

UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ de ȘTIINȚĂ și TEHNOLOGIE
„POLITEHNICA” BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ de INGINERIE CHIMICĂ și BIOTEHNOLOGII
DEPARTAMENTUL de INGINERIE CHIMICĂ și BIOCHIMICĂ



Metodologie de elaborare a modelelor cinetice complexe, structurate pe mai multe niveluri de detaliere (hibride), folosite în calcule de inginerie (bio)chimică privind optimizarea unor reactoare industriale biochimice sau biologice

„Methodology for developing complex kinetic models, structured on multiple levels of detail (hybrid), used in (bio)chemical engineering calculations regarding the optimization of industrial biochemical or biological reactors”

TEZĂ DE DOCTORAT
REZUMATUL EXTINS

Domeniul fundamental de doctorat: Științe Inginerești
Domeniul de doctorat: Inginerie Chimică

Conducător de doctorat
PhD supervisor:
Acad. Prof. Dr. Ing. Gheorghe MARIA

Doctorand
PhD student:
Ing. Laura RENEĂ (căsătorită CERNENCU)

2026
BUCUREȘTI, ROMÂNIA

Cap. I. Oportunitatea temei și principalele obiective ale tezei de doctorat

I.1.1.- Oportunitatea temei

În ultimele decenii s-a constatat o tendință de înlocuire a proceselor complexe de sinteză chimică fină, puternic energofage și generatoare de cantități mari de deseuri toxice, cu procese de biosinteză (folosind enzime izolate și purificate, sau culturi celulare drept bio-catalizatori). Motivatia este dată de multiplele avantaje oferite de procesele enzimatic (Fig. 1-1): i) selectivitate foarte mare; ii) conversie foarte mare; iii) nu generează produse secundare toxice; iv) condiții de reacție foarte blânde (apropiate de cele ambientale), ușor de realizat fără costuri mari (temperaturi joase de 20-60°C, presiune normală, pH în limite controlabile); v) utilizarea unor concentrații mici de bio-catalizator [Moulijn et al., 2001; Gavrilescu și Chisti, 2005]. În prezent se investesc eforturi considerabile în mai multe direcții de dezvoltare a biosintezelor, și anume A) ingineria proteinelor, la nivel de proiectare moleculară pentru abinerea de enzime cu proprietăți dorite; B) ingineria genetică pentru obținerea de micro-organisme modificate genetic (OMG). C) Tratamente fizico-chimice cuplate cu fabricarea de nanostructuri bioactive, cu scopul optimizării materialului suport folosit la imobilizarea enzimelor sau biomasei din bioreactor. Toate aceste eforturi (A-C) urmăresc obținerea de biocatalizatori cât mai activi, cât mai selectivi și cât mai stabili.

Aceste eforturi încearcă să depășească actualele dificultăți din industria de biosinteză, respectiv costurile mari de producere a unor enzime / culturi celulare suficient de stabile și de insensibile la impurități și la variațiile mici ale condițiilor de operare, precum și la stresul chimic (datorită aditivilor din bioreactor), și cel mecanic (datorat agitării lichidului din bioreactor), dificultăți care necesită un control avansat al bio-procesului industrial.

Astfel, în ultimii ani, s-a raportat un număr semnificativ de procese industriale enzimatic, sau biologice în scopul obținerii de produse/derivati chimici în industria de sinteză organică fină, în industria farmaceutică, în industria alimentară, sau în industria detergentilor folosind diverse bioreactoare cu culturi celulare sau enzimatic [Liese et al., 2006; Wang, 2009; Straathof and Adlercreutz, 2005; Blanch and Clark, 1997; Buchholz and Kasche, 1997; Deckwer et al., 2006; Buchholz and Hempel, 2006; Jiménez-González and Woodley, 2010].

Printre aceste noi procese sunt de menționat producția de derivati ai monozaharidelor (indulcitori sintetici), acizi organici, alcooli, aminoacizi, etc., utilizând reactoare mono- sau multi-enzimatic, sau bioreactoare cu culturi celulare utilizate la producția de drojdie, aditivi alimentari, proteine recombinat (enzime, vaccinuri), biopolimeri [Straathof and Adlercreutz, 2005; Liese et al., 2006; Maria et al., 2024B; 2024C; Maria and Renea, 2021; Gijiu and Renea, 2025]. Dezvoltarea unui proces biologic sustenabil trebuie să aibă în vedere câteva aspecte legate de caracteristicile biocatalizatorului, integrarea procesului și minimizarea costurilor, satisfăcând obiective de ordin economic, mediu / siguranta și sociale [Jiménez-González and Woodley, 2010; Khamseh and Miccio, 2012; Tsangaris and Baltzis, 1996].

