru5P}$ (abcde) + X5P (abcde)	0
$0 \leftrightarrow -\mathbf{X5P}$ (abcde) + <b>R5P</b> (abcde)	+0.5
$0 \leftrightarrow -\mathbf{X5P}$ (abcde) – <b>R5P</b> (fghij) + <b>S7P</b> (abfghij) + <b>GAP</b> (cde)	+1.9
$0 \leftrightarrow -\mathbf{S7P}$ (abcdefg) – <b>GAP</b> (hij) + <b>F6P</b> (abchij) + <b>E4P</b> (defg)	-1.7
$0 \leftrightarrow -\mathbf{X5P}$ (abcde) – <b>E4P</b> (fghi) + <b>F6P</b> (abfghi) + <b>GAP</b> (cde)	-1.7
$0 \leftrightarrow -\mathbf{S7P}$ (abcdefg) – <b>E4P</b> (ghij) + <b>R5P</b> (cdefg) + <b>F6P</b> (abghij)	-3.5

*Примечание:* 6PG – 6-фосфоглицерат, Ru5P – рибулозо-5-фосфат, X5P – ксилулозо-5-фосфат.  
*Note:* 6PG – 6-phosphoglycerate; Ru5P – ribulose-5-phosphate; X5P – xylulose-5-phosphate.

перераспределения атомов, меченных <sup>13</sup>C, запись традиционных полноразмерных реакций необходимо заменить, указывая на участие в них обратимых форм ферментов ТК и ТА в комплексе с полупродуктами реакций: ТК-С2 и ТА-С3 [56] (что получило в литературе название “представление половинок реакций по Kleijn” [59]), – продуцирующих при взаимодействии с первыми субстратами соответственно С2-гликоальдегидные или С3-дигидроацетоновые фрагменты и использующих эти С2- или С3-полупродукты для переноса на вторые субстраты.

R. Kleijn с соавт. [56] убедительно показали, что ТК (см., например, [60]) характеризуется широкой субстратной специфичностью. Так X5P, F6P и S7P – типичные доноры С2-фрагмента (субстраты I) для ТК, а GAP, E4P и R5P – типичные акцепторы этого С2-фрагмента (субстраты II). Вслед за авторами, изменявшими привычные представления о механизме работы ТК и ТА [56, 61, 62], стехиометрические модели, использующие половинки реакций с ТК-С2 и с ТА-С3, в настоящее время все чаще применяют для описания метаболизма таких организмов, как *E. coli* [32–34, 63, 64], *Thermus thermophilus* [65], *Geobacillus* LC300 [66], *Clostridium acetobutylicum* [67], *Saccharomyces cerevisiae* [59, 62, 68, 69], *Yarrowia lipolytica* [70], *Penicillium chrysogenum* [71] и клетки млекопитающих [72–74].

Приведенные реакции позволяют довольно просто установить величину МС трех оставшихся МП из PP-пути в единицах «~Р» и «Н<sup>-</sup>». Действительно, по данным, приведенным в табл. 4:

$$MC_{[R5P]} = MC_{[G6P]} - 2\langle H \rangle_{[NADPH]}$$

$$MC_{[E4P]} = MC_{[F6P]} + MC_{[GAP]} - MC_{[R5P]}$$

$$MC_{[S7P]} = MC_{[F6P]} + MC_{[R5P]} - MC_{[E4P]}$$

Значения МС МП, рассчитанные другими исследователями и представленные в табл. 5, сильно отличаются друг от друга и от полученных нами,

что обусловлено использованием различных алгоритмов оценки. Даже включение в сводную табл. 6 данных для эукариот (дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*), имеющих значительно отличающуюся от бактериальной систему ОФ и, следовательно, величину коэффициента Р/О (по современным данным, для эукариот это ~2.5 АТФ/НАДН и ~1.5 АТФ/ФАДН<sub>2</sub>, ранее – 3 и 2 соответственно [76]), не усиливает различия в результатах. Сильный разброс в значениях МС уже на уровне оценок МП удивляет, так как основные представления о ЦМ *E. coli* сформировались достаточно давно.

