

УДК 577.121:51-76

Анализ метаболических потоков с использованием ^{13}C изотопов (^{13}C -MFA).

III. Значение для системной биологии и метаболической инженерии

© 2017 г. Л.И. ГОЛУБЕВА^{1,*}, М.С. ШУПЛЕЦОВ^{1,2}, С.В. МАШКО^{1,3}

¹ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», Москва 117545

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет вычислительной математики и кибернетики, Москва, 119991

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991

*e-mail: luba_golubeva@agri.ru

Поступила в редакцию 24.07.2016

Принята в печать 01.11.2016

^{13}C -MFA является на сегодняшний день основным методом количественного определения внутриклеточных потоков углерода *in vivo* в квазистационарных условиях. За более чем двадцатилетнюю историю этот метод нашел применение как в фундаментальных исследованиях метаболизма прокариотических и эукариотических организмов, так и в решении прикладных задач биотехнологии по улучшению свойств штаммов – продуцентов биологически активных веществ. В третьей заключительной части обзора, посвященного ^{13}C -MFA, представлены уже достигнутые результаты в исследовании бактериального метаболизма данным методом. Анализ модельных штаммов хорошо известных микроорганизмов позволил выявить пластичность метаболизма в целом за счет присутствия в нем альтернативных путей и помог определить физиологическую роль, а также обнаружить новые функции уже охарактеризованных сетей биохимических реакций. Кроме того, в своем современном исполнении ^{13}C -MFA может активно использоваться для фундаментальных исследований метаболизма малоизученных бактерий. В прикладных работах анализ потоков в клетках штаммов-продуцентов аминокислот, витаминов, антибиотиков позволил определить мишени для дальнейшей модификации, предложить нетривиальные подходы метаболической инженерии и, что не менее важно, подтвердить их эффективность. В заключение обсуждаются перспективы развития и использования ^{13}C -MFA, в том числе и для анализа динамики распределения метаболических потоков в ходе культивирования исследуемого организма.

Ключевые слова: активность метаболических путей; баланс NADPH; сопряжение потоков, холостые циклы.

doi: 10.1016/0234-2734-2758-2017-33-2-9-28

Список сокращений: ЦМ – центральный метаболизм; АС – ацетат; АСАЛД – ацетоальдегид; АССОА – ацетил-коэнзим А; АКГ – 2-оксоглутарат; СоА – коэнзим А; С2/С3 – двухуглеродный и трехуглеродный фрагменты, участвующие в энзиматических реакциях, осуществляемых трансальдозой и транскетолозой неокислительной ветки РР-пути согласно пинг-понговому механизму; СИТ – цитрат; ^{13}C -MFA (^{13}C -based Metabolic Flux Analysis) – анализ метаболических потоков в экспериментах с использованием субстратов, содержащих ^{13}C -изотопы углерода; Е4Р – эритрозо-4-фосфат, ED-путь (Entner-Doudoroff pathway) – метаболический путь Энтнера-Дудороффа; ЕМР-путь (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) – метаболический путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса; DHAP – дигидроксиацетонфосфат; ИСИТ – изоцитрат; F6P – фруктозо-6-фосфат; FDP – фруктозо-1,6-дифосфат; FUM – фумарат; G6P – глюкозо-6-фосфат; G3P – глицеральдегид-3-фосфат; GC-MS – газовая хроматография–масс-спектрометрия; GLC – глюкоза; GLX – глиоксилат; KDPG – 2-кето-3-дезоксифосфоглюконат; LC – жидкостная хроматография; LL-DAP – L,L-диаминопимелиновая кислота; MAL – малат; MS/MS – тандемная масс-спектрометрия; MTHF – метилтетрагидрофолат; NAD(H) – никотинамиддинуклеотид окисленный (восстановленный); *meso*-DAP – *мезо*-диаминопимелиновая кислота; ОАА – оксалоацетат; РР-путь (Pentose-Phosphate pathway) – пентозофосфатный путь; PRPP – 5-фосфорибозил-1-пирофосфат; PTS (Phosphoenolpyruvate-dependent phosphoTransferase System) – фосфоенолпируват-зависимая фосфотрансферазная система транспорта сахаров; Puv – пируват; P5P – общий пул фосфорилированных пентозахаров (R5P, Ru5P и Xu5P); PEP – фосфоенолпируват; 3PG – 3-фосфоглицерат; R5P – рибозо-5-фосфат; Ru5P – рибулозо-5-фосфат; S7P – седогептулозо-7-фосфат; SAKP – N-сукцинил- α -амино-оксопимелат; SDAP – сукцинил-диаминопимелиновая кислота; SUC – сукцинат; SUCCOА – сукцинил-коэнзим А; TCA (TriCarboxylic Acid cycle) – цикл трикарбоновых кислот; THDP – тетрагидродипиколинат; Xu5P – ксилулозо-5-фосфат. Аминокислоты обозначены согласно трехбуквенному коду. 6PG – глюконат-6-фосфат; 13DPG – 1,3-дифосфоглицерат.

Эта работа является третьей частью обзора, посвященного фундаментальным основам и достигнутым практически значимым результатам применения одного из самых современных методов системной биологии – флюксомики, а точнее, ее наиболее развитого в настоящее время направления – анализа метаболических потоков в экспериментах с использованием субстратов, содержащих ^{13}C изотопы углерода (^{13}C -MFA). В первой и второй частях обзора [1, 2], кратко изложены основы метода, включая построение упрощенной метаболической модели объекта исследований, математические и экспериментальные аспекты определения параметров потоков и их статистики. Третья часть коротко знакомит заинтересованных читателей с теми результатами, которые уже получены с применением ^{13}C -MFA, и их значением для фундаментальных областей биологии и практически значимой метаболической инженерии. Авторы, руководствуясь собственными профессиональными интересами, ограничили рассмотрение данной темы работами, проведенными в основном с бактериями, используемыми в современной промышленности, хотя эта методология активно применяется в самых различных областях исследований, в том числе и в отношении дрожжей [3], растений [4], млекопитающих [5] и других клеточных систем [6].

ВКЛАД ^{13}C -MFA В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Попробуем очень кратко суммировать реальный вклад, который уже внес ^{13}C -MFA в развитие фундаментальных исследований в области системной биологии микроорганизмов. В последнее десятилетие большое распространение получили исследования специфических особенностей метаболизма бактериальных штаммов с прецизионно введенными делециями отдельных биосинтетических или регуляторных генов. В случае *Escherichia coli* данные исследования часто проводят со штаммами из так называемой Keio-коллекции [7]. Целью этих исследований является выяснение специфической роли отдельных участков метаболической и регуляторной сети бактерий в ответ на специфические нарушения генома и внешние воздействия, а также изучение возможных компенсаторных реакций клеток в ходе адаптивной эволюции. Естественно, наибольший интерес привлекали мутанты по генам ферментов, катализирующих ключевые реакции, а также реакции в точках ветвления основных метаболических путей. Рассмотрим несколько частных примеров. Так, на-

пример, PTS⁻-мутанты не способны потреблять и фосфорилировать глюкозу за счет функционирования PTS, поэтому у таких мутантов активировались альтернативные, существенно менее изученные метаболические пути утилизации углеводного субстрата [8, 9]. Продукты генов *pgi* и *zwf* функционируют на стыке EMP- и PP-путей, а потому ясно было, что инактивация одного из этих генов приводит к безальтернативному распределению потока углерода в этой точке ветвления реакций катаболизма глюкозы; однако дальнейший характер перераспределения потоков был предсказуем в существенно меньшей степени [10, 11]. С помощью ^{13}C -MFA было показано, что после транспорта внутрь клетки *pgi*-мутанта глюкоза катаболизируется в основном через PP-путь, так как через ED-путь поток углерода был незначительным. В то же время, была выявлена значительная активация глиоксилатного цикла у *pgi*-мутанта с одновременным уменьшением потока углерода, проходящего через изоцитрат-дегидрогеназную реакцию. По мнению авторов, такое перераспределение потоков в нижней части метаболической карты связано с необходимостью компенсировать избыточный синтез NADPH, возникающий у *pgi*-мутанта и являющийся токсичным для клетки. Гены *pykA*, *pykF* обеспечивают пути к биосинтезу Pyc и ацетил-CoA, из которых образуются многие продукты ферментации; в связи с этим достаточно трудно было ожидать усиления потока углерода в PP-путь как одного из метаболических ответов на делецию этих генов, которое было обнаружено методом ^{13}C -MFA. [12, 13]. Примеры мутантов, представляющих интерес для изучения, не исчерпываются приведенными выше.

Наряду с большим числом мутантов по генам центрального метаболизма исследованиям были подвергнуты и мутанты по генам глобальной регуляции (см., например, [14, 15]). Интересными являются работы по анализу распределения метаболических потоков в ответ на изменение уровня экспрессии генов двухкомпонентных систем регуляции, в частности, системы кислородного дыхания *arcA-arcB*, в условиях снижения обеспеченности клеток кислородом (аэробный, микроаэробный, анаэробный рост) [16, 17]. Установление высокой степени пластичности и устойчивости бактериального метаболизма явилось результатом многочисленных исследований с использованием ^{13}C -MFA. Было показано, что адаптация к изменяющимся внешним воздействиям и к нарушениям функционирования метаболических генов обеспечивается за счет существования многочисленных «шунтов» и альтернативных путей в

сети реакций [18, 19]. Например, начальным ответом *E. coli* на инактивацию отдельных генов является индукция известных обходных реакций, которые обычно не проявляются в клетках дикого типа в стандартных условиях культивирования на глюкозе. Это, в частности, ED-путь или глиоксилатный шунт. Однако, если клеточный ответ наблюдается в течение многих генераций, то часто в ходе адаптивной эволюции на молекулярном уровне активированный латентный путь вновь репрессируется, а более выгодные альтернативные пути начинают функционировать за счет увеличения уровня экспрессии соответствующих генов, и в совокупности эти пути оказываются наиболее эффективными [18].

Данные, полученные методами ^{13}C -MFA, позволили переосмыслить значение некоторых реакций центрального метаболизма для физиологии микроорганизмов. Так, например, в дополнение к известной роли PP-пути как генератора метаболических предшественников (E4P, R5P) и редокс-эквивалентов (NADPH), реализуемой в большинстве организмов, оказалось, что этот путь может являться главным в катаболизме глюкозы у некоторых бактерий [20].

Именно ^{13}C -MFA позволил прояснить ранее неизвестное физиологическое различие функций мембраносвязанной (PntAB) и растворимой (UdhA) изоформ трансгидрогеназ *E. coli*, способных к потенциальному переносу электронов непосредственно с NADH на NADP^+ и обратно [19]. Действительно, используя анализ потоков в клетках сконструированных мутантов, удалось идентифицировать протонзависимую функцию PntAB как один из основных источников восстановления NADP^+ у *E. coli*. В то же время, возможное энергонезависимое окисление, катализируемое цитоплазматической UdhA, помогает клеткам избежать токсичности, связанной с избытком NADPH [10]. Отметим, что инактивация генов *pntAB* в клетках *E. coli* дикого типа в качестве адаптивного ответа приводит у мутанта к существенному перераспределению потока углерода из EMP-пути в окислительную ветку PP-пути, в которой возрастающий поток углерода служит исключительно для компенсаторного синтеза NADPH, при этом избыток углерода участвует в обратном превращении в интермедиаты EMP-пути (F6P и G3P) в реакциях неоксидативной ветви PP-пути (рис. 1; [19]).

