



UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” din BUCUREȘTI

Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor
Departamentul de Chimie Analitică și Ingineria Mediului

TEZĂ DE DOCTORAT

Ingineria metabolică a Escherichia coli pentru obținerea 1,4-butandiolului din glucoză și glicerină

Autor: ing. Réka SINKLER

Conducător de doctorat: Prof. Dr. ing. Szabolcs LÁNYI

Comisia de doctorat

Președinte	Prof. Dr. ing. Ileana RĂU	de la	Universitatea „Politehnica” din București
Conducător de doctorat	Prof. Dr. ing. Szabolcs LÁNYI	de la	Universitatea „Politehnica” din București
Referent	Prof. Dr.ing. Cristina COSTACHE	de la	Universitatea „Politehnica” din București
Referent	Prof. Dr. ing. Stefan Eugen SZEDLACSEK	de la	Institutul de biochimie al Academiei Române
Referent	Prof. Dr. ing. Csaba PAIZS	de la	Universitatea „Babes Bolyai”, Cluj Napoca

Cuvinte cheie: 1,4-butanediol , *Escherichia coli*, ingineria metabolica, recombinare λ -Red, expresia heteroloaga, profil metabolic

București
2022

Obiectul și importanța temei.....	4
Conținutul lucrării	5
REZUMAT	6
CAPITOLUL I.....	8
STUDIU DOCUMENTAR	8
Importanța 1,4-butanediolului.....	9
Metode și procedee bazate pe inginerie metabolică a bacteriilor	9
CAPITOLUL II.....	10
MATERIALE SI METODE.....	10
Analiza in silico a producției de 1,4-BDO.....	11
Eliminarea căii concurente	12
Investigarea metaboliților formați	12
Proiectarea vectorilor recombinanți.....	13
Asamblării vectorilor recombinanți.....	13
Expresia controlată a enzimelor.....	13
Purificarea proteinelor.....	14
Introducerea căii de proiectare în tulpini optimizate.....	14
Analiza stabilității tulpinilor producătoare de BDO.....	14
Determinarea activității genelor heterologe prin analiza expresiei genelor	15
Analiza transcriptomului prin microarray	15
Validarea datelor cu RT-Q-PCR.....	16
Parametrii de cultivare in bioreactor	16
Metode analitice.....	17
CAPITOLUL III	17
REZULTATE	17
Proiectarea căii metabolice	17
Obținerea de casete de gene specifice	19
Transformare cu vectorul pKD46.....	20
Eliminarea rezistenței la antibiotic	21
Analiza metaboliților produși.....	23
Expresia și purificarea proteinelor heterologe	24

Determinarea activității enzimatică	25
Analiza expresiei genelor cu Microarray	27
Validarea rezultatelor microarray prin RT-Q-PCR.....	29
Determinarea caracteristicilor fenotipice cheie	30
Profilele metabolice ale tulpinilor mutante	30
Evaluarea mediului optimal de cultură	31
Profilul metabolic al tulpinii MG14D3-pGS1.1	33
CONCLUZII.....	33
Bibliografie selectata	35
Publicații și participări la conferințe	42

Obiectul și importanța temei

1,4-Butandiolul (BDO) este un compus chimic industrial utilizat în scară largă în medicină, industria chimică, industria textilă, papetărie, automobile și în chimia generală. Potențialul de piață ale 1,4-butandiolului crește de la an la an, folosit în aplicații precum în ingineria polimerilor și elastomerilor, solvenților și a intermediarilor chimicalelor fine. Producția globală de BDO este deocamdată asigurată în întregime din resurse petroliere, materii prime neregenerabile, precum: acetilena, butan, butadiene, etc. și BDO se află pe lista NICNAS Lista Chimicalelor Industriale cu Producție Ridicată (HVICL).

Utilizarea resurselor regenerabile pentru înlocuirea petrolului ca materie primă pentru obținerea combustibililor lichizi, a chimicalelor și a materialelor a devenit un subiect de interes în întreaga lume. Interesul deosebit se datorează creșterii prețului petrolului, efectelor negative ale petrolului asupra mediului și avantajelor utilizării resurselor regenerabile, datorate abundenței și sustenabilității lor. Prin urmare, este necesară dezvoltarea de noi tehnologii pentru a lărgi spectrul de produși. Substanțe chimice cu valoare adăugată, inclusiv 1,4-butandiolul (BDO), nu pot fi produse în mod natural de nici un organism cunoscut.

Ingineria genetică este un instrument puternic pentru manipularea genetică a sistemelor catalitice în mai multe etape implicate în metabolismul celular. Microorganismele recombinate, cu metabolizarea alterată a zahărului, sunt, prin urmare, capabile să fermenteze zahărul la unele produse chimice de specialitate, care nu pot fi produse de tulpini originale corespunzătoare. Pentru a produce BDO cu *E. coli* în primul rând ar trebui construită o cale nouă de biosinteză. Design-ul tulpinilor reconstruite poate servi ca o contribuție importantă în implementarea biorafinării prin conversia deșeurilor de biocombustibil – glicerol și bineînțeles, glucoza, în compuși chimici cu valoare adăugată. Glucoza este o sursă de carbon abundentă și poate fi găsită în multe industrii ca și produs primar sau secundar; poate fi obținută din amidon, celuloză, etc. prin hidroliză. Pe de altă parte glicerolul rezultat din esterificarea uleiurilor a devenit o sursă de carbon ieftină și abundentă. Industria biodiesel-ului este serios afectată de acest produs de reacție, ceea ce face esențială transformarea lui în produși cu valoare adăugată. Una dintre soluții este biorafinăria, unde combustibilii și chimicalele reduse pot fi obținute din glicerol cu randamente mai mari decât din zahărurile uzuale.

Obiectivul principal al tezei de doctorat a fost de a produce 1,4-butandiol (BDO) din materiile prime menționate anterior, folosind *Escherichia coli* ca tulpina de producție în mediu minimal (M9).

Conținutul lucrării

Teza de doctorat este organizată într-o succesiune logică, coerentă, care pleacă de la aspectele legate de problematica de a produce 1,4-butandiol (BDO) din materii prime regenerabile, inclusiv din glucoză sau glicerină obținut din producția de biodiesel.

Teza de doctorat este structurată pe 6 capitole, dezvoltată pe 90 pagini, conține 15 tabele, 53 figuri și o listă bibliografică cu 111 de titluri, după cum urmează:

Rezumat - “Summary” prezintă obiectivul principal, ipotezele de lucru și obiective specifice pentru atingerea obiectivului principal.

Capitolul 1 – “Literature overview” cuprinde o prezentare a importanța a 1,4 butandiolul, prețul curent al pieței, sinteza chimică a BDO, producția bio-bazată de BDO, importanța glicerolul ca sursa de carbon și metode pentru manipularea organismul țintă. De la an la an se înregistrează o creștere a producerii și utilizării de biocombustibili, în special de bioetanol și biodiesel și deaceia a fost unul dintre motivul că aceste tehnologii reprezintă alternative durabile, regenerabile și sigure din punct de vedere al protecției mediului înconjurător, comparativ cu tehnologiile utilizate pentru combustibilii fosili. Producția anuală de glicerol va crește în viitor, dezvoltarea proceselor biochimice capabile să transforme glicerolul din ce în ce mai ieftin, în compuși cu valoare adăugată, reprezentând o mare provocare și în același timp o oportunitate excelentă. Cu tehnologia propusă în acest teză de doctorat vom fi capabili să adăugăm un plus de valoare la producția biodieselului și să facem acest proces mult mai competitiv. Fermentarea glicerolului de către diferite microorganisme va fi o strategie de viitor promițătoare pentru producția unui produs mai important decât el însuși.

Capitolul 2 – În capitolul „*Materials and methods*” sunt prezentate contribuțiile teoretice originale ale autorului tezei de doctorat, folosind cele mai noi tehnici moderne pentru modificarea genetică a microorganismului-țintă. Din ceea ce știm la ora actuală, 1,4-butandiolul nu este sintetizat de nici un organism cunoscut. De aceea, practic nu există nici o cale biosintetică de creștere a producției acestui compus nenatural. De aceea a fost folosit ca organism-gază binecunoscuta bacterie *E. coli*, în care a fost introdusă calea de producere

biosintetică a BDO. Pentru reconstrucția căilor metabolice în acest organism a fost necesară introducerea unor enzime izolate din alte organisme, prin intermediul unor plasmide speciale. O potențială strategie pentru îmbunătățirea producției de BDO a fost blocarea căilor concurente, lăsând doar calea BDO pentru obținerea echilibrului redox în timpul fermentării glucozei sau glicerolului. După identificarea strategiilor in silico de înlăturare a genei utilizând cadrul de optimizare (OptKnock) rezultatele a fost verificate experimental prin utilizarea metodei de recombinare λ -Red pentru eliminarea căilor concurente. Cele mai mari provocări ale acestui obiectiv a fost: construirea și exprimarea unei căi heterologe de obținere a BDO din intermediari centrali metabolici și ingineria distribuției fluxului de carbon. Cu toate modificările enumerate în acest capitol *E. coli* a fost capabilă să producă BDO din materii prime brute ieftine. Obținerea BDO în tulpini modificate genetic a fost optimizată și în bioreactor pe medii de cultură minimale, folosind diferite condiții de mediu de cultură și diferite surse de carbon.

Capitolul 3 – „Results” este dedicat prezentării rezultatelor experimentale efectuate, analiza fluxului metabolic a fost realizată in silico, rezultatele au fost verificate experimental și în final determinat în cele mai bune condiții în bioreactor, conținând: analiza genomului total și analiza fluxului metabolic in silico, analiza transcriptomului folosind DNA microarray, HPLC pentru a măsura nivelele de expresie ale genelor implicate în diferite căi metabolice și producția de metaboliți.

Conclusions -. prezintă concluziile generale, contribuțiile originale ale autorului și principalele direcții de cercetare în viitor

APPENDIX –.conține informații suplimentare, protocoale și imagini legate de Capitolul 2.

REZUMAT

Prima ipoteză pe care se bazează tema de cercetare se referă la posibilitatea utilizării metodelor bioinformatică (capabile să manipuleze o cantitate uriașă de date genomice, transcriptomice, proteomice și metabolomice) pentru proiectarea și testarea unor noi căi metabolice, inexistente în mod natural.

A doua ipoteză a tezei enunță faptul că, alegând un metabolit important din metabolismul primar, drept compus de pornire în noua cale biosintetică, prin instrumentele ingineriei metabolice (deleția genelor specifice unor căi metabolice secundare concurente) și ingineriei genetice (over-expresia genelor heterologe) fluxul de carbon poate fi dirijat prin calea

metabolică primară în reacțiile biochimice nou-introduse; realizându-se o optimizare genetică a organismului gazdă în vederea creșterii biosintezei compusului de interes.

Pentru atingerea obiectivului principal, următoarele etape au fost realizat:

- **Modelarea metabolismului bacterian și simularea modificărilor metabolice prin utilizarea metodelor bioinformatic**

Pentru înțelegerea celulei ca un sistem, este obligatoriu folosirea unui model metabolic complex, care conține informații, cum ar fi stoichiometria reacțiilor metabolice, formule chimice, sarcina metaboliților și relațiile dintre gene, proteine și reacții. Modelul metabolic cel mai complex a tulpinei bacteriene *Escherichia coli* conține 1366 de gene și mai mult de 2500 de reacții. După analiza stoechiometrică a reacțiilor și a altor parametri, modelul metabolic existent în format SBML (Systems Biology Markup Language) a fost updatat și testat *in silico*. 1,4-butanediolul (BDO) nu este sintetizat de nici un organism cunoscut, și de aceea, calea de obținere a BDO nu este inclusă în modelul de bază. Inserarea noii căi metabolice în model a fost realizată pas cu pas, simulările a fost efectuate utilizând metoda Reconstrucție și Analiză Bazată pe Constrângeri (Constraint-Based Reconstruction and Analysis (COBRA)) a pachetului MATLAB pentru prezicerea varietății fenotipurilor metabolice.

- **Optimizarea tulpinei de producție prin inginerie metabolică**

Identificarea strategiilor de optimizare a producției metabolitului-țintă a fost realizată în primă fază *in silico*, utilizând cadrul de optimizare OptKnock, care rezultatele a fost realizate experimental prin utilizarea metodei de recombinare λ -Red pentru eliminarea căilor concurente. Următoarele gene au fost eliminate: *ldhA* (LDH- lactat dehidrogenază), *pflB* (piruvat format liază), *adhE* (alcool dehidrogenază).

- **Proiectarea căii metabolice modificate pentru producerea de 1,4 butandiol în tulpina-gazdă *Escherichia coli* MG1655**

Pentru reconstrucția căii metabolice noi în acest organism a fost necesar introducerea unor gene heterologe, care codifică enzimele necesare reacțiilor specifice alese. Enzimele corespunzătoare reacțiilor intermediare a fost selectate pe baza datelor din literatura de specialitate și baze de date specifice, folosind drept criterii de selecție în primul rând proprietățile enzimatice (valoarea K_m , K_{cat}/K_m , specificitatea de substrat, temperatura și pH optim, cofactori), proprietățile genelor codificatoare (compoziția GC), proprietăți proteice (tendința de formare a corpurilor de incluziune), respectiv distanța filogenetică a organismului din care provine gena respectivă. Cele mai active enzime găsite au fost izolate și analizate pentru a fi transforma în *E. coli*, iar ca sistem de expresie au fost ales vectori plasmidiali specifici, capabili la expresia și menținerea simultană a mai multor gene în aceeași celulă.

Elementele de reglaj transcripțional (promotor puternic T7) folosite a asigurat expresia enzimelor în cantitate adecvată.

- **Testarea experimentală a fermentației propuse și analiza transcriptomică a tulpinilor de producție**

Analiza fenotipică a tulpinilor de producție s-a realizat prin determinarea concentrației metaboliților intermediari formați din noua cale biosintetică, precum și din urmărirea formării metaboliților din căile secundare concurente, respectiv a formării biomasei. Pentru determinarea nivelului expresiei de enzime a fost analizat transcriptoma prin analiza microarray, prin determinarea nivelului de expresie a genelor dorite.

- **Optimizarea proceselor la scară de laborator**

Obținerea 1,4-butandiolul în tulpini modificate genetic va fi optimizată în bioreactor pe medii de cultură minimale, folosind diferite condiții de mediu de cultură și diferite surse de carbon.

CAPITOLUL I

STUDIUL DOCUMENTAR

Sursele de energie fosile vor fi epuizate nu foarte târziu datorită exploatării continue a acestora. În schimb, biomasa este o sursă viabilă pentru combustibili și chimicale pe termen lung [1-4]. Suplimentarea consumului de petrol cu resurse regenerabile este, astfel, de importanță critică în susținerea creșterii industriei chimice. Recent, utilizarea resurselor regenerabile pentru înlocuirea petrolului ca materie primă pentru obținerea combustibililor lichizi, a chimicalelor și a materialelor a devenit un subiect de interes în întreaga lume. O posibilă modalitate de transformare a biomasei în combustibili și chimicale combină procesele biochimice și chimice [5].

