

УДК: 517.91+577.1

Стехиометрия метаболических путей в динамике клеточных популяций

И. Г. Минкевич

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН,
Россия, 142290, Московская обл., г. Пушкино, Проспект Науки, 5
e-mail: minkevich@ibpm.pushchino.ru

Получено 26 октября 2011 г.

Проанализированы проблемы соответствия кинетических моделей клеточного метаболизма описываемому ими объекту. Изложены основы стехиометрии полного метаболизма и его больших частей. Описана биоэнергетическая форма стехиометрии, основанная на универсальной единице восстановленности химических соединений (редоксон). Выведены уравнения материально-энергетического баланса (биоэнергетической стехиометрии) метаболических потоков, в том числе баланса протонов с высоким электрохимическим потенциалом μ_{H^+} и макроэнергетических соединений. Получены соотношения, выражающие выход биомассы, скорость потребления источника энергии для роста и другие физиологически важные величины через биохимические характеристики клеточной энергетики. Вычислены значения максимального энергетического выхода биомассы при использовании клетками различных источников энергии. Эти значения совпадают с экспериментальными данными.

Ключевые слова: кинетические модели, законы сохранения, биоэнергетика, выход биомассы, скорость потребления источника энергии, поддержание клеток

The stoichiometry of metabolic pathways in the dynamics of cellular populations

I. G. Minkevich

*The Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences
Prospekt Nauki, 5, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*

Abstract. – The problem has been considered, to what extent the kinetic models of cellular metabolism fit the matter which they describe. Foundations of stoichiometry of the whole metabolism and its large regions have been stated. A bioenergetic representation of stoichiometry based on a universal unit of chemical compound reductivity, viz., redoxon, has been described. Equations of mass-energy balance (bioenergetic variant of stoichiometry) have been derived for metabolic flows including those of protons possessing high electrochemical potential μ_{H^+} , and high-energy compounds. Interrelations have been obtained which determine the biomass yield, rate of uptake of energy source for cell growth and other important physiological quantities as functions of biochemical characteristics of cellular energetics. The maximum biomass energy yield values have been calculated for different energy sources utilized by cells. These values coincide with those measured experimentally.

Keywords: kinetic models, conservation laws, bioenergetics, biomass yield, energy source uptake rate, cell maintenance

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2011, vol. 3, no. 4, pp. 455–475 (Russian).

Введение

Математический аппарат дифференциальных уравнений является одним из наиболее широко используемых инструментов в математическом моделировании динамических систем самой различной природы. Среди этих систем живые клетки и их сообщества (популяции одноклеточных организмов, ткани растений и животных) занимают особое место. Все преобразования вещества в метаболизме клеток происходят в жестких рамках законов сохранения количества каждого химического элемента и электрического заряда. Для отдельной биохимической (или химической) реакции это приводит к тому, что, как правило, соотношения между реагентами однозначно определены в виде стехиометрических коэффициентов. Роль стехиометрических закономерностей в функционировании больших или очень больших совокупностей реакций обращает на себя гораздо меньшее внимание исследователей, чем кинетические механизмы, обуславливающие влияние условий среды на скорость процессов метаболизма клеток. Данная работа посвящена рассмотрению того, как влияют стехиометрические рамки на динамику роста клеточных сообществ, прежде всего – популяций одноклеточных организмов.

Неструктурированные модели

Рассмотрим случай, когда клетки получают и вещество, и энергию для роста из потребляемых веществ (субстратов). В случае, когда рассматриваются один субстрат и один продукт метаболизма, уравнения кинетики роста в проточной среде имеют вид [Перт, 1978; Паников, 1992]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX, \quad \frac{dS}{dt} = -q_s X + DS_f - DS, \quad \frac{dP}{dt} = q_p X - DP, \quad (1)$$

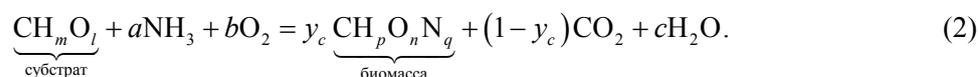
где X , S и P – концентрации биомассы клеток, субстрата и продукта соответственно; μ , q_s и q_p – удельные (то есть в расчете на единицу сухой массы клеток) скорости роста, потребления субстрата и образования продукта; D – скорость протока среды через пространство с клетками, S_f – концентрация субстрата в приточной среде. Здесь предполагается пространственная однородность системы. Если известна зависимость μ , q_s и q_p от S и P , а также величина D , то (1) является системой обыкновенных дифференциальных уравнений. В случае, когда необходимо рассматривать более чем один субстрат или продукт, такая система включает большее число аналогичных уравнений. Это – так называемая неструктурированная модель, то есть модель, не учитывающая внутриклеточных переменных (чаще всего – концентраций).

Стехиометрические ограничения, основанные на законах сохранения вещества, приводят к тому, что μ , q_s и q_p оказываются взаимосвязанными. Например, углерод субстрата распределяется по двум путям – в биомассу и продукты. Если σ_s , σ_b и σ_p – доля углерода в субстрате, сухом веществе клеток и в продуктах, то $\sigma_s q_s = \sigma_b \mu + \sigma_p q_p$. Это уменьшает число независимых скоростей в правых частях (1). Если к тому же оказывается, что известен выход биомассы из субстрата $Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_s}$, то для формулирования математической модели (1) необходимо знать зависимость только одной из трех скоростей от фазовых переменных S и P .

В связи со сказанным возникает два вопроса. Как повлияет на математическую модель роста клеточной популяции учет других химических элементов? Откуда может быть известен $Y_{X/S}$?

Учет других химических элементов приводит к необходимости рассмотрения большего числа субстратов. Наибольшее содержание в сухой биомассе имеют следующие элементы: С, Н, О, N. Если рост популяции не лимитирован недостатком фосфора, магния и других элементов, то можно ограничиться учетом только С, Н, О, N. Например, при аэробном росте мик-

робной культуры, не сопровождающемся образованием заметного количества органических продуктов, уравнение элементного баланса роста имеет вид [Minkevich and Eroshin, 1973; Минкевич, 2005]:



Состав субстрата и биомассы здесь взят в обобщенном виде. Баланс углерода уже учтен. Коэффициенты a, b и c легко находятся балансированием левой и правой частей по каждому элементу: они зависят от y_c . Значение $y_c = \frac{\sigma_B}{\sigma_S} Y_{X/S}$.

Вопрос о том, откуда взять величину выхода биомассы $Y_{X/S}$ – более сложный. Для каждого вида клеток значение $Y_{X/S}$ может быть взято из эксперимента. Однако эта величина не постоянна, что осложняет ее экспериментальное определение. На основе общих соображений о делении затрат субстрата на две части (рост и поддержание клеток) было найдено, что $Y_{X/S}$ и удельная скорость потребления субстрата-источника энергии q_S зависят от скорости роста μ следующим образом [Иерусалимский, 1963; Pirt, 1965; Перт, 1978]:

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_{X/S}^G} + \frac{m_S}{\mu}, \quad q_S = m_S + \frac{\mu}{Y_{X/S}^G}. \quad (3)$$

Параметры $Y_{X/S}^G$ и m_S имеют важное физиологическое значение. В клетках существует неизбежная внутренняя диссипация – самопроизвольный распад макромолекул и структур, утечка веществ через мембраны и т. д., которая должна компенсироваться. Распад и восстановление образуют кругооборот вещества и энергии в клетках. Величина m_S является удельной скоростью затраты субстрата на обеспечение энергией процессов восстановления, совокупность которых получила название «поддержание клеток» (cell maintenance) [Pirt, 1965; Pirt, 1975]. Параметр $Y_{X/S}^G$ (так называемый истинный выход) равен значению выхода биомассы в случае, если бы процессы распада в клетках отсутствовали. Соотношения (3), по существу, являются отступлением от неструктурированности модели – они «вторгаются» в метаболизм.

Структурированные модели

Моделей, учитывающих кинетику внутриклеточных веществ, в литературе огромное множество [Паников, 1992]. Считается, что они гораздо более приближены к действительности, чем неструктурированные модели. Однако само формулирование этих моделей связано с рядом трудностей.

Прежде всего, учесть концентрации всех метаболитов в модели невозможно. К тому же кинетические константы, описывающие активность ферментов, определены экспериментально для меньшинства ферментов. Эту трудность обычно преодолевают на основе представления об «узком месте» – небольшом числе реакций, которые задают общую скорость метаболизма. Такое представление хорошо работает в случае, когда какая-то группа ферментов функционирует с максимальной скоростью, на которую она способна. Но при лимитировании роста каким-то субстратом, когда его содержание в среде низкое, можно с достаточной уверенностью считать, что все ферменты не находятся в насыщении своими внутриклеточными субстратами. Это подтверждается экспериментально тем, что клетки мгновенно реагируют на добавление небольшого количества лимитирующего субстрата в среду [Дудина, 1979]. Тогда становится непонятно, что такое «узкое место». Вообще, эта концепция, на наш взгляд, до сих пор является гипотезой, требующей специального анализа.

Другим важным фактором является пространственная неоднородность как внутри клеток, так и в масштабе «клетки–среда». Несмотря на то, что существование тонкой внутриклеточной структуры давно известно, при составлении моделей до сих пор доминирует взгляд на клетку как на «мешок с ферментами», то есть нечто однородное внутри. Пространственные разграничения внутри клеток (компарментализация) учитываются редко, так как существенно усложняют систему уравнений. Открытие высокоорганизованных полиферментных комплексов, так называемых метаболонов [Srere, 1985; Srivastava and Bernard, 1986], показало, что в клетках существует ультратонкая структура, в частности, характеризующаяся наличием очень малых внутренних пространств, куда обращены активные центры ферментов комплекса. В это пространство попадает субстрат первого фермента данного пути, выходит продукт последнего фермента, а промежуточные метаболиты остаются внутри и не проникают ни наружу, ни внутрь из окружения метаболона. Есть основания считать, что внутри метаболонов может не быть воды, представление о водном растворе метаболитов внутри клетки в этом случае не работает.