Atunci când se urmărește ridicarea la scară a unui proces biologic nou, într-o primă etapă se determină pe baze experimentale caracteristicile procesului biologic (modelul cinetic, condițiile optime de reacție pentru enzima / biomasa, cinetica dezactivării enzimei / biomasei). În continuare, trebuie soluționate mai multe **probleme de inginerie biochimică** care constau în:

i).- alegerea tipului de reactor enzimatic sau biologic (cu culturi celulare) cel mai potrivit bioprocesului studiat (cu amestecare perfectă, sau cu deplasare totală dacă biocatalizatorul este imobilizat în strat fix) [Maria, 2020D; Maria and Renea, 2022B];

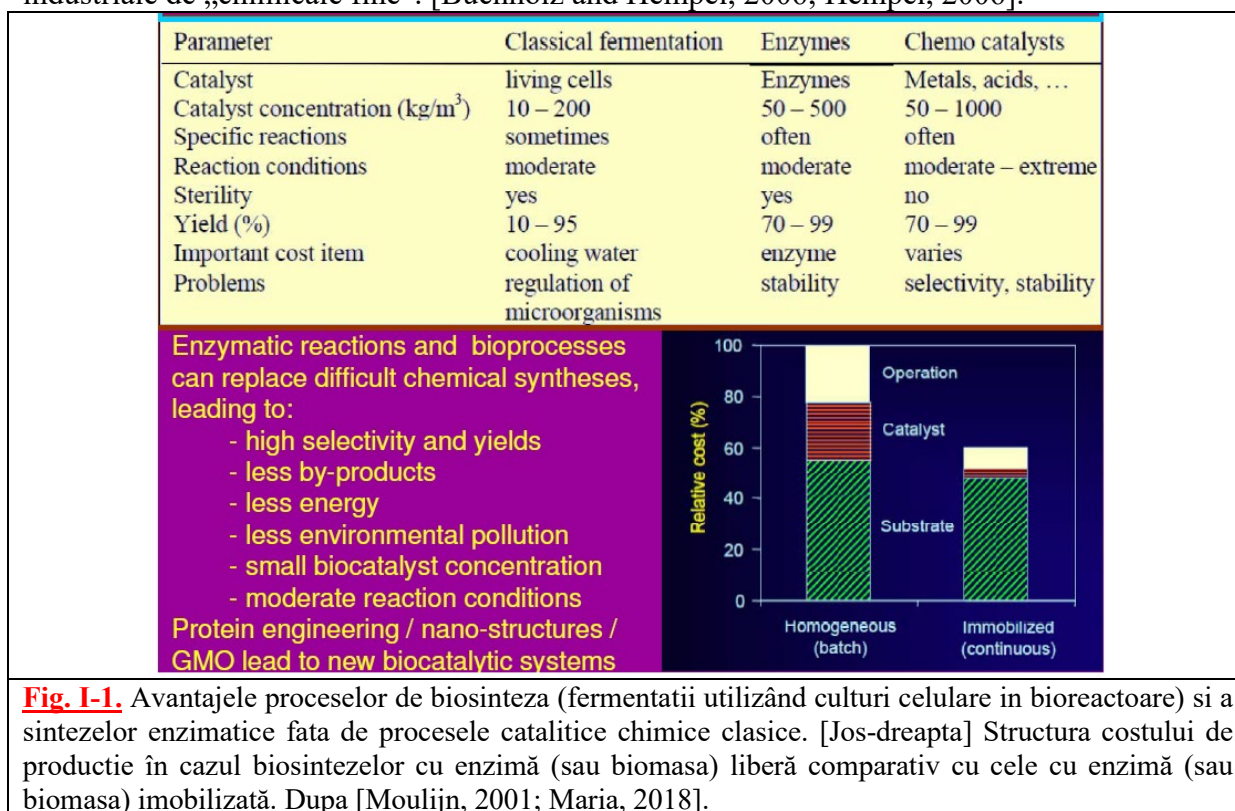
ii).- alegerea modului optim de operare al reactorului selectat [discontinuu **BR**, semi-continuu **FBR**, discontinuu cu aditie intermitentă de enzima / biomasa / substrat **BRP**, sau continuu („chemostat”)] [Maria, 2020D; Moser, 1988; Deckwer, 1991];