Procesul biochimic implică utilizarea unui microorganism recombinat prin inginerie metabolică cu capacitatea de a produce 1,4-butandiol (BDO) fie din materii prime regenerabile, inclusiv din glucoză sau glicerină obținut din producția de biodiesel. Ingineria metabolică modernă reprezintă o viziune sistemică în analiza metabolismului celular și în predicția/reproiectarea optimă a rețelelor metabolice cu scopul de a obține organisme cu proprietăți îmbunătățite. Ingineria genetică este un instrument puternic pentru manipularea genetică a sistemelor catalitice în mai multe etape implicate în metabolismul celular [6]. Microorganismele recombinat, cu metabolizarea alterată a zahărului, sunt, prin urmare, capabile să fermenteze zahărul la unele produse chimice de specialitate, care nu pot fi produse de tulpini originale corespunzătoare [6-8]. De exemplu, catecolul și acidul adipic au fost

obținute din glucoză utilizând *E.coli* modificată genetic, în timp ce atât glucoza și xiloza din biomasă celulozică au fost transformate în etanol de drojdia *Saccharomyces* recombinată [9]. Cu toate acestea, există alte substanțe chimice cu valoare adăugată, inclusiv 1,4-butandiolul (BDO), care nu pot fi produse în mod natural de nici un organism cunoscut. Totuși, prin utilizarea amprenteii genetice și diferitelor informații biochimice, pot fi create modele de metabolism pentru orice organism care pot ajuta la ingineria organismului pentru producerea multor produși de interes.

Utilizarea glicerolului ca sursă de carbon pentru obținerea de BDO aduce multe avantaje: glicerolul este produs ca un produs secundar al producției de biodiesel, prețul redus face ca glicerolul să fie o sursă atractivă de carbon, combustibilii și substanțele chimice pot fi obținute din glicerol cu o rată mai mare decât din zahărurile comune deoarece, de exemplu, gradul de reducere per carbon din glicerol este semnificativ mai mare decât cel al glucozei.

Importanța 1,4-butandiolului

1,4-Butandiolul este un compus chimic important, un compus organic utilizat ca intermediar pentru sinteza altor chimicale și polimeri [12].

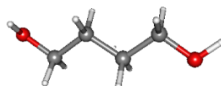


Fig.1.2.1. Modelul de structură chimică a BDO [13]

Datorită reactivității bifuncționale a celor două grupări OH (**Fig.1.2.1.**), este unul dintre cei mai importanți componenți în producția de diferite tipuri de plastic, inclusiv a polibutilen-tetraftalatului (PBT), a fibrelor elastice (Spandex) [14], poliuretanilor (barele de protecție a mașinilor), unei familii large a homopolimerilor și copolimerilor [12,15].

Metode și procedee bazate pe inginerie metabolică a bacteriilor

Alegerea microorganismului-gazdă pentru aplicații de inginerie metabolică este, în cele mai multe cazuri, determinată de ușurința de manipulare al organismului, în speță, condiții de cultivare simple, secvența genomică cunoscută, cu tehnici de manipulare genetică bine puși la punct și cu rețele metabolice înțelese în detaliu [63,64]. *Escehrichia coli* și *Saccharomyces*

cerevisiae sunt organisme-model care îndeplinesc aceste criterii, astfel sunt folosite în dezvoltarea multor strategii de reproiectare în vederea creșterii productivității și randamentului produsului-țintă [65, 66].

Un alt criteriu care trebuie luat în considerare este selecția enzimelor. Enzimele (elementele fundamentale ale căilor biosintetice heterologe) pot fi obținute din diferite surse, iar o serie de baze de date, secvențe și proprietăți funcționale ale enzimelor stau la baza unei selecții raționale ale enzimelor care catalizează pașurile individuale ale căilor biosintetice heterologe [68-71]. Diversitatea asigurată de evoluția enzimelor (enzime mai robuste, mai eficiente, cu specificitate de substrat diversificată) oferă posibilitatea selecției enzimelor pentru converșia unor substraturi ne-naturale, iar printr-o abordare modulară, enzimele pașurilor individuale provenind din diferite fundaluri biosintetice, pot fi combinate pentru a realiza o serie de reacții într-un scop definit [68].

CAPITOLUL II

MATERIALE SI METODE

Acest capitol descrie în detaliu proiectarea noii căi biosintetice care duce la producția de 1,4-BDO. Pentru a crește concentrația moleculei inițiale (succinil-coA), o potențială strategie a fost blocarea căilor concurente, prin deleția genelor piruvat formiat liază, lactat dehidrogenază și alcool dehidrogenază (*AldhA*, *ΔpflB* and *ΔaldhE₂*), folosind metoda recombinare λ-Red, lăsând doar calea BDO pentru obținerea echilibrului redox în timpul fermentării glucozei sau glicerolului [51]. Cantitatea de acid succinic formată a fost monitorizată prin HPLC.

Pentru calea biosintetica alternativă, au fost selectate enzima cu specificitate dubla aldehida/alcool dehidrogenaza din *Clostridium acetobutylicum* (adhE2 EC 1.1.1.1) și enzima nativă a *E. coli*, succinil-CoA sintetaza (sucCD EC 6.2.1.5).

În design-ul și selecția sistemului de expresie pentru calea biosintetică heterologă pentru producția de 1,4 butandiol, s-a avut în vedere, drept criteriu general, manipularea ușoară al vectorilor, posibilitatea clonării direcționate, prezența siturilor de legare ribosomale, dar și al secvențelor specifice în vederea purificării și determinării specifice ale enzimelor individuale.

Am ales folosirea unui sistem vectorial de coexpresie cunoscut și folosit în mod curent în aplicații de inginerie metabolică, dezvoltat de compania Novagen. Sistemul de coexpresie Duet

conține vectori plasmidiali bazat pe sistemul pET, cu promotor puternic T7lac, fiecare fiind proiectat pentru expresia simultană a două proteine-țintă. Vectorii din seria Duet conțin repliconi compatibili, respectiv gene marker (rezistență la diferite antibiotice). Plasmidele conțin și gena *lacI*, pentru controlul suplimentar al expresiei genice. Primul site de policlonare (MCS1) conține situri de restricție pentru clonare direcțională, și codifică un 6XHis-tag amino-terminal pentru detecție și purificare. MCS2 codifică o secvență carboxi-terminală opțională de 15 aminoacizi (S-Tag).

Știind că expresia proteinelor recombinante și delețiile genelor pot influența semnificativ viabilitatea celulară, am investigat impactul exprimării enzimelor cheie prin utilizarea tulpinilor de deleție. Acest lucru ne-a ajutat să analizăm modificările fiziologice ale *E. coli* și ne-a oferit direcții pentru optimizarea ulterioară a sistemului nostru pentru a obține randamente satisfăcătoare ale produsului țintă. După optimizarea tulpinii, cantitatea de 1,4-BDO formată a fost monitorizată prin HPLC.

Analiza in silico a producției de 1,4-BDO

Pentru simulări in silico a fost folosit modelul metabolic al *E. coli* K12 MG1655 (iJO1366) publicat anterior [96], disponibil în format SBML (Systems Biology Markup Language) la baza de date on-line BioModels (<http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/>). Pentru a actualiza modelul pentru obiectivul propus 11 reacții au fost modificate. Distribuția fluxului în starea staționară a fost estimată prin implementarea modelului în setul de aplicații COBRA Toolbox (MATLAB). Modelul conține 1366 gene, 2251 reacții metabolice și 1136 metaboliți. Modelele metabolice conțin informații despre căile metabolice, majoritatea provenite din literatura de specialitate. SBML este un standard de comunicare între webservices, biologii au definit un standard pentru a comunica datele din biochimie. În vederea simulării in silico a metabolismului celular este necesară utilizarea unor proceduri de integrare numerică (proceselor biochimice), proceduri care sunt astăzi practic standardizate. Cea mai populară abordare de optimizare pe bază de constrângere este analiza fluxului de echilibru (FBA) o aplicație directă de programare liniară pentru sistemele biologice pentru a estima rata de creștere a unui organism sau a ratei de producție a unui metabolit, folosind coeficienții stoichiometrici pentru fiecare reacție. Distribuția fluxului în starea staționară a fost estimată prin implementarea modelului în setul de aplicații COBRA Toolbox (MATLAB) și OptFlux . Inputurile au fost limitate la mediul minimal (M9) care conține numai săruri minerale și glucoză sau glicerină ca sursă de carbon. Creșterea pe glucoză a fost simulată prin constrângerea limitei

inferioare a ratei de absorbție a glucozei la valoarea determinată experimental: 20 mmol gDW-1h⁻¹. În condiții aerobe consumul de oxigen a fost fixat la 1000 mmol gDW-1h⁻¹ (absorbție nelimitată de oxigen), pentru microaerobe am utilizat 5 mmol gDW-1h⁻¹ și 0 pentru a crea condiții anaerobe.

Eliminarea căii concurente

Delețiile genelor cromozomale au fost realizate prin utilizarea metodei de recombinare λ-Red publicata de Datsenko și Wanner în 2000 [51].

Table 2.2.5.1. Lista tulpinilor mutante

Gene eliminate	GENOTIP RELEVANT	EXPLACATII	NOTA
piruvat format liaza	MG1655 $\Delta pflB$	<i>pflB</i> mutant deletional	MG14D1
piruvat format liaza lactat dehidrogenaza	MG1655 $\Delta pflB\Delta ldhA$	<i>pflB</i> , <i>ldhA</i> mutant deletional dubla	MG14D2
piruvat format liaza lactat dehidrogenaza alcool/aldehyde dehidrogenaza	MG1655 $\Delta pflB\Delta ldhA\Delta adhE_2$	<i>pflB</i> , <i>ldhA</i> , <i>adhE</i> mutant deletional tripla	MG14D3

Investigarea metaboliților formați

Pentru a studia producția de acid succinic a bacteriilor mutanta tripla MG1655 $\Delta pflB\Delta ldhA\Delta adhE_2$ în comparație cu tulpina control MG1655 următoarele metode au fost utilizate. Prima fază de creștere aerobă a fost urmată de faza de producție anaerobă. Celulele au fost cultivate în 5 ml LB într-un mediu oxigenat cu agitare la 150 rpm la 37°C peste noapte, apoi recoltate prin centrifugare la 4500 rpm timp de 5 minute, resuspendate în mediu de fermentație și transferate într-un Erlenmeyer de 100 ml care conține 20 ml bulion de fermentare. Celulele au fost cultivate în continuare în condiții aerobe cu agitare la 150 rpm la 37°C timp de 16 ore. După fază aerobă, celulele au fost recoltate prin centrifugare la 4500 rpm timp de 10-minute și resuspendate în mediu de fermentare proaspăt. Culturile au fost transferate aseptice în sticle sigilate conținând 75 ml de mediu M9 suplimentat cu 5 g/L glicerol. Aerul din spațiul de cap a fost înlocuit cu gaz CO₂ și bacteriile au fost cultivate cu agitare la 150 rpm la 37 °C timp de 120 de ore. Pentru a analiza metaboliții extracelulari, 1 ml de probă de cultură a fost recoltat prin centrifugare la 14000 rpm timp de 10 minutes, supernatantul a fost apoi filtrat printr-un filtru de seringă cu dimensiunea porilor de 0,2 μm pentru analiza cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC-Varian ProStar). Probele filtrate au fost păstrate la -20 °C până la utilizare.

Proiectarea vectorilor recombinanți

În design-ul și selecția sistemului de expresie pentru calea biosintetică heterologă pentru producția de 1,4 butandiol, s-a avut în vedere, drept criteriu general, manipularea ușoară al vectorilor, posibilitatea clonării direcționate, prezența siturilor de legare ribosomale, dar și al secvențelor specifice în vederea purificării și determinării specifice ale enzimelor individuale.

Am ales folosirea unui sistem vectorial de coexpresie cunoscut și folosit în mod curent în aplicații de inginerie metabolică, dezvoltat de compania Novagen. Sistemul de coexpresie Duet conține vectori plasmidiali bazat pe sistemul pET, cu promotor puternic T7lac, fiecare fiind proiectat pentru expresia simultană a două proteine-țintă. Vectorii din seria Duet conțin repliconi compatibili, respectiv gene marker (rezistență la diferite antibiotice). Plasmidele conțin și gena *lacI*, pentru controlul suplimentar al expresiei genice. Primul site de policlonare (MCS1) conține situri de restricție pentru clonare direcțională, și codifică un 6XHis-tag amino-terminal pentru detecție și purificare. MCS2 codifică o secvență carboxi-terminală opțională de 15 aminoacizi (S-Tag).

Clonarea a două ORF într-un singur vector de expresie necesită planificare suplimentară, în constructele cu două gene, siturile de restricție folosite pentru clonare direcționată trebuie să fie verificate și pentru prezența în cealaltă secvență codificatoare. Într-un experiment tipic, după clonarea primului insert, plasmida intermediară va fi izolată, iar prezența insertului și corectitudinea cadrului de citire, verificată prin restricție și secvențiere.

Asamblării vectorilor recombi nați

Subclonarea secvențelor codificatoare în vectorul original pETDuet1 s-a realizat prin clivarea vectorului, respectiv al produsului de PCR/genei sintetice obținut în pasul anterior cu un set de două enzime de restricție selectate pentru fiecare genă introdusă, urmată de izolarea și purificare benzilor aferente fragmentelor vectorului, respectiv insertului.

Expresia controlată a enzimelor

Expresia controlată a enzimelor în celulele transformate *E. coli* BL21(DE3)Star, cu vectorii pGS1.1, pGS2.1 s-a realizat în culturi de 100 mL, în mediu LB suplimentat cu 100 µg/ml ampicilină. Culturile de producție s-au inițiat de la valori OD de 0.1 și s-au incubat la 37°C cu agitare 250 rpm până la atingerea valorii de OD₆₀₀ de 0.5-0.7 (faza logaritmică de creștere). Inducerea expresiei genice s-a realizat prin adăugarea la culturile de producție a agentului de inducere IPTG. Întrucât concentrația de inductor folosit poate influența semnificativ cantitatea

de proteine exprimate, în special în cazul vectorilor de co-expresie, s-a stabilit concentrația optimă de IPTG folosit în teste preliminare, cărora în restul experimentelor s-a folosit o concentrație de inductor de 0.5 mM. Producția de proteine s-a realizat timp de 4 ore, iar probe pentru separarea prin electroforeză SDS PAGE și analiza proteinelor celulare s-au luat în fiecare fază a experimentelor.

Conform rezultatelor prezentate, culturile *E. coli* Star sunt adecvate producției de proteine din vectorii recombinanți pGS1.1, pGS2.1. În probele corespunzătoare a 1,2,3 și 4 ore de cultivare după inducere, pot fi remarcate benzile proteice aferente enzimelor adhE2 (94.6 kDa) și sucCD (subunități de 38 și 40 kDa), respectiv, cu mase moleculare aparente similare maselor moleculare teoretice. Benzile proteice ale enzimelor heterologe sugerează în mod vizibil o cantitate ridicată de enzime heterologe produse comparativ cu benzile aferente celorlalte proteine celulare.

Purificarea proteinelor

Deoarece proteina de interes conține un tag (etichetă) polihistidinică face posibilă separarea prin cromatografie cu afinitate de Ni⁺, unde proteina de interes cu His6Tag se leagă de ionii de Ni⁺.

Introducerea căii de proiectare în tulpini optimizate

Culturile obținute din tulpinile optimizate metabolic (tulpina M14D3, din care s-au eliminat genele pflB, ldhA și adhE) transformate (tulpini conținând vectorul ADN pGS1.1) s-au realizat în volume de 100 mL, în mediu M9, suplimentat cu ampicilină pentru menținerea plasmidelor în cursul cultivării. În vase anaerobe (condițiile de anaerobioză fiind asigurate prin purjarea mediului de cultură cu CO₂ înainte de inoculării). Inducerea exprimării genelor căii biosintetice s-a realizat cu 1 mM IPTG (izopropil-tiogalactopiranozidă), adăugată în momentul inoculării. Pe durata cultivării, s-a monitorizat creșterea numărului de celule prin măsurarea valorilor OD₆₀₀, și s-au determinat concentrațiile metaboliților de interes în intervalele specificate din supernatantul culturilor de producție conform metodologiei bioanalitice elaborate.