Проиллюстрируем расхождения в некоторых представлениях. Так, Akashi & Gojobori [4] предположили, что при росте на глюкозе ОА образуется через карбоксилирование РЕР. Как и мы, авторы приводят полученные значения в единицах «~Р» и «Н», а именно: 2 и 4 для РЕР и 1 и 4 для ОА. Таким образом, по их расчетам значение МС для ОА на одну «~Р» меньше, чем для РЕР, что, на наш взгляд, противоречит самому определению понятия МС. Мы уже приводили аргументы относительно равенства МС для РЕР и ОА при аэробном росте *E. coli* на глюкозе – при анализе экзотермической анаэробной реакции (13) и “обратной” к ней амфиболической реакции (14). Аналогична ситуация между РЕР и РYR: по определению, при росте на глюкозе разница в МС этих метаболитов составляет величину, равную одной «~Р» за счет гидролиза РЕР до РYR с образованием одной молекулы АТФ; при этом идет амфиболический синтез РЕР из РYR, сопряженный с гидролизом АТФ до АМР, который эквивалентен двум «~Р» (то есть 2АТФ). Отметим, что по расчетам Akashi & Gojobori [4] значения МС для РЕР и РYR одинаковы. На наш взгляд, это довольно странный результат. Проанализировав литературу, мы пришли к выводу, что наиболее близки к нашему алгоритму расчета МС МП подходы, использованные С. Kaleta с соавт. [19] и G. Mahmoudabadi и др. [77]. Из приведенных авторами значений МС МП – при конверсии



**Таблица 5.** Значения МС для D-глюкозы и МП, полученные при использовании различных соотношений между «~P» и «H»

**Table 5.** Metabolic cost values of D-glucose and metabolic precursors obtained using various «~P» and «H» ratios

МП	«~P»	«H»			МС <sup>a</sup>		
	ATP	NADPH	NADH	FADH <sub>2</sub>	(1)	(2)	(3)
D-Glc	4	2	8	2	38	26	20
G6P	5	2	8	2	39	27	21
F6P	5	2	8	2	39	27	21
GAP	3	1	4	1	20	14	11
3PG	2	1	3	1	16	11	8.5
PEP	2	1	3	1	16	11	8.5
PYR	1	1	3	1	15	10	7.5
R5P	5	0	8	2	33	23	18
E4P	3	3	4	1	26	18	14
S7P	5	4	6	2	45	31	24
OA	2	1	3	1	16	11	8.5
Ac-CoA	1	1	2	1	12	8	6
AKG	3	1	5	2	25	17	13
Suc-CoA	3	1	4	2	22	15	11.5

*Примечание:*<sup>a</sup> Величина МС для МП вычислена из данных по «P» и «H» с учетом разных допущений о значениях конверсионного коэффициента: (1) [NADPH] = [NADH] = 3[ATP], [FADH<sub>2</sub>] = 2[ATP]; (2) [NADPH] = [NADH] = 2[ATP], [FADH<sub>2</sub>] = [ATP]; (3) [NADPH] = [NADH] = 1.5[ATP], [FADH<sub>2</sub>] = 0.5[ATP].

*Note:*<sup>a</sup> MC value for metabolic precursors was calculated based on data of «P» and «H» with different assumptions about coefficient of conversion: (1) [NADPH] = [NADH] = 3[ATP], [FADH<sub>2</sub>] = 2[ATP]; (2) [NADPH] = [NADH] = 2[ATP], [FADH<sub>2</sub>] = [ATP]; (3) [NADPH] = [NADH] = 1.5[ATP], [FADH<sub>2</sub>] = 0.5[ATP].