Обнаружение «новых» реакций в клетках хорошо охарактеризованных с метаболической точки зрения организмов, осуществление которых в данных условиях ранее не предполагалось, отмечается как безусловный вклад ^{13}C -MFA в

развитие фундаментальных исследований. В применении к ^{13}C -MFA термин «новый», взятый в привычку, требует специального комментария. Ранее, обсуждая принципы анализа метаболических потоков, мы отмечали, что в основе будущих расчетов параметров потоков лежит предложенная самим исследователем метаболическая модель, в которой в явном виде представлены все допустимые биохимические реакции. Сам же по себе расчет должен определить параметры потоков этих реакций (значения скорости прямых и обратных реакций) и их статистически значимые доверительные интервалы. При этом определенный параметр близкий к «0» в пределах установленного доверительного интервала свидетельствует о том, что, по имеющимся экспериментальным данным, эта реакция не идет в данных условиях, хотя возможность ее прохождения и предполагалась использованной метаболической моделью. (рис. 2; [21]).

Таким образом, никаких «новых», т.е. непредусмотренных моделью реакций, ^{13}C -MFA не предлагает, он лишь находит оптимальное сочетание параметров потоков определенных изначально реакций, обеспечивающих наилучшее совпадение экспериментально полученных и рассчитанных *in silico* данных. Именно с учетом этого смысла «новизны» реакций необходимо рассматривать вклад ^{13}C -MFA в фундаментальные исследования.

Так, методом ^{13}C -MFA удалось подтвердить предположение об одновременном функционировании «прямых» и «обратных» реакций, катализируемых иногда различными ферментами. Это и группа реакций EMP-пути, протекающая совместно с глюконеогенезом, это и сопряжение терминальной части реакций EMP-пути, сопровождающейся синтезом PEP и PYR, с циклом трикарбоновых кислот (PEP-PYR-ОАА-узел). Такие взаимодействия реализуются для противодействия изменению внешних условий за счет энергии гидролиза АТФ [23]. Показано, что при низких концентрациях глюкозы окисление этого углевода и анаэробозис осуществляются клетками *E. coli* через PEP-глиоксилатный путь, а не через PEP-карбоксилазную реакцию, как происходит при избытке глюкозы в среде [24] (рис. 3). Баланс кофакторов (АТФ, NADH, NADPH), подведенный с использованием данных о распределении потоков углерода у различных бактерий, позволил выявить «скрытые» пути их синтеза и балансирования в микробном метаболизме [25].

Существует представление, что ^{13}C -MFA вносит существенный вклад в фундаментальные исследования лишь наиболее изученных с

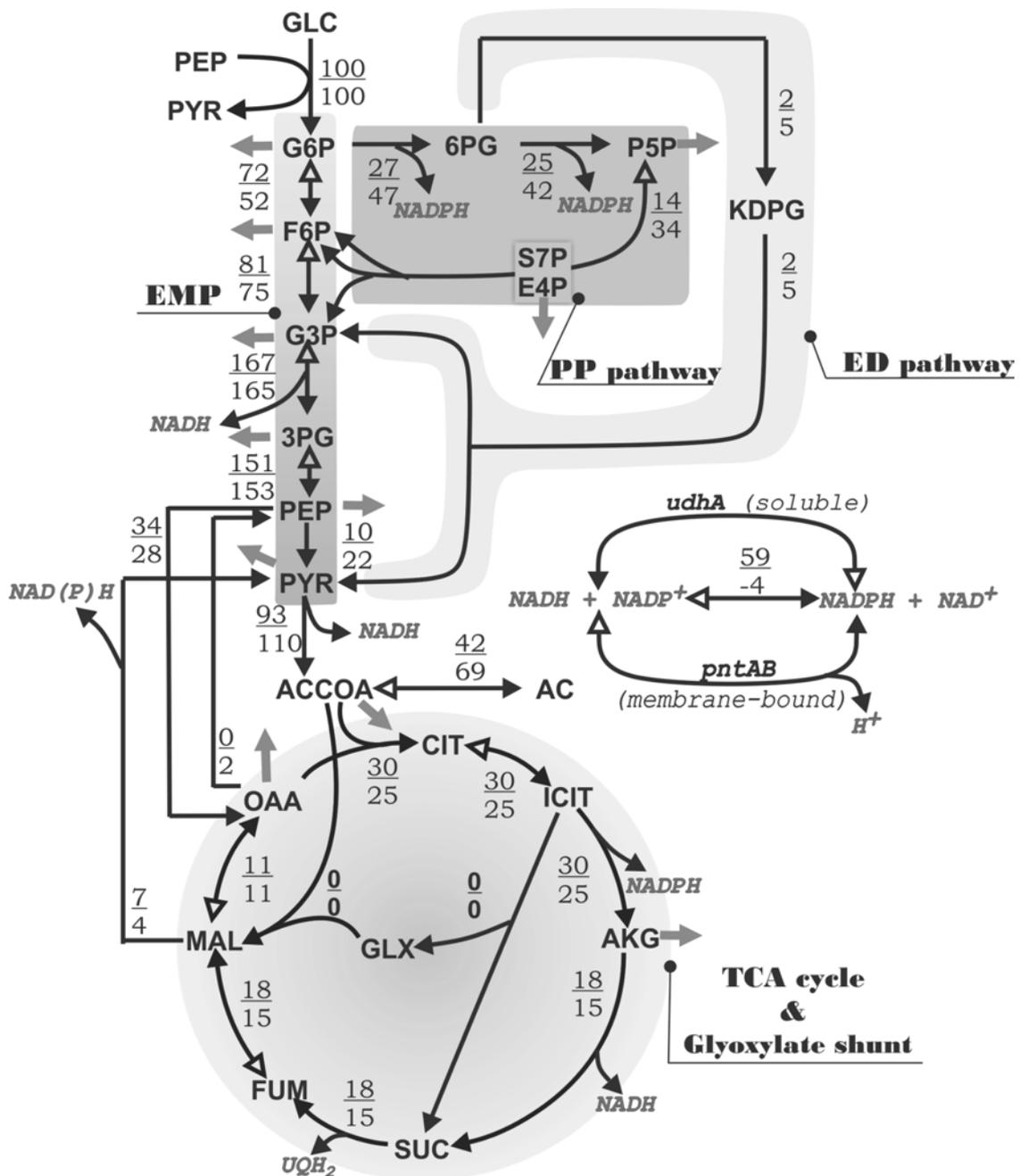


Рис. 1. Результаты ¹³C-MFA в центральном метаболизме клеток *E. coli* дикого типа и мутанта по трансгидрогеназам Δ (*udhA-pntAB*). Клетки культивировались в аэробных условиях на минимальной среде с глюкозой в качестве источника углерода. Цифры над чертой – величины потоков для клеток дикого типа, цифры под чертой – для мутанта по трансгидрогеназам Δ (*udhA-pntAB*). Результаты нормированы на скорость потребления глюкозы клетками дикого типа и мутанта, принятой за 100%. Обратимые реакции обозначены двунаправленными стрелками; указанное для них численное значение соответствует модулю разницы между величиной прямого и обратного потоков, при этом за направление потока вещества (стрелка с закрашенным наконечником) выбрано направление большей по модулю из двух разнонаправленных реакций согласно величинам для штамма дикого типа. Затраты на синтез биомассы учитывались авторами как отток интермедиатов ЦМ (серые стрелки)

Fig. 1. ¹³C-MFA results in *E. coli* wt strain (top numbers) and its Δ (*udhA-pntAB*) derivative (bottom numbers) grown aerobically on minimal media with glucose as a carbon source [19]. The flux values are normalized to the mean value of measured specific glucose uptake rate for each strain, which was equal to 100%. The reversible reactions are represented by bidirectional arrows. The flux values for these reactions are equal to the module of the difference between the forward and reverse reactions. The direction of the net flux of the reversible reactions corresponds to painted end of a bidirectional arrow, and it is selected as a direction of a greater module value of two bidirectional reactions. Biomass formation is accounted through the drain of corresponding central metabolism precursors (gray arrows)

метаболической точки зрения организмов, таких как *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae* и др. И действительно, именно для этих объектов анализ метаболических потоков проводится наиболее часто, особенно с позиций системной метаболической инженерии при создании высокоэффективных штаммов-продуцентов биологически активных соединений (см., например, [26–28]). В то же время, по мере развития и совершенствования метода, а также повышения статистической надежности определения параметров потоков в предложенной исследователями метаболической модели стали появляться публикации, в которых авторы используют метод ^{13}C -MFA для исследования организмов с существенно менее изученным метаболизмом [29, 30].

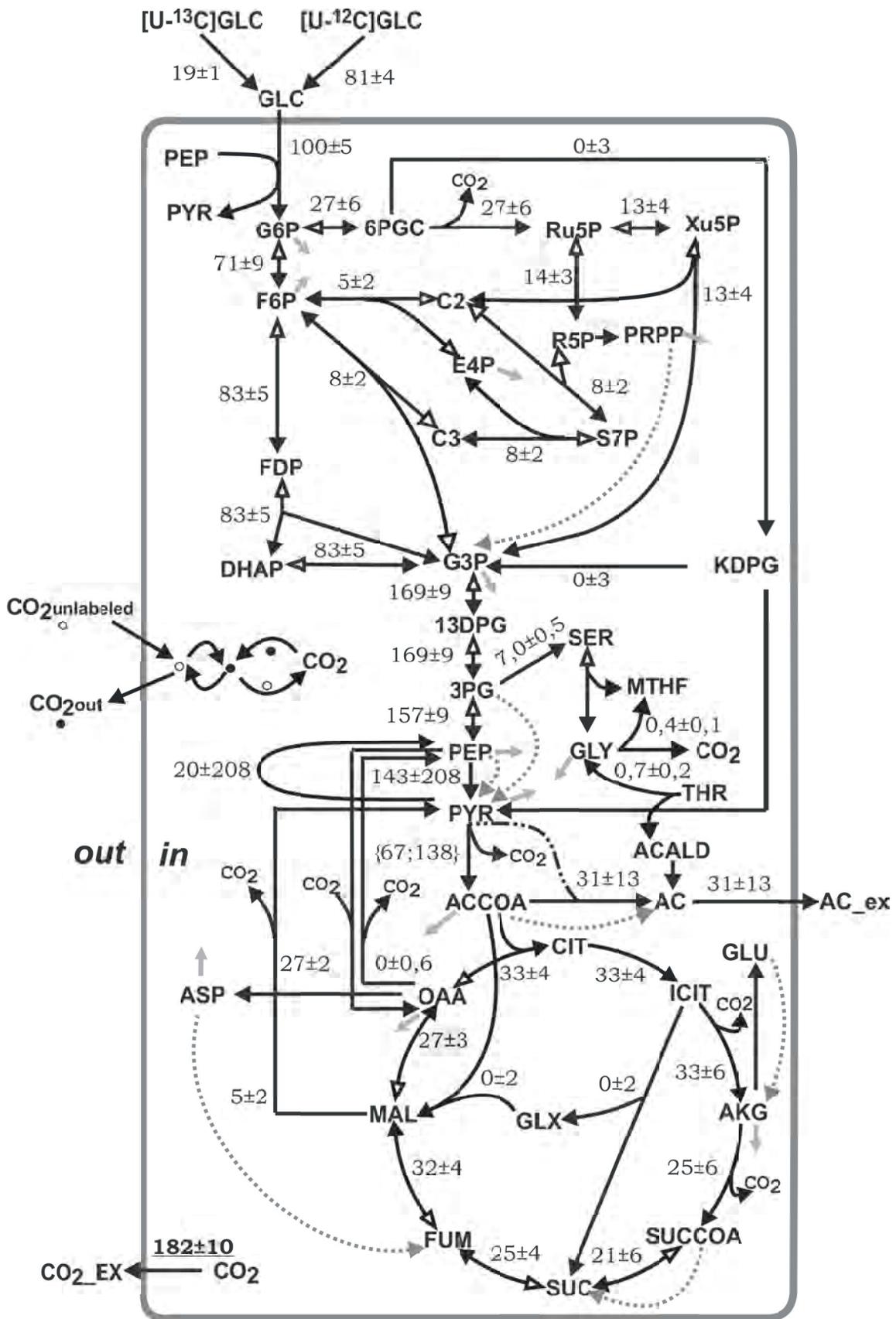
Так, в частности, анализ потоков, проведенный для модельного штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и 17 его клинических изолятов показал, что все исследованные микроорганизмы катаболизируют глюкозу через ED-путь с последующим респираторным метаболизмом без сбрасывания ацетата. Этот путь обеспечивает клеткам образование большего количества NADPH, чем нужно для анаболических целей, что является определенным преимуществом клинических изолятов при противодействии оксидативному стрессу. Следствием избыточного образования NADPH в ED-пути являлось то, что PP-путь, а точнее его неоксидативная ветвь, использовалась псевдомонадами для удовлетворения потребностей в биосинтетических предшественниках (E4P, R5P). В то время, как гликолитическая часть метаболизма штаммов псевдомонад демонстрировала высокий уровень консерватизма, потоки через пируват, цикл трикарбоновых кислот и глиоксилатный шунт очень сильно варьировали у различных штаммов, являясь, по-видимому, следствием адаптивного ответа микроорганизмов в процессе развития инфекции [30].

