

Федеральное государственное бюджетное автономное образовательное учреждение высшего образования “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”
Институт цитологии и генетики СО РАН
Кафедра информационной биологии

Исследование метаболизма L-валина бактерии *Corynebacterium glutamicum* методами математического моделирования

Подготовила:

студентка Трофимова Мария Федоровна,

группа 18410, ФЕН НГУ

Научный руководитель:

Казанцев Федор Владимирович, к.б.н.,

н.с. сектора компьютерного анализа и

моделирования биологических систем ИЦиГ СО РАН

Актуальность работы

Производство и торговля аминокислотами являются одним из наиболее динамичных секторов мирового кормового рынка. В 2020 году мировой рынок незаменимых аминокислот достиг \$20 млрд.

Основные задачи:

- оптимизация метаболизма для увеличение выхода целевой аминокислоты
- проектирование штаммов-суперпродуцентов
- потребление альтернативных субстратов



ГосНИИгенетика
ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ДО ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Бактерии

2759 элементов

<https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/>



Применение
L-валина

Лечение
бессонницы
и
нервозност
и

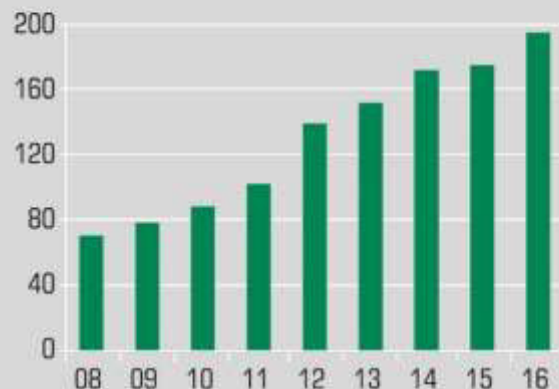
Укрепляю-
щее
действие на
мускулатуру

Улучшение
корма
животных

Ингредиент
препаратов
для лечения
заболеваний
печени

Восстанов-
ление
иммунной
системы

Рынок аминокислот в России прирастал
в среднем на 15% в год



динамика рынка аминокислот в России, тыс. тонн

Источник: Российская биотопливная ассоциация

В моей работе в качестве предмета исследования выступает метаболизм L-валина бактерии *Corynebacterium glutamicum* - часто используемая в биохимическом производстве.

Цель работы

исследование метаболизма L-валина в бактерии *Corynebacterium glutamicum* методами компьютерного и математического моделирования.

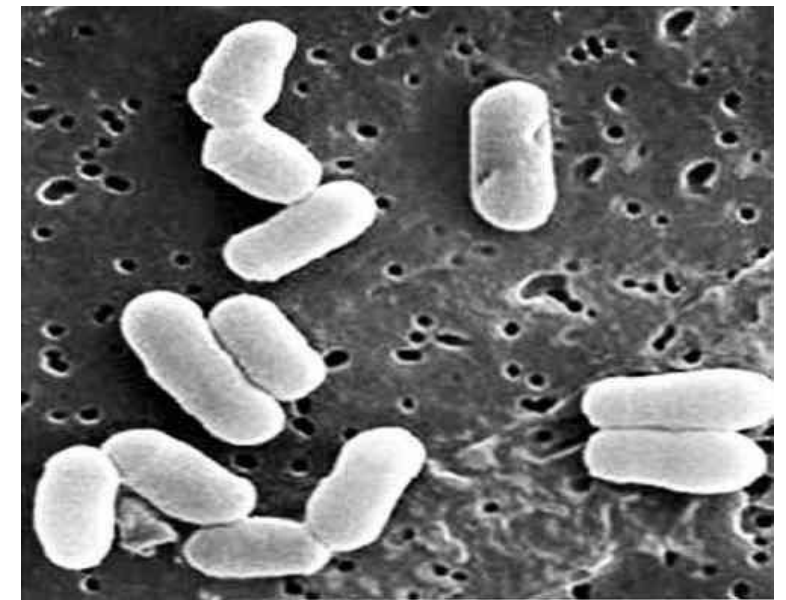
Задачи

- анализ литературы по выявлению ключевых аспектов метаболизма бактерии *Corynebacterium glutamicum* и существующих математических моделей;
- построение структурной модели метаболических путей L-валина ;
- построение и валидация потоковой модели *Corynebacterium glutamicum* штамма В-5212.

Corynebacterium glutamicum

Небольшие , неподвижные грамположительные бактерии, средой обитания которых является почва.

Являются **факультативно-анаэробными** бактериями, но высокой плотности достигают при аэробном культивировании.



https://www.researchgate.net/figure/Corynebacterium-glutamicum-showing-the-characteristic-cell-division_fig1_258225582

- Не являются патогенным, не образует спор;

- Геном относительно стабилен;

- Быстро растут и не выделяют внеклеточные протеазы;

- Возможно использовать для биоремедиации.

- **Растут** на глюкозе, сахарозе, мальтозе, фруктозе, маннозе, этаноле, рибозе.

Не растут на ксилозе, арабинозе, лактозе, раффинозе.

- Растут при **температуре** 24-40 °C

- Растут на **средах с pH** от 6 до 8,5

- Имеется возможность использовать в качестве субстрата несколько источников углерода (ко-утилизация с глюкозой ацетата, фруктозы)

- Для роста и продукции аминокислот клеткам, кроме углерода, необходимы азот и сера.

Сравнение моделей для описания метаболизма бактерии *Corynebacterium glutamicum*

Выбрана модель: *i*CGB21FR

Модель совмещает в себе полученные ранее модели и расширяет, за счет включения более широкого метаболического охвата. Эти модели:

- *i*KK446 ([Kjeldsen and Nielsen, 2009](#)) 446 генов, 446 реакций
- *i*EZ482 ([Zelle et al., 2015](#)) 482 гена, 475 реакций
- *i*CW773 ([Zhang et al., 2017](#)) 773 гена, 1207 реакции

Субстраты:

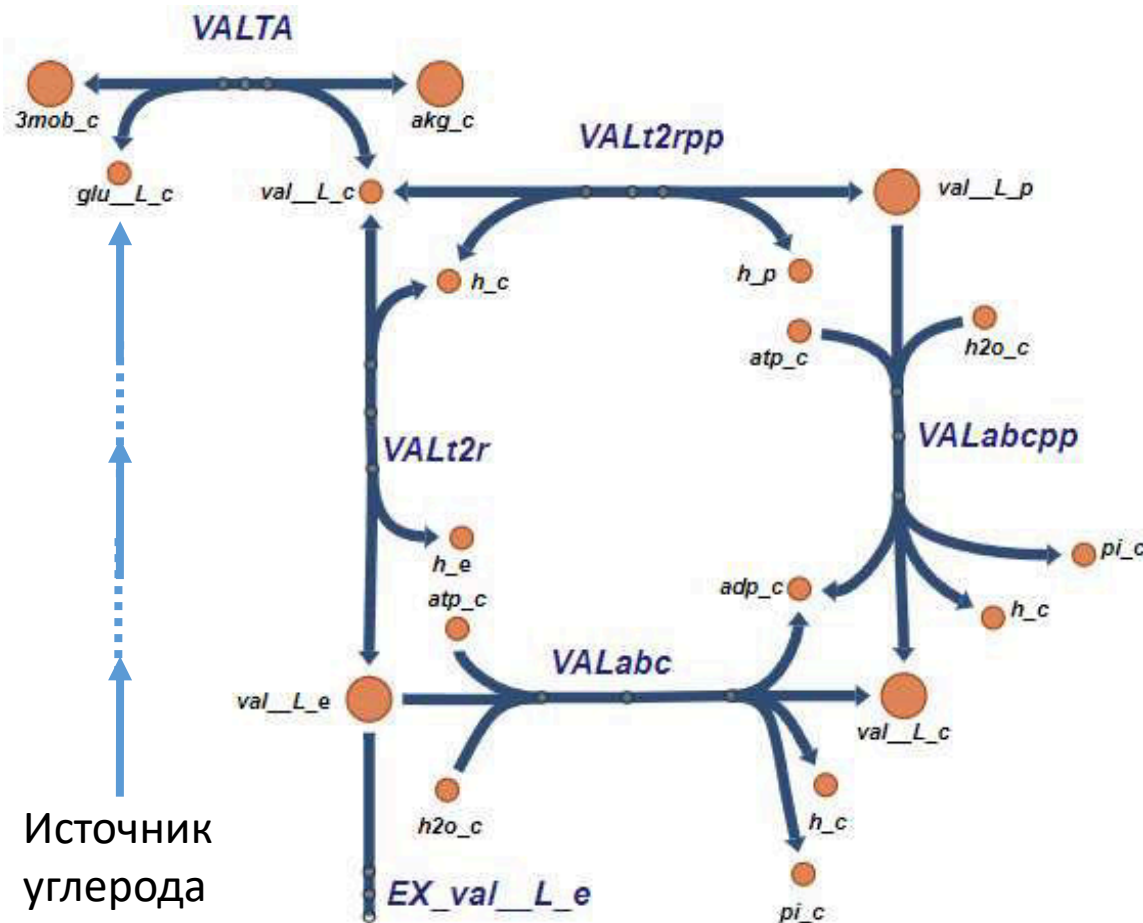
В качестве единственных источников углерода в аэробных и анаэробных условиях в данной модели были протестированы глюкоза, фруктоза, сахароза, рибоза, глюконат, пируват, ацетат, лактат и пропионат.

Все эти соединения могут служить единственным источниками углерода в аэробных условиях. В анаэробных условиях источниками углерода служат глюкоза, фруктоза, сахароза и рибоза.