Там же, где вода присутствует, внутренняя среда в клетке скорее напоминает гель, чем разбавленный раствор. Содержание сухого вещества в клетках составляет 20÷25% от их влажной массы. В такой среде константы скоростей реакций и связанные с ними константы равновесия могут существенно отличаться от получаемых *in vitro* в разбавленных растворах ферментов и их метаболитов. Например, для малатдегидрогеназной реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК, другое название – цикл Кребса) разность свободной энергии между продуктами и субстратами ΔG° , согласно данным, полученным в разбавленном растворе, составляет 30 кДж/моль [Nelson and Cox, 2008]. Это означает, что равновесие реакции сильно смещено в направлении против обычной работы цикла. Тем не менее, ЦТК в клетках работает в обоих направлениях.

Следует учесть, что содержание молекул в малых пространствах может быть настолько низким, что представление о концентрации, макроскопическое по сути, оказывается некорректным. В качестве примера клетки или субклеточного отсека рассмотрим сферу с тремя вариантами радиуса r , мкм: 1, 0.1 и 0.01. При концентрации 1 мМ (миллимоль на литр) число молекул данного типа внутри сферы будет 2.5×10^6 , 2.5×10^3 и 2.5 соответственно. Последняя цифра является формальной. При концентрации 1 мкМ (микромоль на литр) числа молекул будут меньше в 1000 раз, и тогда формальное содержание 2.5 будет при $r = 0.1$ мкм. Концентрация протонов при $\text{pH} = 7$ равна 10^{-7} М, тогда уже при $r = 1$ мкм сфера содержит всего 250 ионов H^+ . При таких содержаниях метаболитов понятие концентрации перестает работать и требуется математический аппарат не ОДУ, а теории случайных процессов.

Наконец, серьезным фактором является пространственная изоляция внутреннего содержимого клеток друг от друга. Если в отдельных клетках имеют место регулярные или хаотические колебания метаболитов, то они могут быть согласованы по фазе только при наличии механизма, обеспечивающего взаимодействие клеточных осцилляторов между собой. Такие механизмы могут использовать метаболиты, выделяемые во внеклеточную среду, световое излучение клеток (например, флуоресценцию фотосистем), прямые контакты клеток в тканях или при достаточно высокой их концентрации в культуре и т. д. В отличие от тканей в популяциях одноклеточных организмов (бактерии, дрожжи, водоросли), однако, контактное взаимодействие при обычных концентрациях клеток невелико. Такой важный процесс, как клеточный цикл, при росте одноклеточных в перемешиваемой среде обычно проходит несинхронно, если нет внешнего синхронизирующего воздействия. О возможности взаимодействия клеток друг с другом говорят, в частности, имеющиеся в литературе данные о колебаниях количества образуемого ими углекислого газа. Но представление о среде с растущими в ней клетками как о гомогенном растворе метаболитов и ферментов имеет полное соответствие объекту только для бесклеточного экстракта – раствора содержимого клеток, получаемого после их жесткой дезинтеграции.

Сказанное говорит о существовании серьезных проблем, связанных с самим кинетическим подходом, применяемым при моделировании. В то же время стехиометрический подход к метаболизму в значительной степени свободен от этих трудностей и позволяет с высокой достоверностью учитывать биохимические свойства всего метаболизма.

Стехиометрия больших частей метаболизма. 1

Стехиометрия отдельных реакций имеет, как правило, фиксированный характер – коэффициенты при участниках реакции строго заданы законами сохранения (см. выше) и могут меняться, только оставаясь в жестких пропорциях. Например, $2\text{H}_2 + \text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O}$, $4\text{H}_2 + 2\text{O}_2 = 4\text{H}_2\text{O}$ и $\text{H}_2 + \frac{1}{2}\text{O}_2 = \text{H}_2\text{O}$ – это одна и та же реакция. Но наличие большого числа реакций, среди которых многие образуют параллельные пути, имеющие общие реагенты, приводит к тому, что стехиометрия всего метаболизма или больших его частей приобретает определенную гибкость, становится нефиксированной. Это видно, например, из уравнения (2). В нем гибкость проявляется в нефиксированности величины y_c , которая описывает распределение углерода, поступающего в метаболизм, между «выходными» потоками. Метаболизм в этом случае рассматривается как «черный ящик».

Представляет большой интерес задача о влиянии параметров больших частей метаболизма на общую стехиометрию роста популяции клеток. Здесь возникает вопрос о том, как следует делить метаболизм на части. В классической биохимии существуют понятия катаболизма, анаболизма и амфиболизма [Nelson and Cox, 2008], объединяющие, соответственно, реакции деградации сложных субстратов до малых фрагментов, синтез макромолекул клетки из молекул-предшественников и совокупность промежуточных реакций. Каждый из таких больших потоков является объединением биохимических реакций, причем число реакций-участников может быть самым разным. Существуют и другие объединения, например, относящиеся к клеточному дыханию и фотосинтезу. Объединение реакций в такие «блоки» производится в топологическом плане (по их связности друг с другом) и по роли в жизни клеток, в том числе в биоэнергетическом аспекте. Анаболизм в целом потребляет энергию макроэргических связей (МЭС), имеющихся в молекулах АТФ, ГТФ, ацетил-КоА и ряде других [Buchanan, et al., 2000; Nelson and Cox, 2008]. Эти внутримолекулярные связи служат переносчиком энергии и имеют близкую друг к другу величину (около 30 кДж/моль) во всех содержащих их молекулах. Поэтому в энергетическом (но не в кинетическом, регуляторном) аспекте макроэргические связи всех соединений-переносчиков образуют единый, легко обменивающийся внутри себя пул.

Главная роль МЭС в синтезе макромолекул состоит в обеспечении течения этих реакций только в направлении их образования, исключая обратный ход процесса. В низкомолекулярных частях метаболизма участие МЭС позволяет изменить направление реакций, которые при отсутствии сопряжения с расщеплением, например, АТФ необратимо протекали бы в направлении, неправильном с точки зрения целостного метаболизма.

Образуются макроэргические связи в клетках двумя способами: 1) в реакциях, где метаболиты, дающие энергию для МЭС, и соединение-носитель МЭС являются реагентами одной реакции; это, например, так называемое субстратное фосфорилирование, при котором нуклеозиддифосфаты (АДФ и др.) превращаются в нуклеозидтрифосфаты (АТФ и др.); 2) при работе электрон-транспортных цепей, ЭТЦ (клеточное дыхание и фотосинтез). В обоих случаях энергия образуемых МЭС берется за счет сопряжения с необратимыми реакциями, в которых без такого сопряжения происходило бы большое падение свободной энергии. В отличие от способа 1 образование АТФ при работе электрон-транспортных цепей происходит через энергоноситель-посредник – протоны, обладающие высоким электрохимическим потенциалом μ_{H^+} [Скулачев, 1989; Buchanan, Gruijssem and Jones, 2000; Рубин, 2000; Nelson and Cox, 2008]. Компоненты ЭТЦ погружены в мембраны, окружающие соответствующие органеллы клеток (митохондрии и тилакоиды). Транспорт электронов сопряжен с переносом протонов через мембрану в область высокого μ_{H^+} . Другая часть процесса передачи энергии в образуемые макроэргические связи происходит отдельно от процессов окисления-восстановления. Осуществляется она уникальной молекулярной машиной – АТФ-синтазой, которая образует АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет обратного перехода протонов в область низкого μ_{H^+} .

Содержание макроэргических соединений в клетках невелико, но их оборот весьма значителен: они с большой скоростью получают энергию в одних реакциях и отдают ее в других.

Биоэнергетическая форма стехиометрии

Измерение количества того или иного вещества в традиционных единицах – молях, граммах или грамм-атомах углерода молекул – не отражает запас энергии вещества и, соответственно, его роли в энергетике целого метаболизма. Как известно, направление реакций зависит от баланса в них стандартной свободной энергии Гиббса G° (разность G° реакции определяет константу равновесия), а тепловыделение задается разностью энтальпии реагентов H° [Пригожин, Дефэй, 1966; Пригожин, Кондепуди, 2002]. Молярные и удельные значения этих величин сильно различаются в разных веществах. Было найдено, однако, что органические вещества обладают уникальным свойством: изменения H° и G° при окислении их свободным кислородом пропорциональны количеству прореагировавшего O_2 [Thornton, 1917; Kharasch and Sher, 1925; Kharasch, 1929], причем коэффициент пропорциональности близок к постоянной величине.

На этой основе возникло понятие «доступного электрона» как меры восстановленности органических веществ [Payne, 1970]. Развитие этого подхода привело к разработке универсальной единицы восстановленности любых веществ редоксона (RO) [Minkevich, 1982; Минкевич, 2005]. Число редоксонов в молекуле описывает ее восстановленность относительно общего нулевого уровня, присвоенного совокупности базисных веществ: двуокись углерода, вода, аммоний, ортофосфат и ряд других. Эта совокупность веществ названа физиологическим базисом. (В отличие от него множество всех простых веществ, каждое из которых содержит только один химический элемент, относительно которого в химии принято отсчитывать значения всех термодинамических потенциалов, названо химическим базисом.)

Элементный состав любого соединения может быть представлен в альтернативной форме: оно рассматривается как сумма базисных веществ, откуда удалено необходимое количество кислорода (тем самым производится восстановление относительно уровня базисных веществ). Редоксон в плане элементного состава соответствует $-(1/4)O_2$; поэтому удаление кислорода означает вложение редоксонов. По данным для $\sim 10^2$ органических соединений различных типов, стандартная свободная энергия редоксона G^{RO} в среднем равна $\langle G^{RO} \rangle = 116.6$ кДж/экв. RO ($\pm 4\%$), энтальпия H^{RO} близка к $\langle H^{RO} \rangle = 111.5$ кДж/экв. RO ($\pm 3\%$); для сухой биомассы микробных клеток $\langle H^{RO} \rangle = 114$ кДж/экв. RO ($\pm 4.6\%$) [Минкевич, 2005].

По сути, другой способ представления состава веществ является переходом к другой системе координат – смена химического базиса на физиологический. Такой переход, как и любое изменение системы координат, ничего не меняет в физике процесса, но может дать лучшее соответствие свойствам объекта, подобно тому, как в электростатике сферическая система координат более удобна для описания поля точечного заряда, чем декартова.