Именно с помощью ^{13}C -MFA был показан преимущественный катаболизм глюкозы через ED-путь у клеток растительного патогена *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). Этот микроорганизм является продуцентом промышленно важного полисахарида – ксантановой камеди (xanthan gum), используемой в различных областях, в частности, в пищевой промышленности в качестве загустителя и в косметологии для увлажнения кожи. Этот факт метаболизма для данного организма был ранее неизвестен и был выявлен в результате анализа потоков при использовании упрощенной метаболической модели, в

которой, в частности, учитывались три возможных гликолитических пути катаболизма глюкозы (ED, EMP и PP), предусмотренные на основании известной последовательности генома Xcc [31].

^{13}C -MFA используют даже для проверки гипотез о наличии или отсутствии тех или иных специфических путей в центральном метаболизме малоизвестных организмов. В этом смысле показательны две недавние работы группы проф. М. Антоневич (M. Antoniewicz). В одной из них [32] авторы применяли ^{13}C -MFA для изучения штамма *Thermus thermophilus* HB8 – микроорганизма с хорошо установленной пространственной структурой большой группы клеточных ферментов, но со слабо изученным метаболизмом. Метаболическая модель, предложенная авторами на основе аннотации генома и реконструкции потенциальных биохимических реакций по наличию гомологов известных ферментов других организмов, содержала, помимо ожидаемых реакций катаболизма глюкозы, те типичные метаболические реакции, например, ED-пути, оксидативной ветки PP-пути, для которых в геноме хозяина не были обнаружены гомологи соответствующих ферментов. Именно результаты ^{13}C -MFA позволили однозначно доказать реальное отсутствие у данного организма катализаторов этих реакций: определенные величины соответствующих потоков статистически не отличались от нулевых. В то же время, было показано, что метаболические предшественники биомассы, E4P и R5P, синтезируются в результате реакций неоксидативной ветки PP-пути. Было также показано, что величины потоков реакций глиоксилатного шунта, а именно, превращений MAL→PYR и OAA→PEP, гомологи которых были найдены в геноме *T. thermophilus* HB8, статистически не превышают нулевых значений в исследованных экспериментально условиях. Это свидетельствует о неактивности данных биохимических превращений в условиях эксперимента. [32].

Исследования вышеупомянутой лаборатории были также посвящены ^{13}C -MFA метаболических потоков в клетках *Clostridium acetobutylicum* [33]. Были проведены серии экспериментов с использованием различных меченых субстратов (parallel labeling experiment, PLE) и последующим решением задачи регрессионного анализа для единой метаболической модели. Само формирование метаболической модели в этой работе представляло собой последовательное введение новых модификаций (дополнительных метаболических реакций), которые минимизировали различие в экспериментально определенных и рассчитанных из предложенной модели значений взвешенных остат-



ков в оптимизируемой SSR-функции (см. [2]). После нахождения оптимальной модели методом проб и ошибок модель минимизировали путем удаления из нее реакций с нулевыми значениями потоков.

Выводы работы оказались довольно неожиданными. Вопреки существовавшим ранее гипотезам о метаболизме *C. acetobutylicum* авторы обнаружили, что в то время, как реакции цикла трикарбоновых кислот протекают в «оксидативном направлении», не удается обнаружить значимого потока между α -кетоглутаратом и сукцинил-СоА или между сукцинатом и фумаратом, а также, что конверсия сукцинил-СоА в сукцинат происходит вне цикла Кребса [33]. Было также показано, что отсутствует значимый поток между малатом и оксалоацетатом и существует пируват-фумаратное превращение, которое осуществляется через аспартат. В итоге был идентифицирован ген предполагаемой цитратмалатсинтетазы, возможно, катализирующей первую стадию биосинтеза изолейцина у *C. acetobutylicum*. Но самое главное, работа [33] прекрасно иллюстрировала огромные возможности современного ^{13}C -MFA – анализ экспериментальных данных параллельных экспериментов с различными мечеными субстратами позволяет не только окончательно подтвердить

адекватность предлагаемых метаболических моделей, но и сам способен инициировать процесс модификации моделей с целью дальнейшей проверки новых вариантов в ^{13}C -MFA и в независимых биохимических исследованиях.

Исследования метаболических потоков, как правило, проводят или в условиях избытка субстрата (при периодическом культивировании), или в условиях лимитирования по субстрату (хеостат). По-видимому, клеточный ответ на эти условия различен. Так, например, удивительную стабильность профиля метаболических потоков (т.е. относительно небольшие изменения их параметров) зарегистрировали при культивировании в хеостате у 24 различных одиночных «knockout-мутантов» по различным генам центрального метаболизма *E. coli* [14]. Напротив, значительно более заметные изменения профиля потоков наблюдали у тех же штаммов, растущих в условиях периодического культивирования [34]. Существенная зависимость параметров потоков у штамма от условий его культивирования и скорости роста значительно усложняет выявление прямого влияния мутации и условий окружения на эффективность тех или иных метаболических потоков [18]. Однако эксперименты по определению метаболиче-

←

Рис. 2. Результат ^{13}C -MFA в центральном метаболизме *E. coli* MG1655, аэробно растущих на минимальной среде с глюкозой, рассчитанный с использованием [20%- ^{13}U]/[80%- ^{12}U]-glucose OpenFLUX2 [21]. Цифры на рисунке – скорость потоков в процентах от специфической скорости поглощения глюкозы, принятой за 100%. За оптимальное распределение потоков углерода взяты значения, обеспечивающие минимальную разницу между экспериментально измеренными и рассчитанными из предложенной метаболической модели распределениями тяжелых атомов углерода в протеиногенных аминокислотах. Для оценки точности определения потоков использована величина, рассчитанная как длина 95%-ного доверительного интервала, деленная на четыре [22]. Доверительные интервалы рассчитывали с помощью метода Монте-Карло с последующим отбрасыванием части максимальных и минимальных оценок (discarding method) [21]. Для потока через пируватдегидрогеназу могут быть рассчитаны только нижняя и верхняя границы (указаны с учетом 68%-ного доверительного интервала), которые зависят от того, каким путем синтезируется ацетат в клетках – Pta-Ack-зависимым или Pox-зависимым. Использованная для расчетов метаболическая модель помимо основных путей ЦМ включает большинство особенностей, необходимость учета которых была показана при анализе метаболизма разными исследовательскими группами: пинг-понговый механизм работы ферментов неокислительной ветки PP-пути; обмен CO_2 с внешней средой; моделирование отдельного потока для каждого типа «меченности» субстрата; наличие биосинтетических реакций, сопряженных с реакциями ЦМ (пунктирные стрелки). При описании синтеза биомассы образование белка и нуклеиновых кислот представлено через их структурные блоки (аминокислоты, нуклеозиды). Серые стрелки – отток предшественников на синтез биомассы

Fig. 2. Carbon flux distribution in MG1655 strain estimated by the authors from the labeling experiment with [20%- ^{13}U]/[80%- ^{12}U]-glucose OpenFLUX2 [21] software. The cells were grown on a minimal medium with glucose. The flux values were normalized to the glucose uptake rate that was equaled to 100%. The flux values corresponding to the minimal deviation between experimentally measured and simulated mass isotopomer distributions of the proteinogenic amino acids were taken to estimate the intracellular flux distribution. One-fourth of the 95% confidential interval value was used to characterize the precision of the calculated flux parameters [22]. The confidential intervals were determined using the “discarding” strategy of the Monte-Carlo-based approach [21]. For pyruvate dehydrogenase reaction, only upper and lower boundaries of the possible flux values could be calculated (the represented values account for 68% confidence interval) depending on the occurrence of one of two possible but not distinguished pathways of the acetate synthesis, Pta-Ack or Pox. The metabolic map consists of the main central metabolic pathways and accounts for the following important features: ping-pong kinetic mechanism of transaldolase and transketolase reactions; carbon exchange with atmosphere carbon dioxide; separate flux for each label used in experiment; and coupling of biomass synthesis reaction with the central metabolism (dotted arrows). In summarized biomass synthesis equation drain to protein (gray arrows), RNA and DNA synthesis were accounted through the corresponding building blocks (amino acids and nucleosides)

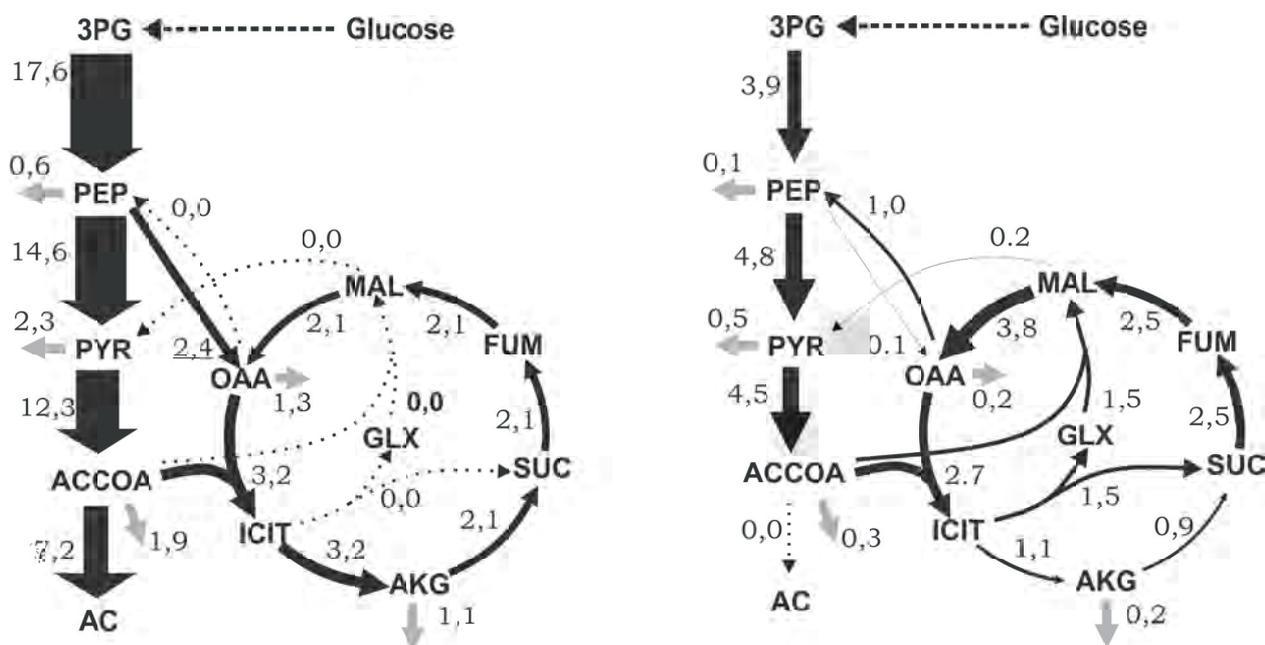


Рис. 3. Распределение потоков в клетках штамма *E. coli* дикого типа MG1655, аэробно растущих на минимальной среде в условиях избытка глюкозы (слева) и лимита по глюкозе (справа) по результатам ^{13}C -MFA [24]. Удельная скорость потребления клетками глюкозы составляла $11,3 \pm 0,2$ и $2,3 \pm 0,1$ ммоль/(г сухой биомассы·ч), соответственно. Представлена только та часть использованной в работе метаболической модели, в которой перераспределение потоков было наиболее значимо, а именно: ЦТК, глиоксилатный шунт, реакции карбоксилирования PEP и декарбоксилирования PYR и реакция малик-энзима. Цифры – рассчитанные значения потоков в абсолютных величинах (ммоль/(г сухой биомассы·ч))