Analiza stabilității tulpinilor producătoare de BDO

În vederea evaluării stabilității tulpinilor posibil producătoare de BDO în diferite condiții, în termenii menținerii plasmidelor și al exprimării genelor heterologe, s-au realizat culturi aerobe și anaerobe din tulpina M14D3-pGS1.1 în mediu M9, cu ampicilină 50 ug/mL și 5g/L glucoză ca unică sursă de carbon, culturile fiind menținute la 37°C cu agitare la 250 rpm, iar inducerea

exprimării genice s-a realizat în momentul inoculării, suplimentând mediul de cultură cu 0.5 mM IPTG. În cursul fermentațiilor, s-a urmărit cantitatea de plasmide menținute în culturi, respectiv evoluția exprimării genice, la nivel de proteine, utilizând metodele descrise anterior. Cum era de așteptat, privind menținerea vectorilor recombinanți în culturile tulpinei optimizate metabolic M14D3, nu s-au înregistrat diferențe semnificative privind cantitățile de ADN plasmidial în diferite momente ale fermentațiilor aerobe, respectiv anaerobe, în cazul culturii anaerobe fiind observată o ușoară reducere în cantitatea de ADN plasmidial prezent în cultură, consistent cu valorile OD600 mai reduse. Privind exprimarea genică la nivel de proteine, urmărirea evoluției proteinelor celulare în intervale de timp definite în cursul fermentației anaerobe/aerobe a rezultat în identificarea proteinelor codificate în vectorul de co-exprimare pGS1.1, intensitatea relativă a benzilor proteice corespunzătoare modificându-se în timp, conform creșterii numărului de celule în culturi.

Determinarea activității genelor heterologe prin analiza expresiei genelor

Analiza completă a expresiei genice a tulpinilor de producție de BDO s-a propus a fi realizată prin experimente de microarray a transcriptomului tulpinilor optimizate, conținând enzimele căii biosintetice, în diferite condiții de cultură (utilizând ca sursă unică de carbon glucoza, respectiv glicerina). Datele experimentale rezultate s-au validat prin experimente de RT-Q-PCR genă-specifice. Culturile de producție (MG14D2-pGS1.1), cultivate în condiții microaerobe, în volume de 100 mL mediu M9, suplimentat cu IPTG, ampicilină și glucoză 10 g/L sau glicerină 10g/L ca sursă de carbon s-au cultivat la 37°C până atingerea fazei exponențiale de creștere ($OD_{600}=0.7-1$), după care s-a procedat la extracția de ARN total (Thermo GeneJet RNA Purification Kit), conform recomandării producătorului.

Analiza transcriptomului prin microarray

Analiza transcriptomului tulpinii de producție M14D2-pGS1.1, comparată cu tulpina de referință M14D2-pC, crescută în condiții similare s-a efectuat în laboratoarele UD-Genomed din Debrețin (Universitatea din Debrețin, Ungaria), folosind platforma de microarray GeneChip 3000 7G, cu Autoloader și Scanner GCS 3000 7G, FS450 Fluidic Station, respectiv HO 645 Hibridization Oven. Marcarea specifică a moleculelor de ARNm, adecvate hibridizării cu GeneChip *E. coli* array (Affymetrix), rezultate din probele analizate s-a realizat prin utilizarea unei reacții de reverz-transcriere cu oligonucleotizi random hexamer pentru sinteza cADN, urmată de fragmentarea cu DNAză I și marcarea prin transferază terminală, respectiv biotinilarea cu reagentul GeneChip DNA labeling reagent la terminațiile 3'

După cvantificarea probelor de cADN fragmentat, s-a procedat la hibridizarea acestora la GeneChip *E. coli* array, utilizându-se o cantitate minimă de cADN fragmentat de 1 µg. După hibridizarea realizată într-un cuptor de hibridizare HO 645, s-a realizat spălarea, marcarea și scanarea array-ului, cu ajutorul unui scanner GCS 3000 7G respectiv a platformei automate FS450 Fluidic Station.

Datele rezultate din experimente s-au analizat (filtrarea datelor relevante și analiza statistică) prin software-ul specializat GeneSpring, obținându-se o listă cu gene relevante din punctul de vedere al modificării expresiei genice.

Validarea datelor cu RT-Q-PCR

Validarea datelor obținute din analiza transcriptomului prin microarray s-a realizat prin reacții de RT-Q-PCR, pornind de la probele de ARN total obținute din culturile de producție. Sinteza cADN s-a realizat prin RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo), cu oligonucleotide oligo d(T), pentru sinteza selectivă a cADN pe baza mARN, conform recomandării producătorului. Reacțiile de PCR cantitative s-au realizat pornind de la 0.5 µg de cADN sintetizat, utilizând o platformă Mx3005P (Agilent). Reacțiile s-au realizat utilizând marcaj fluorescent bazat pe chimia SybrGreen, cu Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, folosind drept fluorocrom de referință ROX. Reacțiile s-au realizat în triplicate, pentru un set de 3 gene de interes din punctul de vedere al funcționalității căii biosintetice introduse (pflB, sucCD, pykF) folosind ca genă-control, regiunea 16SrADN. Profilul termic al reacțiilor de Q-PCR s-a realizat după cum urmează: denaturare inițială la 95°C, 10 min., 35 cicluri de denaturare la 95°C, 15", annealing la 45°C, 30", extensie la 72°C, 1' 30", urmate de un ciclu la 95°C, 1', 45°C, 30", 95°C, 30", pentru determinarea curbei de disociere.

Citirea fluorescenței s-a realizat prin metoda end-point, setată pentru sfârșitul perioadei de hibridizare, iar în ciclul terminal, citirea intensității fluorescenței fiind setat la all-point. Analiza datelor experimentale, normalizarea și reprezentarea grafică s-a efectuat prin programul MxPro.

Parametrii de cultivare in bioreactor

Pentru preparare inoculului au fost utilizate mai multe faze printre care, faze aerobe, microaerobe, anaerobe într-o sticlă de ser. Prima dată am preparat o pre-cultura aeroba pornind dintr-o singură colonie bacteriană. După inocularea acestei colonii bacteriene în 5 mL LB, a

fost incubat la o temperatura de 37°C peste noapte. Celulele au fost centrifugate la 5000 rpm timp de 10 minute, peletul a fost spălate cu PBS și resuspendate cu 1 mL de bulion de cultură, apoi s-au transferat într-un baloane Erlenmeyer sterile de 100 mL care conțineau 25 mL de mediu M9. În cazul condițiilor microaerobe/anaerobe, culturile starter au fost preparate în același mod, apoi bacteriile au fost introduse în 150 ml de baloane anaerobe sterile care conțin 100 ml de mediu. În cazul culturilor anaerobe, condițiile de anaerobioză fiind asigurate prin purjarea mediului de cultură cu CO₂ înaintea incolulării. Toate versiunile de culturi au fost pregătite în trei exemplare. Culturile de producție (de exemplu, culturi de tulpini mutante care adăpostesc plasmide pGS) au fost induse cu 1 mM IPTG (Sigma). Densitatea optică a fost urmărită cu un spectrofotometru CamSpec M330 la 600 nm.

Metode analitice

Analizele metaboliților au fost efectuate de sistemul de cromatografie Agilent Infinity 1260 echipat cu detectoare UV-VIS și RID și auto-sampler. Determinarea izocratică a glucozei, BDO, succinatului și acetatului a fost efectuată folosind o coloană Coregel 87H3 menținută la 50°C, cu H₂SO₄ 0,008 N ca fază mobilă, la debit de 0,6 ml/min. Probele au fost preparate prin centrifugarea culturilor la 10000 rpm timp de 10 minute, supernatantul a fost filtrat prin filtre Millipore de 0,2 μm și depozitat, atunci când a fost necesar, la -80°C. Calibrarea a fost efectuată cu compuși puri de calitate HPLC achiziționați toți de la Sigma.

CAPITOLUL III REZULTATE

Proiectarea căii metabolice

Calea biochimică proiectată care duce la producția de BDO pornește de la succinil-CoA, care poate fi transformat în 4-hidroxibutirat de către *aldehida/alcool dehidrogenaza* cu dublă specificitate din *Clostridium acetobutylicum* (*adhE2*). Gruparea carboxilică a 4-hidroxibutiratului poate fi activată de enzima nativă a *E. coli*, *succinil-CoA sintetaza* (*sucCD*) iar în etapa finală 4-hidroxibutiril-CoA va fi transformată în 1,4-butandiol de către același *adhE2*.

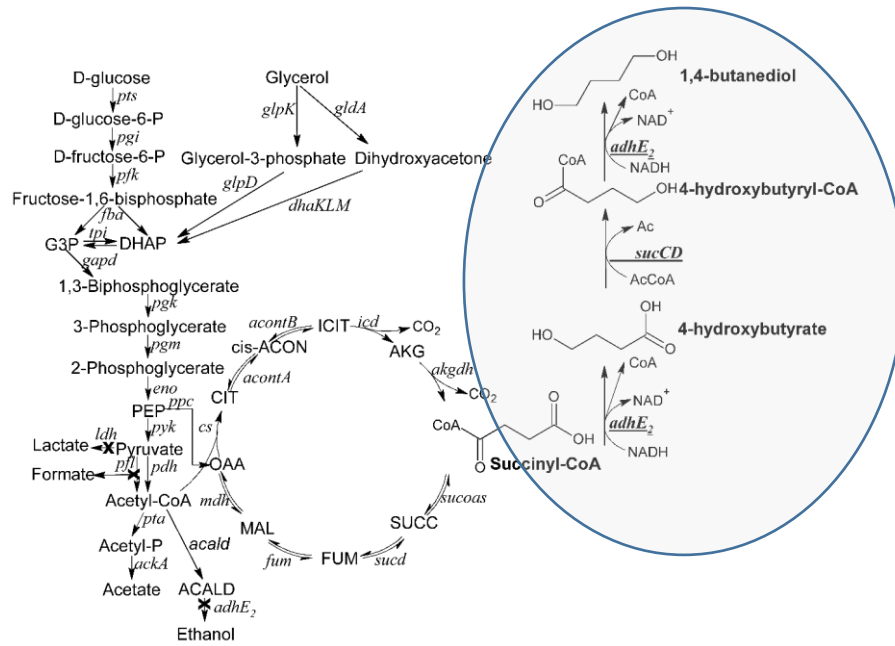


Fig. 3.1.1. Calea de biosinteză propusă pentru formarea 1,4-butandiolului
Calea propusă este prezentată evidențiată, reacțiile eliminate sunt reprezentate de un „X”

Pentru optimizarea randamentului produsului țintă, blocarea căilor metabolice concurente este una dintre strategiile promițătoare. Cu eliminarea genei *ldhA* producția de acid lactic, cu eliminarea genei *pflB* producția de acid formic și cu eliminarea genei *adhE2*, producția de etanol ar putea fi inhibată, redirecționând fluxul de carbon pentru a crește formarea succinil-coA, care este molecula de pornire a traseu noastre nou proiectate.

Analiza echilibrului fluxului a fost utilizată pentru analizele fenotipului pentru a estima distribuția fluxului și a determina dacă calea este activă în anumite condiții. Simulările au fost efectuate în condiții de stare staționară:

$$\max Z = c^T v \quad (1)$$

$$\text{subject to } S v = 0 \quad (2)$$

$$(\sum_j S_{ij} v_j = 0) \quad (3)$$

$$v_{lb} < v < v_{ub} \quad (4)$$

unde:

- Z - funcția obiectiv,
- c - vector de greutate (contribuția fiecărei reacții la funcția obiectiv),
- S - matricea stoechiometrică cu m metaboliți și n reacții,,
- v vector flux cu n elemente,
- v_{lb} și v_{ub} reprezintă limitele inferioare și, respectiv, superioare ale fluxurilor.

Având în vedere previziunile, calea BDO este inactivă în tulpina *E. coli* MG1655 de tip sălbatic chiar dacă consumul de oxigen este redus/eliminat sau sursa de carbon este schimbată

de la glucoză la glicerol. Optimizarea pe două niveluri a fost efectuată pentru a găsi gene/candidați de reacție care conduc la formarea BDO, menținând în același timp creșterea optimă (creștere de cel puțin 0,1 h⁻¹). Rezultatele cu cele mai mari producții de BDO sunt prezentate în Tabelul 3.1.1.

Table 3.1.1. Rezultate obținut in silico de modelare, comparativ cu alte lucrări [107]

SUBSTRATUL	BIOMAS S FLUX (H ⁻¹)	BDO (MMOL GDW ⁻¹ H ⁻¹)	BY- PRODUCTS (MMOL GDW ⁻¹ ¹ H ⁻¹)		CONDITII	BIBLIOGRAFIE
GLUCOZA	0.30	14.46	Acetat	21.06	Anaerob	Rezultate proprii
	0.14	15.17	Acetat	-	Anaerob	[12]
			Piruvat	-		
			Etanol	-		
	0.39	10.27	-	-	Anaerob	[108]
GLICEROL	0.25	8.68	Acetat	7.49	Microaerob	Rezultate proprii

Condițiile de fermentație optime prezise pentru glucoză ar putea fi fără oxigen (anaerob) cu 3 mutații KO (*ΔpflB*, *ΔldhA*, *ΔadhE2*), unde randamentul molar a fost de peste 0,7 mol BDO per mol glucoză. În cazul glicerolului, numai condițiile microaerobe par a fi adecvate pentru producția de BDO.

Obținerea de casete de gene specifice

Pentru producerea mutantei în primul rând a fost produsă casete specifice cu ajutorul reacției de polimerizare în lanț amplificând caseta care codifică rezistență la cloramfenicol/kanamicină având și capete de lanțomolog cu regiunea care delimitează genele țintă din genomul *E. coli*. Succesul reacției de PCR a fost verificat pe electroforeză în gel de agaroză 1%, mărimea casetei este de 1100 perechi de baze azotate în cazul casetei cloramfenicol și 1300 perechi de baze azotate în cazul casetei de kanamicină.

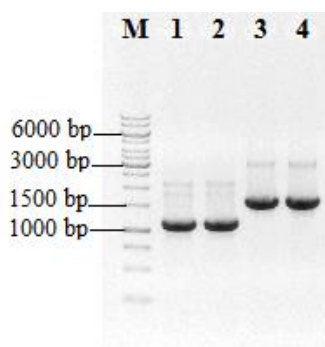


Figure 3.2.1. Verificarea casetelor de gene specifice în gel de agaroză 1%

1: 1 kb AND marker, Fermentas, 1µl; 2, 3: Casetele de gene specifice cu rezistență la cloramfenicol; 4,5: Casetele de gene specifice cu rezistență la kanamicină

Transformare cu vectorul pKD46

După ce am obținut caseta de gene specifice, am creat celule de *E. coli* K-12 MG1655 chimic competente și celulele au fost transformate cu plasmida pKD46, prin metode chimice.

Deoarece plasmida pKD46 are rezistență la ampicilină pe mediu conținând ampicilină se pot dezvolta doar celulele care au putut integra plasmidele purtătoare de rezistență, astfel având capacitatea de a descompune inelul lactamic al ampicilinei.

Verificarea eliminării genelor prin PCR

Faptul că gena a fost înlocuită într-adevăr cu caseta de cloramfenicol, am demonstrat-o cu ajutorul tehnicii PCR. Produsul de PCR a fost verificat pe gel de agaroză de 1%, rezultatul fiind ilustrat pe Figura 3.2.4.1.