Главным достоинством стехиометрии, рассматриваемой в физиологическом базисе, является возможность совмещения баланса вещества и баланса энергии при рассмотрении больших метаболических потоков и метаболизма в целом. Число редоксонов, прошедших по любому количеству реакций, жестко связано с количеством прошедшего вещества и с точностью до нескольких процентов связано с энергией, которая перешла от субстратов к продуктам процесса. Связь восстановленности с количеством вещества определяется его элементным составом и электрическим зарядом [Минкевич, 2005]. Если этот состав имеет вид $C_R H_P O_N N_Q^{(E)}$, где E – заряд молекулы (число несбалансированных элементарных зарядов, отрицательное для электронов) то число RO на одну молекулу (молярная восстановленность) равно $\alpha = 4R + P - 2N - 3Q - E$. Отсюда, в частности, следует, что для электрона $E = -1$, $\alpha = 1$ – электрон имеет один редоксон.

Для углеродсодержащих веществ, в том числе их смесей, включая сухое вещество биомассы клеток, состав может быть представлен как $\text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_q^{(E_c)}$ ($p = P/R$, ... $E_c = E/R$). Тогда восстановленность в расчете на 1 г-ат углерода равна $\gamma = 4 + p - 2n - 3q - E_c$. Число RO в m граммах вещества равно $N_{\text{RO}} = \alpha m / M^{\text{mol}}$ (M^{mol} – молекулярная масса соединения). Для углеродсодержащих веществ число RO может быть выражено еще и в другом виде: $N_{\text{RO}} = (\sigma\gamma/12)m$, где σ – доля углерода в массе вещества.

Для каждого индивидуального химического соединения σ и γ имеют фиксированные значения. Замечательным является обнаруженное нами свойство биомассы микроорганизмов: несмотря на значительную вариабельность макромолекулярного состава значения σ и γ для биомассы весьма стабильны: $\sigma_{\text{B}} = 0.46 (\pm 5\%)$, $\gamma_{\text{B}} = 4.2 (\pm 3\%)$ [Минкевич, 2005]. Близкие значения получены для сухой древесины [Patel and Erickson, 1981]. Заметное отклонение от этих значений наблюдается у микробов, способных к сверхсинтезу липидов, поскольку последние имеют более высокие значения σ и γ . Было найдено [Minkevich et al., 2010], что липидная и безлипидная фракции биомассы имеют различные, но весьма стабильные значения параметров γ и σ . Стабильность значений σ_{B} и γ_{B} у большинства микроорганизмов и растений объясняется достаточно малым содержанием в них липидов (порядка 10% от сухой биомассы). Причину такого постоянства еще предстоит выяснить. Однако уже сейчас в расчетах можно использовать вышеприведенные средние величины, не определяя экспериментально элементный состав клеток исследуемого организма.

Под энергосодержанием мы подразумеваем изменение энтальпии вещества при его окислении свободным кислородом до веществ физиологического базиса (двуокись углерода, вода и т. д.), которое равно тепловыделению такого процесса. Приблизленно энергосодержание вещества равно $\langle H^{\text{RO}} \rangle N_{\text{S}}^{\text{RO}}$, точное его значение равно $H_{\text{S}}^{\text{RO}} N_{\text{S}}^{\text{RO}}$, где N_{S}^{RO} – число RO в данном количестве вещества S, H_{S}^{RO} – энтальпия редоксона в данном веществе, имеющая малое отклонение от $\langle H^{\text{RO}} \rangle$. Соответственно, точное значение свободной энергии равно $G_{\text{S}}^{\text{RO}} N_{\text{S}}^{\text{RO}}$. Следовательно, использование физиологического базиса дает альтернативную форму стехиометрии, максимально сближающую количества вещества и энергии. Поэтому она получила название материально-энергетического баланса (mass-energy balance) [Минкевич, Ерошин, 1973; Erickson et al., 1978].

Стехиометрия больших частей метаболизма. 2

Использование баланса редоксонов дает биоэнергетическую основу для разделения метаболизма на большие части, для которых предложен термин «парциальный метаболизм» или «парциальный обмен» [Минкевич, Ерошин, 1976; Minkevich, 1982; Minkevich, 1983; Минкевич, 2005]. Электрон-транспортные цепи (ЭТЦ) выделяются как парциальный метаболизм потому, что в них перенос редоксонов, осуществляемый передаваемыми электронами, связан с большими изменениями их энергии. Это кажущееся нарушение вышеописанной закономерности (приблизительное постоянство энергетического уровня RO) вызвано присутствием в компонентах электрон-транспортных цепей атомов металлов (Fe, Cu), в которых редоксоны имеют уровень энергии, сильно отличающийся от органических соединений. Именно окисление-восстановление этих атомов ответственно за перенос электронов.

Системы ЭТЦ+АТФ-синтаза являются генератором макроэнергетических связей (АТФ). Эти системы содержатся в клетках прокариот, в митохондриях эукариот, где они осуществляют клеточное дыхание, и в тилакоидах фототрофов, где они связаны со структурами, осуществляющими фотосинтез. Совокупность реакций в системах ЭТЦ+АТФ-синтаза естественным об-

разом является парциальным метаболизмом (ПМ). ПМ близкого типа – ЭТЦ в микросомах, осуществляющая окисление в отсутствие АТФ-синтаз и, соответственно, без синтеза АТФ.

Другие парциальные обмены – это конструктивный обмен, в процессе которого восстановленность (редоксоны) исходного вещества переходит в восстановленность биомассы; продуктный обмен, заканчивающийся образованием и выбросом в окружающую среду восстановленных органических или неорганических продуктов. Эти совокупности реакций могут быть выделены так, что они будут частично совпадать, как, например, в случае роста на глюкозе, сопровождающегося образованием этанола или молочной кислоты. Таким образом, возможно последовательное или параллельное деление метаболизма на парциальные обмены. Наконец, кругооборот вещества, который включает в себя процессы деградации и восстановления, – еще один специфический вид парциального обмена.

Каждый парциальный обмен сопряжен с балансом макроэргических связей (МЭС). Конструктивный обмен в целом потребляет МЭС, хотя в него могут входить отдельные реакции, сопряженные с образованием АТФ, ГТФ и т. д. Дыхательный обмен, а также фотосинтетический обмен в аноксигенных фототрофных микроорганизмах генерируют АТФ. Фотосинтетический обмен в клетках оксигенных фототрофов образует не только АТФ, но также положительное количество редоксонов НАДФН и равное ему по модулю отрицательное количество RO свободного кислорода (про отрицательное число RO см. [Minkevich, 1982; Минкевич, 2005]). Продуктный обмен может как генерировать, так и потреблять АТФ в зависимости от субстрата и продукта. Наконец, кругооборот вещества в клетках обязательно потребляет макроэргические связи, поскольку компенсация всех видов распада требует энергии.

Из сказанного следует, что ряд парциальных обменов характеризуется наличием двух сопряженных потоков. В конструктивном обмене поток вещества, идущий через биосинтетические пути и измеряемый в количестве редоксонов, сопряжен с потоком затрачиваемых МЭС; отношение их далее обозначается как Ψ_B (МЭС/ RO). В дыхательном (респираторном) обмене поток RO (в обычной терминологии – поток электронов) сопряжен с приданием протонам высокой энергии, а затем с передачей этой энергии образуемым МЭС; эти два преобразования энергии описываются стехиометрическими отношениями Φ_{HE} (H^+/RO) и Φ_{HM} ($H^+/MЭС$) соответственно. Продуктный обмен также может быть сопряжен с образованием или затратой МЭС. Например, сбраживание глюкозы в этанол в общем балансе образует МЭС, хотя гликолитический путь содержит и реакции, связанные с затратой АТФ. Для продуктивного обмена аналогичный параметр обозначим как Ψ_p (МЭС/ RO). Чтобы не усложнять изложение мы не рассматриваем здесь разновидности конструктивного обмена, в которых поток RO сопряжен не только с затратами МЭС, но и с прямыми затратами высокоэнергетических протонов (см. [Minkevich et al., 2004]).

С другой стороны, существуют парциальные обмены, в которых подобное сопряжение отсутствует. Первичное окисление кислородом метана у бактерий и метанола в микросомах метилотрофных дрожжей проходит без сопряжения с запасанием энергии в виде трансмембранного электрохимического потенциала протонов (мы будем называть их далее высокоэнергетическими протонами, ВЭП). Другой пример – так называемое цианидрезистентное дыхание (ЦРД), а именно, параллельный путь в электрон-транспортной цепи митохондрий, который может активизироваться в определенных условиях [Акименко В. К. 1989]. Этот путь шунтирует часть основного потока электронов; он не сопряжен с образованием ВЭП.

Выделенные таким образом парциальные обмены в большинстве своем обладают свойством, важным для материально-энергетического баланса целого метаболизма – *их стехиометрические характеристики или вообще постоянны, или включают в себя достаточно постоянные слагаемые*. Продуктный обмен часто является фиксированной совокупностью реакций, и тогда Ψ_p задано однозначно. Например, на 1 молекулу глюкозы, потребляемой в гликолитическом пути (то есть на 24 RO), получается 2 молекулы АТФ [Nelson and Cox, 2008], откуда $\Psi_p = 1/12$.

Электрон-транспортные цепи в настоящее время изучены хорошо, поэтому известны все сайты сопряжения транспорта редоксонов (электронов) с образованием высокоэнергетических протонов, а также стехиометрия этого сопряжения, которая носит фиксированный характер. Так, в митохондриях при окислении NADH транспорт RO проходит через комплексы I, III и IV, которые образуют 2, 2 и 1 ВЭП/RO соответственно. Если присутствует цианидрезистентное дыхание (ЦРД), шунтирующее часть ЭТЦ, то для расчета стехиометрии дыхательного обмена нужно знать соотношение потоков в основной ЭТЦ и цепи ЦРД. При окислении с участием ЦТК (цикл Кребса) входящим субстратом является ацетил~коэнзим А; его фрагмент, уходящий в названный цикл, – уксусная кислота (12 RO). Из них 2 RO попадают в ЭТЦ через сукцинат, то есть через комплекс II в обход первого сайта сопряжения с образованием ВЭП: комплекс II не имеет сопряжения с образованием ВЭП. Следовательно, 10 RO образуют 50 ВЭП, а 2 RO – 6 ВЭП. В целом окисление ацетил~КоА в отсутствие ЦРД дает $\Phi_{HE} = 56/12 = 4.7$ ВЭП/RO.