Fig. 3. ^{13}C -MFA results of a carbon flux distribution in *E. coli* MG1655 strain grown on minimal media under the glucose excess batch (left) and glucose-limited chemostat (right) cultivation conditions [24]. Specific glucose uptake rates were $11,3 \pm 0,2$ and $2,3 \pm 0,1$ mmol $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectively. A part of the central metabolism including TCA, glyoxylate shunt, PEP-carboxylase, PEP-carboxykinase and malic enzyme reactions is represented. The calculated fluxes are represented as absolute values (mmol $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$)

ских потоков у генетически модифицированных штаммов с использованием ^{13}C -MFA остаются самой прямой экспериментальной оценкой метаболического состояния исследуемого организма на сегодняшний день. Необходимо отметить, постоянно увеличивающуюся точность ^{13}C -MFA [22] и возможность проведения физиологической части экспериментов на миниатюризованном оборудовании, которая обеспечивает высокую воспроизводимость результатов [35, 36]. Такие эксперименты становятся доступными все более широкому кругу научных лабораторий.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ^{13}C -MFA В ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Перспективы количественного определения параметров потоков для исследований по созданию практически значимых продуцентов биологически активных веществ были отчетливо понятны с самого начала развития методологии ^{13}C -MFA. Однако, на сегодняшний день число работ, в которых ^{13}C -MFA сыграл бы ключевую

роль в планировании и проведении направленного конструирования и/или усовершенствования штамма-продуцента, остается относительно небольшим. Причиной этого, по мнению авторов [37], «как минимум является тот факт, что многие компании утратили или просто не имеют той высокопрофессиональной команды экспериментаторов и компьютерных специалистов, которая необходима для начала и эффективного проведения ^{13}C -MFA в полном объеме. А возможно, и это не менее важно, что осознание истинной сложности проведения таких исследований в совокупности с небольшим числом имеющихся на сегодняшний день успешных примеров использования полученных результатов другими исследователями не мотивирует большое число лабораторий к инициации этого анализа».

Тем не менее, использование ^{13}C -MFA в прикладных исследованиях неуклонно растет. Основная его задача – это выявление «узких мест» в метаболизме реального продуцента, «дисбаланса биосинтетических кофакторов» и дефицита энергии, а также обнаружение признаков участия

организма в ответе на стрессовые факторы [28]. Успешное решение поставленной задачи, в свою очередь, позволяет разрабатывать стратегии преодоления негативных факторов для улучшения свойств имеющихся продуцентов (см., например, [38, 39]).

Если учесть, что в 90-х годах XX века крупнотоннажное микробиологическое производство аминокислот и ферментов базировалось на продуцентах, созданных по большей части на основе коринобактерий и бацилл, неудивительно, что именно эти микроорганизмы явились стратегическим плацдармом для разработки методов ^{13}C -MFA. Сейчас остается только гадать, почему существенного развития не получили в то время работы по анализу потоков в клетках актиномицетов – главных производителей антибиотиков, основного продукта микробиологической промышленности. Это тем более удивительно, что на заре исследований по флюксомике в Великобритании уже проявлялся интерес к соответствующей методологии [40] и существовали мощные группы, изучающие продуценты антибиотиков на основе актиномицетов и использующие серьезные бизнес-контакты с фармацевтическими компаниями, производящими эти соединения. Однако представителей этой страны не оказалось в списке мировых лидеров, внесших решающий вклад в становление и развитие ^{13}C -MFA как одного из ведущих современных методов системной биологии. Этот список возглавили представители Германии и Швейцарии и во многом благодаря серьезной финансовой поддержке германского биотехнологического бизнеса [41–43]. В дальнейшем к этой работе активно подключились исследовательские группы из США [44–46] и Японии [47, 48], а позже и из других развитых стран [49, 50].

Справедливости ради надо отметить, что именно американские ученые стояли у истоков флюксомики и внесли большой вклад в развитие математического аппарата, использованного в дальнейшем и в ^{13}C -MFA [51–54]. Так или иначе, работы (по крайней мере, открытые научные публикации) по использованию метода ^{13}C -MFA для исследования метаболизма актиномицетов, продуцирующих антибиотики, стали появляться позже [55, 56], по мере становления этого подхода, развитаго и апробированного на других объектах.

Первые работы по определению метаболитических потоков коринобактерий – продуцентов аминокислот [41, 57, 58], не потерявшие своей актуальности и научно-практической значимости и в настоящее время, появились раньше, чем первые открытые публикации о секвенированном

геноме *Corynebacterium glutamicum* [59] и последующей реконструкции полноразмерной метаболитической карты этого организма [60]. С тех пор ^{13}C -MFA активно используется для определения параметров потоков в клетках штаммов различных организмов, создаваемых методами системной метаболитической инженерии и продуцирующих аминокислоты (лизин [35, 39, 41, 61, 62], глутамат [63, 64], фенилаланин [65], метионин [66], валин [67]), 1,3-пропандиол [68], этанол [69, 70], этилацетат [71], глицерин [72], жирные [38] и органические (сукцинат) [73] кислоты, витамины (рибофлавин [74], кератины [75]), антибиотики (пенициллин-G [76, 77], нистатин [78], тобрамицин [79], актинохордин [55, 80], ундецилпродигоизин [80]), а также рекомбинантные белки [81, 82].

В обзоре мы отметим лишь те прикладные работы, в которых использование ^{13}C -MFA позволило достичь следующих целей: 1) получить важнейшую информацию об объекте исследования, способствующую разработке стратегии дальнейшего улучшения свойств продуцента; 2) идентифицировать потоки побочных продуктов, которые снижают накопление желаемого продукта биосинтеза; 3) обнаружить метаболитические «узкие места» (bottlenecks), которые лимитируют общую скорость образования целевого продукта.

^{13}C -MFA для совершенствования продуцентов аминокислот

Как уже отмечалось, бактериальные продуценты аминокислот, создаваемые методами метаболитической инженерии сначала на основе штаммов коринобактерий [83], которые остаются незаменимой «рабочей лошадкой» и по настоящее время [39, 84], а впоследствии и на основе *E. coli* [85, 86], являются традиционными объектами ^{13}C -MFA [27, 87]. Практически значимые результаты по улучшению продуцентов, достигнутые на основе применения флюксомных методов анализа метаболизма, убеждают в том, что и некоторые другие искусственно созданные микроорганизмы – продуценты аминокислот в ближайшее время также станут объектами исследований с помощью ^{13}C -MFA [88, 89].

Учет баланса NADPH, проведенный с помощью ^{13}C -MFA при биосинтезе валина (Val), позволил рекомендовать введение протон-зависимой мембраносвязанной PntAB-системы генерации NADPH *E. coli* в штамм *C. glutamicum* с инактивированной пируватдегидрогеназной системой (PDHC⁻). В результате дефицит образования NADPH при суперпродукции Val компенсировал-

ся за счет активности гетерологичной трансгидрогеназы вместо наблюдавшегося ранее усиления потока в оксидативную ветвь PP-пути. Такая модификация генома продуцента позволила существенно увеличить выход Val путем экономии углерода, ранее «улетавшего» в виде CO₂ в результате реакций оксидативной ветви PP-пути [67].

Хорошо известно, что анаплерозис в клетках *Corynebacterium glutamicum* может осуществляться как в результате работы PEP-карбоксилазы в реакции PEP + CO₂ → OAA, так и при реакции PYR + CO₂ + ATP → ADP + OAA, катализируемой PYR-карбоксилазой [60]. В то же время, работа двух этих ферментов подвержена метаболической регуляции. С помощью ¹³C-MFA было показано, что синтез Glu у *C. glutamicum*, индуцированный истощением среды по биотину или добавлением определенных детергентов или антибиотиков, сопровождается усилением потока углерода через пируваткарбоксилазную реакцию, в то время как поток углерода через фосфоенолпируваткарбоксилазную реакцию остается конstitutивным как на стадии роста, так и на стадии продукции глутамата [64]. Таким образом, количественный ¹³C-MFA в стадии высокоэффективной продукции глутамата показал, какая реакция в анаплерозисе должна активно контролироваться, и позволил разработать стратегию соответствующей генетической модификации хромосомы штамма-продуцента.

Целая серия очень нетривиальных работ по анализу потоков способствовала совершенствованию штаммов коринебактерий – продуцентов лизина. Так ¹³C-MFA позволил установить, что в условиях культивирования продуцента лизина на глюкозе большая доля углерода сжигается с выделением ATP в холостом цикле PEP → PYR → OAA → PEP [90]. Разрыв этого цикла за счет инактивации гена, кодирующего PEP-карбоксикиназу, позволил значительно повысить выход Lys [91].

Именно методом ¹³C-MFA было показано, что даже незначительное усиление экспрессии гена *fbp* у *C. glutamicum* может существенно увеличить поток углерода в оксидативную ветвь PP-пути и в конечном итоге привести к увеличению выхода Lys за счет возрастания уровня синтеза NADPH – необходимого кофактора для биосинтеза целевой аминокислоты [86, 92].

Блестящей иллюстрацией поэтапного проведения ¹³C-MFA с разработкой стратегии последующей генетической модификации и созданием нового штамма-продуцента Lys, который в свою очередь подвергается новому анализу и модификации, является работа Becker с соавт. [39]. Серия таких циклов позволила существенно перераспределить поток углерода в ЦМ бактерии, приблизив его к «идеальному», предсказанному для продуцента лизина методом FBA¹. Показательно, что, как отмечают сами авторы, шесть стадий направленных модификаций привели к созданию штамма, практически не уступающего по продуктивности лизина варианту, отобранному в течение более, чем 50 лет, традиционными методами, включающими и генетическую селекцию, и генно-инженерные модификации.

Значительное увеличение продуктивности лизина было достигнуто в результате слияния потоков, участвующих в биосинтезе целевой аминокислоты, и редуцированного цикла Кребса, нарушенного путем направленной инактивации генов сукцинил-CoA-синтетазы (*ΔsucCD*) [93]. В этом случае сукцинил-CoA-синтетазная ветвь биосинтетического пути лизина, возможно, являлась мостом для превращения сукцинил-CoA в сукцинат, обеспечивающим функционирование TCA в условиях аэробного роста бактерий (рис. 4). Мутант *ΔsucCD* демонстрировал 60%-ное увеличение выхода лизина по сравнению с достаточно эффективным продуцентом, взятым в качестве исходного штамма. Факт действительного слияния биосинтетического пути лизина с дефектным TCA был убедительно подтвержден методом ¹³C-MFA [93].

Еще одна успешная попытка увеличения продукции лизина искусственно созданным штаммом на основе коринебактерий с использованием ¹³C-MFA была описана Bommareddy [94]. Путем замены нативной глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) с кофакторной специфичностью к NAD на фермент с двойной (NAD⁺/NADP⁺)-специфичностью был создан новый метаболический путь образования NADPH в клетках *C. glutamicum*, способных к суперпродукции лизина. Решение этой задачи позволило рассчитывать на синтез дополнительного количества NADPH в результате катаболизма глюкозы через EMP-путь гликолиза.