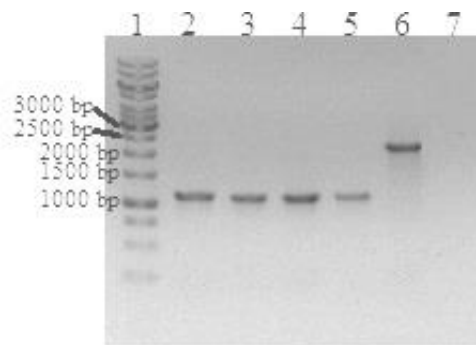


Figure 3.2.4.1. Verificarea schimbării genei piruvat-formiat liază la caseta de rezistență la antibiotice în gel de agaroză 1%

Coloana 1. 1 kb ADN marker, Fermentas

Coloanele 2,3,4,5: Produsele PCR din *Escherichia coli* K-12 W3110 Coloana 6. Gena piruvat-formiat liaza din genomul *E. coli* Coloana 7. Controlul

Conform gelului obținut putem afirma că înlocuirea genei piruvat formiat liază cu caseta de cloramfenicol a fost de succes. Ampliconul de ADN care apare în coloana a 6. este identic cu mărimea genei piruvat formiat liaza din genomul de *E. coli*, având 2295 perechi de baze azotate. Având în vedere că caseta folosită pentru deleția genei, conține pe capetele sale de lanț părți omologe cu gena respectivă, o mică parte rămâne în genom după procesul de deleție. Ampliconul de ADN apărute la valorile 1200 corespund atât casetei de cloramfenicol

(1100 perechi de baze azotate) cât și genei piruvat formiat liaza rămasă în genom (100 perechi de baze azotate).

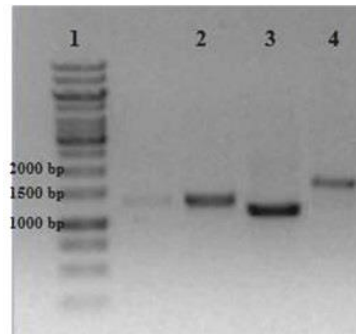


Figure 3.2.4.2. Verificarea schimbarii genei *ldhA* la caseta de specifică

Coloana 1. 1 kb ADN marker, Fermentas, Coloana 2: gena *ldhA* a produselor PCR specifice genei *E. coli* MG1655, Coloana 3: produse PCR specifice genei obținute pentru MG14D1, Coloana 4: produse PCR specifice genei pentru $\Delta pflB \Delta ldhA$

Ampliconii ADN apărut în coloana 2 este identic cu dimensiunea genei genomice *ldhA* a *E. coli* MG1655, având o dimensiune de 1319 perechi de baze. Înlocuirea genei *ldhA* cu caseta de cloramfenicol a avut succes (corespunzând mărimii casetei 1600 bp).

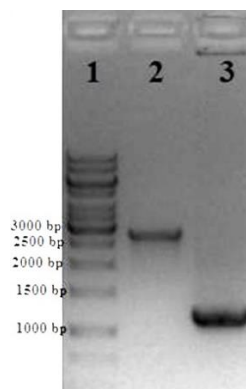


Figure 3.2.4.3. Verificarea schimbarii genei *adhE* la caseta de specifică

Coloana 1. 1 kb ADN marker, Fermentas, Coloana 2: *adhE2* de *E. coli* MG1655, Coloana 3: produse PCR specifice genei pentru $\Delta pflB \Delta ldhA \Delta adhE2$

Conform rezultatului dat putem confirma că schimbul genei *adhE2* a avut succes, produsul PCR specific genei a fost de 1100 bp, fiind dovezi pentru prezența casetei de cloramfenicol.

Eliminarea rezistenței la antibiotic

După ce am fost convinși că deleția genei a fost de succes, am eliminat rezistența la antibiotic. Pornind de la câte o colonie de mutant nul *pflB* am generat celule electrocompetente după care celulele au fost electroporate cu plasmida pCP20. Având în vedere că plasmida

pCP20 conține rezistență de ampicilină, din mixul de transformare însămânțăm pe mediu conținând ampicilină, pe care vor crește doar celulele care au preluat plasmida. Coloniile crescute au fost transferate pe un nou mediu, care sa ținut timp de 48 ore la temperatura 43°C. În acest timp celulele pierd plasmida pCP20. După 48 ore coloniile au fost transferate pe trei medii LB agarizate, dintre care unul nu a conținut antibiotice, unul a conținut ampicilină în concentrație de 100 µg/ml, iar al treile cloramfenicol în concentrația 15µg/ml. În funcție de, plăcile pe care au crescut coloniile, putem decide dacă eliminarea rezistenței a fost de succes sau nu. Dacă coloniile cresc doar pe placa care nu a conținut antibiotice, înseamnă că enzima flipaza a reușit să elimine partea casetei de gena specifică responsabilă pentru rezistența de cloramfenicol, astfel nu a putut crește pe mediu conținând cloramfenicol. Dacă nici pe placa care a conținut ampicilină nu crește, înseamnă că celula a pierdut plasmida pCP20. În cadrul experimentului nostru am transferat 10 colonii pe mediu LB agarizat în cazul ambelor tulpini, l-am incubat la temperatura 43°C și la transferat pe trei noi medii. Mutația a fost verificată și cu reacția PCR. Mărimea produsului de PCR corespunde mărimii celor două regiuni al genei de piruvat formiat liaza rămase în genom și cu o poziție de FRT (200 perechi de baze azotate).

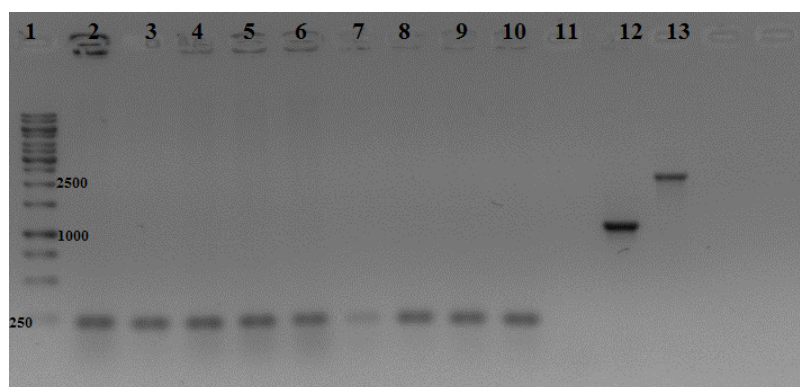


Figure 3.2.5.4.: Migrarea electroforetică în gel de agaroză a produselor PCR
 Coloana 1: 1 kb ADN marker, Fermentas; Coloana 2-10: Produs obținut prin PCR cu primeri pflB3 și pflB4, Colona 11: Controlul, Coloana 12: Caseta de gene specifice din *E. coli* K12 MG1655-*pflB*; Coloana 13: Gena piruvat formiat liaza

Mărimea genei piruvat format liaza este de 2295 perechi de baze, mărimea casetei obținute cu reacția PCR este de 1200 perechi de baze, pe când mărimea părților rămase în genom după eliminarea rezistenței la antibiotice este de 200 perechi de baze azotate. Astfel putem afirma, că partea casetei responsabile pentru rezistența la antibiotice nu se mai află în genom, am reușit să îndepărtăm rezistența la antibiotice.

Analiza metaboliților produși

Concentrația metaboliților în mediu a fost determinată prin HPLC (Varian ProStar), sistemul a fost echipat cu detector de indice de refracție, detector UV și o coloană schimbătoare de ioni (7,8 mm x 300, ICSep Coregel 87H3, Transgenomic). Faza mobilă a fost de 0,008 N H₂SO₄ și debitul de 0,6 ml/min în timpul eluării. Temperatura coloanei a fost de 50°C. Acidul succinic a fost măsurat cu detectorul UV la 210 nm și zaharurile au fost măsurate cu detectorul RI. Cromatogramele obținute sunt prezentate mai jos.

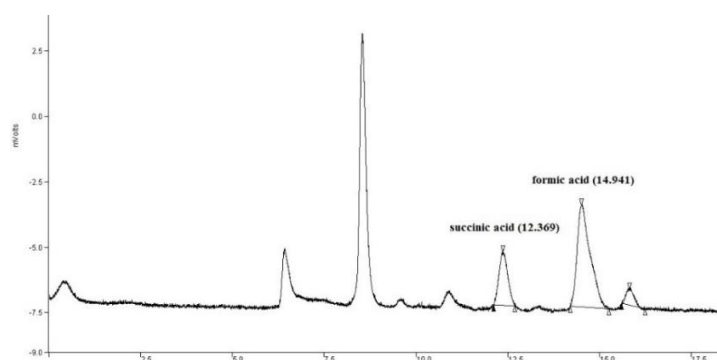


Figure 3.2.6.1. Metaboliți produși de *Escherichia coli* MG1655 după 120 de ore de fermentație

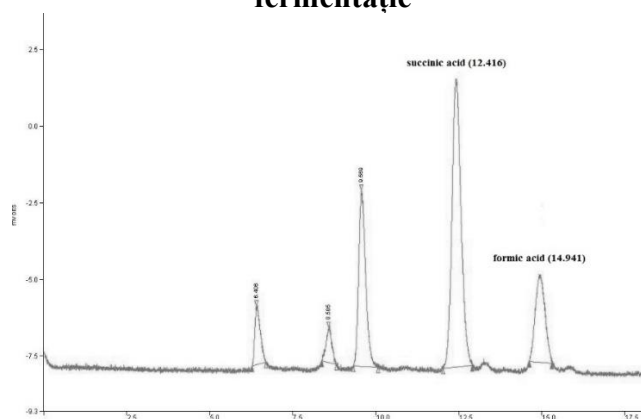


Figure 3.2.6.2. Metaboliți produși de *Escherichia coli* MG1655 Δ pflB Δ ldhA Δ adhE2 după 120 de ore de fermentație

Timpul de retenție al acidului succinic este de 12,4 min. După cum putem vedea, prin eliminarea genelor adecvate, producția de acid succinic crește semnificativ.

Expresia și purificarea proteinelor heterologe

Expresia controlată a enzimelor în celulele transformate *E. coli* BL21(DE3)Star, cu vectorii pGS1.1 s-a realizat în culturi de 100 mL, în mediu LB suplimentat cu 100 µg/ml ampicilină. Culturile de producție s-au inițiat de la valori OD de 0.1 și s-au incubat la 37°C cu agitare 250 rpm până la atingerea valorii de OD₆₀₀ de 0.5-0.7 (faza logaritmică de creștere). Inducerea expresiei genice s-a realizat prin adăugarea la culturile de producție a agentului de inducere IPTG.

Proteina recombinantă adhE2 a fost purificată prin cromatografie de afinitate. Succesul exprimării și purificării au fost vizualizate cu electroforeză pe gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE).

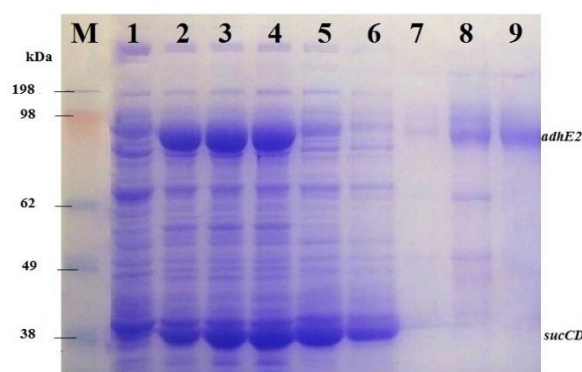


Fig.3.4.2. Proteine heterologe expresate din pGS1.1 și purificarea adhE2

Proteine celulare derivate din *E. coli* BL21 (DE3) transformate cu vectorul de co-expresie pGS1.1; proteina adhE2 a fost purificată prin legarea specifică la Ni²⁺-Sepharose. Probele au fost vizualizate cu ComassieBlueR250.

M: Marker de greutate moleculară SeeBlue Plus2 (Invitrogen); 1. supernatant de cultură celulară al BL21(DE3)-pGS1.1 înainte de inducție; 2: supernatant de cultură celulară după 1 oră de inducție; 3: supernatantul culturii celulare după 2 ore de inducție; 4: supernatantul culturii celulare după 3 ore de inducție; 5: proteine solubile obținute din extract de celule brute; 6: unbound proteins to the Ni²⁺-Sepharose resin (flowthrough); 7-8: fracții proteice pure după eluție cu 300 mM imidazol; 9: adhE2 pur dializat

Conform rezultatelor, tulpina de *E. coli* BL21(DE3) este adecvată pentru producerea de proteine din vectorul recombinant pGS1.1. După 1, 2 și 3 ore de inducție s-a format o cantitate mare de adhE2 (94,6 kDa) în comparație cu controlul (înainte de inducție). Supraexprimarea enzimei native sucCD (subunități 38 și 40 kDa) a avut, de asemenea, succes, benzile apărând pe dimensiuni similare cu greutatea moleculară teoretică. Purificarea adhE2 cu His-tagged a avut, de asemenea, succes și după eluare și dializă am câștigat aproximativ 3 mg/mL proteină pură.

Determinarea activității enzimatice

În timpul determinării activității enzimatice a *adhE2* au fost utilizate substraturi generale și specifice. *AdhE2* utilizează NAD⁺ sau NADP⁺ ca coenzimă, care este redusă în timpul dehidrogenării. NADH sau NADPH redus prezintă o absorbție puternică UV la 340 nm. Reacția poate fi urmată de măsurarea creșterii absorbanței soluției la 340 nm pe măsură ce se formează NADH. Specificitatea substratului a fost investigată folosind acid acetic, succinil-coA și butiril-coA, care sunt compușii intermediari ai căii de producție a 1,4-butandiol. Pe baza curbelor cinetice obținute, activitatea enzimatică a fost calculată folosind legea lui Beer-Lambert. Curba cinetică înregistrată și metoda de calcul pentru determinarea activității enzimatice relative sunt prezentate mai jos:

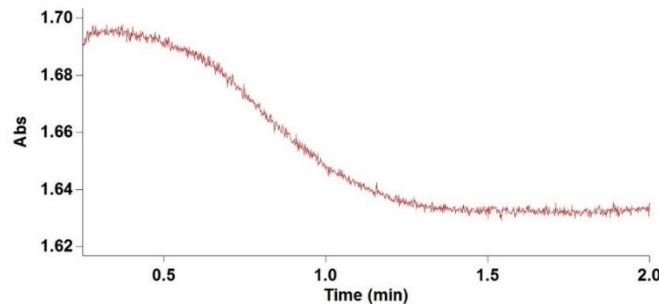


Fig.3.4.1.1. Activitatea *adhE2* pe substratul succinil-CoA

$$\Delta_{\text{Abs}}/\text{min} = 0,038$$

$$A = \varepsilon * c * L$$

$$c = \frac{A}{\varepsilon * L}$$

$$c_{\text{product}} = \frac{0,038}{6,22 * 10^3 * 1} = 0,0000061093 = 6,109 \mu\text{mol}$$

$$U_{\text{rel}} = \frac{c_{\text{product}}}{m_{\text{enzyme}} * t} = \frac{6,109 \mu\text{mol}}{12,7 \mu\text{g enzyme} * \text{min} * \text{mL}}$$

$$U_{\text{rel}} = \frac{0,481 \mu\text{mol}}{\mu\text{g enzyme} * \text{min} * \text{mL}} = 0,481 \text{ mol} \frac{\text{substrate}}{\text{mg enzyme} * \text{min} * \text{L}}$$