Электрон-транспортные цепи фотосинтезирующих клеток имеют систему образования ВЭП, аналогичную комплексу III со стехиометрией 2 ВЭП/RO. Еще два протона с высоким μ_{H^+} образуются при фоторазложении одной молекулы воды с образованием свободного кислорода у оксигенных фотосинтетиков (стехиометрия: 1 ВЭП/RO).

Стехиометрия работы АТФ-синтазы: $\Phi_{HM} = 4$ ВЭП/АТФ [Elston et al., 1998]. Отсюда можно вычислить Ψ_E – общее количество МЭС в расчете на 1 RO, прошедший через дыхательный обмен, начинающийся от глюкозы [Минкевич, 2005]. Помимо АТФ, синтезируемой АТФ-синтазой, сюда входят еще 4 МЭС, получаемые путем субстратного фосфорилирования (2АТФ в гликолитическом пути и 2ГТФ в цикле Кребса). Тогда $\Psi_E = (\Phi_{HE}/\Phi_{HM}) + (4/24) = 1.33$.

Наибольшую сложность представляет подсчет величины Ψ_B – затрат МЭС на конструктивный обмен из-за его обширности. Прямой расчет требует знания потоков вещества через все реакции конструктивного обмена, а соотношения этих потоков зависят, в частности, от вариаций аминокислотного, нуклеотидного и жирнокислотного состава клеток каждого вида. Кроме того, существуют доказательства того, что скорость затрат энергии на поддержание клеток может содержать слагаемое, которое пропорционально скорости роста [Neijssel and Tempest, 1976; Pirt, 1982; Russell and Cook, 1995]. Тогда коэффициент пропорциональности входит в Ψ_B как слагаемое, то есть ведет себя, как если бы это были дополнительные затраты МЭС на биосинтез (см. цит. лит.). Поэтому нами был выбран другой способ расчета Ψ_B [Minkevich, 1985; Минкевич, 2005]. Наиболее хорошо исследована величина выхода биомассы при росте на глюкозе. Многочисленные литературные данные, относящиеся к самым различным микроорганизмам, дают величину $Y_{x/s} = 0.5$ при росте в оптимальных условиях. Она относится к клеткам различного макромолекулярного состава. Причина такого постоянства представляет собой предмет для специального исследования. Приведенный ниже расчет дает для глюкозы $\Psi_B = 0.8$.

Затраты МЭС на конструктивный обмен, начинающийся от другого внешнего или внутреннего субстрата–источника RO, получаются из найденного здесь значения $\Psi_B = 0.8$ введением поправок, описывающих отличие конструктивного обмена на данном субстрате от этого обмена на глюкозе. Эти отличия касаются начальных реакций метаболизации субстрата, число которых обычно невелико.

Например, при росте на метаноле промежуточным внутренним субстратом, начиная с которого удобно выделять конструктивный метаболизм, является формальдегид НСНО. Биохимические преобразования НСНО проходят по одному из трех известных метаболических путей и приводят к образованию гицеральдегид-3-фосфата или 3-фосфоглицерата [Antony, 1982]. Оба метаболита являются участниками гликолитического пути, благодаря чему нетрудно рассчитать поправку к Ψ_B .

Два других примера – метаболизм фотосинтезирующих клеток с одной и двумя фотосистемами. У аноксигенных фототрофов (одна фотосистема) источником RO является органиче-

ский субстрат (молочная, уксусная кислоты и т. д.) либо неорганический субстрат – водород. Конструктивный обмен на органическом субстрате совершенно аналогичен тому же у гетеротрофов. При росте на водороде этот субстрат передает свою восстановленность переносчику редоксонов НАДФ; затем в специфическом метаболическом пути (цикл Кальвина) происходит передача этих редоксонов на CO_2 , в результате чего синтезируется, опять же, 3-фосфоглицерат. У кислородных фототрофов (две фотосистемы) восстановление НАДФ происходит за счет RO , генерируемых фотосистемой II. Дальнейший путь редоксонов проходит, как и в случае роста аноксигенных фототрофов на водороде, через цикл Кальвина. Этот цикл, пересчитанный на образование, в конечном счете, глюкозы требует затраты 18 АТФ на моль глюкозы, то есть на 24 RO [Buchanan, Gruijssem and Jones, 2000; Nelson and Cox, 2008]. Отсюда поправочное слагаемое к базовому значению Ψ_B равно $18/24 = 0.75$.

Стехиометрия метаболизма в целом

Анализ стехиометрии полного метаболизма должен объединить многочисленные биохимические данные об отдельных реакциях в общие показатели эффективности (выходы) роста биомассы и синтеза продуктов метаболизма и подобные им величины. Рациональный способ сделать это использует трехступенчатый анализ. Первая ступень, описанная выше, состоит в разделении метаболизма на большие части, характеризующиеся постоянными или почти постоянными стехиометрическими соотношениями между потоками редоксонов и сопряженными с ними потоками макроэнергетических связей. Соотношения же между потоками RO могут изменяться, если имеет место их ветвление. Вторая ступень заключается в записи уравнений общего баланса редоксонов и макроэнергетических связей. Таким образом, получается система уравнений материально-энергетического баланса целого метаболизма. Третья ступень заключается в вычислении искомых значений выхода биомассы и продукта метаболизма (если этот продукт является восстановленным соединением и образуется в заметных количествах) из энергетического субстрата или поглощенного света. Кроме того, находятся связи между скоростями больших метаболических потоков. Все эти характеристики оказываются выраженными через биохимические параметры метаболизма клеток.

Далее ограничимся случаем, когда синтез восстановленных продуктов практически отсутствует и главный интерес представляет рост биомассы. Рассмотрим примеры материально-энергетических схем метаболизма для некоторых видов клеток, показанные на рис. 1. Детально они описаны ниже. Общие обозначения на схемах: S – субстрат-источник восстановленности (то есть редоксонов), это может быть органическое вещество или неорганическое соединение (например, водород); B – сухое вещество биомассы клеток; O_2 – кислород; CM – процессы поддержания клеток (cell maintenance), LES и HES – низко- и высокоэнергетические состояния фотосинтетических комплексов. Все потоки берутся как удельные скорости (в расчете на 1 экв. RO уже существующей биомассы), час^{-1} . Везде через μ обозначен поток RO в биомассу, то есть, удельная скорость роста, χ_M – затраты МЭС на поддержание. Прочие обозначения вводятся по мере необходимости в них.

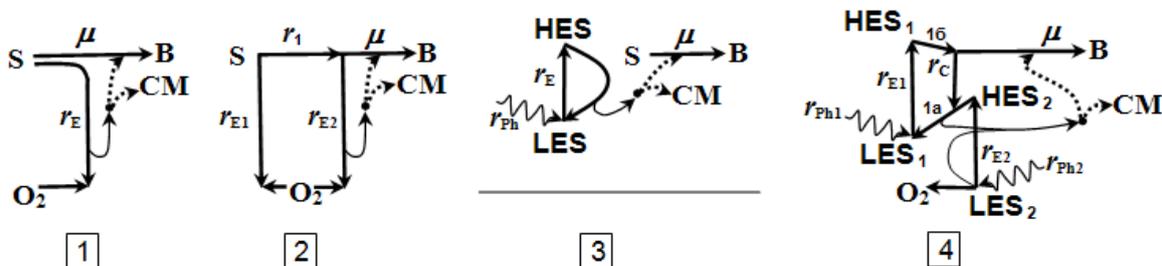


Рис. 1. Материально-энергетические схемы метаболизма клеток

Толстые линии обозначают потоки RO, включая отрицательные количества RO кислорода. Для них нижняя горизонтальная линия в каждом из примеров соответствует нулевому уровню энергии, который присвоен базисным веществам (в примере 3 это отдельная линия внизу), верхние горизонтальные линии приблизительно отображают уровень энергии RO. Тонкие сплошные изогнутые стрелки символизируют получение и расход высокоэнергетических протонов (ВЭП), точечные линии относятся к макроэргическим связям. Высота линий, относящихся к ВЭП и МЭС, не связана с уровнем энергии этих носителей. Небольшой черный кружок везде изображает АТФ-синтазу.

Вариант 1 – аэробный рост микроорганизмов на глюкозе. Толстая стрелка, идущая сначала горизонтально, а затем вертикально, изображает дыхательный обмен, полностью горизонтальная стрелка – конструктивный. Их совпадающие части (нарисованы отдельно для простоты восприятия) относятся к реакциям от глюкозы до метаболитов цикла Кребса; энергетический уровень RO в этих частях метаболизма изменяется мало, что и символизируется горизонтальностью линий на схеме. Поскольку эти реакции все же приводят к небольшому падению уровня RO, субстратное фосфорилирование дает 4 МЭС (см. предыдущий раздел). Это не отображено на схеме, но учтено в балансе МЭС. Вертикальная линия изображает ЭТЦ, которая снижает энергетический уровень RO до нуля и образует ВЭП. Принимая во внимание, что затраты МЭС на поддержание клеток в общем случае состоят из двух слагаемых, не зависящие от скорости роста и пропорционального ей (см. выше), баланс RO имеет следующую, весьма простую форму:

$$r_s = \mu + r_E, \quad (4)$$

$$r_E \Psi_E = \mu \Psi_B + \chi_M, \quad \chi_M = \chi_M^0 + \chi_M^1 \mu, \quad (5)$$

где r_s – удельная скорость потребления субстрата, r_E – поток через ЭТЦ, Ψ_E – общий стехиометрический коэффициент образования МЭС в дыхательном обмене, где, кроме продукции МЭС системой ЭТЦ+АТФ-синтаза учтено и субстратное фосфорилирование.