Name	<i>i</i> CGB21FR
Memory address	0x02643c9a2460
Number of metabolites	1042
Number of reactions	1539
Number of groups	102
Objective expression	1.0*Growth - 1.0*Growth_reverse_699ae
Compartments	cytosol, periplasm, extracellular space
Генов	805

Реакции с L-валином в модели iCGB21FR

Ц-цитозоль
 П-периплазма
 В-внеклеточный



Название реакции в модели iCGB21FR	Стехиометрическое описание реакции
VALabc:	АТФ(ц)+ h2o(ц) + L-валин (в) --> АДФ(ц) + h(ц) + фосфат(с) + L-валин (ц)
VALt2r:	H(в) + L-валин (в)<=> h(ц) + L-валин (ц)
VALabcpp:	АТФ(ц)+ h2o(ц) + L-валин (п)--> АДФ(ц) + h(ц) + фосфат(ц) + L-валин (ц)
VALt2rpp:	H(п) + L-валин (п)<=> h(ц)+ + L-валин (ц)
VALTA:	2-оскоглутарат(ц) + L-валин (ц) <=> 3-Метил-2-оксобутаноат(ц) + глутамат(ц)
Секреция L-валина во внеклеточную среду:	L-валин (в) -->

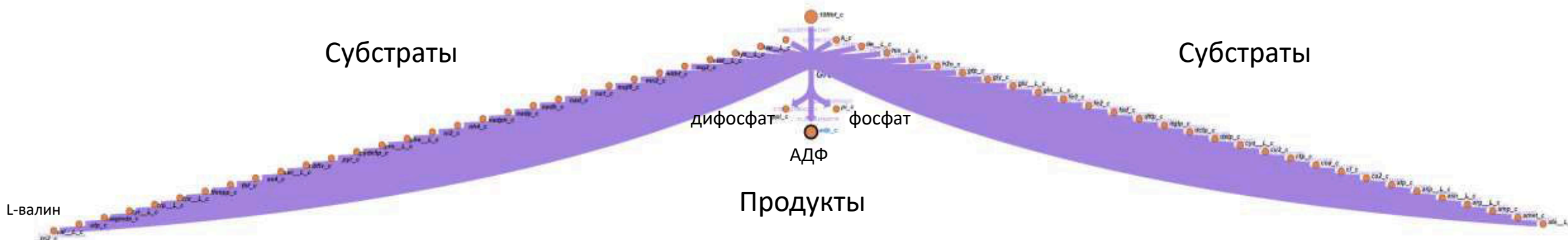
Фрагмент метаболического пути L-валина. Визуализация выполнена в онлайн визуализаторе Escher (<https://escher.github.io/#/>)

Псевдо-реакция «роста биомассы»

Идентификатор	Формула	Стехиометрия
pro__L_c	C5H9NO2	-0.214073861663851
lys__L_c	C6H15N2O2	-0.332323631867312
thf_c	C19H21N7O6	-0.000215957436615497
ile__L_c	C6H13NO2	-0.281353803150062
ser__L_c	C3H7NO3	-0.208977072475925
fad_c	C27H31N9O15P2	-0.000215957436615497
val__L_c	C5H11NO2	-0.409798120148372
asn__L_c	C4H8N2O3	-0.233442241629366
thr__L_c	C4H9NO3	-0.245675310415586
ribflv_c	C17H19N4O6	-0.000215957436615497
mlthf_c	C20H21N7O6	-0.000215957436615497
gtp_c	C10H12N5O14P3	-0.208303052853126
h2o_c	H2O	-47.0666420920129
datp_c	C10H12N5O12P3	-0.0114582929862282

Идентификатор	Формула	Стехиометрия
utp_c	C9H11N2O15P3	-0.139553051327532
thmpp_c	C12H16N4O7P2S	-0.000215957436615497
met__L_c	C5H11NO2S	-0.14883244216901
trp__L_c	C11H12N2O2	-0.0550478411189897
leu__L_c	C6H13NO2	-0.436302779712182
gln__L_c	C5H10N2O3	-0.254849143586252
10fthf_c	C20H21N7O7	-0.000215957436615497
gly_c	C2H5NO2	-0.593290278265672
amet_c	C15H23N6O5S	-0.000215957436615497
his__L_c	C6H9N3O2	-0.0917460790586501
phe__L_c	C9H11NO2	-0.179414145715561
atp_c	C10H12N5O13P3	-52.4155146188655
asp__L_c	C4H6NO4	-0.233442241629366
pydx5p_c	C8H8NO6P	-0.000215957436615497
uaagmda_c	C95H152N8O28P2	-0.0968418998275772
tyr__L_c	C9H11NO3	-0.133541106186236
ctp_c	C9H12N3O14P3	-0.129291683621802
mql8_c	C51H74O2	-9.68418998275772e-05
cys__L_c	C3H7NO2S	-0.0886878118620952
arg__L_c	C6H15N4O2	-0.286450592337987
ala__L_c	C3H7NO2	-0.497466186805283
zn2_c	Zn	-0.0332356868852644
fe3_c	Fe	-0.0389276218726522

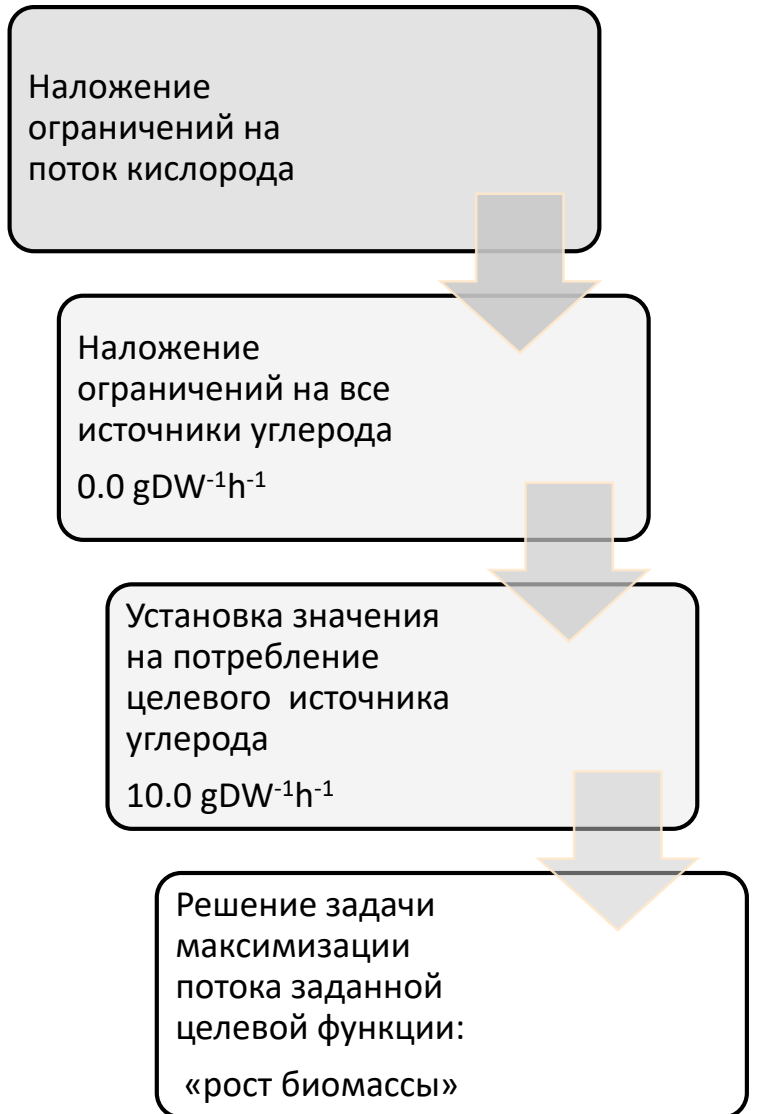
Идентификатор	Формула	Стехиометрия
dttp_c	C10H13N2O14P3	-0.0117989352923303
dctp_c	C9H12N3O13P3	-0.0144799266879183
dgtп_c	C10H12N5O13P3	-0.0127140840198214
nad_c	C21H26N7O14P2	-0.0032817885287191
nadh_c	C21H27N7O14P2	-0.00327680251610115
coa_c	C21H32N7O16P3S	-0.00284729052433628
nadp_c	C21H25N7O17P3	-0.00293620785264914
nadph_c	C21H26N7O17P3	-0.00293221599297493
amp_c	C10H12N5O7P	-0.0062974490405647
glu__L_c	C5H8NO4	-0.0148774528144029
pyr_c	C3H3O3	-0.0249719719581137
nh4_c	NH4	-0.120515445524632
h_c	H	-2.15678814560218
na1_c	Na	-0.094560017063166
cl_c	Cl	-0.0613181689413663
fe2_c	Fe	-0.0389276218726522
so4_c	SO4	-0.0226301707790364
k_c	K	-0.0556012165101363
cu2_c	Cu	-0.0342100689811831
ca2_c	Ca	-0.0542420540814976
mg2_c	Mg	-0.0894430382011216
mn2_c	Mn	-0.0395702629243034
ni2_c	Ni	-0.0370384582163968



Реакция функции роста биомассы. Визуализация выполнена в онлайн визуализаторе Escher.