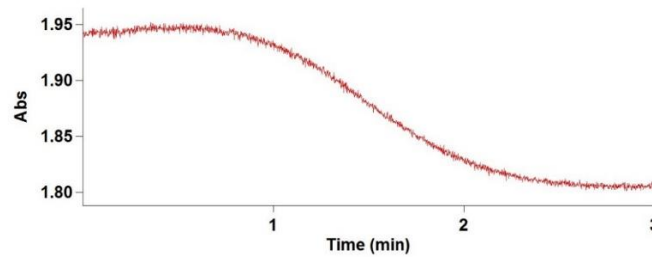


Fig.3.4.1.1. Activitatea *adhE2* pe substratul butiril-coA

$$\Delta_{\text{Abs}}/\text{min} = 0,051$$

$$c_{\text{product}} = \frac{0,051}{6,22 * 10^3 * 1} = 0,000008199 = 8,199 \mu\text{mol}$$

$$U_{\text{rel}} = \frac{c_{\text{product}}}{m_{\text{enzyme}} * t} = \frac{8,199 \mu\text{mol}}{6,351 \mu\text{g enzyme} * \text{min} * \text{mL}}$$

$$U_{\text{rel}} = \frac{1,291 \mu\text{mol}}{\mu\text{g enzyme} * \text{min} * \text{mL}} = 1,291 \text{ mol} \frac{\text{substrate}}{\text{mg enzyme} * \text{min} * \text{L}}$$

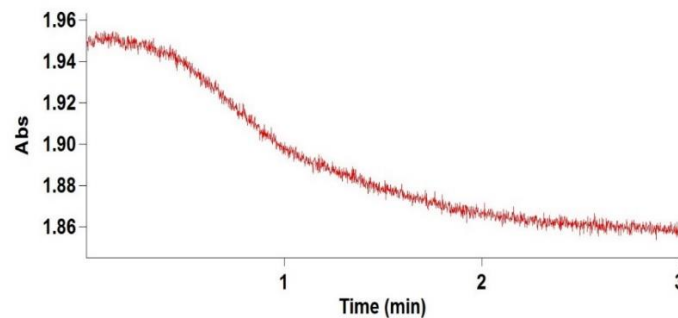


Fig.3.4.1.3. Activitatea *adhE2* asupra acidului acetic

$$\Delta_{\text{Abs}}/\text{min} = 0,033$$

$$c_{\text{product}} = \frac{0,033}{6,22 * 10^3 * 1} = 0,000005305 = 5,305 \mu\text{mol}$$

$$U_{\text{rel}} = \frac{c_{\text{product}}}{m_{\text{enzyme}} * t} = \frac{5,305 \mu\text{mol}}{3,177 \mu\text{g enzyme} * \text{min} * \text{mL}}$$

$$U_{\text{rel}} = \frac{1,669 \mu\text{mol}}{\mu\text{g enzyme} * \text{min} * \text{mL}} = 1,669 \text{ mol} \frac{\text{substrate}}{\text{mg enzyme} * \text{min} * \text{L}}$$

Rezultatele activităților enzimactice pentru diferite substraturi sunt rezumate în Tabelul 3.4.1.

Tabel 3.4.1. Values of enzymatic activities

ACIDUL ACETIC	SUCCINIL-COA	BUTIRIL-COA
U $= 0,481 \frac{\text{mol subst}}{\text{mg enzyme} * \text{min} * \text{L}}$	U $= 1,669 \frac{\text{mol subst}}{\text{mg enzyme} * \text{min} * \text{L}}$	$U = 1,891 \frac{\text{mol subst}}{\text{mg enzyme} * \text{min} * \text{L}}$

Analiza expresiei genelor cu Microarray

Tehnologia microarray poate fi folosită pentru caracterizarea profilului expresiei genice a tulpinilor bacteriene, luând în considerare faptul că determinarea modificărilor în nivelul expresiei genice poate furniza informații valoroase asupra modificărilor intervenite în rețeaua metabolică celulară ca urmare a modificărilor genetice, sau a condițiilor de cultivare. Astfel pot fi corelate clustere de gene, cu funcții biologice definite, care prezintă modificări relevante la nivel de expresie cu modificările genetice efectuate sau cu modificări în condițiile de cultivare. Prin analiza simultană a unui număr mare de transcripți se realizează producerea consecutivă a unei cantități mari de date. Drept rezultate ale analizei complete a transcriptomului tulpinilor dezvoltate s-a obținut o listă cu genele care prezintă modificări semnificative la nivel de expresie genică, analiza statistică a datelor fiind realizat prin definirea parametrului fold-change. Gene relevante din setul de probe analizate s-au comparat din punctul de vedere al substratului utilizat (glicerina: probele 1.2 și 2.2 sau glucoza: probele 1.1 și 2.1) sau pe baza activității căii heterologe (probele cu plasmida control 1.1 și 1.2 respectiv probele cu calea biosintetică funcțională 2.1 și 2.2).

S-a realizat astfel, fără a reuși însă identificarea tuturor dintre genele care prezintă diferențe semnificative în termeni de fold-change, selectarea unui număr de 40 de gene relevante din perspectiva nivelului de expresie și s-a procedat la gruparea acestora potrivit funcției biologice și relevanței din punctul de vedere al scopului acestei etape: identificarea unor puncte de intervenție în căile metabolice sau în elemente de reglaj pentru creșterea productivității tulpinilor optimizate metabolic. Întrucât scopul nostru principal a fost crearea unei optimizări metabolice în vederea formării produsului cuplat cu rata de creștere bacteriană, mai ales în cazul utilizării ca substrat al glicerinei (un substrat mai greu metabolizat ca glucoza), în analiza transcriptomică ne-am concentrat la genele care pot influența aceste două criterii. Datorită sistemului de expresie utilizat pentru introducerea căii biosintetice pentru 1,4-BDO (lizogenizarea DE3 și promotorul puternic T7), genele care prezintă cele mai mari nivele de expresie în cazul tulpinilor de producție 2.1 și 2.2 sunt implicate în sinteza T7 ARN polimerazei, inducției expresiei prin adăugarea de IPTG, respectiv aparatului translațional. Gruparea genelor

relevante după funcția biologică a rezultat în identificarea unui cluster de gene aferente metabolismului glicerinei, *glpK* (glicerol-kinaza), *glpT* (transportor de glicerol-3-fosfat) *glpF* (transportor de glicerină), dar și al *glpQ* (glicerofosforil-diester fosfodiesteraza periplasmică), acestea prezentând expresie genică crescută de 4.09x, 3.26x, 2.22x, respectiv 2.45x exprimat în fold-change în cazul tulpinii producătoare MG14D2-pGS1.1 (proba 2.2) în comparație cu tulpina de referință (proba 1.2) în prezența de glicerol ca substrat. Surprinzător, *glpC* (glicerol-3-fosfat dehidrogenaza anaerobă) prezintă un nivel de expresie mai scăzut în cazul tulpinii producătoare de 1,4-BDO (**Fig.3.6.1.1.**).

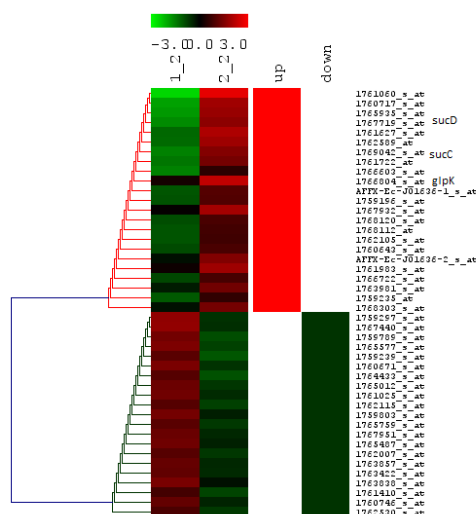


Fig.3.6.1.1 Gene relevante în termeni de modificare a nivelului de expresie în cazul comparării tulpinii de producție MG14D2-pGS1.1 (proba 2.2) și a tulpinii de referință (proba 1.2), crescuți pe glicerol ca unică sursă de carbon. (MeV 4.9.0)

O altă grupă a genelor identificate participă în metabolismul acidului piruvic, respectiv în ciclul tricarboxilic, aceste căi metabolice fiind de importanță majoră din punctul de vedere al proiectului, întrucât metabolitul intermediar din care se realizează conversia 1,4-BDO este succinil-CoA, iar căile competitive, inhibitate prin deleția genelor *ldhA* și *pflB* sunt reacții din metabolismul acidului piruvic. Cum era de așteptat, datele experimentale sugerează un nivel de expresie crescut al *sucC* și *sucD* (gene codificatoare ale subunităților succinil-CoA sintetazei, una dintre enzimele căii biosintetice, introduse prin plasmida pGS1.1) de 8.47x, respectiv de 9.84x ori exprimat în fold-change în cazul culturilor crescute pe glicerină, iar în cazul utilizării glucozei, ca substrat, se înregistrează un nivel de expresie și mai pronunțat, de 14.84x în cazul *sucC* și 12.52x în cazul *sucD*. Astfel, se poate concluziona, că plasmida recombinată purtătoare a enzimelor căii biosintetice pentru 1,4- BDO este funcțională pe substraturile folosite,

asigurând un nivel de expresie adecvat promotorului puternic T7, și poate asigura suplimentarea unui pool suplimentar de succinil-CoA. S-a observat și o creștere mai modestă a genelor aferente complexului α -cetoglutarat dehidrogenazei (sucA și sucB), înregistrându-se o creștere a nivelului de expresie în cazul tulpinii de producție de 1.64x (sucA) și 1.72 (sucB) în cazul glicerinei și 1.74x (sucA) și 1.46 (sucB) în cazul glucozei. Nivelul de expresie crescut al acnB (aconitat hidratază), cu 1.31x pe glicerină și 2.12x pe glucoză în cazul tulpinii producătoare de 1,4-BDO sugerează funcționarea ramurii oxidative a ciclului tricarboxilic, iar aceB (malat-sintetaza) prezintă și ea nivel crescut de expresie similar (2.06x pentru glicerină și 1.36 pentru glucoză). Conform datelor experimentale, s-a observat niveluri de expresie genică alterate în cazul câtorva gene cu rol de reglaj, respectiv menținerea echilibrului redox celular. Astfel, s-a înregistrat o scădere semnificativă al expresiei genei rseC (activator transcripțional redoxsensibil) (Koo et al., 2003) în cazul tulpinii producătoare în comparație cu tulpina de referință (3.94x în cazul glicerinei și 3.93x în cazul glucozei). o posibilă explicație ar putea fi echilibrarea condițiilor redox celulare de către modificările metabo-genetice introduse în tulpina producătoare. O altă genă cu rol în menținerea echilibrului redox este nuoG (NADH-quinone oxidoreductase subunit G), care prezintă un nivel de expresie crescut cu 2.27x în cazul tulpinei de producție 2.2 pe glicerină, respectiv 1.45x pe glucoză.

Validarea rezultatelor microarray prin RT-Q-PCR

Pentru reacțiile RT-Q-PCR în două etape, au fost utilizate un set de 3 gene de interes în ceea ce privește funcționalitatea căii biosintetice introduse (pflB, sucCD, pykF) folosind controlul genei, regiunea 16SrADN. Curbele de amplificare efectuate sugerează o corelație bună cu datele obținute în urma analizei transcriptomului, valorile CT (cycle limit) în cazul genei sucCD fiind de 23,56 în tulpina de producție și de 18,87 în cazul probei 1.2 (Fig.3.6. 2.1). În schimb, în cazul piruvat kinazei (pyk) nu s-au observat modificări ale nivelului de expresie în condițiile cultivării aplicate (Fig.3.6.2.2), înregistrându-se valori CT de 19,45 pentru 1.2, respectiv 19,58 pentru proba 2.2.

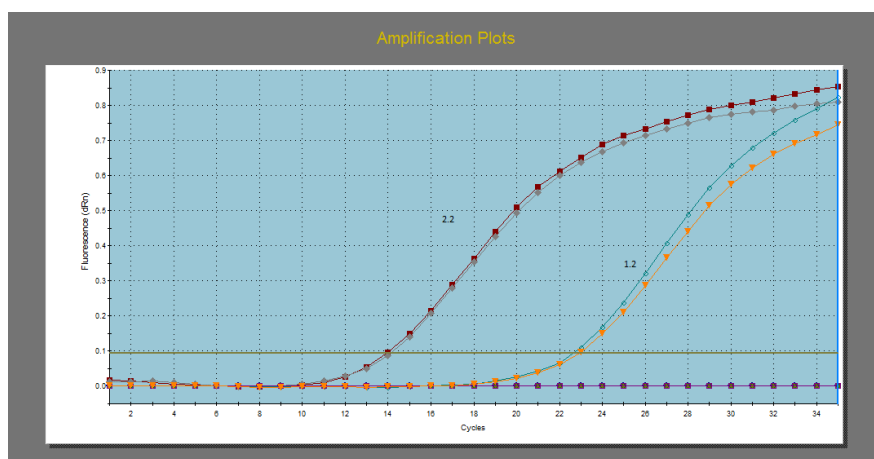


Fig.3.6.2.1. Curba de amplificare pentru reacțiile RT-Q-PCR specifice sucCD pentru tulpina de producție (2.2) și tulpina de referință (1.2), crescute folosind substrat de glicerină

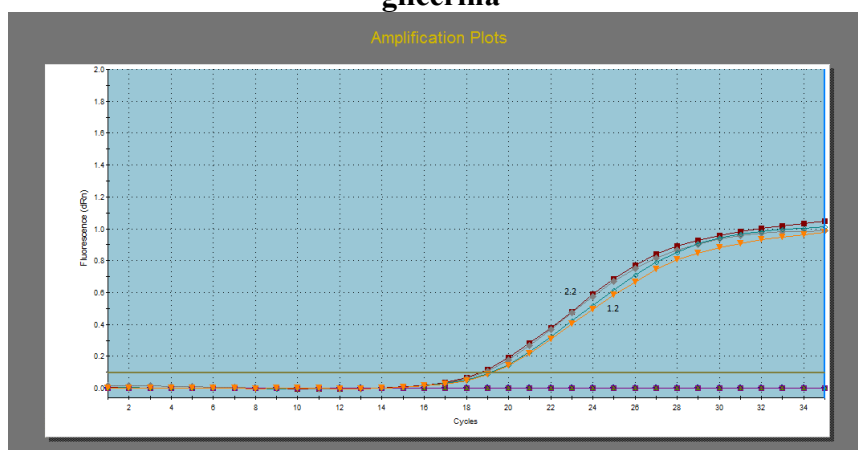


Fig.3.6.2.2. Curba de amplificare pentru reacțiile RT-Q-PCR specifice pyk în cazul tulpinii de producție (2.2) și tulpinii de referință (1.2), crescute folosind substrat de glicerină.

Determinarea caracteristicilor fenotipice cheie

Profilele metabolice ale tulpinilor mutante

Pentru a determina cele mai importante caractere fenotipice ale tulpinilor obținute, culturi anaerobe la scară mică au fost înființate în trei exemplare și cultivate așa cum este descris în secțiunea Materiale si Metode. Culturile care conține plasmide au fost induse cu IPTG 1 mM la inoculare. Creșterea culturii a fost monitorizată pe baza valorilor OD₆₀₀, iar probele la momentele de timp indicate au fost analizate prin HPLC. Rezultatele prezentate în Fig.3.8.1.1. descrie evoluția concentrației de substrat, produs și metaboliți selectați în timpul fermentațiilor. Cantitățile de acetat și succinat din supernatanții culturii MG14D3, MG14D3-pGS1 și MG14D3-pGS1.1 sugerează că succinatul și acetatul s-au format în culturi, în conformitate cu condițiile de cultură, concentrațiile mai mari ale celor doi metaboliți variind cu modificările concentrației substratului (Fig. .3.8.1.1.B).