В качестве оценки эффективности клеточного роста используем $\eta_{X/S} = \mu/r_s$ – выход биомассы из субстрата по редоксонам [Минкевич, 2005], Эта величина при росте на органическом субстрате близка к выходу по энергии (см. ниже). Введем обозначения:

$$\Psi_B^{\text{app}} = \Psi_B + \chi_M^1, \quad \eta_{X/S}^m = \frac{\Psi_E}{\Psi_E + \Psi_B^{\text{app}}}, \quad m_{RO}^0 = \frac{\chi_M^0}{\Psi_E}, \quad (6)$$

где Ψ_B^{app} – кажущиеся затраты МЭС на биосинтез, которые в действительности равны сумме затрат собственно на биосинтез и коэффициента увеличения затрат на поддержание при увеличении скорости роста. Тогда из (4)–(6) получаем следующие эквивалентные друг другу выражения:

$$\frac{1}{\eta_{X/S}} = \frac{1}{\eta_{X/S}^m} + \frac{m_{RO}^0}{\mu}, \quad r_s = m_{RO}^0 + \frac{\mu}{\eta_{X/S}^m}. \quad (7)$$

Левое выражение (7) дает зависимость обратного выхода от обратной скорости роста. Величина m_{RO}^0 – не зависящая от μ составляющая скорости затрат редоксонов субстрата на поддержание клеток. Соотношение $m_{RO}^0 = \chi_M^0/\Psi_E$ выражает эту величину через не связанную с μ компоненту скорости непосредственных затрат на поддержание, а именно, затрат МЭС. Если скорость роста настолько велика, что $m_{RO}^0/\mu \ll 1/\eta_{X/S}^m$, то доля не зависящих от μ затрат на поддержание становится малой в общем балансе метаболизма, и тогда $\eta_{X/S} \approx \eta_{X/S}^m$. Аналогично терминологии, используемой для выхода по массе $Y_{X/S}$, будем называть $\eta_{X/S}^m$ максимальным выходом клеток по редоксонам, имея при этом в виду, что это – асимптотическое значение, которое само по себе зависит от условий среды (например, от температуры). Соотношения (7)

аналогичны (3). Однако формулы (6) расшифровывают биохимическую структуру максимального выхода и скорости расходов на поддержание клеток.

Выход клеток по массе $Y_{X/S}$ связан с $\eta_{X/S}$ простым соотношением: $Y_{X/S} = \frac{\sigma_S \gamma_S}{\sigma_B \gamma_B} \eta_{X/S}$, где индексы S и B относятся к субстрату и биомассе. Отсюда легко получаются пересчетные формулы: $Y_{X/S}^m = \frac{\sigma_S \gamma_S}{\sigma_B \gamma_B} \eta_{X/S}^m$, $m_S^0 = \frac{\sigma_B \gamma_B}{\sigma_S \gamma_S} m_{RO}^0$. Вышеупомянутые средние значения σ_B и γ_B дают $\sigma_B \gamma_B = 1.93$.

Соотношения (6) выражают важные физиологические характеристики роста биомассы, то есть целостного метаболизма через биохимические параметры парциальных обменов. Эти параметры, в свою очередь, объединяют в себе именно те биоэнергетические характеристики отдельных реакций, которые реально влияют на эффективность роста. Прямое использование (6) и (7), казалось бы, затруднено тем, что члены χ_M^0 и χ_M^1 неизвестны – это суммарные скоростные характеристики большого количества самых разнообразных процессов кругооборота вещества в клетках. Тем не менее, эти выражения применимы к конкретным расчетам. Во-первых, постоянная составляющая затрат на поддержание m_S^0 при заданных температуре и pH может быть измерена на основании данных о непрерывном культивировании популяции микроорганизмов или других одноклеточных при разных скоростях роста [Перт, 1978]. У многих организмов эта величина невелика по сравнению с максимальной скоростью роста. Во-вторых, численная оценка Ψ_B и χ_M^1 по отдельности, несмотря на то, что она интересна в общенаучном плане, для вычисления выхода биомассы не нужна, так как в $\eta_{X/S}^m$ они входят в виде суммы, Ψ_B^{app} . Последнюю величину можно оценить для аэробного роста на глюкозе ($C_6H_{12}O_6$), когда, как уже говорилось, $Y_{X/S} = 0.5$. Используя $\eta_{X/S} = \frac{\sigma_B \gamma_B}{\sigma_S \gamma_S} Y_{X/S}$ и $\sigma_S \gamma_S = 1.6$, получаем $\eta = 0.6$.

Значение $\eta = 0.6$ (то есть 60%), основанное на многократно полученном значении $Y_{X/S} = 0.5$, принято нами как экспериментально найденное наибольшее значение выхода биомассы по редоксонам. Поскольку оно измерено для быстрорастущих штаммов, выращивавшихся в оптимальных условиях, когда затраты на поддержание невелики, можно рассматривать найденные 60% как значение $\eta_{X/S}^m$. Тогда, используя вторую формулу (6), находим: $\Psi_B^{app (gluc)} = \Psi_E (1 - \eta_{X/S}^m) / \eta_{X/S}^m = 0.8$. Это значение получено косвенным путем, из надежных экспериментальных данных о росте микроорганизмов и материально-энергетического баланса метаболизма глюкозы. Ранее предпринимавшиеся попытки прямого подсчета затрат МЭС на конструктивный обмен [Oura, 1972; Stouthamer, 1973] дают $\Psi_B = 0.1-0.2$, что значительно ниже, чем 0.8.

Величина $\Psi_B^{app (gluc)} = 0.8$ использована нами для расчета Ψ_B^{app} при росте на других источниках энергии, в том числе для фотосинтезирующих клеток, что показано на приведенных ниже примерах. Величина Ψ_E в общем случае также требует коррекции согласно особенностям метаболизма. Таким образом, логика расчетов значений выхода биомассы такова:

$$\underbrace{\left. \begin{array}{l} Y_{X/S}^m \rightarrow \eta_{X/S}^m \\ \Psi_E^{(gluc)} \end{array} \right\} \rightarrow \Psi_B^{app (gluc)} \rightarrow \left. \begin{array}{l} \Psi_B^{app} \\ \Psi_E \end{array} \right\} \rightarrow \eta_{X/...}^m \rightarrow Y_{X/...}^m}_{\substack{\text{рост на глюкозе в оптимальных условиях} \\ \text{(исходные данные – из эксперимента)}}} \quad \substack{\text{рост на другом источнике энергии} \\ \text{(значения величин } \Psi \text{ скорректированы)}}$$

Многоточие в индексах обозначает субстрат или свет или и то, и другое (см. ниже).

Вариант 2 – аэробный рост дрожжей на метаноле (рассматриваются виды, способные использовать этот субстрат, токсичный при высоких концентрациях). Показано, что первичное окисление метанола в дрожжах производится метанолоксидазой, которая превращает его

в формальдегид без образования ВЭП [Antony, 1982]. Формальдегид является промежуточным субстратом, утилизация которого идет по схеме, в общих чертах близкой к варианту 1. Баланс метаболизма этих организмов имеет вид

$$r_s = r_1 + r_{E1}, \quad r_{E1} = r_s \zeta_{ox}, \quad (8)$$

$$r_1 = \mu + r_{E2}, \quad r_{E2} \Psi_E = \mu \Psi_B + \chi_M, \quad \chi_M = \chi_M^0 + \chi_M^1 \mu, \quad (9)$$

где ζ_{ox} – стехиометрическое отношение числа RO, идущих на кислород в оксидазной реакции (2 RO), к числу RO в молекуле метанола (6 RO); эта величина имеет жестко заданное значение $\zeta_{ox} = 1/3$. Из (8) и (9) следует, что выражения (7) остаются в силе, но для $\eta_{X/S}^m$ вместо второй

формулы (6) имеет место несколько иное соотношение: $\eta_{X/S}^m = \frac{(1 - \zeta_{ox}) \Psi_E}{\Psi_E + \Psi_B^{app}}$. Поправочный мно-

житель $(1 - \zeta_{ox})$ отражает долю RO, которые не пропадают для роста после оксидазной реакции. Кроме того, величина Ψ_B^{app} имеет значение, отличающееся от аналогичного параметра при росте на глюкозе. Было рассчитано, что метаболизация формальдегида у дрожжей происходит через диоксиацетоновый цикл, добавляя 0.21 к $\Psi_B^{app(gluC)}$ [Minkevich, 1985]; Отсюда $\Psi_B^{app} = 1$. Значение Ψ_E также должно быть скорректировано. «Поставщиком» RO в ЭТЦ является в данном случае только NAD, восстановленная форма которого образуется формальдегиддегидрогеназой и формиатдегидрогеназой (последняя реакция работает в связке с трансгидрогеназой). Субстратное фосфорилирование в дыхательном обмене здесь не участвует. Редоксоны NADH дают $\Phi_{HE} = 5$ (см. выше), откуда и из $\Phi_{HM} = 4$ получаем $\Psi_E = \Phi_{HE} / \Phi_{HM} = 1.25$. Тогда $\eta_{X/S}^m = 0.37$, $Y_{X/S}^m = 0.43$. Последняя цифра совпадает с наибольшим экспериментально достигнутым значением выхода биомассы дрожжей из метанола (ссылки см. [Minkevich, 1985]).

Метанолассимилирующие бактерии имеют такую же общую схему потоков RO, но у них поток, скорость которого обозначена как r_{E1} , частично проходит через ЭТЦ [Antony, 1982] и производит высокоэнергетические протоны, хотя и с меньшей эффективностью, чем RO, идущие от NADH. Поэтому уравнение баланса МЭС содержит дополнительный член, величина Ψ_E получается большей, чем у дрожжей, и, соответственно, выход биомассы у бактерий на метаноле также выше, чем у дрожжей. Эти значения также совпадают с полученными экспериментально (ссылки см. [Minkevich, 1985]).

Схема потоков RO при росте на этаноле как источнике углерода и энергии несколько отличается от схемы варианта 2. Аналогичный подход снова дает теоретические значения выхода биомассы, совпадающие с максимальными значениями, полученными в эксперименте [Minkevich, 1985].

Вариант 3 – фототрофный рост аноксигенных (обладающих одной фотосистемой) фотосинтезирующих микроорганизмов (пурпурные бактерии и т. д.). В этом случае источником RO для образования биомассы служит субстрат – органическое соединение (например, органические кислоты) или водород. Редоксоны субстрата полностью переходят в сухое вещество клеток, вследствие чего выход биомассы из субстрата по редоксонам $\eta_{X/S} = 1$. Вместе с RO субстрата в биомассу переходит и их энергия, хотя следует помнить, что значения H^{RO} в субстрате и в биомассе могут несколько отличаться. Из жесткого равенства $\eta_{X/S} = 1$ следует, что выход биомассы таких клеток из каждого субстрата $Y_{X/S}$ также равен постоянной величине, которая зависит только от вида субстрата.