Данные об условиях и скорости роста на различных источниках углерода

Анаэробные условия			
Субстрат	Рост биомассы	Скорость выхода L-валина	Конверсия углерода (в % от потребленного)
Глюкоза	0.152	2.0	18.32%
Рибоза	0.150	2.635	20.43%
Сахароза	0.463	6.0	18.32%
Фруктоза	0.136	-2.174	19.72%
Аэробные условия			
Глюкоза	0.571	-	-
Рибоза	0.719	-	-
Сахароза	1.089	-	-
Фруктоза	0.567	-	-
Ацетат	0.580	-	-
Лактат	0.639	-	-
Пируват	0.585	-	-
Пропионат	0.585	-	-
Сукцинат	0.585	-	-
Манноза	0.8610	-	-
Мальтоза	1.107	-	-

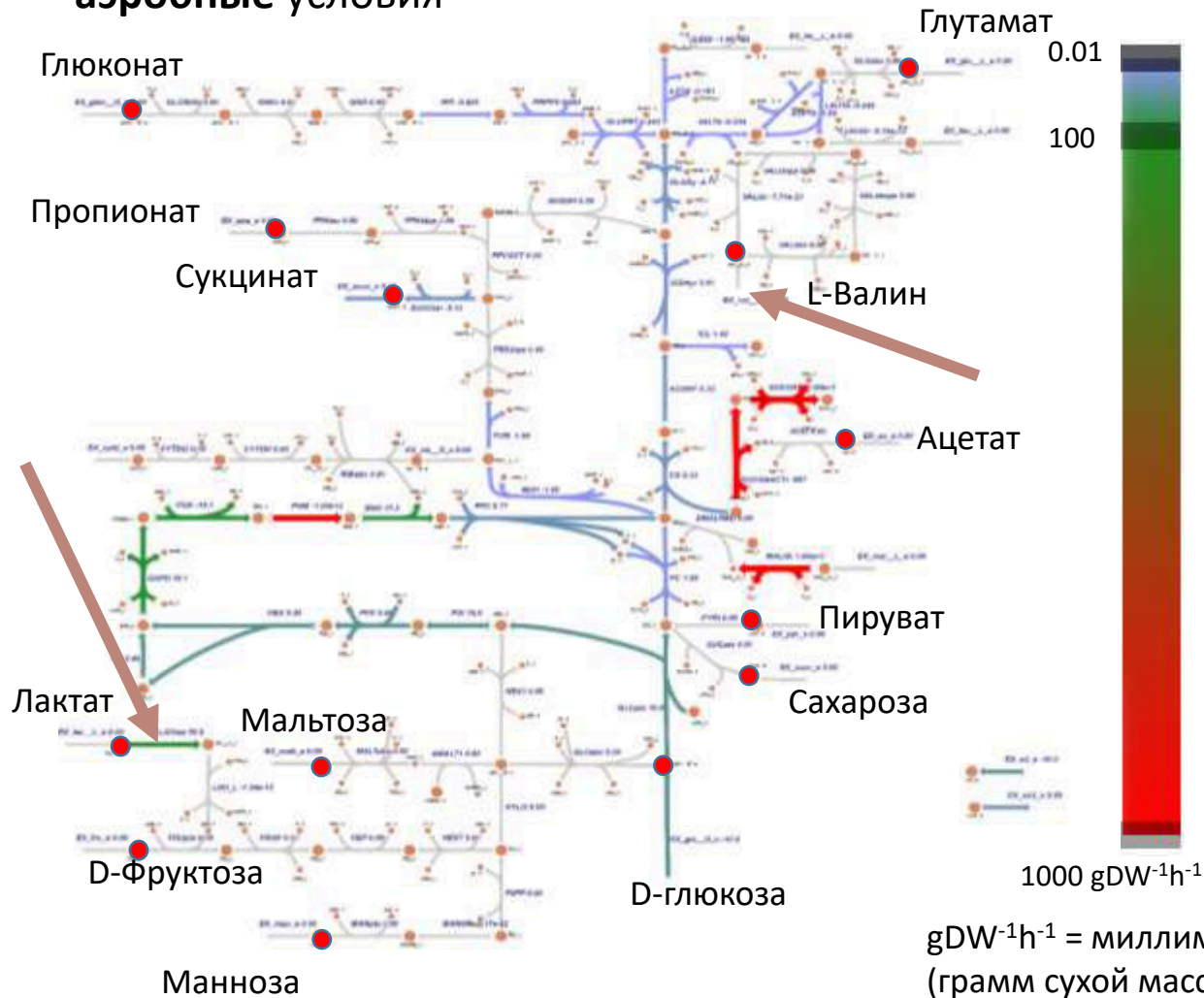


В ходе решения задачи оптимизации роста бактерии использовалась библиотека COBRApy (<https://cobrapy.readthedocs.io/en/latest/>).

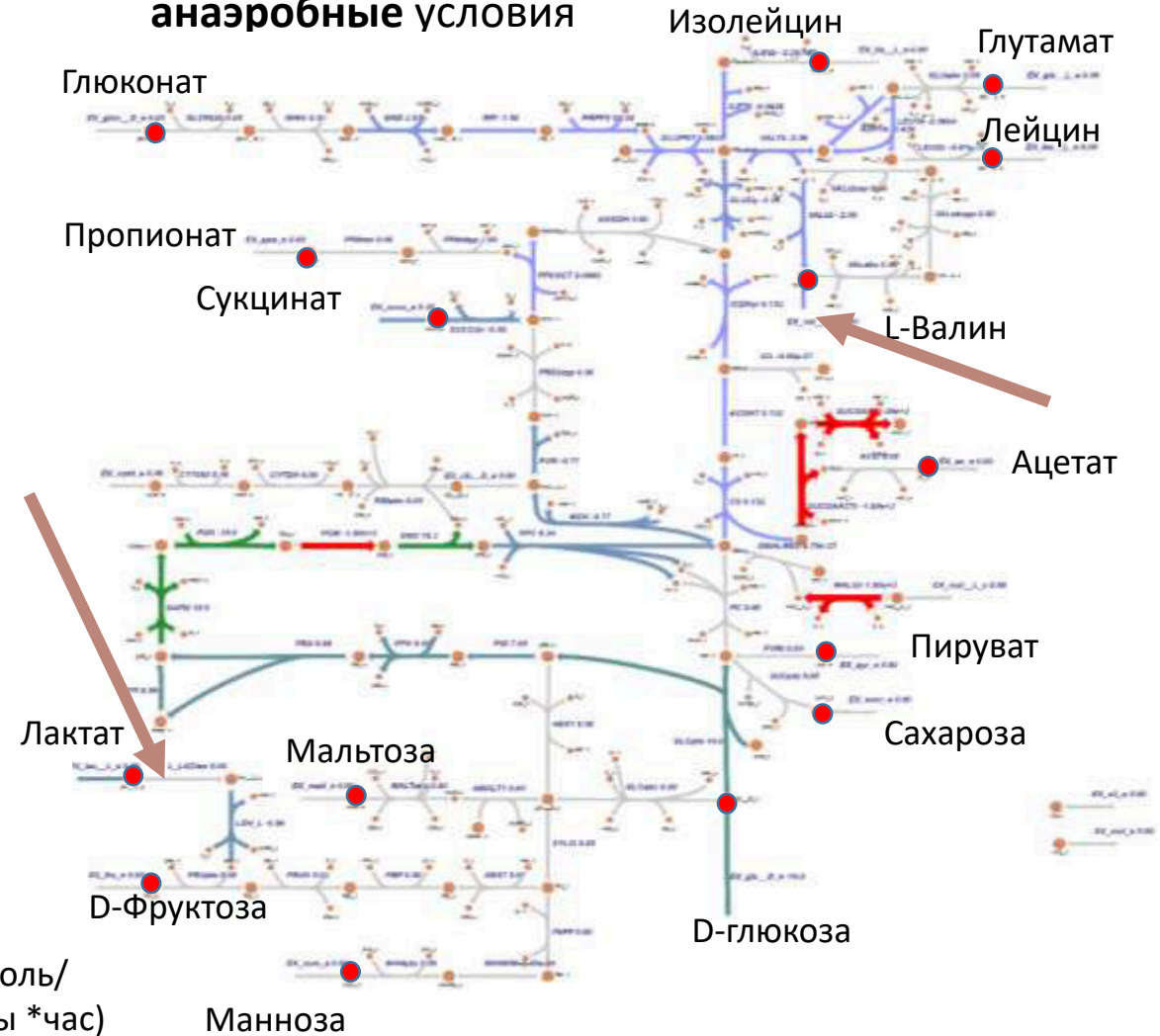
gDW⁻¹h⁻¹ = миллимоль/ (грамм сухой массы * час) 8

Решение задачи оптимизации роста биомассы на карте метаболитических путей. Субстратом является глюкоза.