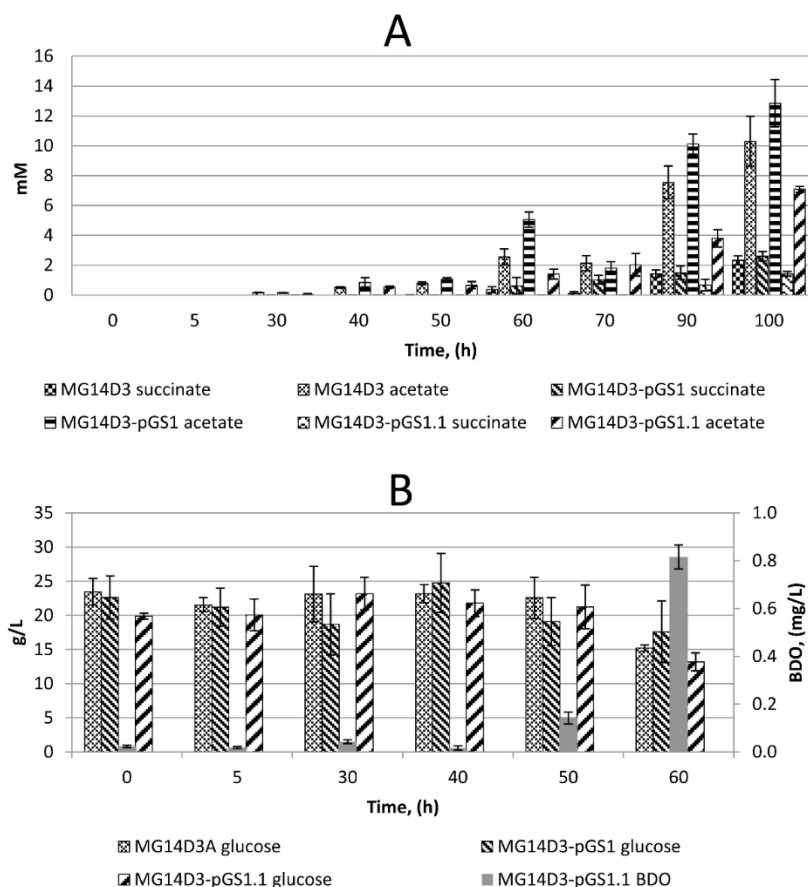


Fig.3.8.1.1.. Evoluția concentrațiilor de substrat, produs și metaboliți selectați în timpul fermentației.

A. Produse metabolice ale culturilor anaerobe MG14D3, MG14D3-pGS1 și MG14D3-pGS1.1.
B. Concentrații de substrat și BDO în culturi anaerobe MG14D3, MG14D3-pGS1 și MG14D3-pGS1.1.

Evaluarea mediului optimal de cultură

După experimente preliminare, am studiat stabilitatea tulpinilor producătoare de WT și BDO în diferite condiții de fermentație, începând cu câteva teste pentru a evalua eficiența compoziției medii selectate (M9+NaCl/M6) în comparație cu un mediu complex într-un bioreactor. Producția de biomasă a fost urmărită în primul rând în cazul tulpinii originale (Fig. 3.8.2.1.A) în mediu LB, în condiții aerobe și greutatea celulelor uscate a fost determinată în diferite momente de timp. Rezultatele noastre sugerează o corelație bună între valorile DO și valorile DW determinate, cu o DO maximă atingând 10,79 după 9 ore de cultură.

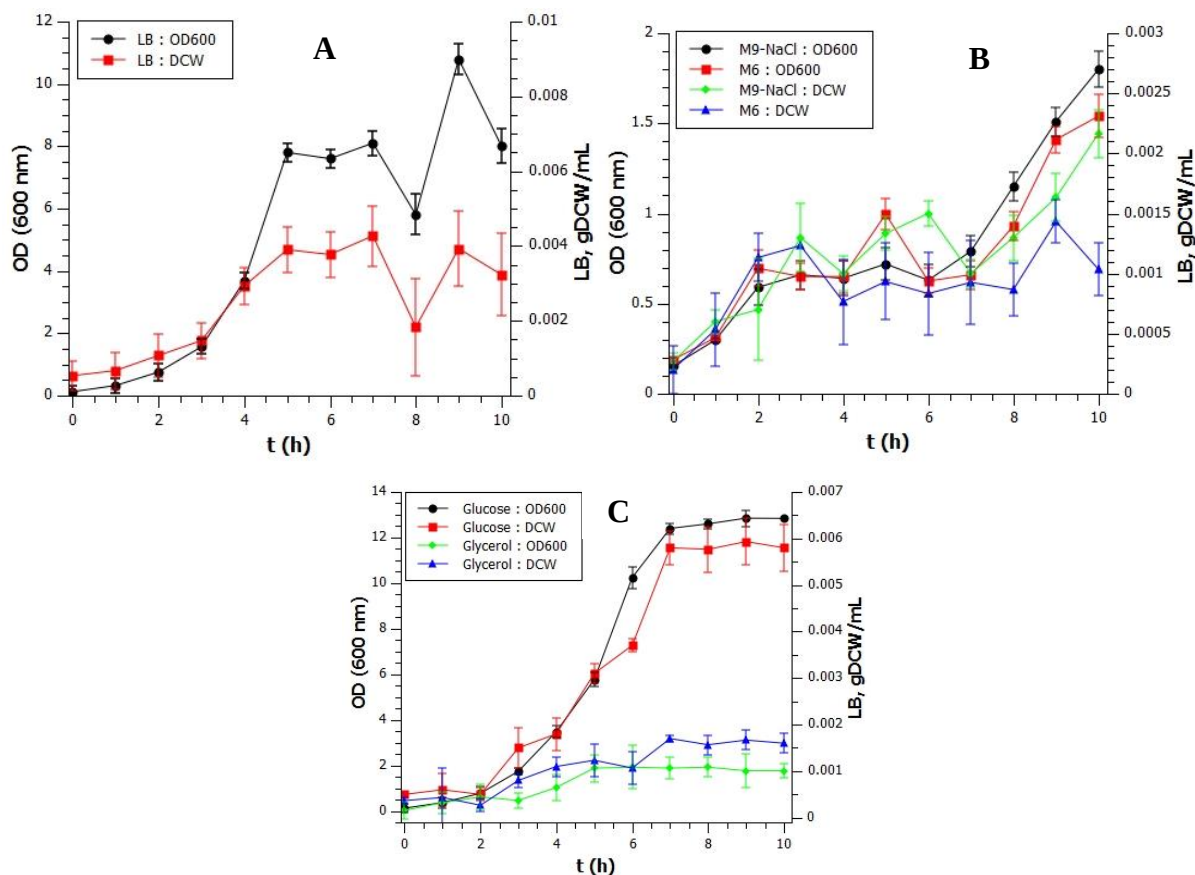


Fig.3.8.2.1 Creșterea culturilor de MG1655 și MG14D3-pGS1.1 în condiții aerobe și microaerobe.

A. MG1655 cultivat aerob pe mediu LB, monitorizarea valorilor OD și a valorilor DW corespunzătoare pe parcursul cultivării.

B. Cultura MG1655 într-un bioreactor, pe glicerol, folosind M9+NaCl sau M6. Sunt reprezentate valorile OD600 și DW.

C. Cultură în bioreactor microaerob de MG14D3-pGS1.1, pe mediu M9+NaCl, cu glucoză/glicerol ca unică sursă de carbon. Este reprezentată evoluția valorilor DO față de gDW/mL de cultură.

Au fost efectuate o serie de experimente pentru a evalua efectul mediilor minime selectate anterior asupra tulpinii WT MG1655 folosind glicerol ca unica sursă de carbon în condiții aerobe. Experimentele cu bioreactor nu au dovedit nicio influență semnificativă a celor două medii selectate (M9+NaCl/M6), M9+NaCl totuși, producând un randament de biomasă puțin mai mare. Configurarea reactorului microaerob pentru tulpina producătoare de BDO MG14D3-pGS1.1 a fost efectuată pentru a evalua efectul sursei de carbon asupra culturilor din bioreactor ale acestei tulpini. Ca mediu de cultură am folosit mediul mineral M9+NaCl selectat anterior pentru tulpina de tip sălbatic, cu glicerol (5 g/l) sau glucoză (5 g/l) adăugat în regim batch, DO fiind setat la 25%. După cum este prezentat în Fig. 3.8.2.1. C, am putut atinge o valoare DO de peste 12 în cazul glucozei ca sursă unică de carbon, în timp ce pentru glicerol, am înregistrat o valoare maximă a DO de 1,92, datorită capacității slabe de utilizare a acestui substrat [107].

Profilul metabolic al tulpinii MG14D3-pGS1.1

După stabilirea condițiilor de cultură adecvate și evaluarea comportamentului tulpinii în diferite circumstanțe, au fost efectuate experimente cu bioreactor pentru a evalua modificările metabolismului celular într-o situație foarte specifică: tranziția microaerobă/anaerobă. În acest scop, am înființat culturi bioreactor de MG14D3-pGS1.1, în mediu M9+NaCl cu glucoză și Amp, la 37°C, pH 7 și agitare inițială 350 rpm, controlând cantitatea de oxigen dizolvat în mediu printr-un flux constant de aer în spațiul aerian al reactorului. Am monitorizat modificările concentrațiilor de pO₂, OD600, substrat, produs, precum și concentrațiile de metaboliți selectați în bulionul de cultură la anumite momente de timp.

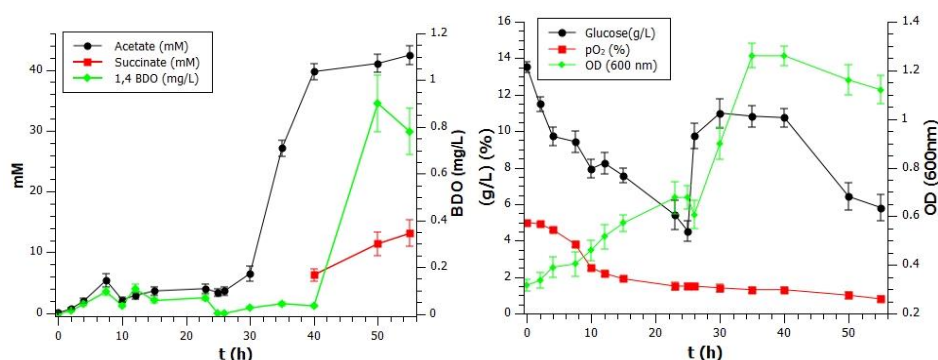


Fig.3.9.1. Tranziția microaerobă/anaerobă în creșterea MG14D3-pGS1.1 în bioreactor

A. Producția de acetat, succinat și BDO în MG14D3-pGS1.1 în culturi de bioreactor.

B. Concentrațiile de glucoză, valorile DO și valorile DO ale MG14D3-pGS1.1 în culturi de bioreactor.

După cum se arată în Fig.3.9.1. celulele au început să producă acetat, succinat și BDO la limita anaerobiozei (valoarea pO₂ în jur de 1%), cu toate acestea, am putut găsi niveluri detectabile de BDO (0,89 mg/l) în probe corespunzătoare la 50 de ore de cultură [107].

CONCLUZII

Ingineria căilor și optimizarea gazdei pot provoca dezechilibre metabolice și pot induce secreția de metaboliți secundari. Mai mult, modificările genetice cresc adesea sarcina metabolică asupra gazdei, de ex. prin utilizarea plasmidelor cu număr mare de copii sau a promotorilor puternici, care, la rândul lor, pot afecta creșterea celulelor și, în consecință, productivitatea generală. Analiza fluxului metabolic a arătat că supraexprimarea genelor căii de biosinteză crește semnificativ cheltuielile de întreținere a ATP. Prin urmare, ingineria modernă a fermentației ar trebui să se concentreze pe reducerea sarcinii metabolice și pe creșterea prosperității

metabolismului energetic. Mai multe strategii eficiente pot fi aplicate pentru a îmbunătăți disponibilitatea NAD(P)H și ATP, cum ar fi: adăugarea de surse de nutrienți (cum ar fi extract de drojdie și alți aditivi) la mediile de cultură; supraexprimarea NADH dehidrogenazei pentru a crește eficiența respirației; utilizarea enzimelor proiectate pentru a echilibra generarea și consumul de NADH/NADPH; recuperarea/separarea produsului in situ pentru a evita inhibarea produsului; și în primul rând menținerea condițiilor optime de cultivare (cum ar fi O₂ dizolvat, concentrația substratului etc.) O optimizare suplimentară poate fi realizată la nivel de transcripție/translație prin utilizarea sistemelor controlabile de expresie a genelor, reglajul fin al promotorului și optimizarea RBS. Pe baza rezultatelor noastre, se poate afirma că obiectivul nostru major, crearea unei căi de biosinteză stabilă pentru BDO, a fost atins. Studiul nostru a combinat două faze de experimente: rezultatele obținute prin metode in silico au fost luate în considerare pe parcursul experimentelor in vivo. Calea biosintetică proiectată a fost implementată într-un model metabolic și s-au determinat tulpinile knock-out adecvate pentru producția de BDO cuplată cu creștere. În diferite condiții de mediu și genetice, am găsit randamente foarte promițătoare in silico molare. Deși producția in vivo s-a dovedit a fi sub predicțiile in silico, comparabile sau sub datele raportate în literatură, producția poate fi crescută prin optimizarea suplimentară a tulpinii (reglaj fin promotor, optimizare RBS), optimizarea condițiilor de fermentație (pH) și prin experimente de adaptare pe termen lung (câteva luni). În special, dezvoltarea unei metode analitice robuste pentru 1,4-butanediol nu a fost încă realizată. În concluzie, putem spune că în studiul prezentat am realizat cu succes dezvoltarea unei tulpini modificate genetic capabile să producă BDO din materii prime durabile, notabilă din glicerol, care poate constitui baza dezvoltării de noi procese de biosinteză pentru compuși cu valoare adăugată ridicată.