**Таблица 6.** Сравнение величин МС МП, приведенных в работах различных авторов и представленных в обобщенных величинах «~P», полученных при суммировании «~P» и «H» при схожих коэффициентах конверсии

**Table 6.** Comparison of metabolic cost values of metabolic precursors represented in works of different authors as generalized values «~P», obtained by summation «~P» and «H» with similar conversion coefficients

Коэффициент конверсии «H» в «~P»	D-Glc	G6P	F6P	GAP	3PG	PEP	PYR	R5P	E4P	S7P	OA	Ac-CoA	AKG	Suc-CoA	Ссылка
	«H» = 2«~P»	н.о.	н.о.	н.о.	14.5	н.о.	14.5	13.5	30	28	н.о.	2	12	9.5	н.о.
	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	16	10	10	27	21	н.о.	9	8	4	н.о.	[4]
	30	н.о.	н.о.	н.о.	14.5	14.5	12.5	27	27	н.о.	13.5	10	7.5	н.о.	[19]
«H» <sub>[NAD(P)H]</sub> = 2«~P»,	26	27	27	14	11	11	10	23	23	н.о.	11	8	17	н.о.	[16]
«H» <sub>[FADH<sub>2</sub>]</sub> = «~P»	26	н.о.	н.о.	14	11	11	10	23	23	н.о.	11	8	17	н.о.	[75]
	26	27	27	14	11	11	10	23	18	31	11	8	17	15	Данная работа

*Примечание:* н.о. – не определяли.

*Note:* н.о. – not determined.

«H» в «~P» в соответствии с уравнениями (2), приводящей к цене глюкозы в 26«~P», – в каждом наборе представленных данных замечено лишь одно отличие от нашей группы: 23«~P» вместо

18«~P» для E4P. В этом случае объяснение найти можно. Действительно, с одной стороны, в реакциях между МП из PP-пути (R5P, E4P, S7P) не происходит изменения «H» или «~P» относитель-

но R5P, что, по-видимому, позволило авторам работ [19, 77] считать значения MC этих МП одинаковыми. С другой стороны, из анализа реакций оксидативной ветки РР-пути видно, что  $MC_{[R5P]} = MC_{[G6P]} - 2\langle N \rangle_{[NADPH]}$ , а при договоренности  $MC_{[Glc]} = 26\langle \sim P \rangle$  это соответствует  $MC_{[R5P]} = MC_{[R5P]} = 23\langle \sim P \rangle$ . По-видимому, на этих основаниях авторы работ [19, 77] присваивают это же значение MC и другому МП из РР-пути – E4P, не проанализировав при этом уравнений с участием других МП для уточнения MC всех требуемых предшественников, как это сделано нами.

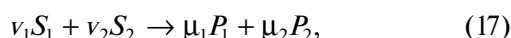
### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы считаем, что метаболическая стоимость основных метаболических предшественников, выраженная через потенциалы фосфорилирования и различные редокс-эквиваленты (см. табл. 5), полностью соответствует определению этого параметра и современным представлениям о механизмах аэробного катаболизма глюкозы клетками *E. coli*. В то же время абсолютная величина метаболической стоимости в  $\langle \sim P \rangle$  зависит от условий аэробного культивирования, конкретного значения коэффициента Р/О для окислительного фосфорилирования и в том числе от договоренности исследователей.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 1

#### РАСЧЕТ ЭНЕРГИИ ГИББСА ДЛЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Для произвольной химической реакции:



где  $S_i$  и  $P_j$  – соответственно субстраты и продукты реакции,  $v_i$  и  $\mu_j$  – их стехиометрические коэффициенты. Энергию Гиббса для этой реакции ( $\Delta_r G'$ ) можно рассчитать по следующей формуле:

$$\Delta_r G' = \Delta_r G'^{\circ} + RT \ln \left( \frac{[P_1]^{\mu_1} [P_2]^{\mu_2}}{[S_1]^{v_1} [S_2]^{v_2}} \right), \quad (18)$$

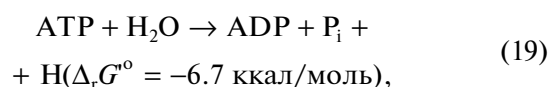
где  $[S_i]$  и  $[P_j]$  – молярные концентрации субстратов и продуктов реакции;  $\Delta_r G'^{\circ}$  – стандартная свободная энергия Гиббса реакции, проводимой при 1 атм, 25°C и 1 М концентрации всех реагентов;  $T$  – абсолютная температура, К;  $R$  – универсальная газовая постоянная ( $\approx 8.3144598(48)$  Дж моль<sup>-1</sup> К<sup>-1</sup>).