¹ FBA – это теоретический анализ параметров внутриклеточных метаболических потоков, входящих в стехиометрическую модель исследуемого организма, основанный на решении задачи линейного программирования при поиске экстремума некой заданной исследователем целевой функции, линейной в отношении потоков.

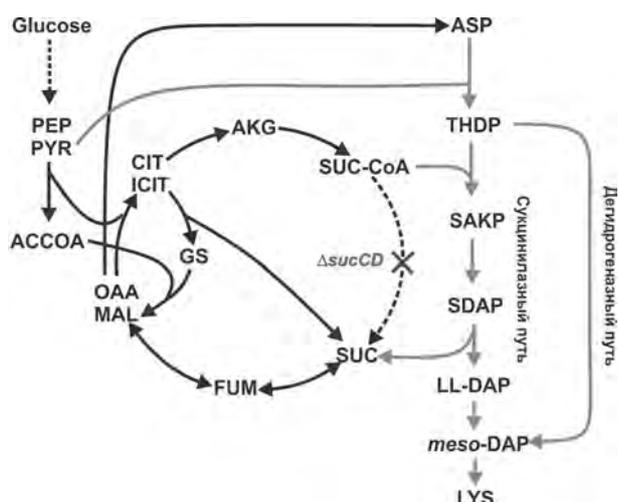


Рис. 4. Новая стратегия метаболической инженерии, использованная для увеличения продукции лизина клетками *C. glutamicum*: сопряжение редуцированного цикла ТСА с сукцинилазной ветвью биосинтеза лизина, способной заместить реакцию SUC-CoA-синтазы (SucCD)

Fig. 4. A new metabolic engineering strategy to increase the lysine production by *C. glutamicum* cells: coupling of TCA cycle with the succinylase pathway of lysine synthesis that is capable of substituting for the reaction of SUC-CoA-synthase (SucCD)

Ген мутантного фермента был введен в клетки продуцента лизина, после чего наблюдалось существенное увеличение накопления целевой аминокислоты. Методом ¹³C-MFA было показано, что, хотя поток углерода в направлении биосинтеза лизина был существенно выше у нового мутантного штамма, распределение потоков в узловой точке, соответствующей G6P, было практически одинаковым для нового и исходного штаммов, что указывало на неспособность PP-пути служить источником дополнительного NADPH для увеличенной продукции лизина. Как и ожидалось, поток в цикле трикарбоновых кислот у мутантного штамма был уменьшен на 10%, а сниженный расход углерода перераспределялся на увеличение потока в сторону образования лизина и уменьшение суммарного потока ($v_{net} = |v^{\rightarrow} - v^{\leftarrow}|$) анаплерозиса.

Уменьшение потоков в ТСА и в пути С₄-декарбоксилирования исключало возможное участие NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназы и малик-энзима в биосинтезе дополнительных количеств NADPH для суперпродукции лизина. Поскольку другие пути образования NADPH в клетках коринебактерий не описаны, представленные данные явились безусловным доказательством того, что увеличение продукции лизина обусловлено появлением дополнительных

количеств NADPH в результате работы мутантной GAPDH.

Переключение на *E. coli* в качестве основного объекта для создания продуцентов аминокислот, произошедшее в конце XX века, было обусловлено такими свойствами этого микроорганизма, как высокая скорость роста, доступность тщательно разработанного генетического инструментария для манипуляций непосредственно с бактериальной хромосомой, а также, безусловно, высокая степень изученности у него механизмов генетической и метаболической регуляции.

Именно на продуценте лизина, созданного на основе *E. coli*, Иватани (S. Iwatani) и группа соавторов под общим руководством проф. Шимизу (K. Shimizu) реализовали новый подход в ¹³C-MFA, при котором анализ распределения изотопомеров осуществляется с помощью LC-MS/MS не для белкового гидролизата, а для свободных аминокислот [95]. Поскольку квазистационарное состояние для свободных внутриклеточных метаболитов устанавливается относительно быстро, то можно анализировать достигнутое стационарное распределение тяжелых изотопов в свободных аминокислотах уже через несколько часов после импульсного добавления меченого субстрата (т.е., например, в разных фазах одной периодической ферментации с подпиткой (fed-batch fermentation)). Вслед за группой проф. Виттманна (Wittmann) [96], работавшей с GC-MS-техникой для анализа изотопомеров свободных аминокислот в клетках коринебактериального продуцента лизина, Iwatani с соавт., используя импульсное добавление меченого субстрата на разных стадиях ферментации, провели ¹³C-MFA в стационарном приближении для логарифмически растущей и вступившей в стационарную фазу культуры *E. coli* при fed-batch-выращивании. Авторы убедительно показали наблюдавшееся переключение метаболических потоков. Так, в частности, при переходе клеток в стационарное состояние было замечено значительное усиление интенсивности PEP-глиоксилатного потока за счет ослабления характерного для логарифмически растущей культуры анаплеротического превращения (PEP/PYR) + CO₂ + (-/ATP) → OAA + (-/ADP). Помимо этого, анализ позволил наметить путь дальнейшего улучшения свойств продуцента в результате еще большего увеличения продукции NADPH мембраносвязанной PntAB трансгидрогеназой [95].

Wahl и соавт. [65] провели серию последовательных экспериментов с меченым субстратом, отражающих реальную промышленную фермен-

тацию в 300-литровом аппарате продуцента фенилаланина на основе *E. coli*. Было показано, что, по-видимому, большой поток от PEP к PYR является причиной снижения выхода целевого продукта, поскольку PEP является прямым предшественником фенилаланина. На основе полученных данных и известных кинетических свойств ферментов, вовлеченных в метаболизм PEP, было высказано довольно очевидное предположение о том, что мишенью для дальнейшей оптимизации штамма-продуцента должна служить PEP-синтаза, позволяющая осуществлять обратное преобразование PYR в PEP [97].

13С-MFA и метаболизм продуцентов витаминов, антибиотиков и других биологически активных соединений

Метаболизм продуцентов этих практически важных соединений также исследовался путем анализа потоков. Во многих случаях первым логическим шагом на пути увеличения синтеза целевого соединения является устранение накопления сопутствующих побочных продуктов (by-products). Например, такие хорошо известные метаболические пути, как синтез этанола в клетках дрожжей, синтез ацетата в *E. coli* и молочной кислоты в клетках млекопитающих могут значительно ограничивать высокоэффективную продукцию целевых соединений соответствующими организмами. Часто необходимо приложить значительные усилия, чтобы уменьшить синтез копродуктов методами метаболической инженерии штаммов и/или путем оптимизации процесса [37]. Так, ¹³C-MFA позволил зарегистрировать заметное изменение параметров потоков в ответ на накопление октановой (C₈) кислоты в культуре клеток *E. coli* [98]. Было показано снижение потока в цикле трикарбоновых кислот при образовании CO₂ в реакции, катализируемой пируватдегидрогеназой. В то же время, активность таких метаболических путей, как окисление пирувата и образование внеклеточного ацетата, возросла. Основываясь на этих результатах, была предложена рабочая гипотеза, объясняющая наблюдаемое перераспределение потока углерода в ответ на C₈-зависимый стресс. Было предположено, что основными негативными факторами указанного стресса являлись нарушение структуры мембраны, низкая активность электрон-транспортной цепи и активация негативного регулятора пируватдегидрогеназы (PdhR). Эта гипотеза послужила основой для разработки стратегии оп-

тимизации условий культивирования и дальнейшей генетической модификации штамма, реализация которой позволила повысить выход и накопление целевого соединения [98].

Изучая метаболический статус продуцирующих витамины клеток *Bacillus subtilis* методом ¹³C-MFA, Замбони (Zamboni) и соавт. [74] исследовали изменения потоков, происходящие в непрерывно растущей культуре при переключении продукции рибофлавина (витамина B2) с высокого уровня на низкий. Было показано, что в условиях высокой продуктивности по рибофлавину его пентозный предшественник синтезируется исключительно в реакциях неоксидативной ветки PP-пути. Это был довольно неожиданный результат, поскольку три молекулы пентозы требовались для образования одной молекулы рибофлавина, а потому считалось, что только высокоэффективный поток через оксидативную ветку PP-пути может обеспечить накопление целевого продукта. Однако перенаправление потока углерода в оксидативную ветвь сопровождалось значительным снижением скорости синтеза рибофлавина. Анализ требуемых для обеспечения синтеза витамина количеств АТФ и NADPH позволил авторам сделать выводы о возможной суперпродукции токсичных количеств NADPH при активации оксидативной ветки и достаточном для синтеза рибофлавина количестве кофакторов, поступающих только от неоксидативной ветви PP-пути. На этом основании были сделаны практические рекомендации по улучшению реальных продуцентов рибофлавина: не усиливать, а ослаблять уровень экспрессии генов ферментов оксидативной ветки PP-пути по сравнению с базовым уровнем, характерным для клеток дикого типа.

Совершенно противоположные выводы были сделаны Каннизарро (Cannizzaro) и соавт. [75] на основе ¹³C-MFA дрожжей *Phaffia rhodozyma*, растущих на глюкозе и продуцирующих красный пигмент – астаксантин, каротиноид, который традиционно используется в качестве добавки к кормам животных. Анализ показал, что катаболизм глюкозы в этом случае осуществляется преимущественно через оксидативную ветку PP-пути, однозначно указывая на необходимость больших количеств NADPH в качестве кофактора для эффективного биосинтеза целевого витамина.

В 2000-х годах начинает появляться все большее число практически значимых работ, в которых ¹³C-MFA используется для анализа метаболического состояния и разработки стратегии дальнейшей модификации стрептомицетов, продуцирующих различные антибиотики. Надо отме-

тить, что антибиотики относятся к большой группе вторичных метаболитов и для их синтеза используются специализированные биосинтетические пути, однако предшественниками и кофакторами для них являются интермедиаты первичного метаболизма. Поэтому неудивительно, что для создания высокоэффективных продуцентов антибиотиков требуется глубокий анализ и системная перестройка их первичного метаболизма.

При создании подробных метаболических моделей различных стрептомицетов авторы, как и всегда, стремятся использовать всю доступную им информацию. Так, для штаммов наиболее изученного классического объекта – *Streptomyces coelicolor*, продуцента актинохордина [55] и ундецилпродигиозина [80] – метаболическая модель для анализа потоков была построена на основе геномной аннотации [99], а также данных транскриптомного [100] и протеомного [101] анализа. Исследование потоков у этого штамма показало, что мутантный вариант, неспособный к продукции актинохордина, имел существенно большую скорость роста и усиленные потоки через PP-пути и через анаэробное превращение PEP + CO₂ → OAA. К тому же у этого штамма были снижены скорость потребления глюкозы и поток через цикл Кребса по сравнению с аналогичными потоками в клетках дикого типа. Большой поток через PP-путь приводит к формированию больших количеств NADPH, необходимых для продукции биомассы и других целей. В то же время, и в клетках штамма – продуцента антибиотика количество образующегося NADPH превышало рассчитанные минимальные потребности, что указывало на ключевую роль никотинамиднуклеотид-трансгидрогеназы в поддержании редокс-гомеостаза стрептомицетов. Уровень продукции АТФ в клетках обоих исследованных штаммов также существенно превышал минимально необходимый, что свидетельствовало о высоком расходе энергии на поддержание жизнеспособности организма. Важным практическим следствием проведенного исследования явилось указание на возможную конкуренцию между путями синтеза актинохордина и триацилглицерина за общий метаболический предшественник – ацетил-СоА.