Bibliografie selectata

- [1] J. v. Haveren, E. L. Scott, and J. Sanders.
- [2] T. M. Carole, J. Pellegrino, and M. D. Paster, "Opportunities in the industrial biobased products industry," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 113-116, pp. 871-85, Spring, 2004.
- [3] A. J. Straathof, "Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells," *Chem Rev*, vol. 114, no. 3, pp. 1871-908, Feb 12, 2014.
- [4] B. Erickson, Nelson, and P. Winters, "Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals," *Biotechnol J*, vol. 7, no. 2, pp. 176-85, Feb, 2012.
- [5] M. J. Burk, "Sustainable production of industrial chemicals from sugars," 1333, *Int. Sugar J*, 2010, pp. 30-35.
- [6] B. E. Dale.
- [7] L. P. Huang, B. Jin, P. Lant *et al.*
- [8] H. Danner, and R. Braun, "Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass," *Chemical Society Reviews*, vol. 28, no. 6, pp. 395-405, 1999.
- [9] Y. Xu, "'Green' Chemicals from Renewable Agricultural Biomass - A Mini Review," *The Open Agriculture Journal*, vol. 2, pp. 54-61, 2008.
- [10] W. Zha, Z. Shao, J. W. Frost *et al.*, "Rational pathway engineering of type I fatty acid synthase allows the biosynthesis of triacetic acid lactone from D-glucose in vivo," *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 14, pp. 4534-5, Apr 14, 2004.
- [11] Haselbech, R., D. Trawick *et al.*, *Microorganisms for the production of 1,4-butanediol, 4-hydroxybutanal, 4-hydroxybutyryl-CoA, Putrescine and related compounds, and methods related thereto*, 2013.
- [12] H. Yim, R. Haselbeck, W. Niu *et al.*, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol," *Nat Chem Biol*, vol. 7, no. 7, pp. 445-52, May 22, 2011.
- [51] K. A. Datsenko, and B. L. Wanner, "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 12, pp. 6640-5, Jun 6, 2000.
- [63] J. D. Keasling, "Manufacturing molecules through metabolic engineering," *Science*, vol. 330, no. 6009, pp. 1355-8, Dec 3, 2010.
- [64] D. Shepelin, A. S. L. Hansen, R. Lennen *et al.*, "Selecting the Best: Evolutionary Engineering of Chemical Production in Microbes," *Genes*, vol. 9, no. 5, pp. 249, 2018.
- [65] H. Karathia, E. Vilaprinyo, A. Sorribas *et al.*, "*Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study," *PloS one*, vol. 6, no. 2, pp. e16015-e16015, 2011.
- [66] C. G. T. C. A. M. A. n. e. S. M. S. Associates, and C. A. E. M. A. f. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9917/>.
- [68] L. B. Pickens, Y. Tang, and Y.-H. Chooi, "Metabolic engineering for the production of natural products," *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, vol. 2, pp. 211-236, 2011.
- [95] J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual*: Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001, 2001.
- [96] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?," *Nature biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 245-248, 2010.
- [97] J. S. Edwards, R. U. Ibarra, and B. O. Palsson, "In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data," *Nat Biotechnol*, vol. 19, no. 2, pp. 125-30, Feb, 2001.
- [98] A. Varma, and B. O. Palsson, "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli*

- W3110,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 60, no. 10, pp. 3724-3731, 1994.
- [99] A. Varma, B. W. Boesch, and B. O. Palsson, “Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 59, no. 8, pp. 2465-2473, 1993.
- [100] S. A. Becker, A. M. Feist, M. L. Mo *et al.*, “Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox,” *Nat Protoc*, vol. 2, no. 3, pp. 727-38, 2007.
- [101] J. Schellenberger, R. Que, R. M. Fleming *et al.*, “Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0,” *Nat Protoc*, vol. 6, no. 9, pp. 1290-307, Aug 4, 2011.
- [102] A. P. Burgard, P. Pharkya, and C. D. Maranas, “Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 84, no. 6, pp. 647-57, Dec 20, 2003.
- [103] D. S. Lun, G. Rockwell, N. J. Guido *et al.*, “Large-scale identification of genetic design strategies using local search,” *Mol Syst Biol*, vol. 5, pp. 296, 2009.
- [107] I. Miklossy, Z. Bodor, R. Sinkler *et al.*, “In silico and in vivo stability analysis of a heterologous biosynthetic pathway for 1,4-butanediol production in metabolically engineered *E. coli*,” *J Biomol Struct Dyn*, vol. 35, no. 9, pp. 1874-1889, Jul, 2017.
- [1] Haveren, J. van, Scott, E. L., & Sanders, J. (2008). Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(1), 41–57. doi:10.1002/bbb.43
- [2] T. M. Carole, J. Pellegrino, and M. D. Paster, “Opportunities in the industrial biobased products industry,” *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 113-116, pp. 871-85, Spring, 2004.
- [3] A. J. Straathof, “Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells,” *Chem Rev*, vol. 114, no. 3, pp. 1871-908, Feb 12, 2014.
- [4] B. Erickson, Nelson, and P. Winters, “Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals,” *Biotechnol J*, vol. 7, no. 2, pp. 176-85, Feb, 2012.
- [5] M. J. Burk, "Sustainable production of industrial chemicals from sugars," 1333, *Int. Sugar J*, 2010, pp. 30-35.
- [6] Eranki, P. L., Bals, B. D., & Dale, B. E. (2011). Advanced Regional Biomass Processing Depots: a key to the logistical challenges of the cellulosic biofuel industry. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5(6), 621–630. doi:10.1002/bbb.318
- [7] Huang, L. P., Jin, B., Lant, P., & Zhou, J. (2003). Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewater treatment by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78(8), 899–906. doi:10.1002/jctb.877
- [8] H. Danner, and R. Braun, “Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass,” *Chemical Society Reviews*, vol. 28, no. 6, pp. 395-405, 1999.
- [9] Y. Xu, ““Green” Chemicals from Renewable Agricultural Biomass - A Mini Review,” *The Open Agriculture Journal*, vol. 2, pp. 54-61, 2008.
- [10] W. Zha, Z. Shao, J. W. Frost *et al.*, “Rational pathway engineering of type I fatty acid synthase allows the biosynthesis of triacetic acid lactone from D-glucose in vivo,” *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 14, pp. 4534-5, Apr 14, 2004.
- [11] Haselbech, R., D. Trawick *et al.*, *Microorganisms for the production of 1,4-butanediol, 4-hydroxybutanal, 4-hydroxybutyryl-CoA, Putresceine and related compounds, and methods related thereto*, 2013.
- [12] H. Yim, R. Haselbeck, W. Niu *et al.*, “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol,” *Nat Chem Biol*, vol. 7, no. 7, pp. 445-52, May 22, 2011.
- [13] -. B. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 1, CID=8064, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8064> (accessed on Mar. 27, 2019).
- [14] <http://www.basf-petronas.com.my/> BASF Petronas Chemichals.
- [15] J. D. Trawick, M. J. Burk, and A. P. Burgard, *Microorganisms and methods for conversion of syngas and other carbon sources to useful products*, 2012.
- [16] E4tech, *From the Sugar Platform to Biofuels and Biochemicals*, 2015.

- [17] A. Burgard, M. J. Burk, R. Osterhout *et al.*, “Development of a commercial scale process for production of 1,4-butanediol from sugar,” *Curr Opin Biotechnol*, vol. 42, pp. 118-125, Dec, 2016.
- [18] <https://www.grandviewresearch.com/> Grand Viewer Research.
- [19] A. Forte, A. Zucaro, R. Basosi *et al.*, “LCA of 1,4-Butanediol Produced via Direct Fermentation of Sugars from Wheat Straw Feedstock within a Territorial Biorefinery,” *Materials (Basel)*, vol. 9, no. 7, Jul 12, 2016.
- [20] “Ashford's Dictionary of Industrial Chemicals,” *Analytical Chemistry*, vol. 67, no. 11, pp. 385A-385A, 1995/06/01, 1995.
- [21] C. Weekly, *Special report:1,4-Butanediol: A Techno-commercial profile*, 2011.
- [22] R. G. Towers, Harris, N., McKee, D., *Process for preparing 1,4-butanediol from maleic anhydride*, 1994, 1994.
- [23] T. Haas, B. Jaeger, R. Weber *et al.*, “New diol processes: 1,3-propanediol and 1,4-butanediol,” *Applied Catalysis A: General*, vol. 280, no. 1, pp. 83-88, 2005/02/25/, 2005.
- [24] M. M. Okuyama, JP), *Process for preparing 1,4-butanediol*, United States 5981810, to Mitsubishi Chemical Corporation (Tokyo, JP), 1999.
- [25] H. Gräfe, W. Kornig, H. M. Weitz *et al.*, *Butanediols, Butenediol, and Butynediol*: John Wiley & Sons., 2000.
- [26] Burgard, PA., E. Osterhout *et al.*, *MICROORGANISMS FOR PRODUCING 1,4-BUTANEDIOL AND METHODS RELATED THERETO*, 2012.
- [27] M. J. S. D. Burk, CA, US), Burgard, Anthony P. (Bellefonte, PA, US), Osterhout, Robin E. (San Diego, CA, US), Sun, Jun (San Diego, CA, US), *Microorganisms for the production of 1,4-butanediol*, United States 8178327, to Genomatica, Inc. (San Diego, CA, US), 2012.
- [28] K. MADDEN, T., D. YOUNG, M., S. BOWER *et al.*, *Production de 1,4-butanediol dans un microorganisme*, 2010.
- [29] S. Y. Lee, and H. U. Kim, “Systems strategies for developing industrial microbial strains,” *Nat Biotechnol*, vol. 33, no. 10, pp. 1061-72, Oct, 2015.
- [30] Y. S. Jang, J. M. Park, S. Choi *et al.*, “Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches,” *Biotechnol Adv*, vol. 30, no. 5, pp. 989-1000, Sep-Oct, 2012.
- [31] Haselbech, R., D. Trawick *et al.*, *Microorganisms for the production of 1,4-butanediol, 4-hydroxybutanal, 4-hydroxybutyryl-CoA, Putresceine and related compounds, and methods related thereto*, 2013.
- [32] X. J. Ji, H. Huang, and P. K. Ouyang, “Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review,” *Biotechnol Adv*, vol. 29, no. 3, pp. 351-64, May-Jun, 2011.
- [33] S. Ui, Y. Takusagawa, T. Sato *et al.*, “Production of L-2,3-butanediol by a new pathway constructed in *Escherichia coli*,” *Lett Appl Microbiol*, vol. 39, no. 6, pp. 533-7, 2004.
- [34] Z. J. Li, J. Jian, X. X. Wei *et al.*, “Microbial production of meso-2,3-butanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* under low oxygen condition,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 87, no. 6, pp. 2001-9, Aug, 2010.
- [35] D. R. Nielsen, S. H. Yoon, C. J. Yuan *et al.*, “Metabolic engineering of acetoin and meso-2, 3-butanediol biosynthesis in *E. coli*,” *Biotechnol J*, vol. 5, no. 3, pp. 274-84, Mar, 2010.
- [36] S. Mazumdar, J. Lee, and M. K. Oh, “Microbial production of 2,3 butanediol from seaweed hydrolysate using metabolically engineered *Escherichia coli*,” *Bioresour Technol*, vol. 136, pp. 329-36, May, 2013.
- [37] N. Kataoka, A. S. Vangnai, T. Tajima *et al.*, “Improvement of (R)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli*,” *J Biosci Bioeng*, vol. 115, no. 5, pp. 475-80, May, 2013.
- [38] S. Zhou, T. B. Causey, A. Hasona *et al.*, “Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 69, no. 1, pp. 399-407, Jan, 2003.
- [39] L. Y. Liang, R. M. Liu, J. F. Ma *et al.*, “Increased production of succinic acid in *Escherichia coli* by overexpression of malate dehydrogenase,” *Biotechnol Lett*, vol. 33, no. 12, pp. 2439-44, Dec, 2011.

- [40] S. J. Lee, D. Y. Lee, T. Y. Kim *et al.*, “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout simulation,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 71, no. 12, pp. 7880-7, Dec, 2005.
- [41] C. Yu, Y. Cao, H. Zou *et al.*, “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 89, no. 3, pp. 573-83, Feb, 2011.
- [42] O. Fruchey, S. Keen, Brian, T. Albin, Brooke, A. Clinton, Nye, A. Dunuwila, Dilumdombek, Bernard, *Processes for producing succinic acid from fermentation broths containing diammonium succinate*, 2011.
- [43] J. H. Park, K. H. Lee, T. Y. Kim *et al.*, “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 19, pp. 7797-802, May 8, 2007.
- [44] S. Atsumi, A. F. Cann, M. R. Connor *et al.*, “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production,” *Metab Eng*, vol. 10, no. 6, pp. 305-11, Nov, 2008.
- [45] Z. G. Qian, X. X. Xia, and S. Y. Lee, “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 104, no. 4, pp. 651-62, Nov 1, 2009.
- [46] N. R. Barton, A. P. Burgard, M. J. Burk *et al.*, “An integrated biotechnology platform for developing sustainable chemical processes,” *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 42, no. 3, pp. 349-60, Mar, 2015.
- [47] Y.-S. Tai, M. Xiong, P. Jambunathan *et al.*, “Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products,” *Nature Chemical Biology*, vol. 12, pp. 247, 02/08/online, 2016.
- [48] H. Liu, and T. Lu, “Autonomous production of 1,4-butanediol via a de novo biosynthesis pathway in engineered *Escherichia coli*,” *Metab Eng*, vol. 29, pp. 135-141, May, 2015.
- [49] S. Vaswani, *BIO-BASED 1,4-BUTANEDIOL*, 2012, <https://ihsmarket.com/products/chemical-technology-pep-bio-based-butanediol-2012.html>
- [50] Genomatica, “Genomatica and DuPont Tate & Lyle Bio Products Successfully Produce 1,4-Butanediol (BDO) on Commercial Scale,” 2012.
- [51] K. A. Datsenko, and B. L. Wanner, “One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 12, pp. 6640-5, Jun 6, 2000.
- [52] J. Palazon, A. Navarro-Ocana, L. Hernandez-Vazquez *et al.*, “Application of metabolic engineering to the production of scopolamine,” *Molecules*, vol. 13, no. 8, pp. 1722-42, Aug 18, 2008.
- [53] W. Wang, Z. Li, J. Xie *et al.*, “Production of succinate by a pflB ldhA double mutant of *Escherichia coli* overexpressing malate dehydrogenase,” *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 32, no. 6, pp. 737-45, Oct, 2009.
- [54] C. T. Trinh, and F. Srienc, “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient conversion of glycerol to ethanol,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 75, no. 21, pp. 6696-705, Nov, 2009.
- [55] S. Shams Yazdani, and R. Gonzalez, “Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products,” *Metab Eng*, vol. 10, no. 6, pp. 340-51, Nov, 2008.
- [56] G. P. da Silva, M. Mack, and J. Contiero, “Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology,” *Biotechnol Adv*, vol. 27, no. 1, pp. 30-9, Jan-Feb, 2009.
- [57] A. Murarka, Y. Dharmadi, S. S. Yazdani *et al.*, “Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, no. 4, pp. 1124-1135, 2008.
- [58] A. Kang, and T. S. Lee, “Converting Sugars to Biofuels: Ethanol and Beyond,” *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, vol. 2, no. 4, pp. 184-203, 2015.
- [59] P. Shah, F. S. Chiu, and J. C. Lan, “Aerobic utilization of crude glycerol by recombinant *Escherichia coli* for simultaneous production of poly 3-hydroxybutyrate and bioethanol,” *J Biosci Bioeng*, vol. 117, no. 3, pp. 343-50, Mar, 2014.
- [60] D. Szymanowska-Powalowska, and K. Leja, *An increasing of the efficiency of microbiological synthesis of 1,3-propanediol from crude glycerol by the concentration of biomass*, 2014.