Величина  $\Delta_r G'^{\circ}$  для метаболических реакций может быть взята из специализированной литературы (например, [26, 78]). Там же приведены значения  $\Delta_r G'^m$  для реакции, проводимой при стандартных давлениях и температуре, но при концентрации реагентов 1 мМ, а также величины стандартной свободной энергии Гиббса формирования метаболитов при концентрации 1 М

( $\Delta_r G'^m$ ) или 1 мМ ( $\Delta_r G'^m$ ). Имеющиеся в литературе параметры  $\Delta_r G'^{\circ}$ , как правило, результат теоретической оценки, проведенной с использованием “метода групповых вкладов” (group contribution method), разработанного М. Mavrouniotis [79, 80] и дополненного М. Jankowski и др. [75] и далее В. Du и др. [78] на основе расчетных и экспериментальных данных R. Alberty [81].

Зная величину  $\Delta_r G'^{\circ}$ , по формуле (18) можно определить величину  $\Delta_r G'$ , например, для реакции с “физиологическими” концентрациями реагентов, то есть характерными для метаболитов клеток *E. coli*, экспоненциально растущих в аэробных условиях на среде с глюкозой. В этих условиях, согласно работе [82]:  $[ATP] = 9.6 \times 10^{-3}$ ,  $[ADP] = 5.6 \times 10^{-4}$ ,  $[P_i] = 2 \times 10^{-2}$ ,  $[NAD^+] = 2.6 \times 10^{-3}$ ,  $[NADPH] = 1.2 \times 10^{-4}$ ,  $[NADPH] = 8.3 \times 10^{-5}$ ,  $[NADP^+] = 2.1 \times 10^{-6}$ . Именно эти концентрации использованы нами при расчете  $\Delta_r G'$ .

Энергию, выделяемую при гидролизе АТФ до АДФ и  $P_i$  (ATP maintenance requirement), называют потенциалом фосфорилирования и оценивают ее величину при проведении реакции в стандартных условиях [82]:



а при “физиологических” концентрациях метаболитов уравнение выглядит так:

$$\Delta_r G' = \Delta_r G'^{\circ} + RT \ln \left( \frac{[ADP][P_i]}{[ATP]} \right) = -10.9 \text{ ккал/моль} = [P_i], \quad (20)$$

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Varma A., Palsson B.O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *BioTechnology*, 1994, 12, 994–998. <https://doi.org/10.1038/nbt1094-994>
2. Varma A., Palsson B.O. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. Synthesis of biosynthetic precursors and cofactors. *J. Theor. Biol.*, 1993, 165, 477–502. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1202>
3. Stouthamer A.H. A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1973, 39, 545–565. <https://doi.org/10.1007/BF02578899>
4. Akashi H., Gojobori T. Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 3695–3700. <https://doi.org/10.1073/pnas.062526999>
5. Craig C., Weber R. Selection costs of amino acid substitutions in *ColE1* and *Colla* gene clusters harbored by *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.*, 1998, 15, 6, 774–776. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025981>