аэробные условия

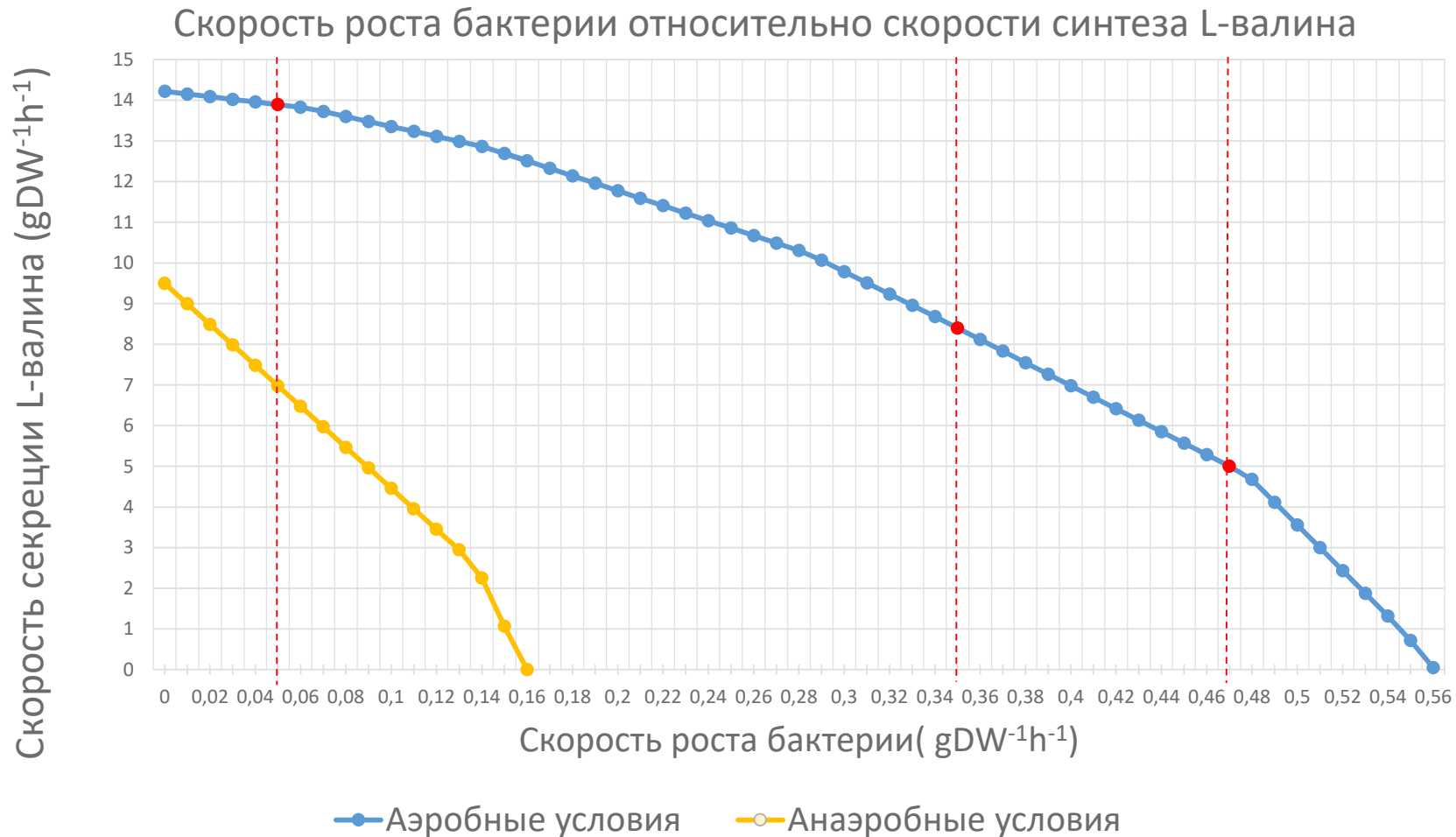


анаэробные условия



$\text{gDW}^{-1}\text{h}^{-1} = \text{миллимоляр} / (\text{грамм сухой массы} \cdot \text{час})$

Оценка соотношения максимального выхода L-валина в ограничениях на скорость реакции роста биомассы. Источником углерода является глюкоза.



Наложение ограничений на поток кислорода и все источники углерода

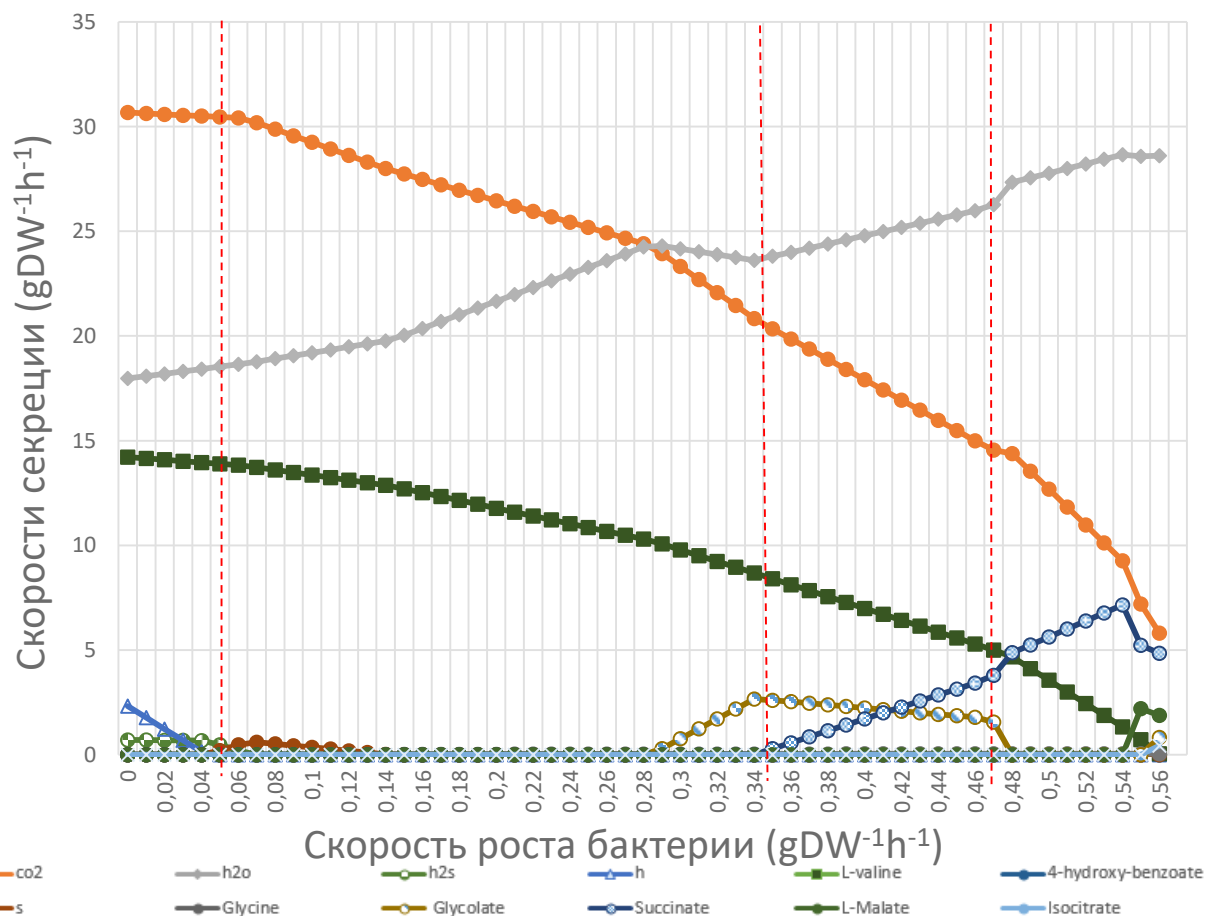
Установка значения на потребление целевого источника углерода
 $10 \text{ gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$

Наложение ограничений на поток через псевдо-реакцию
«рост биомассы»

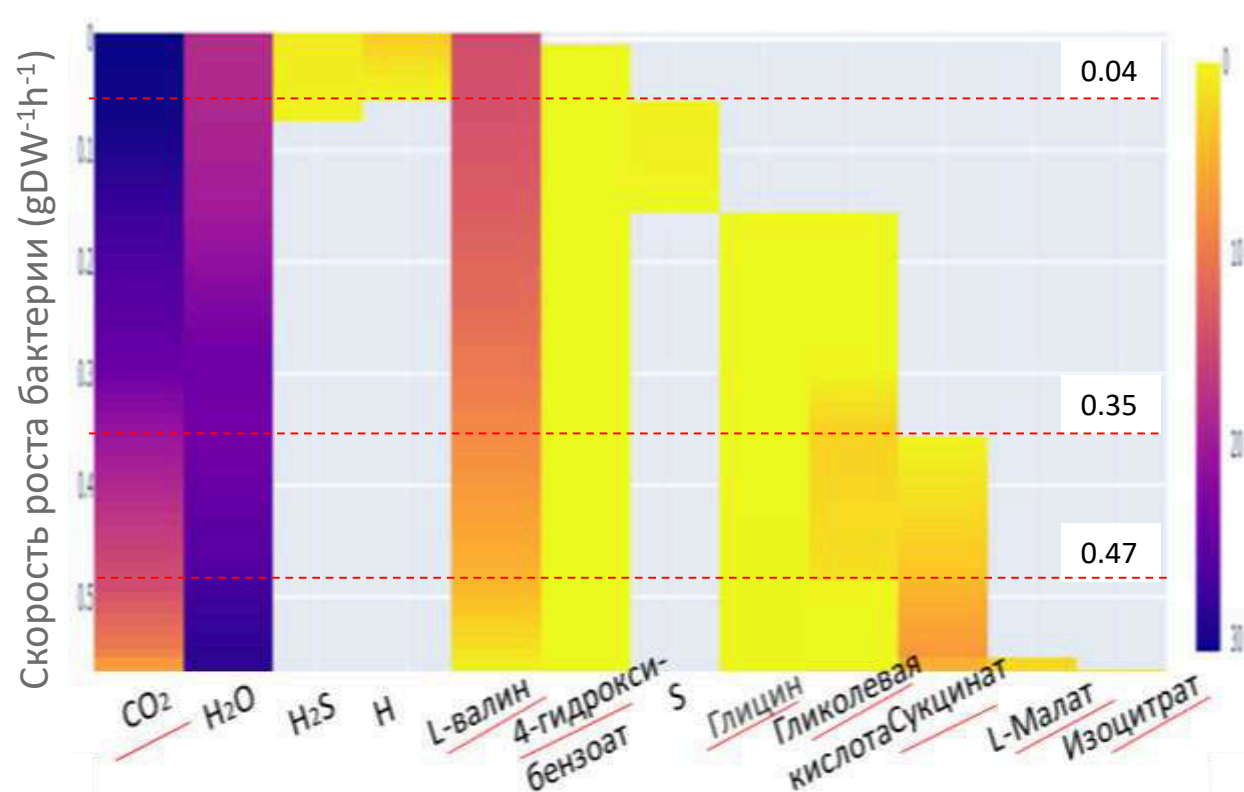
Решение задачи максимизации потока заданной целевой функции:
«секреция L-валина»

Оценка соотношения максимального выхода L-валина в ограничениях на скорость реакции роста биомассы. Источником углерода является глюкоза.