Для биосинтеза, однако, нужна дополнительная энергия, переносимая макроэргическими связями и после их использования при синтезе макромолекул уходящая в виде тепла. Эти МЭС поставляются фотосинтетическим «блоком» метаболизма. Фотосистема клеток имеет два состояния – низкоэнергетическое LES (low energy state) и высокоэнергетическое HES (high energy

state). Переход $LES \rightarrow HES$ происходит благодаря абсорбции фотонов. Обратный переход сопряжен с переводом протонов в высокоэнергетическое состояние (то есть с продукцией ВЭП). Затем ВЭП передают свою энергию МЭС при участии АТФ-синтазы, а МЭС тратятся на биосинтез и поддержание клеток, как и в гетеротрофном метаболизме. Циркуляция $LES \rightleftharpoons HES$, продукция ВЭП и затем макроэнергетические связи вместе взятые составляют энергетический обмен у организмов такого типа.

Из этого следует, что рост таких организмов должен характеризоваться другой величиной, аналогичной $\eta_{X/S}$ – квантовым выходом биомассы $\eta_{X/Ph}$, экв. RO биомассы/Э (эйнштейн, то есть, моль фотонов). Поскольку интенсивность кругооборота вещества в клетке зависит от условий среды и других факторов, то потребление энергии на поддержание клеток не является фиксированной величиной, что отражается в вариабельности $\eta_{X/Ph}$. Уравнения материально-энергетического баланса роста аноксигенных фотосинтетиков имеют вид

$$r_E \Psi_E = \mu \Psi_B + \chi_M, \quad \chi_M = \chi_M^0 + \chi_M^1 \mu, \quad (10)$$

$$r_{Ph} = r_E \Psi_{Ph}, \quad \Psi_E = \Phi_{HE} / \Phi_{HM}. \quad (11)$$

Соотношения (10) описывают продукцию и расход макроэнергетических связей, (11) связывают величины r_E и Ψ_E со скоростью абсорбции фотонов и работой АТФ-синтазы. Из (10) и (11) получаем выражения, аналогичные (7), выведенным выше для гетеротрофного роста:

$$\frac{1}{\eta_{X/Ph}} = \frac{1}{\eta_{X/Ph}^m} + \frac{m_{Ph}^0}{\mu}, \quad r_{Ph} = m_{Ph}^0 + \frac{\mu}{\eta_{X/Ph}^m}. \quad (12)$$

Выражения для максимального квантового выхода и не зависящей от μ компоненты скорости расходов на поддержание клеток, однако, отличаются от аналогичных величин для гетеротрофного роста в силу отличий метаболизма:

$$\eta_{X/Ph}^m = \frac{\Phi_{HE}}{\Psi_B^{app} \Psi_{Ph} \Phi_{HM}}, \quad m_{Ph}^0 = \chi_M^0 \frac{\Psi_{Ph} \Phi_{HM}}{\Phi_{HE}}. \quad (13)$$

Квантовый выход из абсорбированного света и параметры его зависимости от μ :

$$Y_{X/Ph} = \frac{12}{\sigma_B \gamma_B} \eta_{X/Ph}, \quad \frac{1}{Y_{X/Ph}} = \frac{1}{Y_{X/Ph}^m} + \frac{M_{Ph}^0}{\mu}, \quad \text{где } Y_{X/Ph}^m = \frac{12}{\sigma_B \gamma_B} \eta_{X/Ph}^m, \quad M_{Ph}^0 = \frac{\sigma_B \gamma_B}{12} m_{Ph}^0. \quad (14)$$

Поскольку абсорбция одного фотона переводит один электрон фотосистемы из низко- в высокоэнергетическое состояние, $\Psi_{Ph} = 1$ [Buchanan, Gruissem and Jones, 2000; Nelson and Cox, 2008]. Затем прохождение двух электронов от HES к LES производит 4, высокоэнергетических протона (см. там же), откуда $\Phi_{HE} = 2$. В качестве примера рассмотрим рост фототрофных бактерий на лактате. Тогда к $\Psi_B^{app} (gluc)$ должно быть добавлено слагаемое, учитывающее разницу между метаболизмом глюкозы и лактата, равное 0.4 [Minkevich, 1985], откуда $\Psi_B^{app} = 1.2$. Тогда $\eta_{X/Ph}^m = 0.42$, $Y_{X/Ph}^m = 2.6$ г/Э. Это значение соответствует экспериментальным данным [Gobel, 1978].

Вариант 4 – фототрофный рост оксигенных (обладающих двумя фотосистемами) организмов (одноклеточные водоросли, растения). Фотосистема II (ФС II), используя энергию абсорбированных фотонов, рождает пары редоксонов – в восстановленных молекулах компонентов фотосистемы (положительное число RO) и в молекулах образованного свободного кислорода (такое же по модулю, но отрицательное число RO). Одновременно образуются высокоэнергетические протоны. Редоксоны в компонентах ФС II, находящихся в состоянии с высокой энергией (HES_2), имеют энергию, полученную от фотонов, уровень которой ниже, чем вышеописанный средний уровень RO в органических веществах. Фотосистема II, переведенная в высо-

коэнергетическое состояние, передает RO по электрон-транспортной цепи в фотосистему I (ФС I), находящуюся в низкоэнергетическом состоянии. В ЭТЦ находится еще один участок образования ВЭП. Фотосистема I за счет энергии абсорбированных ею фотонов поднимает уровень RO, пришедших от ФС II, до уровня, несколько более высокого, чем средний в органических соединениях. Дальнейшее движение редоксонов идет через переносчики восстановленности (ферредоксин, NADP), в результате чего их энергия приводится к уровню, соответствующему средней энергии RO в органических веществах. Далее поток RO расходуется на два. Один из них идет в биомассу, а другой возвращается в электрон-транспортную цепь таким образом, что он складывается с потоком, приходящим от ФС II, и через участок образования ВЭП проходит их сумма. Таким образом, через ФС I идет сумма потока RO от ФС II и циклического потока RO. Высокоэнергетические протоны, образуемые в двух вышеупомянутых местах метаболизма, проходят затем через АТФ-синтазу, образуя МЭС, которые затем тратятся, как в любом метаболизме, на биосинтез и поддержание.

Потоки RO через фотосистемы II и I обозначены как r_{E2} и r_{E1} , циклический поток, возвращающий редоксоны в ЭТЦ, – как r_C ; скорости абсорбции фотонов фотосистемами – как r_{Ph2} и r_{Ph1} (две последние – в единицах Э/эquiv. RO существующей биомассы в час). Потока RO на участках, обозначенных на схеме 4 как 1а и 1б, равны r_{E1} .

Уравнения материально-энергетического баланса для таких клеток имеют вид

$$\mu = r_{E2}, \quad r_{E2} + r_C = r_{E1}, \quad (15)$$

$$(r_{H1} + r_{H2})\Phi_{HM} = \mu\Psi_B + \chi_M, \quad \chi_M = \chi_M^0 + \chi_M^1\mu, \quad (16)$$

$$r_{H2} = r_{E2}\Phi_{HE2}, \quad r_{H1} = r_{E1}\Phi_{HE1}, \quad (17)$$

$$r_{Ph2} = r_{E2}\Psi_{Ph2}, \quad r_{Ph1} = r_{E1}\Psi_{Ph1}. \quad (18)$$

Уравнения (15) описывают баланс редоксонов, первое уравнение (16) – баланс МЭС (левая часть соответствует АТФ-синтазе), (17) отражают стехиометрию продукции ВЭП, (18) – стехиометрию абсорбции фотонов и перехода фотосистем в высокоэнергетическое состояние. При решении этой системы полагаем удельную скорость роста известной; тогда известна и скорость перехода $LES_2 \rightarrow HES_2$: $r_{E2} = \mu$. Заменяя в левом уравнении (16) r_{H1} , r_{H2} из (17), χ_M из второго уравнения (16), а затем, используя (15), находим скорость циклического потока редоксонов:

$$r_C = \left[\frac{\Phi_{HM}}{\Phi_{HE1}} (\Psi_B + \chi_m^1) - \frac{\Phi_{HE1} + \Phi_{HE2}}{\Phi_{HE1}} \right] \mu + \frac{\Phi_{HM}}{\Phi_{HE1}} \chi_m^0. \quad (19)$$

Отсюда и из (15) получаем величину r_{E1} как функцию μ . Затем, используя (18), находим скорости абсорбции фотонов каждой из фотосистем. Из их суммы получаем выражения для квантового выхода биомассы $\eta_{X/Ph}$ (эquiv. RO/Э) и общей скорости абсорбции света клетками (Э/эquiv. RO существующей биомассы в час):

$$\frac{1}{\eta_{X/Ph}} = \frac{r_{Ph1} + r_{Ph2}}{\mu} = \frac{1}{\eta_{X/Ph}^m} + \frac{m_{Ph}^0}{\mu}, \quad r_{Ph1} + r_{Ph2} = m_{Ph}^0 + \frac{\mu}{\eta_{X/Ph}^m}, \quad (20)$$

где максимальный выход и скорость затрат на поддержание клеток, выраженные в единицах восстановленности (редоксонах), равны

$$\eta_{X/Ph}^m = \frac{\Phi_{HE1}}{\Phi_{HM}\Psi_{Ph1}\Psi_B^{app} + (\Phi_{HE1}\Psi_{Ph2} - \Phi_{HE2}\Psi_{Ph1})}, \quad m_{Ph}^0 = \frac{\Phi_{HM}}{\Phi_{HE1}}\Psi_{Ph1}\chi_m^0. \quad (21)$$

Пересчет квантового выхода $\eta_{X/Ph}$, параметров $\eta_{X/Ph}^m$ и m_{Ph}^0 в единицы массы производится, как и для клеток с одной фотосистемой, по формулам (14). Приведем также получаемое из уравне-

ний баланса отношение скорости перехода $LES \rightarrow HES$ фотосистемы I к такой же скорости у фотосистемы II:

$$\frac{r_{E1}}{r_{E2}} = \frac{1}{\Psi_{Ph1}} \left[\left(\frac{1}{\eta_{X/Ph}^m} - \Psi_{Ph2} \right) + \frac{m_{Ph}^0}{\mu} \right]. \quad (22)$$

Численные значения параметров: $\Psi_{Ph1} = \Psi_{Ph2} = 1$, $\Phi_{HE2} = 1$, $\Phi_{HE1} = 2$ [Buchanan, Gruissem, and Jones, 2000; Nelson and Cox, 2008] $\Phi_{HM} = 4$. Значение Ψ_B^{app} должно быть скорректировано. Углерод поступает в метаболизм окисленных фототрофов в наиболее окисленном виде (CO_2). У большинства видов таких организмов восстановление двуокиси углерода производится в цикле Кальвина (это сокращенное название). Источником восстановленности (редоксонов) служит NADPH, к которому RO приходят от ФС I. Конечным продуктом цикла Кальвина является трехуглеродный углевод, поступающий в метаболические пути ассимиляции глюкозы. Поэтому к Ψ_B^{app} должно быть добавлено слагаемое, описывающее баланс цикла Кальвина. Поскольку на восстановление 3 CO_2 до трехуглеродного углевода тратится 6 NADPH (12 RO) и 9 АТФ, дополнительные затраты в конструктивном обмене составляют $9/12 = 0.75$ RO/МЭС, и $\Psi_B^{app} = \Psi_B^{app(glu)} + 0.75 = 1.55$ RO/МЭС.