6. Zamboni N., Fendt S.-M., Rühl M., Sauer U.  $^{13}\text{C}$ -based metabolic flux analysis. *Nat. Protoc.*, 2009, 4, 878–892. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.58>
7. Long C.P., Antoniewicz M.R. High-resolution  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis. *Nat. Protoc.*, 2019, 14, 2856–2877. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0204-0>
8. Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J.H. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. Ed. G. Stephanopoulos. San Diego, USA: Academic Press, 1998, 725 p.
9. Andreeva I.G., Golubeva L.I., Kuvaeva T.M., et al. Identification of *Pantoea ananatis* gene encoding membrane pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase and pqqABCDEF operon essential for PQQ biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2011, 318, 55–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02240.x>
10. Современная микробиология. Прокариоты (в 2 томах), том 1. Ред. Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. Москва, Мир, 2005, 654 с.
11. Noor E., Eden E., Milo R., Alon U. Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy. *Mol. Cell*, 2010, 39, 809–820. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.031>
12. Gopalakrishnan S., Maranas C.D.  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis at a genome-scale. *Metab. Eng.*, 2015, 32, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.08.006>
13. Neidhardt F.C., Umbarger H.E. Chemical composition of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd edition. Ed. F.C. Neidhardt. Washington, USA: ASM Press, 1996, 13–16.
14. Ferreira G.C., Gong J. 5-Aminolevulinic acid synthase and the first step of heme biosynthesis. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1995, 27(2), 151–159. <https://doi.org/10.1007/BF02110030>
15. Reed J.L., Vo T.D., Schilling C.H., Palsson B.O. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). *Genome Biol.*, 2003, 4(9), R54. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-r54>
16. Seligmann H. Cost-minimization of amino acid usage. *J. Mol. Evol.*, 2003, 56, 151–161. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2388-z>
17. Heizer Jr. E.M., Raiford D.W., Raymer M.L., et al. Amino acid cost and codon-usage biases in 6 prokaryotic genomes: a whole-genome analysis. *Mol. Biol. Evol.*, 2006, 23, 1670–1680. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl029>
18. Heizer Jr. E.M., Raymer M.L., Krane D.E. Amino acid biosynthetic cost and protein conservation. *J. Mol. Evol.*, 2011, 72, 466–473. <https://doi.org/10.1007/s00239-011-9445-4>
19. Kaleta C., Schäuble S., Rinas U., Schuster S. Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.*, 2013, 8, 1105–1114. <https://doi.org/10.1002/biot.201200267>
20. Zhang H., Wang Y., Li J., et al. Biosynthetic energy cost for amino acids decreases in cancer evolution. *Nat. Commun.*, 2018, 9, 4124. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06461-1>
21. Страйер Л. Биохимия (в 3 томах), том 2. Ред. С.Е. Селверин. Москва: Мир, 1985, 312 с.
22. Wagner A. Energy constraints on the evolution of gene expression. *Mol. Biol. Evol.*, 2005, 22, 1365–1374. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi126>
23. Taymaz-Nikerel H., Borujeni A.E., Verheijen P.J.T., et al. Genome-derived minimal metabolic models for *Escherichia coli* MG1655 with estimated *in vivo* respiratory ATP stoichiometry. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 107, 369–381. <https://doi.org/10.1002/bit.22802>
24. Bekker M., de Vries S., Beek A.T., et al. Respiration of *Escherichia coli* can be fully uncoupled via the nonelectrogenic terminal cytochrome bd-II oxidase. *J. Bacteriol.*, 2009, 191, 5510–5517. <https://doi.org/10.1128/JB.00562-09>
25. Magalon A., Alberge F. Distribution and dynamics of OXPHOS complexes in the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, 1857, 198–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.015>
26. Feist A.M., Henry C.S., Reed J.L., et al. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.*, 2007, 3, 121. <https://doi.org/10.1038/msb4100155>
27. Tomaszek J.J., Brusilow W.S.A. Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2000, 32, 493–500. <https://doi.org/10.1023/A:1005617024904>
28. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M. *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*. Ed. F.C. Neidhardt. Sunderland, USA: Sinauer Associates, 1990, 507 p.
29. Krick T., Verstraete N., Alonso L.G., et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. *Mol. Biol. Evol.*, 2014, 31, 2905–2912. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu228>
30. Stahlberg H., Muller D.J., Suda K., et al. Bacterial  $\text{Na}^+$ -ATP synthase has an undecameric rotor. *EMBO Rep.*, 2001, 2, 229–233. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve047>
31. Steigmiller S., Turina P., Gräber P. The thermodynamic  $\text{H}^+$ /ATP ratios of the  $\text{H}^+$ -ATP synthases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 3745–3750. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708356105>
32. Antoniewicz M.R., Kraynie D.F., Laffend L.A., et al. Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol. *Metab. Eng.*, 2007, 9, 277–292. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.01.003>
33. Lighty R.W., Antoniewicz M.R. Parallel labeling experiments with  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glucose validate *E. coli* metabolic network model for  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis. *Metab.*