Секреции метаболитов относительно роста бактерии (аэробные условия)



Секреции метаболитов относительно роста бактерии (аэробные условия)



Отличия, заложенные в целевом штамме

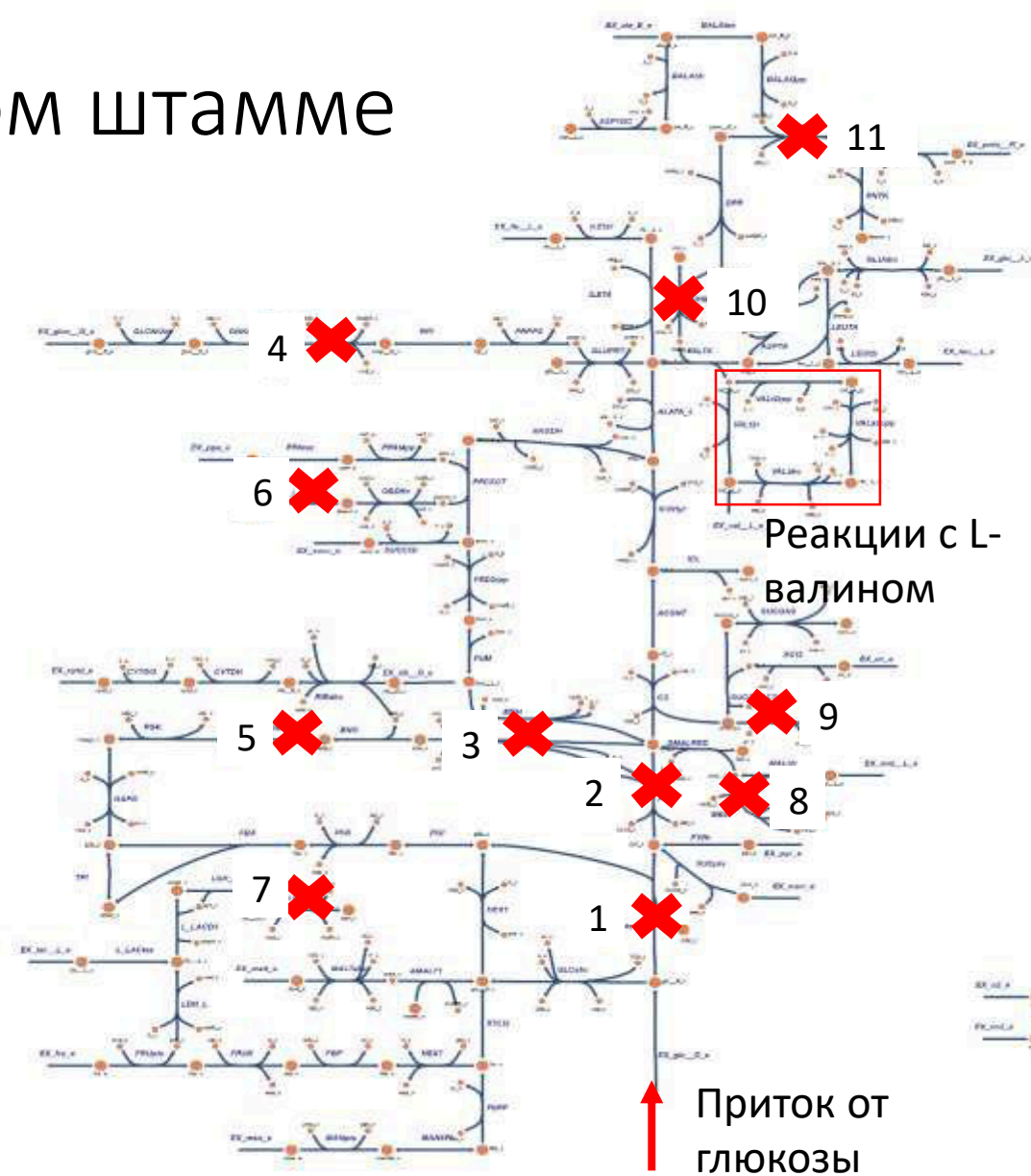
Corynebacterium glutamicum (B-5212) CH-59

Производимый продукт

L-валин

<https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/show21916/>

Номер реакции	Название гена	Название реакции в модели	Принадлежность к штамму B-5212
1	rmpC, cg3365	GLCpts	Отсутствует
2	pus	PC	Отсутствует
3	ppc	PPC	Отсутствует
4	gnd	GND	Отсутствует
5	pgm	PGM	Отсутствует
6	ilvA	THRD_L	Отсутствует
7	dld, cg1027	LDH_D	Отсутствует
8	malE cg3335	ME2	Отсутствует
9	pta	PTAr	Отсутствует
10	panB	MOHMT	Отсутствует
11	panC	PANTS	Отсутствует

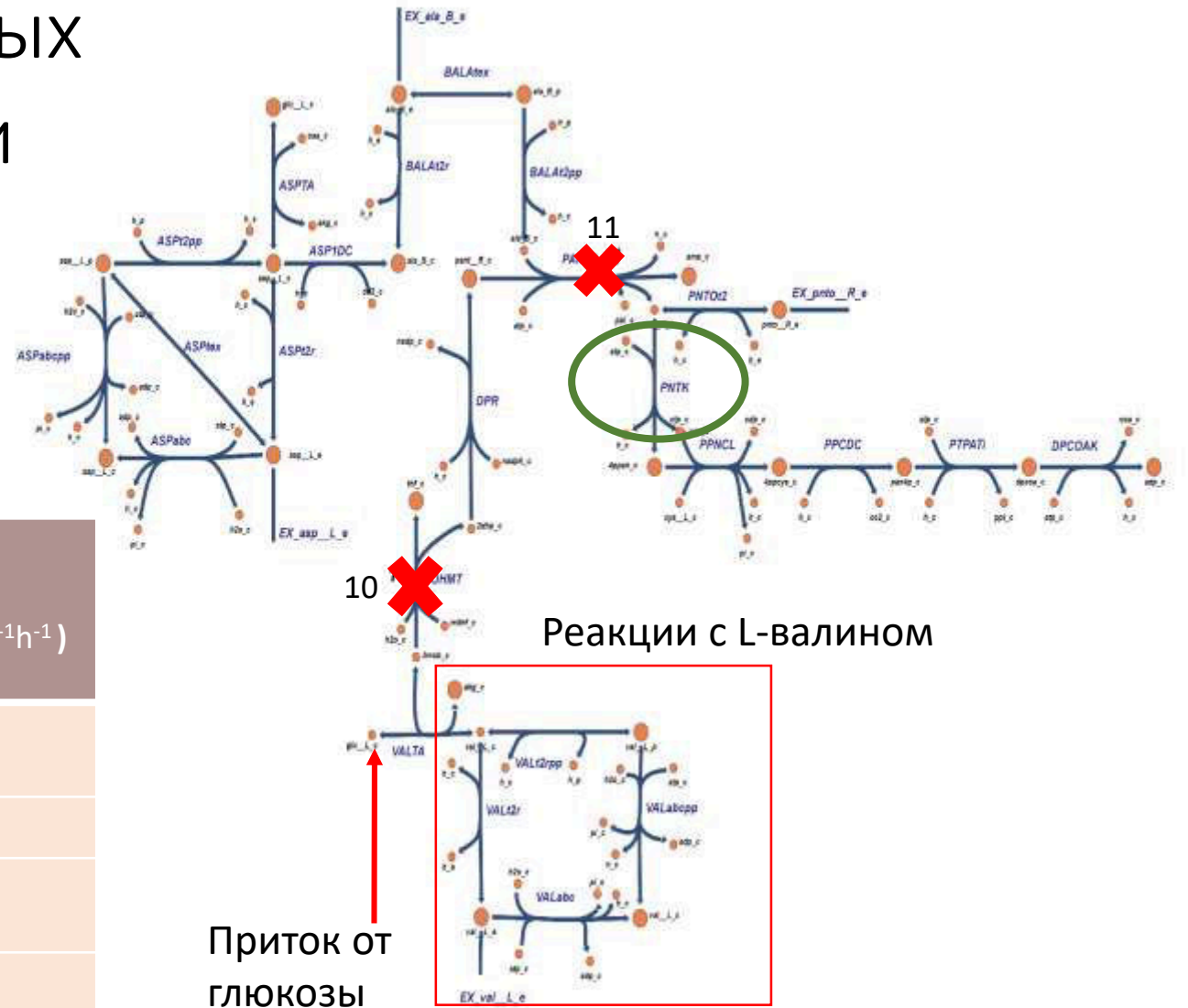


Карта утилизации источника углерода с учетом реакций, не реализующихся в штамме B-5212 .

Визуализация выполнена в онлайн визуализаторе Escher.

