

ABSTRACTUL TEZEI

Analiza, modelarea și ingineria in silico a căilor metabolice în Escherichia coli pentru obținerea acidului succinic

Introducere: scopul principal al ingineriei metabolice este de a proiecta și reproiecta metabolismul celular, pentru a redirecționa fluxul prin metabolismul central de carbon și obținerea unor metaboliți cu impact economic ridicat (acid succinic) din resurse regenerabile - produși secundari (deșeuri) rezultate din diferite industrii. *Escherichia coli* poate fi folosit cu succes, dar producția acidului succinic în mediu minim este foarte redusă și pentru a îmbunătăți producția trebuie să modificăm căile metabolice- (inginerie metabolică, inginerie genetică). Metabolismul microorganismelor este foarte complex din această cauză manipulările metabolice sunt foarte dificile. Pentru proiectarea rațională analiza *in silico* denumit biologia sistemică s-a dovedit de a avea succes în ingineria metabolică. Folosind această metodă putem analiza fenomenele și procesele din biologie cu metodele și mijloacele sistemelor.

Prima etapă este obținerea unor modele matematice care au la bază procese fiziologice, biochimice. Analiza fluxului metabolic este cea mai des folosită pentru optimizarea proceselor biologice.

Scopul principal al cercetării a fost optimizarea *in silico* a căilor metabolice pentru obținerea acidului succinic din glucoză și glicerină și caracterizarea căilor metabolice înainte și după modificările metabolice.

Metode: modelul folosit *iJO1366 E. coli* K12 MG1655 publicat în 2011 conține peste 2000 de reacții. Pentru simulări au fost folosite diferite platforme COBRA Toolbox (MATLAB), OptFlux și GEMSiRV. Condiții de analiză: surse de carbon glucoză și glicerină, mediu minim (M9), în condiții aerobe, microaerobe și anaerobe.

Rezultate: modelul metabolic a fost updatat modificând 11 reacții importante. Primul pas a fost identificarea căilor competitive; în condiții anaerobe au fost eliminate patru căi: acidul formic, acidul lactic și etanolul, respectiv sistemul de fosfotransferază în cazul glucozei. Cu aceste modificări în condiții anaerobe randamentul acidului succinic a crescut de la 0.008 la 1.25 mol mol⁻¹ glucoză. În cazul glicerinei căile metabolice nu pot fi eliminate (rata de creștere zero) și este critic utilizarea co-substraților. Au fost testați diferiți aminoacizi respectiv glucoza; cu glucoza ca co-substrat randamentul a fost aproape 0.6 mol mol⁻¹ glicerină. Importanța genelor a fost determinat în diferite condiții, înainte și după modificări metabolice. Modificarea metabolismului redox nu schimbă numărul genelor esențiale, dar numărul genelor cu impact negativ asupra ratei de creștere în cazul mutantei a crescut. O tendință similară a fost observată după schimbarea sursei de carbon la glicerină. Genele letale nu au fost modificate semnificativ de condițiile de mediu, dar genele cu impact negativ au fost influențate de substrat și de prezența oxigenului, efectul inginerie căilor redox fiind mai redus. Folosind simulări dinamice în condiții aerobe și microaerobe avem un fenomen denumit diauxic (creștere diauxică)- metaboliții produși anterior pot fi metabolizați. Robustețea, respectiv impactul parametrilor importante asupra ratei de creștere au fost analizate folosind metoda analiza fazelor fenotipice. Au fost obținute fenotipuri calitativ distincte, determinând izoclinele dintre faze și linia optimă (care reprezintă relația optimă dintre două fluxuri metabolice). Pentru soluții alternative au fost testați algoritmi de optimizare bi-level ca OptKnock și GDLS. Rezultatele obținute au confirmat condiția anaerobă pentru glucoză iar pentru glicerină condiția optimă a fost condiția microarobă și fără co-substraturi (0.6 mol mol⁻¹ glicerină). Genele au fost eliminate din sistem folosind metoda λ -Red recombinaza și profilul metabolic a fost determinat folosind cromatograf de gaze cuplat cu spectrometru de masă.

Contribuții originale: model metabolic up-dat; rolul căilor metabolice redox în diferite condiții folosind mediu minimal; au fost create tulpini modificate genetic pentru supraproducția de acid succinic; au fost analizate efectele co-substraților în cazul glicerinei și efectul asupra biomasei și acidului succinic; am identificat efectul modificărilor genetice și condițiilor de mediu asupra genelor din sistem; creștere diauxică identificat; am identificat câteva fenotipuri distincte pentru fiecare condiții în parte; condiția optimă pentru producția acidului succinic.