- Eng.*, 2012, 14, 533–541.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.06.003>
34. *Leighty R.W., Antoniewicz M.R.* COMPLETE-MFA: complementary parallel labeling experiments technique for metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2013, 20, 49–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.08.006>
  35. *Long C.P., Gonzalez J.E., Feist A.M., et al.* Fast growth phenotype of *E. coli* K-12 from adaptive laboratory evolution does not require intracellular flux rewiring. *Metab. Eng.*, 2017, 44, 100–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.09.012>
  36. *Gonzalez J.E., Long C.P., Antoniewicz M.R.* Comprehensive analysis of glucose and xylose metabolism in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions by <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2017, 39, 9–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.11.003>
  37. *Orth J.D., Conrad T.M., Na J., et al.* A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Mol. System. Biol.*, 2011, 7, 535.  
<https://doi.org/10.1038/msb.2011.65>
  38. *Ravikirthi P., Suthers P.F., Maranas C.D.* Construction of an *E. coli* genome-scale atom mapping model for MFA calculations. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108, 1372–1382.  
<https://doi.org/10.1002/bit.23070>
  39. *Latendresse M., Malerich J.P., Travers M., Karp P.D.* Accurate atom-mapping computation for biochemical reactions. *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, 52, 2970–2982.  
<https://doi.org/10.1021/ci3002217>
  40. *Szyperski T.* Biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C-labeling of proteinogenic amino acids: an efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 232, 433–448.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20829.x>
  41. *Antoniewicz M.R., Kelleher J.K., Stephanopoulos G.* Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions. *Metab. Eng.*, 2007, 9, 68–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.09.001>
  42. *Wiechert W., Möllney M., Petersen S., de Graaf A.* A universal framework for <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2001, 3, 265–283.  
<https://doi.org/10.1006/mben.2001.0188>
  43. *Shupletsov M.S., Golubeva L.I., Rubina S.S., et al.* OpenFLUX2: <sup>13</sup>C-MFA modeling software package adjusted for the comprehensive analysis of single and parallel labeling experiments. *Microb. Cell Fact.*, 2014, 13, 152.  
<https://doi.org/10.1186/s12934-014-0152-x>
  44. *Wittman C., Van De Graaf A.A.* Chapter 12. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*, 1st edition. Eds L. Eggeling & M. Bott. Boca Raton: CRC Press, 2005, 277–304.  
<https://doi.org/10.1201/9781420039696.ch12>
  45. *Becker J., Wittmann C.* Chapter 10. In: Metabolic Flux Analysis: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), 1st edition. Eds J.O. Krömer, L. Nielsen, L.M. Blank. Humana: Springer Nature, 2014, 165–174.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1170-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1170-7_10)
  46. *Kawai S., Mori S., Mukai T., et al.* Molecular characterization of *Escherichia coli* NAD<sup>+</sup> kinase. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, 4359–4365.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02358.x>
  47. *Sakuraba H., Kawakami R., Ohshima T.* First archaeal inorganic polyphosphate/ATP-dependent NAD<sup>+</sup> kinase, from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*: cloning, expression, and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 4352–4358.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4352-4358.2005>
  48. *Outten C.E., Culotta V.C.* A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 2003, 22, 2015–2024.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg211>
  49. *Strand M.K., Stuart G.R., Longley M.J., et al.* POS5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial NADH kinase required for stability of mitochondrial DNA. *Eukaryot. Cell*, 2003, 2, 809–820.  
<https://doi.org/10.1128/EC.2.4.809-820.2003>
  50. *Sauer U., Canonaco F., Heri S., et al.* The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 6613–6619.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M311657200>
  51. *Wiechert W., de Graaf A.A.* Modelling for improved bioreactor performance. In: Modelling for improved bioreactor performance. Ed. V. Bales. Bratislava: Male Centrum, 1993, 19–24.
  52. *Wiechert W., de Graaf A.A.* In vivo stationary flux analysis by <sup>13</sup>C labeling experiments. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1996, 54, 109–154.  
<https://doi.org/10.1007/BFb0102334>
  53. *Quek L.E., Wittmann C., Nielsen L.K., Krömer J.O.* OpenFLUX: efficient modelling software for <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis. *Microb. Cell Fact.*, 2009, 8, 25.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-25>
  54. *Quek L.E., Nielsen L.K.* Steady-state <sup>13</sup>C fluxomics using OpenFLUX. *Methods Mol. Biol.*, 2014, 1191, 209–224.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1170-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1170-7_13)
  55. *van Winden W., Verheijen P., Heijnen S.* Possible pitfalls of flux calculations based on <sup>13</sup>C-labeling. *Metab. Eng.*, 2001, 3, 151–162.  
<https://doi.org/10.1006/mben.2000.0174>
  56. *Kleijn R.J., van Winden W.A., van Gulik W.M., Heijnen J.J.* Revisiting the <sup>13</sup>C-label distribution of the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway based upon kinetic and genetic evidence. *FEBS J.*, 2005, 272, 4970–4982.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04907.x>
  57. *Meléndez-Hevia E., Isidoro A.* The game of the pentose phosphate cycle. *J. Theor. Biol.*, 1985, 117, 251–263.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(85\)80220-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(85)80220-4)
  58. *Shaikh A.S., Tang Y.J., Mukhopadhyay A., et al.* Study of stationary phase metabolism via isotopomer analysis of amino acids from an isolated protein. *Biotechnol. Prog.*, 2010, 6, 52–56.  
<https://doi.org/10.1002/btpr.325>