Результаты вычислительных экспериментов на модели целевого штамма B-5212

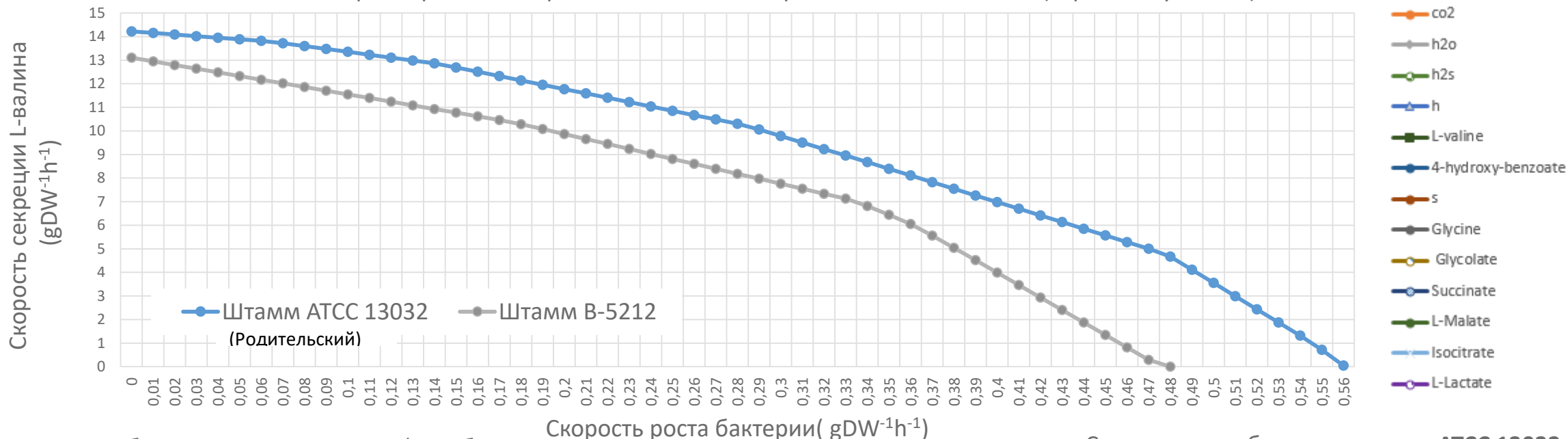
Максимизация функции реакции:	Условия роста бактерии	Величина реакции роста ($\text{gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Величина секреции L-валина ($\text{gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$)
Секреция L-валина	Аэробные ($10 \text{ gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0	13.2618
	Анаэробные	0	0
Рост бактерии	Аэробные ($10 \text{ gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0.4871	0
	Анаэробные	0	0



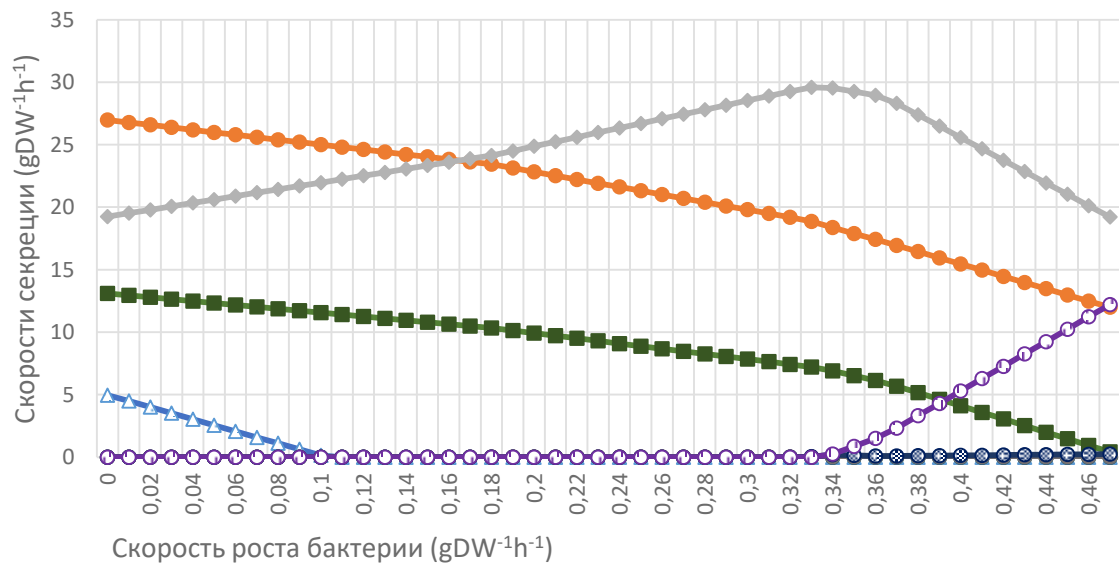
Фрагмент метаболической карты.
 10 - реакция MOHMT, 11 - реакция PANTS.

Визуализация выполнена в онлайн визуализаторе Escher

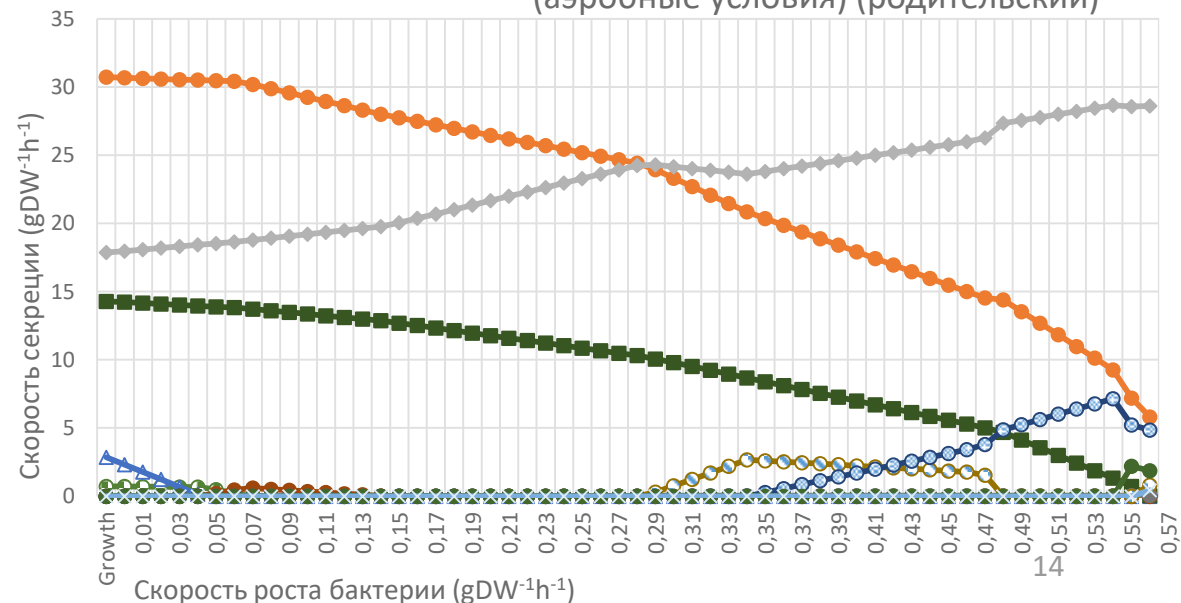
Скорость роста бактерии относительно скорости синтеза L-валина (аэробные условия)



Секреция метаболитов штамма B-5212 (аэробные условия)

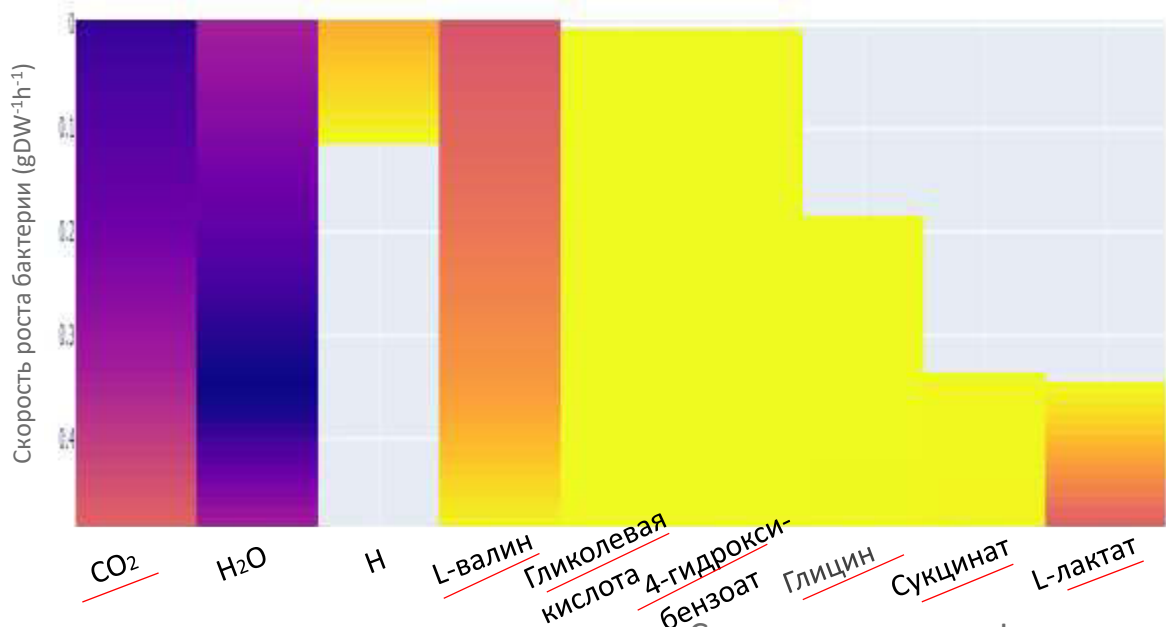


Секреция метаболитов штамма ATCC 13032 (аэробные условия) (родительский)