Примером того, как направленная модификация генов центрального метаболизма может существенно отразиться на способности штамма стрептомицетов продуцировать антибиотик, является работа [80]. Авторами показано, что делеция *pfkA2* (одного из трех аннотированных генов-гомологов *pfkA*) снижает общую активность фосфофруктокиназы и увеличивает накопление

пигментированных антибиотиков актинохордина и ундецилпродигиозина. ^{13}C -MFA, проведенный на основе предложенной авторами метаболической модели организма, показал, что следствием указанной генетической модификации кроме существенного возрастания потока через оксидативную ветку PP-пути действительно является также и увеличение потока, направленного на биосинтез антибиотиков из пирувата через ацетил-СоА.

Специфические изменения метаболизма обнаруживались и у других стрептомицетов при колебании уровня биосинтеза различных антибиотиков и смене физиологического состояния продуцентов. Так, для *Streptomyces noursei* при увеличении продукции нистатина потоки через цикл Кребса и PP-путь, соответственно, уменьшались и увеличивались, а выход биомассы снижался [78]. Для *Streptomyces tenebrarius* потоки через EMP- и PP-пути гликолиза усиливались, а поток через ED-путь ослаблялся в результате метаболических изменений, приводящих к смене фазы роста клеток на фазу продукции антибиотика тобрамицина [79].

Данные о метаболизме, полученные, в частности, и в результате ^{13}C -MFA, могут быть положены в основу стратегий использования как традиционных, так и новых для биотехнологии объектов в качестве базовых организмов при производстве новых биопродуктов промышленного значения.

НЕКОТОРЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ^{13}C -MFA

К настоящему времени основные успехи ^{13}C -MFA связаны с использованием квазистационарного приближения и экспериментальных данных о распределении изотопомеров протеиногенных аминокислот. Эти факты предопределили возможность применения метода для непрерывно и периодически растущих культур с анализом потоков в логарифмической фазе роста (в стадии наиболее активного синтеза белка). Однако с практической точки зрения наиболее интересной является возможность анализа кинетики распределения потоков в условиях быстрых и/или накапливающихся изменений параметров и состава окружающей среды. Показано, что уже развитый математический аппарат анализа потоков в квазистационарном состоянии для количественного учета распределения изотопомеров протеиногенных аминокислот может с успехом быть применен для вычисления параметров изменяющихся потоков. Однако для этого необходимо использовать введение меченого субстрата в различное

время ферментации с последующим детектированием изотопомеров доступных метаболитов после относительно небольшого периода установления стационарного изотопомерного состояния. В качестве материала для детектирования изотопомеров в этом случае могут служить либо свободные аминокислоты (с учетом поправок, связанных с образованием аминокислот как в результате синтеза *de novo*, так и за счет распада ранее синтезированных белков [95]), либо другие внутриклеточные метаболиты [102] и их осколки, получаемые в результате LC-MS/MS-измерений при специальных режимах [103]. Если масс-изотопомеры протеиногенных аминокислот детектировались на относительно недорогом оборудовании типа GC-MS [42, 104–108], то анализ изотопомеров внутриклеточных метаболитов требует использования уже существенно более дорогого и чувствительного оборудования типа CE-TOFMS [102], GC-MS/MS [109–111] или LC-MS/MS [95, 103, 112, 113].

Использование все более точных и информативных методов анализа, обеспечивающих получение все большего объема информации о распределении масс-изотопомеров (в идеале – о распределении всех пространственно различающихся изотопомеров) ключевых внутриклеточных метаболитов – перспектива дальнейшего развития «химической» компоненты ^{13}C -MFA. Отказ от необходимости использования квазистационарного приближения, рассмотрение нестационарного состояния изотопомеров на ультракоротких отрезках времени представляет чрезвычайно сложную и интересную с математической точки зрения задачу, которая активно разрабатывается в настоящее время [68, 87, 114–116]. Кинетический анализ включения метки во внутриклеточные метаболиты в рамках нестационарного ^{13}C -MFA должен повысить точность определения параметров потоков, уменьшить время проведения и стоимость экспериментов с тяжелыми изотопами, а также сделать возможным исследование неустойчивых и переходных метаболических состояний [87]. Однако, как нам представляется, использование аппарата квазистационарного ^{13}C -MFA применительно к пулам свободных внутриклеточных метаболитов является вполне адекватным для количественной оценки кинетического изменения параметров потоков в практически значимых задачах метаболической инженерии.

Нет сомнения, что в самое ближайшее время метаболические модели микроорганизмов требуют существенных усложнений, учитывающих компартментализацию эукариотических сис-

тем [5, 117–119] и организацию природных метаболонов в бактериальной клетке [120, 121], наличие искусственно создаваемых надмолекулярных белковых комплексов – скаффолдов, обеспечивающих субстратное туннелирование в сложнейших мультиферментных системах [122–124], а также направленное изменение природных компартментов, в которых происходит целевой биосинтез [125]. По крайней мере пионерские работы в области исследований субстратного туннелирования и направленного изменения метаболизма уже опубликованы; они демонстрируют высокую эффективность и практическую значимость, а потому адекватное изучение новых метаболических состояний настоятельно требует использования такого инструментария, как ^{13}C -MFA.

Как именно должно быть изменено метаболическое состояние исследуемого организма для потенциального увеличения его способности продуцировать желаемое соединение, каждая группа исследователей до недавнего времени должна была решать самостоятельно, базируясь исключительно на собственных субъективных оценках, опыте и интуиции. Однако уже имеются примеры разработок новых компьютерных программ, которые, по заявлениям их авторов, позволяют идентифицировать все возможные генно-инженерные вмешательства в охарактеризованные реакции данной метаболической модели с тем, чтобы увеличить, уменьшить или сделать равными нулю параметры потоков ключевых реакций с целью достижения желаемой суперпродукции целевого метаболита [126, 127]. Например, совершенно нетривиальные стратегии, предложенные для модификации метаболизма на основе одной из таких новых программ OptForce, позволили поднять уровень продукции требуемой (C_{14-16}) жирной кислоты в модифицированных клетках *E. coli* с базового уровня в 11% (дикий тип) до 39% от ее теоретически возможного выхода [128].

Возможно, все возрастающая точность определения параметров потоков в полногеномных метаболических моделях (genome-scale metabolic models) как новых, так и традиционных организмов в хорошо развитых квазистационарных приближениях является одной из плодотворных тенденций в решении фундаментальных и прикладных естественнонаучных задач. При этом неизменную важность имеет изучение потоков в динамике культивирования продуцентов за счет использования PLE с различными информативными мечеными субстратами, GC(LC)-MS/MS-детекции изотопомеров как протеиногенных аминокислот, так и внутриклеточных интермедиатов

метаболизма и их фрагментов известной структуры. Эти тенденции наряду с широким внедрением разнообразных алгоритмов проведения статистически достоверного ¹³C-MFA и разработкой стратегии направленной модификации параметров потоков генно-инженерными способами при оптимизации продуцентов являются наиболее яркими направлениями развития и использования ¹³C-MFA в фундаментальных и прикладных биотехнологических исследованиях XXI века.

Хотелось бы высказать глубокую благодарность академику РАН М.П. Кирпичникову за предложение подготовить для публикации настоящий обзор на основе материалов, частично входящих в постоянно обновляемый курс лекций по метаболической инженерии, который один из авторов, проф. С.В. Машко, уже более 10 лет читает на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Хотелось бы также поблагодарить академика РАН В.Г. Дебабова за постоянный интерес к исследованиям авторов по ¹³C-MFA, а также за любезное предложение опубликовать подготовленный обзор в руководимом им журнале «Биотехнология».

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубева Л.И., Щуплецов М.С., Машко С.В. Анализ метаболических потоков с использованием ¹³C изотопов (¹³C-MFA). 1. Основы метода и современное состояние исследований. *Биотехнология*. 2016, 32(5), 10-37. (Golubeva L.I., Shupletsov M.S., and Mashko S.V. Metabolic flux analysis using ¹³C isotopes. 1. Experimental basis of the method and present state of investigations. *Biotechnologia* (Biotechnology), 2016, 32(5), 10–37.) doi: 10.1016/0234-2734-2016-32-5-10-37
2. Щуплецов М.С., Голубева Л.И., Машко С.В. Анализ метаболических потоков с использованием ¹³C изотопов (¹³C-MFA). 2. Математические основы метода. *Биотехнология*. 2016, 32(6), 9–34. (Shupletsov M.S., Golubeva L.I., and Mashko S.V. Metabolic flux analysis using ¹³C isotopes. II. Mathematical basis for the method. *Biotechnologia* (Biotechnology), 2016, 32(6), 9–34. doi: 10.1016/0234-2734-2016-32-6-9-34
3. Moxley J.F., Jewett M.C., Antoniewicz M.R., et al. Linking high-resolution metabolite flux phenotypes and transcriptional regulation in yeast modulated by the global regulator Gen4p. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009, 106(16), 6477–6482. doi: 10.1073/pnas.0811091106
4. Junker B.H. Flux analysis in plant metabolic networks: increasing throughput and coverage. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 26, 183–188. doi: 10.1016/j.copbio.2014.01.016
5. Mueller D., and Heinzle E. Stable isotope-assisted metabolomics to detect metabolic flux changes in mammalian cell cultures. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, 24, 54–59. doi: 10.1016/j.copbio.2012.10.015
6. You L., B. Berla B., L. He L., et al. ¹³C-MFA delineates the photomixotrophic metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under light- and carbon-sufficient conditions. *Biotechnol. J.*, 2014, 9, 684–692. doi: 10.1002/biot.201300477
7. Baba T., Ara T., Hasegawa M., et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.*, 2006, 2, 1–11. doi: 10.1038/msb4100050
8. Yao R., Hirose Y., Sarkar D., et al. Catabolic regulation analysis of *Escherichia coli* and its *crp*, *mlc*, *mgsA*, *pgi* and *ptsG* mutants. *Microb. Cell Fact.*, 2011, 10(67), 1–11. doi: 10.1186/1475-2859-10-67
9. Meza E., Becker J., Bolivar F., et al. Consequences of phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, 2012, 11(127), 1–13. doi: 10.1186/1475-2859-11-127
10. Canonaco F., Hess T.A., Heri S., et al. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, 204, 247–252. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10892.x
11. Hua Q., Yang C., Baba T., et al. Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *J. Bacteriol.*, 2003, 185, 7053–7067. doi: 10.1128/JB.185.24.7053-7067.2003
12. Emmerling M., Dauner M., Ponti A., et al. Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2002, 184, 152–164. doi: 10.1128/JB.184.1.152-164.2002
13. Siddiquee K.A.Z., Arauzo-Bravo M.J., Shimizu K., et al. Metabolic flux analysis of *pykF* gene knockout *Escherichia coli* based on ¹³C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 63, 407–417. doi: 10.1007/s00253-003-1357-9
14. Ishii N., Nakahigashi K., Baba T., et al. Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science*, 2007, 316, 593–597. doi: 10.1126/science.1132067
15. Long C.P., and Antoniewicz M.R. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* knockouts: lessons from the Keio collection and future outlook. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, 28, 127–133. doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.006
16. Nizam S.A., and Shimizu K. Effects of *arcA* and *arcB* genes knockout on the metabolism in *Escherichia coli* under anaerobic and microaerobic conditions. *Biochem. Eng. J.*, 2008, 42, 229–236. doi: 10.1016/j.bej.2008.06.021
17. Nizam S.A., Zhu J., Ho P.Y., and Shimizu K. Effects of *arcA* and *arcB* genes knockout on the metabolism in *Escherichia coli* under aerobic condition. *Biochem. Eng. J.*, 2009, 44, 240–250. doi: 10.1016/j.bej.2008.12.017
18. Fong S. S., Nanchen A., Palsson B.O., and Sauer U. Latent pathway activation and increased pathway capacity enable *Escherichia coli* adaptation to loss of key metabolic enzymes. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 8024–8033. doi: 10.1074/jbc.M510016200
19. 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. doi: 10.1074/jbc.M311657200