59. Wasylenko T.M., Stephanopoulos G. Metabolomic and  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase. *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, 112, 470–483. <https://doi.org/10.1002/bit.25447>
60. Kochetov G.A., Solovjeva O.N. Structure and functioning mechanism of transketolase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, 1844, 1608–1618. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.06.003>
61. van Winden W.A., Gulik W.M., SchiPer D., et al. Metabolic flux and metabolic network analysis of *Penicillium chrysogenum* using 2D [ $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ] COSY NMR measurements and cumulative Bondomer simulation. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 83, 75–92. <https://doi.org/10.1002/bit.10648>
62. van Winden W.A., van Dam J.C., Ras C., et al. Metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of  $^{13}\text{C}$ -labeled primary metabolites. *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5, 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.007>
63. Millard P., Sokol S., Letisse F., Portais J.C. IsoDesign: a software for optimizing the design of  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis experiments. *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, 111, 202–208. <https://doi.org/10.1002/bit.24997>
64. Martín H.G., Kumar V.S., Weaver D., et al. A method to constrain genome-scale models with  $^{13}\text{C}$  labeling data. *PLoS Comput. Biol.*, 2015, 11, e1004363. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004363>
65. Cordova L.T., Lu J., Cipolla R.M., et al. Co-utilization of glucose and xylose by evolved *Thermus thermophilus* LC113 strain elucidated by  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis and whole genome sequencing. *Metab. Eng.*, 2016, 37, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.05.001>
66. Cordova L.T., Long C.P., Venkataramanan K.P., Antoniewicz M.R. Complete genome sequence, metabolic model construction and phenotypic characterization of *Geobacillus* LC300, an extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing bacterium. *Metab. Eng.*, 2015, 32, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.09.009>
67. Au J., Choi J., Jones S.W., et al. Parallel labeling experiments validate *Clostridium acetobutylicum* metabolic network model for  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2014, 26, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.08.002>
68. Zelle R.M., de Hulster E., van Winden W.A., et al. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 2766–2777. <https://doi.org/10.1128/AEM.02591-07>
69. Shymansky C.M., Wang G., Baidoo E.E.K., et al. Flux-enabled exploration of the role of Sip1 in galactose yeast metabolism. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2017, 5, 31. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00031>
70. Wasylenko T.M., Ahn W.S., Stephanopoulos G. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng.*, 2015, 30, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.007>
71. Kleijn R.J., van Winden W.A., Ras C., et al.  $^{13}\text{C}$ -labeled gluconate tracing as a direct and accurate method for determining the pentose phosphate pathway split ratio in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 4743–4754. <https://doi.org/10.1128/AEM.02955-05>
72. Ahn W.S., Antoniewicz M.R. Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metab. Eng.*, 2011, 13, 598–609. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.07.002>
73. Ahn W.S., Crown S.B., Antoniewicz M.R. Evidence for transketolase-like TKTL1 flux in CHO cells based on parallel labeling experiments and  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2016, 37, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.05.005>
74. Long C.P., Au J., Gonzalez J.E., Antoniewicz M.R.  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis of microbial and mammalian systems is enhanced with GC-MS measurements of glycogen and RNA labeling. *Metab. Eng.*, 2016, 38, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.06.007>
75. Jankowski M.D., Henry C.S., Broadbelt L.J., Hatzimanikatis V. Group contribution method for thermodynamic analysis of complex metabolic networks. *Biophys. J.*, 2008, 95, 1487–1499. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.124784>
76. Silverstein T. The mitochondrial phosphate-to-oxygen ratio is not an integer. *Biochem. Mol. Biol. Edu.*, 2005, 33, 416–417. <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.49403306416>
77. Mahmoudabadi G., Phillips R., Lynch M., Milo R. Defining the energetic costs of cellular structures. *bioRxiv*, 2019, 66040. <https://doi.org/10.1101/666040>
78. Du B., Zhang, Z., Grubner S., et al. Temperature-dependent estimation of Gibbs energies using an updated group-contribution method. *Biophys. J.*, 2018, 114, 2691–2702. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.030>
79. Mavrovouniotis M.L. Estimation of standard Gibbs energy changes of biotransformations. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 14440–14445. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98705-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98705-3)
80. Mavrovouniotis M.L. Group contributions for estimating standard Gibbs energies of formation of biochemical-compounds in aqueous-solution. *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 36, 1070–1082. <https://doi.org/10.1002/bit.260361013>
81. Alberty R.A. Calculation of standard transformed formation properties of biochemical reactants and standard apparent reduction potentials of half reactions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, 358, 25–39. <https://doi.org/10.1002/bit.260361013>
82. Bennett B.D., Kimball E.H., Gao M., et al. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.*, 2009, 5, 593–599. <https://doi.org/10.1038/nchembio.186>