- [61] Y. Dharmadi, A. Murarka, and R. Gonzalez, "Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering," *Biotechnol Bioeng*, vol. 94, no. 5, pp. 821-9, Aug 5, 2006.
- [62] M. Metsoviti, S. Paramithiotis, E. Drosinos *et al.*, *Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol*, 2012.
- [63] J. D. Keasling, "Manufacturing molecules through metabolic engineering," *Science*, vol. 330, no. 6009, pp. 1355-8, Dec 3, 2010.
- [64] D. Shepelin, A. S. L. Hansen, R. Lennen *et al.*, "Selecting the Best: Evolutionary Engineering of Chemical Production in Microbes," *Genes*, vol. 9, no. 5, pp. 249, 2018.
- [65] H. Karathia, E. Vilaprinyo, A. Sorribas *et al.*, "Saccharomyces cerevisiae as a model organism: a comparative study," *PloS one*, vol. 6, no. 2, pp. e16015-e16015, 2011.
- [66] C. G. T. C. A. M. A. n. e. S. M. S. Associates, and C. A. E. M. A. f. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9917/>.
- [67] A. E. McKee, B. J. Rutherford, D. C. Chivian *et al.*, "Manipulation of the carbon storage regulator system for metabolite remodeling and biofuel production in *Escherichia coli*," *Microb Cell Fact*, vol. 11, pp. 79, Jun 13, 2012.
- [68] L. B. Pickens, Y. Tang, and Y.-H. Chooi, "Metabolic engineering for the production of natural products," *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, vol. 2, pp. 211-236, 2011.
- [69] P. Carbonell, J. Wong, N. Swainston *et al.*, "Selenzyme: enzyme selection tool for pathway design," *Bioinformatics*, vol. 34, no. 12, pp. 2153-2154, Jun 15, 2018.
- [70] P. Carbonell, M. Koch, T. Duigou *et al.*, "Enzyme Discovery: Enzyme Selection and Pathway Design," *Methods Enzymol*, vol. 608, pp. 3-27, 2018.
- [71] C. Chen, H. Huang, and C. H. Wu, "Protein Bioinformatics Databases and Resources," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1558, pp. 3-39, 2017.
- [72] J. C. Anderson, J. E. Dueber, M. Leguia *et al.*, "BglBricks: A flexible standard for biological part assembly," *J Biol Eng*, vol. 4, no. 1, pp. 1, Jan 20, 2010.
- [73] J. Quan, and J. Tian, "Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways," *PLoS One*, vol. 4, no. 7, pp. e6441, Jul 30, 2009.
- [74] S. Kirchmaier, K. Lust, and J. Wittbrodt, "Golden GATEway cloning--a combinatorial approach to generate fusion and recombination constructs," *PloS one*, vol. 8, no. 10, pp. e76117-e76117, 2013.
- [75] M. Z. Li, and S. J. Elledge, "Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC," *Nat Methods*, vol. 4, no. 3, pp. 251-6, Mar, 2007.
- [76] Z. Shao, H. Zhao, and H. Zhao, *DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. Nucleic Acids Res* 37(2):e16, 2009.
- [77] M. Itaya, K. Fujita, A. Kuroki *et al.*, *Bottom-up genome assembly using the Bacillus subtilis genome vector*, 2008.
- [78] A. B. Dalia, E. McDonough, and A. Camilli, "Multiplex genome editing by natural transformation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 24, pp. 8937-8942, 2014.
- [79] D. Carroll, "Genome engineering with zinc-finger nucleases," *Genetics*, vol. 188, no. 4, pp. 773-782, 2011.
- [80] D. G. Ousterout, and C. A. Gersbach, "The Development of TALE Nucleases for Biotechnology," *Methods Mol Biol*, vol. 1338, pp. 27-42, 2016.
- [81] F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright *et al.*, "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system," *Nat Protoc*, vol. 8, no. 11, pp. 2281-2308, Nov, 2013.
- [82] J. A. Alberts B, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science, and H. G. S. W. A. f. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26872/>.
- [83] G. H. Reference, and <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/geneonoff>.
- [84] S. Andreatti, A. Chakrabarti, K. C. Soh *et al.*, "Identification of metabolic engineering targets for the enhancement of 1,4-butanediol production in recombinant *E. coli* using large-scale kinetic models," *Metab Eng*, vol. 35, pp. 148-159, May, 2016.
- [85] V. G. Yadav, M. De Mey, C. G. Lim *et al.*, "The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice," *Metab Eng*, vol. 14, no. 3, pp. 233-41, May, 2012.

- [86] S. Carneiro, E. C. Ferreira, and I. Rocha, "Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*," *J Biotechnol*, vol. 164, no. 3, pp. 396-408, Apr 10, 2013.
- [87] P. K. Ajikumar, K. Tyo, S. Carlsen *et al.*, "Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms," *Mol Pharm*, vol. 5, no. 2, pp. 167-90, Mar-Apr, 2008.
- [88] J. Kirby, and J. D. Keasling, "Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering," *Annu Rev Plant Biol*, vol. 60, pp. 335-55, 2009.
- [89] D. Klein-Marcuschamer, P. K. Ajikumar, and G. Stephanopoulos, "Engineering microbial cell factories for biosynthesis of isoprenoid molecules: beyond lycopene," *Trends Biotechnol*, vol. 25, no. 9, pp. 417-24, Sep, 2007.
- [90] R. Muntendam, E. Melillo, A. Ryden *et al.*, "Perspectives and limits of engineering the isoprenoid metabolism in heterologous hosts," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 84, no. 6, pp. 1003-19, Oct, 2009.
- [91] V. G. Yadav, and G. Stephanopoulos, "Reevaluating synthesis by biology," *Curr Opin Microbiol*, vol. 13, no. 3, pp. 371-6, Jun, 2010.
- [92] J. T. Kittleston, G. C. Wu, and J. C. Anderson, "Successes and failures in modular genetic engineering," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 16, no. 3-4, pp. 329-36, Aug, 2012.
- [93] M. Scott, C. W. Gunderson, E. M. Mateescu *et al.*, "Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences," *Science*, vol. 330, no. 6007, pp. 1099-102, Nov 19, 2010.
- [94] S. Réka, M. Both-Fodora, E. Antal *et al.*, "Metabolic engineering of *E. coli*: influence of gene deletions and heterologous genes on physiological traits," *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chimia*, vol. 64, pp. 159-174, 06/30, 2019.
- [95] J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual*: Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001, 2001.
- [96] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?," *Nature biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 245-248, 2010.
- [97] J. S. Edwards, R. U. Ibarra, and B. O. Palsson, "In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data," *Nat Biotechnol*, vol. 19, no. 2, pp. 125-30, Feb, 2001.
- [98] A. Varma, and B. O. Palsson, "Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110," *Applied and environmental microbiology*, vol. 60, no. 10, pp. 3724-3731, 1994.
- [99] A. Varma, B. W. Boesch, and B. O. Palsson, "Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates," *Applied and environmental microbiology*, vol. 59, no. 8, pp. 2465-2473, 1993.
- [100] S. A. Becker, A. M. Feist, M. L. Mo *et al.*, "Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox," *Nat Protoc*, vol. 2, no. 3, pp. 727-38, 2007.
- [101] J. Schellenberger, R. Que, R. M. Fleming *et al.*, "Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0," *Nat Protoc*, vol. 6, no. 9, pp. 1290-307, Aug 4, 2011.
- [102] A. P. Burgard, P. Pharkya, and C. D. Maranas, "Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization," *Biotechnol Bioeng*, vol. 84, no. 6, pp. 647-57, Dec 20, 2003.
- [103] D. S. Lun, G. Rockwell, N. J. Guido *et al.*, "Large-scale identification of genetic design strategies using local search," *Mol Syst Biol*, vol. 5, pp. 296, 2009.
- [104] P. Zhou, Y. Zhang, P. Wang *et al.*, *Butanol production from glycerol by recombinant Escherichia coli*, 2013.
- [105] W. S. Jung, J. H. Kang, H. S. Chu *et al.*, "Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in *Escherichia coli*," *Metab Eng*, vol. 23, pp. 116-22, May, 2014.
- [106] C. Romier, M. Ben Jelloul, S. Albeck *et al.*, "Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 62, no. Pt 10, pp. 1232-42, Oct, 2006.

- [107] I. Miklossy, Z. Bodor, R. Sinkler *et al.*, “In silico and in vivo stability analysis of a heterologous biosynthetic pathway for 1,4-butanediol production in metabolically engineered *E. coli*,” *J Biomol Struct Dyn*, vol. 35, no. 9, pp. 1874-1889, Jul, 2017.
- [108] M. Lakshmanan, B. K. Chung, C. Liu *et al.*, “Cofactor modification analysis: a computational framework to identify cofactor specificity engineering targets for strain improvement,” *J Bioinform Comput Biol*, vol. 11, no. 6, pp. 1343006, Dec, 2013.
- [109] M. Bui le, J. Y. Lee, A. Geraldi *et al.*, “Improved n-butanol tolerance in *Escherichia coli* by controlling membrane related functions,” *J Biotechnol*, vol. 204, pp. 33-44, Jun 20, 2015.
- [110] R. U. Ibarra, J. S. Edwards, and B. O. Palsson, “*Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth,” *Nature*, vol. 420, no. 6912, pp. 186-9, Nov 14, 2002.
- [111] A. R. Joyce, J. L. Reed, A. White *et al.*, “Experimental and computational assessment of conditionally essential genes in *Escherichia coli*,” *J Bacteriol*, vol. 188, no. 23, pp. 8259-71, Dec, 2006.
- [112] Saragliadis, A., Trunk, T., & Leo, J. C. (2018). Producing Gene Deletions in *Escherichia coli* by P1 Transduction with Excisable Antibiotic Resistance Cassettes. *Journal of Visualized Experiments*, (139). doi:10.3791/58267
- [113] Hollinshead, W., He, L., & Tang, Y. J. (2014). Biofuel production: An odyssey from metabolic engineering to fermentation scale-up. *Frontiers in Microbiology*. Retrieved from <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00344>
- [114] Ow, D. S. W., Lee, D. Y., Yap, M. G. S., & Oh, S. K. W. (2009). Identification of cellular objective for elucidating the physiological state of plasmid-bearing *Escherichia coli* using genome-scale in silico analysis. *Biotechnology Progress*, 25, 61–67. Retrieved from <http://doi.org/10.1002/btpr.51>
- [115] Calhoun, M. W., Oden, K. L., Gennis, R. B., De Mattos, M. J.T., & Neijssel, O. M. (1993). Energetic efficiency of *Escherichia coli*: Effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *Journal of Bacteriology*, 175, 3020–3025.
- [116] Javidpour, P., Pereira, J. H., Goh, E. B., McAndrew, R. P., Ma, S. M., Friedland, G. D., Keasling, J. D. (2014). Biochemical and structural studies of NADH-dependent FabG used to increase the bacterial production of fatty acids under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 497–505. Retrieved from <http://doi.org/10.1128/AEM.03194-13>
- [117] Baez, A., Cho, K. M., & Liao, J. C. (2011). High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: A bioreactor study with in situ product removal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1681–1690. Retrieved from <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3173-y>
- [118] Yen, J. Y., Tanniche, I., Fisher, A. K., Gillasp, G. E., Bevan, D. R., & Senger, R. S. (2015). Designing metabolic engineering strategies with genome-scale metabolic flux modeling. *Advances in Genomics and Genetics*, 5, 93. Retrieved from <http://doi.org/10.2147/AGG.S58494>
- [119] Hwang, H. J., Park, J. H., Kim, J. H., Kong, M. K., Kim, J. W., Park, J. W., Cho, K. M. (2014). Engineering of a butyraldehyde dehydrogenase of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* to fit an engineered 1,4-butanediol pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 1374–1384. Retrieved from <http://doi.org/10.1002/bit.25196>

Publicații și participări la conferințe

A. Lucrări publicate în reviste ISI

1. **Réka SINKLER**, , Márta Both-Fodor, Emőke Antal, Hunor Bartos, Szabolcs LÁNYI, Ildikó MIKLÓSSY, Metabolic Engineering Of *E.Coli*: Influence Of Genetic Modifications On Physiological Traits, *Studia Babes-Bolyai, Seria Chemia*, ISSN (Print): 1224-7154 , 2019, Impact Factor: 0,3
2. Ildikó MIKLÓSSY, Zsolt BODOR, **Réka SINKLER**, Kálmán Csongor ORBÁN, Szabolcs LÁNYI, Beáta ALBERT, *In silico* and *in vivo* stability analysis of a heterologous biosynthetic pathway for 1,4-butanediol production in metabolically engineered *E. coli*, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, ISSN: 0739-1102 (Print) 1538-0254 (Online), 1-16, 2016, Impact Factor: 3,123

A. Lucrări publicate în reviste incluse în bazele de date internaționale

Réka SINKLER, Melinda VERÉBI-KERTÉSZ, Dóra NÉMETH, Marianna PAPP, Ferenc KILÁR: Transferrin-iron-anion complex transport into HeLA cells, *Scientific Bulletin-University Politehnica of Bucharest, Seria B, Chemistry and Material Science*, ISSN (print): 1454-2331 / (online): 2286-3680, Vol.82, Iss. 2, 2020

B. Participarea la conferințe (2014-2019)

1. SALAMON Pál, BOTH-FODOR Márta, **SINKLER Réka**, ALBERT Beáta, SIPOS Emese, MIKLÓSSY Ildikó, Application of RT-qPCR in studies concerning effects of genetic modifications and culture conditions, *23rd International Conference on Chemistry*, Deva, October 25-28, 2017
2. **Réka SINKLER**, Márta Both Fodor, Pál Salamon, Emőke Antal, Zsolt Bodor, Ildikó Miklóssy, Szabolcs Lányi Heterologous expression, purification, and primary characterization of an alcohol/aldehyde dehydrogenase suitable for 1,4 butanediol production, *XXth Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering-RICCCE*, Sibiu, September 6-9, 2017, Romania.
3. BODOR Zsolt, MIKLÓSSY Ildikó, **SINKLER Réka**, ORBÁN Kálmán Csongor, LÁNYI Szabolcs, ÁBRAHÁM Beáta, An in silico Re-design of the Metabolism in *Escherichia coli* for Increased 1,4-butanediol Production from Renewable Feedstocks, 21 st International Conference on Chemistry, Șumuleu Ciuc, September 23-27, 2015, Romania
4. MIKLÓSSY Ildikó, BODOR Zsolt, **SINKLER Réka**, ORBÁN Kálmán Csongor, ÁBRAHÁM Beáta, LÁNYI Szabolcs, Production Possibilities of Non-natural Metabolites by Genetic Engineering, 21st International Conference on Chemistry, Șumuleu Ciuc, September 23-27, 2015, Romania.
5. Zsolt BODOR, Beáta ÁBRAHÁM, **Réka SINKLER**, Szabolcs LÁNYI, Csongor ORBÁN, Ildikó MIKLÓSSY, Fermentation strategies for 1,4-butanediol production from bio-industry byproducts, *3rd European Congress of Applied Biotechnology*, Nice, September 27-October 1, 2015, France.
6. Zsolt BODOR, Ildikó MIKLÓSSY, **Réka SINKLER**, Kálmán Csongor ORBÁN, Szabolcs LÁNYI, Beáta ÁBRAHÁM, *Escherichia coli* metabolizmusának *in silico* áttekintése megnövekedett 1,4-butandiol előállításához megújuló alapanyagokból (An *in silico* Re-design of the Metabolism in *Escherichia coli* for Increased 1,4-butanediol Production from Renewable Feedstocks), *XXI Nemzetközi Vegyészkonferencia*, Csíksomlyó, Szeptember 23-27, 2015, Románia.
7. Ildikó MIKLÓSSY, Zsolt BODOR, **Réka SINKLER**, Kálmán Csongor ORBÁN, Beáta ÁBRAHÁM, Szabolcs LÁNYI, Nem természetes metabolitok előállítási lehetőségei génsebészeti eljárásokkal (Production Possibilities of Non-natural Metabolites by Genetic

Engineering), *XXI Nemzetközi Vegyészkonferencia*, Csíksomlyó, Szeptember 23-27, 2015, Románia.

8. **Réka SINKLER**, Ildikó MIKLÓSSY, Zsolt BODOR, Kálmán Csongor ORBÁN, SZABOLCS Lányi, Beáta ÁBRAHÁM, Critical Analysis of Enzyme Selection, Expression and Production Potential of New Biosynthetic Pathway Enzymes in Different Knock-out Mutants of *Escherichia coli*, *XIXth Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering-RICCCE*, Sibiu, September 2-5, 2015, Romania.
9. Ildikó MIKLÓSSY, Zsolt BODOR, **Réka SINKLER**, Kálmán Csongor ORBÁN, Beáta ÁBRAHÁM, Szabolcs LÁNYI, Hozzájárulások az 1,4-butandiol *E. coli*-ban megvalósuló bioszintetikus útvonalának tervezéséhez (Contributions to engineering a new four-step biosynthetic pathway for 1,4-butanediol in *E. coli*), *XX Nemzetközi Vegyészkonferencia*, Kolozsvár, November 6-9, 2014, Románia.