20. Fuhrer T., Fischer E., and Sauer U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J. Bacteriol.*, 2005, 187, 1581–1590. doi: 10.1128/JB.187.5.1581-1590.2005
21. Shupletsov M.S., Golubeva L.I., Rubina S.S., et al. OpenF-LUX2: ¹³C-MFA modeling software package adjusted for the comprehensive analysis of single and parallel labeling experiments. *Microb. Cell Fact.*, 2014, 13(152), 1–25. doi: 10.1186/s12934-014-0152-x
22. Leighty R.W., and Antoniewicz M.R. COMPLETE-MFA: Complementary parallel labeling experiments technique for metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2013, 20, 49–55. doi: 10.1016/j.ymben.2013.08.006
23. Sauer U., and Eikmanns B.J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29, 765–794. doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.002
24. Fischer E., and Sauer U. A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 46446–46451. doi: 10.1074/jbc.M307968200
25. Fuhrer T., and Sauer U. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J. Bacteriol.*, 2009, 191, 2112–2121. doi: 10.1128/JB.01523-08
26. Boghigian B.A., Seth G., Kiss R., and Pfeifer B.A. Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metab. Eng.*, 2010, 12, 81–95. doi: 10.1016/j.ymben.2009.10.004
27. Iwatani S., Yamada Y., and Usuda Y. Metabolic flux analysis in biotechnology process. *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30, 791–799. doi: 10.1007/s10529-008-9633-5
28. Guo W., Sheng J., and Feng X. ¹³C-metabolic flux analysis: an accurate approach to demystify microbial metabolism for biochemical production. *Bioengineering*, 2016, 3(3), 1–32. doi: 10.3390/bioengineering3010003
29. Becker J., Reinefeld J., Stellmacher R., et al. Systems-wide analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in bio-succinate producing *Basfia succiniciproducens*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110, 3013–3023. doi: 10.1002/bit.24963
30. Berger A., Dohnt K., Tielen P., et al. Robustness and plasticity of metabolic pathway flux among uropathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE.*, 2014, 9(4), 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0088368
31. Schatschneider S., Huber C., Neuweger H., et al. Metabolic flux pattern of glucose utilization by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: prevalent role of the Entner-Doudoroff pathway and minor fluxes through the pentose phosphate pathway and glycolysis. *Mol. BioSyst.*, 2014, 10, 2663–2676. doi: 10.1039/c4mb00198b
32. Swarup A., Lu J., DeWoody K.C., and Antoniewicz M.R. Metabolic network reconstruction, growth characterization and ¹³C-metabolic flux analysis of the extremophile *Thermus thermophilus* HB8. *Metab. Eng.*, 2014, 24, 173–180. doi: 10.1016/j.ymben.2014.05.013
33. Au J., Choi J., Jones S.W., et al. Parallel labeling experiments validate *Clostridium acetobutylicum* metabolic network model for ¹³C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2014, 26, 23–33. doi: 10.1016/j.ymben.2014.08.002
34. Nicolas C., Kiefer P., Letisse F., et al. Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.*, 2007, 581, 3771–3776. doi: 10.1016/j.febslet.2007.06.066
35. Wittmann C., Kim H.M., and Heinzle E. Metabolic network analysis of lysine producing *Corynebacterium glutamicum* at a miniaturized scale. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 87, 1–6. doi: 10.1002/bit.20103
36. Havekorn van Rijsewijk B.R., Nanchen A., Nallet S., et al. Large-scale ¹³C-flux analysis reveals distinct transcriptional control of respiratory and fermentative metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.*, 2011, 7(477), 1–12. doi: 10.1038/msb.2011.9
37. McAtee A.G., Jazmin L.J., and Young J.D. Application of isotope labeling experiments and ¹³C flux analysis to enable rational pathway engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2015, 36, 50–56. doi: 10.1016/j.copbio.2015.08.004
38. He L., Xiao Y., Gebreselassie N., et al. Central metabolic responses to the overproduction of fatty acids in *Escherichia coli* based on ¹³C-metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 2014, 111, 575–585. doi: 10.1002/bit.25124
39. Becker J., Zelder O., S. Häfner S., et al. From zero to hero — design—based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. *Metab. Eng.*, 2011, 13, 159–168. doi: 10.1016/j.ymben.2011.01.003
40. Daee E.B., and Ison A.P. Classification and sensitivity analysis of a proposed primary metabolic reaction network for *Streptomyces lividans*. *Metab. Eng.*, 1999, 1, 153–165. doi: 10.1006/mben.1998.0112
41. Marx A., de Graaf A.A., Wiechert W., et al. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 49, 111–129. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960120)49:2<111::AID-BIT1>3.0.CO;2-T
42. Wittmann C., and Heinzle E. Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 62, 739–750. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990320)62:6<739::AID-BIT13>3.0.CO;2-E
43. Sauer U., Hatzimanikatis V., Bailey J.E., et al. Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nat. Biotechnol.*, 1997, 15, 448–452. doi: 10.1038/nbt0597-448
44. Antoniewicz M.R., Kelleher J.K., Stephanopoulos G. Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements. *Metab. Eng.*, 2006, 8, 324–337. doi: 10.1016/j.ymben.2006.01.004
45. Suthers P.F., Burgard A.P., Dasika M.S., et al. Metabolic flux elucidation for large-scale models using ¹³C labeled isotopes. *Metab. Eng.*, 2007, 9, 387–405. doi: 10.1016/j.ymben.2007.05.005
46. Stephanopoulos G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab. Eng.*, 1999, 1, 1–11. doi: 10.1006/mben.1998.0101
47. Yang C., Hua Q., Baba T., et al. Analysis of *Escherichia coli* anaplerotic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phospho-

- enolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 84, 129–144. doi: 10.1002/bit.10692
48. Yang C.Y., Hua Q., Shimizu K. Quantitative analysis of intracellular metabolic fluxes using GC-MS and two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, 93, 78–87. doi: 10.1016/S1389-1723(02)80058-5
 49. Schmidt K., Nielsen J., and Villadsen J. Quantitative analysis of metabolic fluxes in *Escherichia coli*, using two-dimensional NMR spectroscopy and complete isotopomer models. *J. Biotechnol.*, 1999, 279, 175–190. doi: 10.1016/S0168-1656(99)00021-8
 50. Christensen B., and Nielsen J. Isotopomer analysis using GC-MS. *Metab. Eng.*, 1999, 1, 282–290. doi: 10.1006/mben.1999.0117
 51. Varma A., Boesch B.W., and Palsson B.O. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, 42, 59–73. doi: 10.1002/bit.260420109
 52. Vallino J.J., Stephanopoulos G. Metabolic flux distribution in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, 41, 633–646. doi: 10.1002/bit.260410606
 53. Pramanik J., and Keasling J.D. Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, 56, 398–421. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(199712)56:4<398::AID-BIT6>3.0.CO;2-J
 54. Zupke C., and Stephanopoulos G. Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. *Biotechnol. Prog.*, 1994, 10, 489–498. doi: 10.1021/bp00029a006
 55. Coze F., Gilard F., Tcherkez G., et al. Carbon-flux distribution within *Streptomyces coelicolor* metabolism: a comparison between the actinorhodin-producing strain M145 and its non-producing derivative M1146. *PLoS ONE.*, 2013, 8(12), 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0084151
 56. Hwang K.-S., Kim H.U., Charusanti P., et al. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 2014, 32, 255–268. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.008
 57. Sonntag K., Schwinde J., de Graaf A.A., et al. ¹³C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 44, 489–495. doi: 10.1007/BF00169949
 58. Wittmann C., and Heinzle E. Application of MALDI-TOF to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*. A novel approach for metabolic flux analysis. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, 2441–2455. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02129.x
 59. Kalinowski K., Bathe B., Bartels D., et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.*, 2003, 104, 5–25. doi: 10.1016/S0168-1656(03)00154-8
 60. Kildesen K.R., and Nielsen J. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102, 583–597. doi: 10.1002/bit.22067
 61. Wittmann C. Analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 2010, 120, 21–49. doi: 10.1007/10_2009_58
 62. Van Ooyen J., Noack S., Bott M., et al. Improved l-lysine production with *Corynebacterium glutamicum* and systemic insight into citrate synthase flux and activity. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109, 2070–2081. doi: 10.1002/bit.24486
 63. Shirai T., Nakato A., Izutani N., et al. Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria. *Metab. Eng.*, 2005, 7, 59–69. doi: 10.1016/j.ymben.2004.10.001
 64. Shirai T., Fujimura K., C. Furusawa C., et al. Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis. *Microb. Cell Fact.*, 2007, 6(19), 1–19. doi: 10.1186/1475-2859-6-19
 65. Wahl A., Massaoudi M.El., Schipper D., et al. Serial ¹³C-based flux analysis of an l-phenylalanine-producing *E. coli* strain using the sensor reactor. *Biotechnol. Prog.*, 2004, 20(3), 706–714. doi: 10.1021/bp0342755
 66. Krömer J.O., Wittmann C., Schröder H., Heinzle E. Metabolic pathway analysis for rational design of l-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.*, 2006, 8, 353–369. doi: 10.1016/j.ymben.2006.02.001
 67. Bartek T., Blombach B., Lang S., et al. Comparative ¹³C metabolic flux analysis of pyruvate dehydrogenase complex-deficient, l-valine-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 6644–6652. doi: 10.1128/AEM.00575-11
 68. 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. doi: 10.1016/j.ymben.2007.01.003
 69. Blank L.M., Lehmbeck F., Sauer U. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5, 545–558. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.09.008
 70. Frick O., and Wittmann C. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microb. Cell Fact.*, 2005, 4(30), 1–16. doi: 10.1186/1475-2859-4-30
 71. Fredlund E., Blank L.M., Schnurer J., et al. Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 5905–5911. doi: 10.1128/AEM.70.10.5905-5911.2004
 72. Kleijn R.J., Geertman J.M., Nfor B.K., et al. Metabolic flux analysis of a glycerol-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain based on GC-MS, LC-MS and NMR-derived ¹³C-labeling data. *FEMS Yeast Res.*, 2007, 7, 216–231. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00180.x
 73. McKinlay J.B., Shachar-Hill Y., Zeikus J.G., and Vieille C. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ¹³C-labeled metabolic product isotopomers. *Metab. Eng.*, 2007, 9, 177–192. doi: 10.1016/j.ymben.2006.10.006