## To the Question of Metabolic Cost of Main Metabolic Precursors in *Escherichia coli*

L. I. Golubeva<sup>a</sup>, E. S. Kovaleva<sup>a, #</sup>, and S. V. Mashko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Joint-Stock Company Ajinomoto-Genetika Research Institute (AGRI), Moscow, 117545 Russia

<sup>#</sup>e-mail: ekaterina\_kovaleva@agri.ru

**Abstract**—The term *metabolic cost* (MC) is often used for assessment of energy consumption in the biosynthesis of various substances under different growth conditions or by different cell types. MC of the metabolite is calculated according to a specified algorithm in universal units  $\sim P$ , multiples of ATP molecules hydrolyzed to ADP and inorganic phosphate. Our analysis of the published data showed that the interpretation of the MC concept and the algorithms for its calculation proposed by different authors, differ significantly. Since MC is often considered in connection with system-level tasks, such as the metabolic flux analysis and the mechanisms of natural selection, it seems appropriate to characterize this concept in detail. In this work, the term MC was clearly defined and used to calculate the energy consumption for the synthesis of 13 precursor metabolites of *Escherichia coli* biomass based on the modern model of the central metabolism of this bacterium. It was found that the MC, expressed in units of stored or hydrolyzed ATP molecules ( $\sim P$ ), depends on the characteristics of the metabolism of an individual organism, its culturing conditions, and the P/O ratio, which characterizes the number of ATP molecules formed during the transfer of one electron pair to one oxygen atom in oxidative phosphorylation.

**Keywords:** metabolic cost, biosynthetic complexity, metabolic precursors, phosphorylation potential, oxidative phosphorylation complexes, P/O ratio

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
 ПИ № ФС77-75946 от 13 июня 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,  
 информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

---

Подписано к печати 18.06.2022 г.	Формат 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>	Усл. печ. л. 15.16	Уч.-изд. л. 15.50
Тираж 180 экз.	Зак. 5298	Цена договорная	

---

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение  
 «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

---

Издатель: НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1  
 Изготовитель оригинал-макета ООО "ТЕМАТИЧЕСКАЯ РЕДАКЦИЯ",  
 125252, г. Москва, ул. Зорге, д. 19, этаж 3, помещ. VI, комн. 44  
 Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),  
 390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151