Подстановка этих значений в полученные выше выражения дает: $\eta_{X/Ph}^m = 0.28$, $Y_{X/Ph}^m = 1.73$. Полученное теоретическое значение $Y_{X/Ph}^m$, как и значения для других схем метаболизма, находится в хорошем соответствии с экспериментальными данными [Aiba, 1982]. Не зависящий от μ член в (22) равен 2.6 – скорость работы ФС I как минимум в 2.6 раза больше, чем скорость работы ФС II. Это означает, что запасание энергии в форме высокоэнергетических протонов и, в конечном счете, МЭС при прямом потоке через обе фотосистемы (то есть если бы $r_{E1} = r_{E2}$) недостаточно для обеспечения потребностей конструктивного обмена и μ -зависимой компоненты клеточного кругооборота. Для этого требуется еще дополнительный циркулярный поток через ФС I и электрон-транспортную цепь, в полтора раза больший, чем прямой поток.

Упрощенная схема метаболизма окисленных фототрофов, приведенная на рисунке, не учитывает роль оксигеназ и оксидаз (прежде всего, RuBisCO – фермента с двойной функцией, входящего в цикл Кальвина [Buchanan, Gruissem, and Jones, 2000]). Эти ферменты участвуют в путях ухода части редоксонов на свободный кислород без образования МЭС, вследствие чего величина $\eta_{X/Ph}^m$ снижается.

Отметим, что здесь мы не рассматриваем детализацию процессов клеточного поддержания. Несмотря на многочисленность и множественную локализацию этих процессов, возможно выделение некоторых компонентов клеточного поддержания, таких как утечки ВЭП через мембраны и диссипативная релаксация высокоэнергетических состояний фотосинтетического аппарата.

Энергетическая эффективность различных типов метаболизма

В качестве универсальной меры эффективности процесса метаболизма в целом имеет смысл использовать энергетический выход биомассы $\eta_{X/En}$ – отношение энергии, содержащейся во вновь образованном веществе биомассы клеток к энергии, поступившей в метаболизм в процессе роста. Приведенное определение не зависит от вида носителя энергии, потребленной клетками, будь то различные субстраты, органические или неорганические, или свет. Поэтому величина $\eta_{X/En}$ позволяет сравнивать эффективность роста на самых различных источниках энергии.

Если источником энергии служит какое-либо вещество (субстрат роста), то $\eta_{X/En} = (H_B^{RO} / H_S^{RO}) \eta_{X/S}$. Учитывая, что $H_S^{RO} \approx \langle H^{RO} \rangle$ и $H_B^{RO} \approx \langle H^{RO} \rangle$, получаем: $\eta_{X/En} \approx \eta_{X/S}$.

Для $\langle H^{\text{RO}} \rangle$ здесь примем среднее между значениями этой величины для биомассы и низкомолекулярных органических соединений: 113 кДж/экв. RO. Далее, обозначим через E_{ph} энергию фотона, среднюю по абсорбируемому спектру или соответствующую длине волны света при монохроматическом освещении. Для оксигенного типа фотосинтеза $\eta_{\text{X/En}} = (H_{\text{B}}^{\text{RO}}/E_{\text{ph}})\eta_{\text{X/Ph}} \approx (\langle H^{\text{RO}} \rangle/E_{\text{ph}})\eta_{\text{X/Ph}}$. Для случая смешанного источника энергии (субстрат + свет, аноксигенные организмы) введем обозначения: N_{B}^{RO} , N_{S}^{RO} и N_{ph} – числа редоксонов биомассы, потребленного субстрата и абсорбированных фотонов. Тогда, учитывая, что $N_{\text{S}}^{\text{RO}} = N_{\text{B}}^{\text{RO}}$:

$$\frac{1}{\eta_{\text{X/En}}} = \frac{H_{\text{S}}^{\text{RO}} N_{\text{S}}^{\text{RO}} + E_{\text{ph}} N_{\text{ph}}}{H_{\text{B}}^{\text{RO}} N_{\text{B}}^{\text{RO}}} = \frac{H_{\text{S}}^{\text{RO}} + E_{\text{ph}} \frac{N_{\text{ph}}}{N_{\text{B}}^{\text{RO}}}}{H_{\text{B}}^{\text{RO}}} = \frac{H_{\text{S}}^{\text{RO}}}{H_{\text{B}}^{\text{RO}}} + \frac{E_{\text{ph}}}{H_{\text{B}}^{\text{RO}}} \frac{1}{\eta_{\text{X/Ph}}} \approx 1 + \frac{E_{\text{ph}}}{\langle H^{\text{RO}} \rangle} \frac{1}{\eta_{\text{X/Ph}}}.$$

Для численных оценок роста фототрофов возьмем часто встречающиеся условия освещенности [Aiba, 1982]: 1) аноксигенные бактерии – монохроматический свет с длиной волны $\lambda = 860$ нм, $E_{\text{ph}} = N_{\text{A}} hc/\lambda = 139.2$ кДж/Э (N_{A} – число Авогадро); 2) оксигенные клетки (зеленые водоросли) – вольфрамовая лампа со световой температурой 2800 К, спектр поглощения 400–750 нм, расчет по формуле Планка дает среднее значение $E_{\text{ph}} = 188.4$ кДж/Э. Тогда для роста гетеротрофных микроорганизмов на глюкозе $\eta_{\text{X/En}} = 0.6$; метилотрофные дрожжи: $\eta_{\text{X/En}} = 0.37$; пурпурные бактерии (одна фотосистема, субстрат – лактат): $\eta_{\text{X/En}} = 0.25$; одноклеточные водоросли (две фотосистемы): $\eta_{\text{X/En}} = 0.17$. Отсюда видно, что гетеротрофные микроорганизмы достигают намного более высоких значений энергетической эффективности роста, чем фототрофы (в случае глюкозы это вообще – максимальное известное значение), а среди последних организмы, использующие одновременно восстановленные субстраты и свет, достигают более высокой эффективности роста, чем чистые фототрофы.

Стационарная или нестационарная модель метаболизма?

Приведенные выше уравнения материально-энергетического баланса являются стационарными. Подобная стационарность имеет место в электрических цепях (первый закон Кирхгофа), поскольку электроны не могут накапливаться в узлах электрических соединений. В то же время метаболиты, как правило, имеют непостоянное содержание в клетках, поэтому, строго говоря, уравнения баланса должны включать в себя производные от содержания метаболитов по времени. Например, для баланса макроэнергетических связей вместо $r_{\text{E}}\Psi_{\text{E}} = \mu\Psi_{\text{B}} + \chi_{\text{M}}$ следовало бы

записать: $\frac{d[\text{MЭС}]}{dt} = r_{\text{E}}\Psi_{\text{E}} - \mu\Psi_{\text{B}} - \chi_{\text{M}}$. Тогда для содержания МЭС нужно было бы ввести за-

висимость скоростей r_{E} , μ и χ_{M} от влияющих на них концентраций. Последнее, во-первых, сталкивается с проблемами структурированных моделей, о которых говорилось выше, а во-вторых, требует детального расписывания механизмов кинетических взаимодействий в клетках. Тогда вся краткость и ясность материально-энергетического баланса исчезает.

Покажем, что для стехиометрического описания метаболизма нет необходимости в детальном учете нестационарного поведения переменных, описывающих состояние клетки в данный момент времени. Для однонаправленного движения к устойчивому стационарному состоянию можно воспользоваться теоремой Тихонова о масштабировании переходных процессов по скоростям [Васильева, Бутузov, 1973] – быстрые переходные процессы можно рассматривать в их завершённом состоянии, когда динамическая система движется по линии медленного движения [Minkevich and Utkina, 1979]. Для колебательных переходных процессов (периодических или хаотических) можно применить усреднение по времени. Пусть «узловой» метаболит имеет

содержание в биомассе M , а потоки, сходящиеся к узлу и уходящие из него, – f_i ($i=1,2,\dots,I$); последние величины имеют знаки, соответствующие притоку или оттоку веществ – носителей РО или МЭС. Тогда в каждый момент времени $\frac{dM}{dt} = \sum_{i=1}^I f_i$. Усреднение за период времени T с помощью операции $\frac{1}{T} \int_0^T \dots dt$ дает

$$\sum_{i=1}^I \bar{f}_i = \frac{1}{T} (M(T) - M(0)), \quad (23)$$

где \bar{f}_i – усредненные потоки. Многие колебательные процессы имеют период колебаний много меньше, чем время удвоения биомассы (средняя длительность жизненного цикла клеток). Имеет смысл взять время усреднения T меньшим, чем время удвоения биомассы, но существенно большим, чем периоды биохимических колебаний. Это позволяет вышеприведенным балансовым уравнениям быть применимыми к медленным переходным процессам, характерное время которых – порядка длительности жизненного цикла клеток. Поскольку регуляторные механизмы клеток обеспечивают малость $M(t)$, правая часть (23) при вышеуказанных T становится малой по сравнению с каждым из потоков \bar{f}_i . Поэтому для усредненных по времени потоков РО и МЭС стационарное приближение справедливо.