74. Zamboni N., Fischer E., Muffler A., et al. Transient expression and flux changes during a shift from high to low riboflavin production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 89, 219–232. doi: 10.1002/bit.20338
75. Cannizzaro C., Christensen B., Nielsen J., and von Stockar U. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using ¹³C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry. *Metab. Eng.*, 2004, 6, 340–351. doi: 10.1016/j.ymben.2004.06.001
76. Kleijn R.J., van Winden W.A., Ras C., et al. ¹³C-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. doi: 10.1128/AEM.02955-05
77. Kleijn R.J., Liu F., van Winden W.A., et al. Cytosolic NADPH metabolism in penicillin-G producing and non-producing chemostat cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Metab. Eng.*, 2007, 9, 112–123. doi: 10.1016/j.ymben.2006.08.004
78. Jonsbu E., Christensen B., Nielsen J. Changes of *in vivo* fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 56, 93–100. doi: 10.1007/s002530100613
79. Borodina I., Scholler C., Eliasson A., and Nielsen J. Metabolic network analysis of *Streptomyces tenebrarius* a *Streptomyces* species with an active Entner-Doudoroff pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 2294–2302. doi: 10.1128/AEM.71.5.2294-2302.2005
80. Borodina I., Siebring J., Zhang J., et al. Antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2) mediated by phosphofructokinase deletion. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 25186–25199. doi: 10.1074/jbc.M803105200
81. Weber J., Hoffmann F., and Rinas U. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, 80, 320–330. doi: 10.1002/bit.10380
82. Wittmann C., Weber J., Betiku E., et al. Response of fluxome and metabolome to temperature-induced recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 2007, 132, 375–384. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.07.495
83. Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.*, 2003, 104, 155–172. doi: 10.1016/S0168-1656(03)00149-4
84. Becker J., and Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels — *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, 23, 631–640. doi: 10.1016/j.copbio.2011.11.012
85. Becker J., and Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production — the heartbeat of industrial strain development. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, 23, 718–726. doi: 10.1016/j.copbio.2011.12.025
86. Wendisch V.F., Bott M., and Eikmanns B.J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006, 9, 268–274. doi: 10.1016/j.mib.2006.03.001
87. Nöh K., Wiechert W. The benefits of being transient: isotope-based metabolic flux analysis at the short time scale. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91, 1247–1265. doi: 10.1007/s00253-011-3390-4
88. Hara Y., Kadotani N., Izui H., et al. The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ13355, an organism with great biotechnological potential. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 2012, 93, 331–341. doi: 10.1007/s00253-011-3713-5
89. Tsujimoto N., Gunji Y., Ogawa-Miyata Y., et al. L-lysine biosynthetic pathway of *Methylophilus methylotrophus* and construction of an L-lysine producer. *J. Biotechnol.*, 2006, 124, 327–337. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.026
90. Petersen S., de Graaf A.A., Eggeling L., et al. *In vivo* quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacteria glutamicum*. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 35932–35941. doi: 10.1074/jbc.M908728199
91. Wiechert W. ¹³C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2001, 3, 195–206. doi: 10.1006/mben.2001.0187
92. Becker J., Klopprogge C., Zelder O., et al. Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 8587–8596. doi: 10.1128/AEM.71.12.8587-8596.2005
93. Kind S., Becker J., and Wittmann C. Increased lysine production by flux coupling of the tricarboxylic acid cycle and the lysine biosynthetic pathway - metabolic engineering of the availability of succinyl-CoA in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.*, 2013, 15, 184–195. doi: 10.1016/j.ymben.2012.07.000
94. Bommareddy R.R., Chen Z., Rappert S., and Zeng A.-P. A *de novo* NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase. *Metab. Eng.*, 2014, 25, 30–37. doi: 10.1016/j.ymben.2014.06.005
95. Iwatani S., Van Dien S., Shimbo K., et al. Determination of metabolic flux changes during fed-batch cultivation from measurements of intracellular amino acids by LC-MS/MS. *J. Biotechnol.*, 2007, 128, 93–111. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.09.004
96. Kromer O., Sorgenfrei O., Klopprogge K., et al. In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J. Bacteriol.*, 2004, 186, 1769–1784. doi: 10.1128/JB.186.6.1769-1784.2004
97. Patnaik R., and Liao J.C. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60, 3903–3908.
98. Fu Y., Yoon J.M., Jarboe L., and Shanks J.V. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* MG1655 under octanoic acid (C8) stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99, 4397–4408. doi: 10.1007/s00253-015-6387-6
99. Bentley S.D., K. F. Chater K.F., A. M. Cerdeco-Tórraga A.M., et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417, 141–147. doi: 10.1038/417141a
100. Nieselt K., Battke F., Herbig A., et al. The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics*, 2010, 11, 10–18. doi: 10.1186/1471-2164-11-10

101. Thomas L., Hogson D.A., Wentzel A., et al. Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and *phoP* mutant grown in batch culture. *Mol. Cell. Proteomics*, 2012, 11, 1–17. doi: 10.1074/mcp.M111.013797
102. Toya Y., Ishii N., Hirasawa T., et al. Direct measurement of isotopomer of intracellular metabolites using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for efficient metabolic flux analysis. *J. Chromatogr., A*, 2007, 1159, 134–141. doi: 10.1016/j.chroma.2007.04.011
103. Rühl M., B. Rupp B., K. Nöh K., et al. Collisional fragmentation of central metabolites in LC-MS/MS increases precision of ¹³C metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109, 763–771. doi: 10.1002/bit.24344
104. Kohlstedt M., Becker J., and Wittmann C. Metabolic fluxes and beyond — systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 88, 1065–1075. doi: 10.1007/s00253-010-2854-2
105. Fischer E., Sauer U. Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270, 880–891. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03448.x
106. Wittmann C. Metabolic flux analysis using mass spectrometry. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 2002, 74, 39–64. doi: 10.1007/3-540-45736-4_3
107. Antoniewicz M.R., Kelleher J.K., Stephanopoulos G. Accurate assessment of amino acid mass isotopomer distributions for metabolic flux analysis. *Anal. Chem.*, 2007, 79, 7554–7559. doi: 10.1021/ac0708893
108. Wittmann C. Fluxome analysis using GC-MS. *Microb. Cell Fact.*, 2007, 6(6), 1–17. doi: 10.1186/1475-2859-6-6
109. Choi J., Grossbach M.T., and Antoniewicz R.R. Measuring complete isotopomer distribution of aspartate using gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2012, 84, 4628–4632. doi: 10.1021/ac300611n
110. Jeffrey F.M.H., Roach J.S., Storey C.J., et al. ¹³C isotopomer analysis of glutamate by tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 2002, 300, 192–205. doi: 10.1006/abio.2001.5457
111. Choi J., and Antoniewicz M.R. Tandem mass spectrometry: A novel approach for metabolic flux analysis. *Metab. Eng.*, 2011, 13, 225–233. doi: 10.1016/j.ymben.2010.11.006
112. Toya Y., Ishii N., Nakahigashi K., et al. ¹³C-metabolic flux analysis for batch culture of *Escherichia coli* and its *pyk* and *pgi* gene knockout mutants based on mass isotopomer distribution of intracellular metabolites. *Biotechnol. Prog.*, 2010, 26, 975–992. doi: 10.1002/btpr.420
113. Kiefer P., Nicolas C., Letisse F., and Portais J.C. Determination of carbon labeling distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 2007, 360, 182–188. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.032
114. Kajihata S., Furusawa C., Matsuda F., and Shimizu H. OpenMeibius: An open source software for isotopically non-stationary ¹³C-based metabolic flux analysis. *Bio. Med. Res. Intern.*, 2014, 2014, 1–10. doi: 10.1155/2014/627014
115. Nöh K., Grönke K., Luo B., et al. Metabolic flux analysis at ultra short time scale: isotopically non-stationary ¹³C labeling experiments. *J. Biotechnol.*, 2007, 129, 249–267. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.11.015
116. Noack S., Nöh K., Moch M., et al. Stationary versus non-stationary ¹³C-MFA: a comparison using a consistent dataset. *J. Biotechnol.*, 2011, 154, 179–190. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.008
117. Zamboni N. ¹³C metabolic flux analysis in complex systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, 22, 103–108. doi: 10.1016/j.copbio.2010.08.009
118. Papini M., Nookaew I., Siewers V., and Nielsen J. Physiological characterization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Aspergillus nidulans* phosphoketolase pathway: validation of activity through ¹³C-based metabolic flux analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 95, 1001–1010. doi: 10.1007/s00253-012-3936-0
119. Feng X., Zhao H. Investigating xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* via ¹³C metabolic flux analysis. *Microb. Cell Fact.*, 2013, 12(114), 1–12. doi: 10.1186/1475-2859-12-114
120. Meyer F.M., Gerwig J., Hammer E., et al. Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: Evidence for a metabolon. *Metab. Eng.*, 2011, 13, 18–27. doi: 10.1016/j.ymben.2010.10.001
121. Ovadi J., and V. Saks V. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol. Cell. Biochem.*, 2004, 256-257(1-2), 5–12. doi: 10.1023/B:MCBI.0000009855.14648.2c
122. Dueber J.E., Wu G.C., Malmirchegini G.R., et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nature Biotechnol.*, 2009, 27, 753–759. doi: 10.1038/nbt.1557
123. Lee H., DeLoache W.C., and Dueber J.E. Spatial organization of enzymes for metabolic engineering. *Metab. Eng.*, 2012, 14, 242–251. doi: 10.1016/j.ymben.2011.09.003
124. Lee J.H., Jung S.-C., Bui L.M., et al. Improved production of l-threonine in *Escherichia coli* by use of a DNA scaffold system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, 79, 774–782. doi: 10.1128/AEM.02578-12
125. Avalos J.L., Fink G.R., and Stephanopoulos G. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(4), 335–341. doi: 10.1038/nbt.2509
126. Melzer G., Esfandabadi M.E., Franco-Lara E., and Wittmann C. Flux Design: In silico design of cell factories based on correlation of pathway fluxes to desired properties. *BMC Systems Biology*, 2009, 3(120), 1–16. doi: 10.1186/1752-0509-3-120
127. Ranganathan S., Suthers P.F., and Maranas C.D. OptForce: an optimization procedure for identifying all genetic manipulations leading to targeted overproductions. *PLoS Comput. Biol.*, 2010, 6(4), 1–11. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000744
128. Ranganathan S., Tee T.W., Chowdhury A., et al. An integrated computational and experimental study for overproducing fatty acids in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, 2012, 14, 687–704. doi: 10.1016/j.ymben.2012.08.008

Metabolic Flux Analysis using ^{13}C Isotopes: III. Significance for System Biology and Metabolic Engineering

L.I. GOLUBEVA^{1,*}, M.S. SHUPLETSOV^{1,2}, and S.V. MASHKO^{1,3}

¹*The Closed Joint-Stock Company Ajinomoto-Genetika, 117545, Moscow Russia*

²*The Faculty of Computational Mathematics and Cybernetics, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow Russia*

³*The Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow Russia*

*e-mail: luba_golubeva@agri.ru

Received July 07, 2016

Accepted November 01, 2016

Abstract – At present, ^{13}C -MFA is a primary method for the quantitative characterization of the intracellular carbon fluxes *in vivo* distribution under steady-state cell conditions. During more than twenty-year long history of application, the method has been used successfully for both investigations of the fundamental characteristics of the prokaryotic and eukaryotic cell metabolism and improvement of producing strain properties. Present publication is the final in a set of reviews describing various aspects of the method. Here, the authors highlight the recent achievements in the bacterial metabolism investigation reached with the ^{13}C -MFA assistance. Analysis of the well-characterized bacteria model strains revealed the central metabolism robustness provided by a set of the alternative metabolic pathways, and helped understand physiological meaning and find previously unknown functions of the well-studied metabolic pathways. Several good examples of the ^{13}C -MFA-based fundamental investigations of the poorly characterized bacteria are also analyzed. In applied investigations, the flux analysis in strains producing amino acids, vitamins and antibiotics permitted to determine targets for further modifications, to suggest unconventional metabolic engineering approaches, and which is most important, to confirm their helpfulness. In the final section of this article, the ^{13}C -MFA prospects including the monitoring of the dynamics of metabolic fluxes distribution during the culture growth are discussed.

Keywords: flux coupling, futile cycles, metabolic pathway activity, NADPH balance.

doi: 10.1016/0234-2734-2758-2017-33-2-9-28

Acknowledgements

We are deeply acknowledged to Michael P. Kirpichnikov, Academician of Russian Academy of Sciences, for the proposal to prepare for publication this review that is partly based on the current metabolic engineering course that one of the authors, Prof. S.V. Mashko, has lectured for more than 10 years at the Dept. of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University.

We would also like to acknowledge Vladimir G. Debabov, Academician of Russian Academy of Sciences, for his constant interest to ^{13}C -MFA experiments that are in progress in the authors' laboratory, and for his kind proposal to publish the prepared review in the journal *Biotekhnologiya* (Biotechnology) he heads.