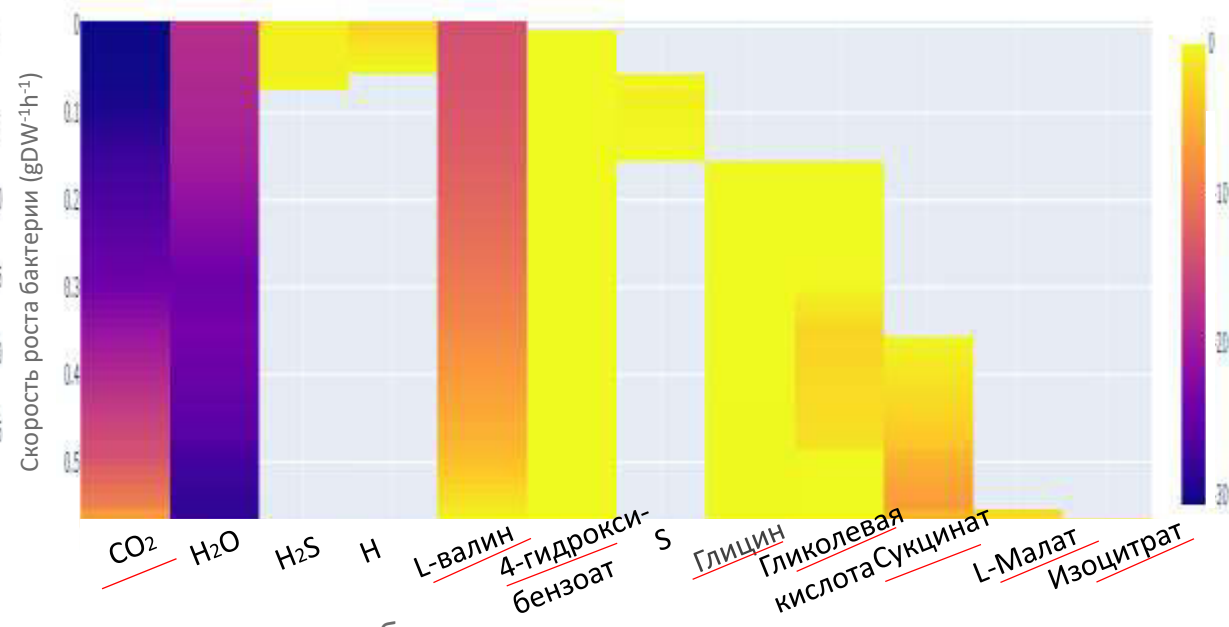


Секреции метаболитов относительно скорости роста биомассы бактерии

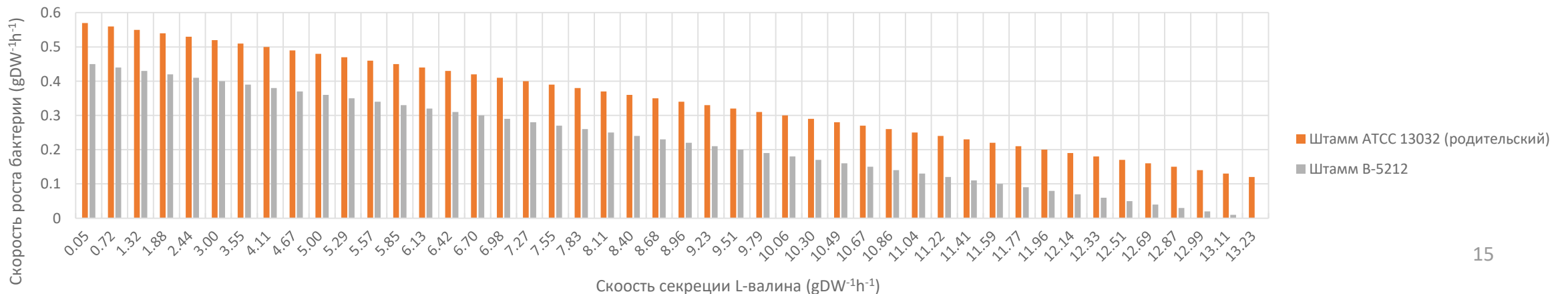
Штамм В-5212



Штамм ATCC 13032 (родительский)



Скорость секреции L-валина относительно скорости роста бактерии



Выводы:

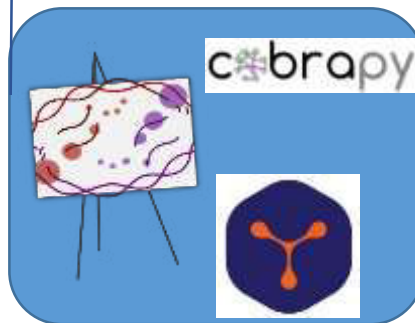
1. В работе был проанализирован метаболизм L-валина на математической модели *iCGB21FR* штамма бактерии *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. В рамках модели построены протоколы вычислительных экспериментов для анализа особенностей метаболизма на различных источниках углерода и при оптимизации секреции L-валина. Была построена серия метаболических карт, отражающих ключевые моменты метаболизма L-валина и перспективные точки воздействия на него.
2. Проведена адаптация модели для штамма *Corynebacterium glutamicum* В-5212, предоставленного ГосНИИгенетика, показана возможность роста бактерии на различных источниках углерода. Получены результаты по исследованию зависимости скорости экскреции валина от скорости роста биомассы этой модели.
3. Проведено сравнение моделей двух штаммов при росте на одинаковом субстрате, и показано, что оценка максимальной скорости роста штамма *Corynebacterium glutamicum* В-5212 ниже чем у родительского. При этом, условие одинакового выхода валина в штамме В-5212 достигается при меньшей скорости роста.
4. *Новые экспериментальные данные от ГосНИИГенетика, полученные в начале недели, показывают, что штамм В-5212 плохо растет на среде CGXII. Этот результат был продемонстрирован в вычислительных экспериментах. Что подтверждает прогностическое свойство предложенной модели.

План работы и сроки выполнения:

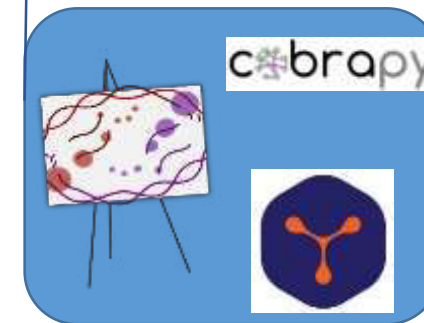
анализ литературы
выявление ключевых
аспектов метаболизма
Corynebacteria glutamicum

построение структурной
модели метаболического
пути L-валина

построение и валидация
поточковой модели
штамма
Corynebacterium glutamicum
B-5212



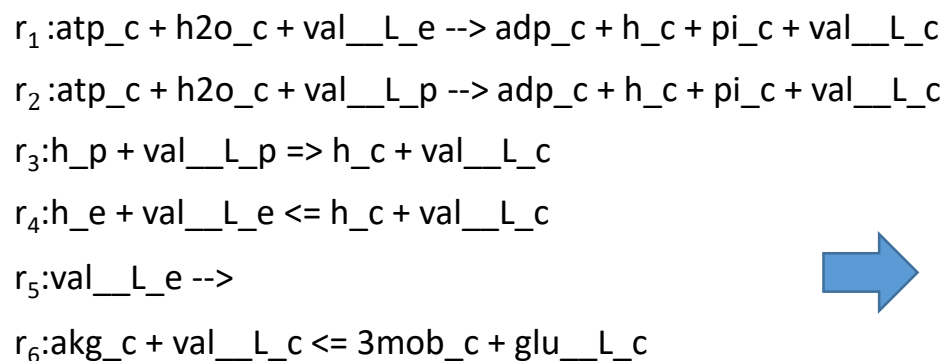
Выступление
на
конференции
МНСК 2022



Используемые в работе инструменты

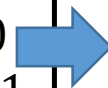
Анализ баланса потоков

Схема фрагмента метаболической сети



Стехиометрическая матрица (N)

	v_1	v_2	v_3	v_4	v_5	v_6
val_L_e	-1	0	0	1	-1	1
h2o_c	-1	-1	0	0	0	0
atp_c	-1	-1	0	0	0	0
adp_c	1	1	0	0	0	0
h_c	1	1	1	-1	0	0
pi_c	1	1	0	0	0	0
val_L_c	1	1	1	-1	0	-1
val_L_p	0	-1	-1	0	0	0
h_p	0	0	-1	0	0	0
h_e	0	0	0	1	0	0
akg_c	0	0	0	0	0	1
3mob_c	0	0	0	0	0	-1
glu_L_c	0	0	0	0	0	-1