В то же время для медленных переменных, таких как концентрация биомассы, динамические уравнения необходимы, и система таких уравнений должна использовать соотношения между метаболическими потоками, полученные как следствие стационарных балансовых соотношений.

Отметим также, что уравнения материально-энергетического баланса – линейные. Тем не менее, нелинейность регуляторных кинетических механизмов клетки существенно присутствует в стехиометрическом описании метаболизма, хотя и в неявной форме. Эти механизмы вместе со структурными свойствами клеток обеспечивают отсутствие выхода большинства метаболитов во внешнюю среду и предотвращают накопление низкомолекулярных метаболитов внутри клеток (последнее вызывало бы разрыв оболочки и клеточных мембран из-за высокого осмотического давления).

Помимо задач, связанных с ростом биомассы и образованием продукта метаболизма, накапливающегося во внешней среде, могут представлять интерес и другие задачи, относящиеся к макромолекулярному составу биомассы, к ее генетическому аппарату, к функционированию тонких механизмов клеточной регуляции и т. д. В этих случаях учет нестационарности тех или иных переменных необходим, но необходим и учет всех сложностей моделирования, описанных выше.

Обсуждение

Стехиометрический анализ не ставит перед собой задачу вычисления скоростей биохимических процессов. Он определяет соотношения между метаболическими потоками, имеющими важное значение с точки зрения физиологии клеток и их сообществ, полагая при этом известными те скорости, от которых зависят такие соотношения. Одним из них является выход биомассы из потребленного источника энергии.

Материально-энергетический баланс является формой стехиометрии, основанной на наиболее общей мере метаболических потоков (редоксон) и максимально приближенной к балансу энергии. Это компактное представление биоэнергетики метаболизма, дающее его экономную схему, обладающую высокой степенью соответствия объекту исследования. Отсюда эффективность расчетов, проводимых на основе этого подхода.

Баланс не идентифицирует однозначно тот механизм, который определяет скорость всего процесса. Однако баланс указывает, на что следует обратить внимание в этом аспекте. Важным моментом является наличие лимитирования роста. Если лимитирует так называемый консервативный субстрат (не источник энергии и не акцептор электронов для электрон-транспортной цепи), то его концентрация в среде непосредственно определяет величину скорости роста μ . Тогда формулы типа (7), (12), (20) и т. д. выражают скорость потребления источника энергии через μ . В противном случае, когда лимитирует восстановленный субстрат или свет, скорость потребления источника энергии непосредственно зависит от концентрации субстрата или интенсивности света, а μ выражается через эту скорость и зависит от внешних условий через нее. Еще одним важным фактором, участвующим в этих соотношениях, является скорость расходов энергии на поддержание клеток. Это еще один механизм влияния среды и на баланс, и на кинетику метаболизма.

В случае, когда имеет место синтез восстановленных продуктов и, соответственно, разветвление потока редоксонов на идущий в биомассу и в продукты, соотношение этих потоков определяется механизмами, осуществляющими регуляцию метаболизма. Это еще один кинетический фактор, влияющий на стехиометрию метаболизма в этом случае.

В силу сказанного выше о проблемах разработки структурированных моделей становится ясно, что моделирование биохимических реакций, протекающих в гомогенной среде, *может не* давать результатов, соответствующих реальному поведению клеточных популяций. Но это не значит, что оно их *не может* давать. Это означает только то, что к этим проблемам следует относиться внимательно, учитывая их и при постановке задачи, и при интерпретации результатов решения. Однако можно уверенно сказать, что феноменологические зависимости скоростей от условий среды, при учете сказанного здесь о стехиометрических связях между метаболическими потоками, являются перспективным подходом, несколько не устаревшим. Более того, удачная «биохимическая» модель может скорее рассматриваться как феноменологическая, а лежащая в ее основе биохимическая схема – как эвристический способ нахождения такой зависимости.

Приведенные результаты показывают, что, помимо моделей, основанных на ограниченной совокупности «ключевых» реакций, необходимо рассмотрение метаболизма в целом. Стехиометрия, основанная на законах сохранения, выявляет простые закономерности, управляющие столь сложной системой.

Список литературы

- Акименко В. К. Альтернативные оксидазы микроорганизмов. – М.: Наука, 1989.
- Васильева А. Б., Бутузов В. Ф. Асимптотические разложения решений сингулярно возмущенных уравнений. – М.: Наука, 1973.
- Дудина Л. П. Проверка лимитирующего компонента среды в процессе непрерывного культивирования микроорганизмов. Прикладная биохимия и микробиология. – 1979, 15, 817–821.
- Иерусалимский Н. Д. Основы физиологии микробов. – М.: Издательство АН СССР, 1963.
- Минкевич И. Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. – М.–Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2005.
- Минкевич И. Г., Ерошин В. К. Материальный и энергетический баланс аэробного роста микроорганизмов и его биохимические основы / Всесоюзное совещание по управляемому биосинтезу и биофизике популяций, 1973, Красноярск. Рр 43–44.
- Минкевич И. Г., Ерошин В. К. Закономерности внутриклеточного материально-энергетического баланса роста микроорганизмов // Успехи современной биологии. 1976, 82, 103–116.
- Паников Н. С. Кинетика роста микроорганизмов. Общие закономерности и экологические приложения. – М.: Наука, 1992.

- Перт С. Д.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978.
- Пригожин И., Дефэй Р.* Химическая термодинамика. – Новосибирск: Наука, 1966.
- Пригожин И., Кондепуди Д.* Современная термодинамика. От тепловых двигателей до диссипативных структур. – М.: Мир, 2002.
- Рубин А. Б.* Биофизика. Т. 2. – М.: МГУ, 2000.
- Скулачев В. П.* Энергетика биологических мембран. – М.: Наука, 1989.
- Aiba S.* Growth Kinetics of Photosynthetic Microorganisms. Advances in Biochemical Engineering. Pp. 85–156 1982.
- Antony C.* The Biochemistry of Methylotrophs, Academic Press. NY, 1982.
- Buchanan B. B., Gruissem W., and Jones R. L.* Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 2000.
- Elston T., Wang H., and Oster G.* Energy Transduction in ATP Synthase. Nature. 1998, 391, 510–513.
- Erickson L. E., Minkevich I. G., and Eroshin V. K.* Utilization of Mass-Energy Balance Regularities in the Analysis of Continuous Culture Data. Continuous Cultivation of Microorganisms. Sikyta B., Fencel Z. and Polacek V. (eds.), 1978, pp. 227–234, Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences Prague.
- Gobel F.* Quantum efficiencies of growth. Photosynthetic bacteria. Sistrom W.R. C. R. K. (ed.). Pp. 907–926, Plenum Press New-York, 1978.
- Kharasch M. S.* Heats of Combustion of Organic Compounds. Bureau of Standards Journal of Research. 1929, 2, 359–430.
- Kharasch M. S. and Sher B.* The Electronic Conception of Valence and Heats of Combustion of Organic Compounds. Journal of Physical Chemistry. 1925, 29, 625–658.
- Minkevich I. G.* Physico-Chemical Properties of Organic Compounds and the Energetics of Metabolism. Journal of Theoretical Biology. 1982, 95, 569–590.
- Minkevich I. G.* Mass-Energy Balance for Microbial Product Synthesis – Biochemical and Cultural Aspects. Biotechnology and Bioengineering. 1983, 25, 1267–1293.
- Minkevich I. G.* Estimation of Available Efficiency of Microbial Growth on Methanol and Ethanol. Biotechnology and Bioengineering. 1985, 27, 792–799.
- Minkevich I. G., Dedyukhina E. G., and Chistyakova T. I.* The effect of lipid content on the elemental composition and energy capacity of yeast biomass. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010, 88, 799–806.
- Minkevich I. G. and Eroshin V. K.* Productivity and Heat Generation of Fermentation under Oxygen Limitation. Folia Microbiologica. 1973, 18, 376–385.
- Minkevich I. G., Laurinavichene T. V., and Tsygankov A. A.* Theoretical and Experimental Quantum Efficiencies of the Growth of Anoxigenic Phototrophic Bacteria. Process Biochemistry. 2004, 39, 939–949.
- Minkevich I. G. and Utkina L. I.* Time Scale in the Dynamics of Continuous Cultivation of Microorganisms. Biotechnology and Bioengineering. 1979, 21, 357–391.
- Neijssel O. M. and Tempest D. W.* Bioenergetic Aspects of Aerobic Growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in Carbon-Limited and Carbon-Sufficient Chemostat Culture. Archives of Microbiology. 1976, 107, 215–221.
- Nelson D. L. and Cox M. M.* Lehninger Principles of Biochemistry, 5th ed., W H. Freeman and Company. New-York, Houndmills, 2008.
- Oura E.* The Effect of Aeration on the Growth Energetics and Biochemical Composition of Baker's Yeast, 1972, pp, University of Helsinki Helsinki.

- Patel S. A. and Erickson L. E.* Estimation of Heats of Combustion of Biomass from Elemental Analysis Using Available Electron Concepts. *Biotechnology and Bioengineering*. 1981, 23, 2051–2067.
- Payne W. J.* Energy Yields and Growth of Heterotrophs. *Annual Review of Microbiology*, pp. 17–52 1970.
- Pirt S. J.* The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. *Proceedings of the Royal Society. Series B. Biological Sciences*. 1965, 163, 224–231.
- Pirt S. J.* *Principles of Microbe and Cell Growth*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1975.
- Pirt S. J.* Maintenance Energy: a General Model for Energy-Limited and Energy-Sufficient Growth. *Archives of Microbiology*. 1982, 133, 300–302.
- Russell J. B. and Cook J. M.* Energetics of Bacterial Growth: Balance of Anabolic and Catabolic Reactions. *Microbiological Reviews*. 1995, 59, 48–62.
- Srere P. A.* The metabolon. *Trends in Biochemical Sciences*. 1985, 10, 109–110.
- Srivastava D. K. and Bernard S. A.* Metabolite Transfer via Enzyme-Enzyme Complexes. *Science*. 1986, 234, 1081–1086.
- Stouthamer A. H.* A Theoretical Study on the Amount of ATP Required for Synthesis of Microbial Cell Material. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1973, 39, 545–565.
- Thornton W. M.* The Relation of Oxygen to the Heat of Combustion of Organic Compounds. *Philosophical Magazine*. 1917, 33, 196–203.