Система обыкновенных дифференциальных уравнений

$$\frac{d_{\text{val_L_e}}}{dt} = -v_1 + v_4 - v_5 + v_5$$

$$\frac{d_{\text{h2o_c}}}{dt} = -v_1 - v_2$$

$$\frac{d_{\text{atp_c}}}{dt} = -v_1 - v_2$$

$$\frac{d_{\text{adp_c}}}{dt} = v_1 + v_2$$

$$\frac{d_{\text{h_c}}}{dt} = v_1 + v_2 + v_3 - v_4$$

$$\frac{d_{\text{pi_c}}}{dt} = v_1 + v_2$$

$$\frac{d_{\text{val_L_c}}}{dt} = v_1 + v_2 + v_3 - v_4 - v_6$$

$$\frac{d_{\text{val_L_p}}}{dt} = -v_2 - v_3$$

$$\frac{d_{\text{h_p}}}{dt} = -v_3$$

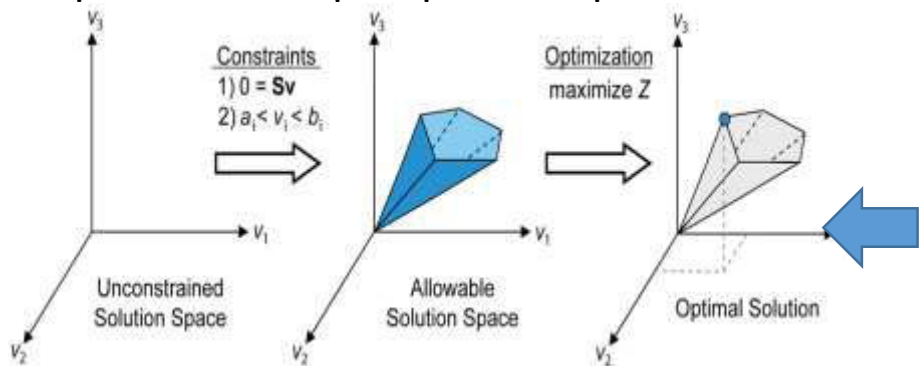
$$\frac{d_{\text{h_e}}}{dt} = v_4$$

$$\frac{d_{\text{akg_c}}}{dt} = v_6$$

$$\frac{d_{\text{glu_L_c}}}{dt} = -v_6$$

$$\frac{d_{\text{3mob_c}}}{dt} = -v_6$$

Ограничение пространства решений



Допущение о равновесии

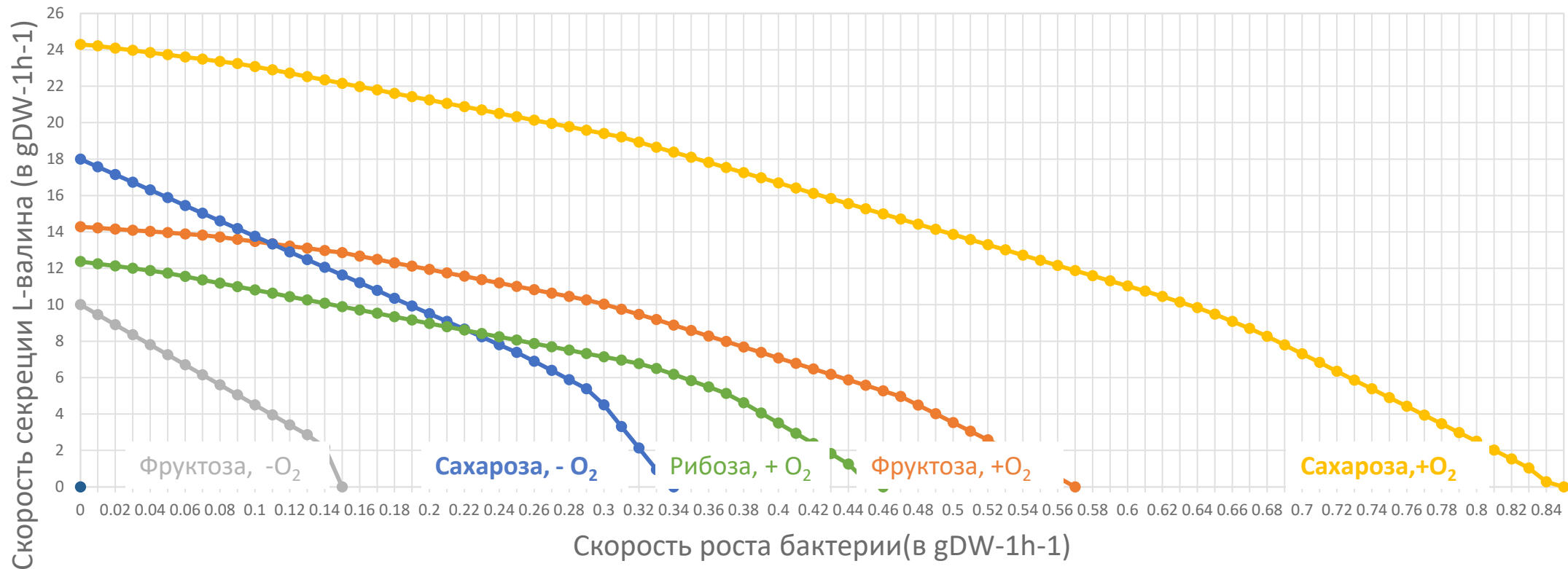
$$\frac{dS}{dt} = Nv = 0, \text{ где } 0 = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \cdot \\ \cdot \\ 0 \end{pmatrix}$$



Анаэробные условия (В-5212)				Анаэробные условия (родительский)			
Субстрат	Рост биомассы	Скорость выхода L-валина	Конверсия углерода (в % от потребленного)	Субстрат	Рост биомассы	Скорость выхода L-валина	Конверсия углерода (в % от потребленного)
Глюкоза	-	-	-	Глюкоза	0.152	-2.0	18.32%
Рибоза	-	-	-	Рибоза	0.150	-2.635	20.43%
Сахароза	-	-	-	Сахароза	0.463	-6.0	18.32%
Фруктоза	-	-	-	Фруктоза	0.136	-2.174	19.72%
Аэробные условия				Аэробные условия			
Глюкоза	0.487	-	-	Глюкоза	0.571	-	-
Рибоза	0.440	-	-	Рибоза	0.719	-	-
Сахароза	0.801	-	-	Сахароза	1.089	-	-
Фруктоза	0.539	-	-	Фруктоза	0.567	-	-
Ацетат	0.269	-	-	Ацетат	0.580	-	-
Лактат	0.353	-	-	Лактат	0.639	-	-
Пируват	0.289	-	-	Пируват	0.585	-	-
Пропионат	0.270	-	-	Пропионат	0.585	-	-
Сукцинат	0.289	-	-	Сукцинат	0.585	-	-
Манноза	0.580	-	-	Манноза	0.8610	-	-
Мальтоза	0.839	-	-	Мальтоза	1.107	-	-

Оценка соотношения максимального выхода L-валина в ограничениях на реакцию роста биомассы на разных источниках углерода.

Скорость роста бактерии относительно скорости синтеза L-валина



- Фруктоза, аэробные условия
- Фруктоза, анаэробные условия
- Сахароза, аэробные условия
- Сахароза, анаэробные условия
- Рибоза, аэробные условия
- Рибоза, анаэробные условия

Конверсия углерода

- Конверсия углерода - процесс перехода углерода из одного вещества в другое. В процессе конверсии происходит перераспределение углерода между разными веществами в разных пропорциях.
- Модель является способом оценки количественного определения процента конверсии углерода между органическими соединениями при решении задачи оптимизации.

Результаты

1. Освоены методы моделирования
2. Построены метаболические карты
3. Подготовлены вычислительные протоколы для дальнейшего анализа целевого штамма бактерии

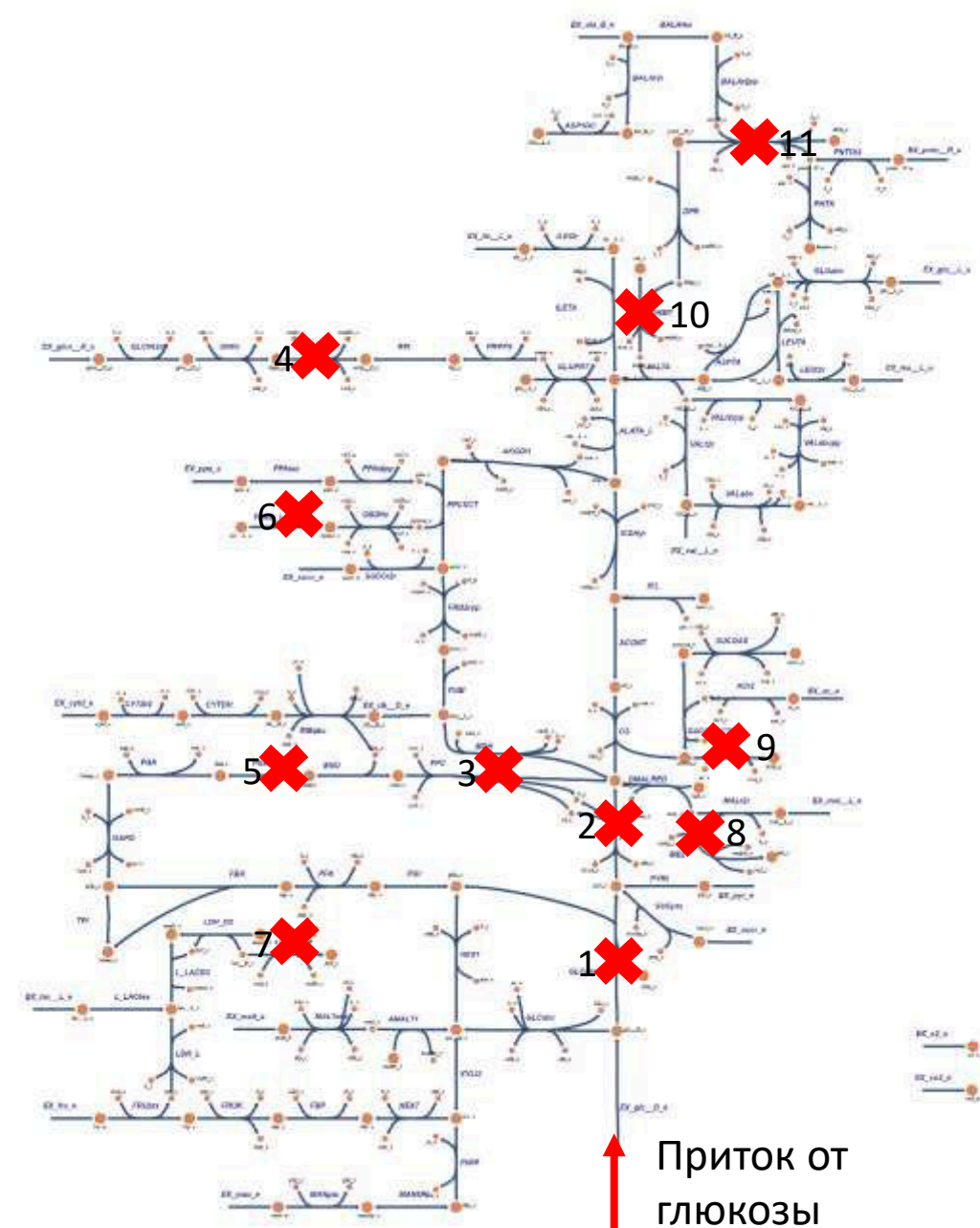
Corynebacterium glutamicum (B-5212) CH-59

Производимый продукт

L-валин

<https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov/show21916/>

Номер реакции	Название гена	Название реакции в модели	Принадлежность к штамму B-5212
1	rmpC, cg3365	GLCpts	Отсутствует
2	pus	PC	Отсутствует
3	ppc	PPC	Отсутствует
4	gnd	GND	Отсутствует
5	pgm	PGM	Отсутствует
6	ilvA	THRD_L	Отсутствует
7	dld, cg1027	LDH_D	Отсутствует
8	malE cg3335	ME2	Отсутствует
9	pta	PTAr	Отсутствует
10	panB	MOHMT	Отсутствует
11	panC	PANTS	Отсутствует



Карта утилизации источника углерода с учетом реакций, не реализующихся в штамме B-5212 .

Визуализация выполнена в онлайн визуализаторе Escher.