iii).- alegerea modului de utilizare al biocatalizatorului (enzimă / biomasa în stare liberă sau imobilizată pe suport solid/gel potrivit). Imobilizarea biocatalizatorului este de dorit, deoarece conduce la o creștere a stabilității sale și a duratei de activitate. În ciuda costurilor mari de imobilizare, efectele economice sunt deosebit de favorabile, întrucât costul biocatalizatorului neimobilizat contribuie cel mai mult la costul de producție, așa cum reiese din (Fig. 1-1) [Nedovic and Willaert, 2005].

Biosinteza industrială

Biosinteza industrială a devenit una dintre cele mai semnificative ramuri ale industriei farmaceutice și alimentare, având o importantă covârșitoare în medicină și un impact social major. La nivel mondial, producția enzimatică și biologică de chimicale este de ordinul $10^2 - 10^6$ t/an, fiind extrem de rentabilă, cu un cost mediu de cca. $10^2 - 10^3$ \$/kg produs [Moulijn et al., 2001]. De asemenea, este de remarcat faptul că prețul de producție depinde nu numai de complexitatea biosintezei, costul materiei prime, al biocatalizatorului, costul de operare, dar și de capacitatea de producție a instalației fiind invers proporțională cu aceasta.

Având în vedere faptul că în ansamblu său biotehnologia reprezintă un domeniu multidisciplinar al științelor naturii, tehnicii, tehnologiei și producției industriale, progresele înregistrate în domeniul cercetărilor de genetică și inginerie genetică, de biologie celulară și moleculară, de biochimie, biofizică și microbiologie au favorizat dezvoltarea acestei ramuri tehnologice, care realizează printre cele mai revolutionare concepte și aplicații industriale, cum ar fi: obținerea de vaccinuri și medicamente [asa-numita tehnologie 'ADN-recombinat'], produse alimentare și suplimente nutritive, biosinteze de intermediari chimici, procese enzimatic / biologice de obținere a energiei, de tratare a poluanților și deșeurilor, etc.". În prezent, aplicarea biotehnologiilor ce implică utilizarea microorganismelor existente în mod natural, selectate prin tehnici convenționale sau reprogramate prin tehnici de inginerie genetică, sau utilizarea componentelor celulare a plantelor și animalelor, cunoaște o creștere exponențială având un impact puternic asupra îmbunătățirii calității vieții prin creștere economică datorată biosintezelor industriale de „chimicale fine”. [Buchholz and Hempel, 2006; Hempel, 2006].



Alegerea tipului de reactor cel mai potrivit procesului (multi-)enzimatic sau biologic studiat, cu biocatalizator (enzime sau biomasa vie) liber (suspendat), sau imobilizat pe granule solide (sau geluri) poroase, se referă la tipul constructiv, anume [Moser, 1988; Lübbert and Jørgensen, 2001; Engasser, 1988; Maria and Renea, 2022B]: a) cu amestecare perfectă **CSTR** (continuu, sau semi-continuu), sau b) cu deplasare totală, dacă biocatalizatorul imobilizat este dispus în strat fix într-o coloană, sau c) în strat fluidizat / cu agitare mecanică în sistem tri-fazic (cu catalizator imobilizat pe un suport solid). În al doilea rând, trebuie ales modul optim de operare al bioreactorului selectat, anume: i) discontinuu (**BR**), ii) semi-continuu/„fed-batch” (**FBR**), sau iii) continuu pentru cazul biomasei imobilizate, fie în **CSTR** cu amestecare mecanică, fie în coloane cu strat fix de biocatalizator granular [Maria, 2020D]. Această analiză poate fi realizată mult mai eficient și într-un mod sistematic pentru fiecare studiu de caz în parte, printr-o abordare *in-silico*, *off-line* (teza de

fata), folosind modelele matematice ale procesului biologic si ale bioreactorului, prin compararea politicilor optime de operare determinate pentru fiecare tip de bioreactor în parte tinând cont de obiectivele problemei de optimizare formulate corespunzător in termeni matematici [Wang, 2009; Maria, 2012; Khamseh and Miccio, 2012; Jiménez-González and Woodley, 2010]. Optimizarea unui reactor biologic se realizează într-un mod similar cu cea a unui reactor enzimatic, politicile optime de operare depinzând de caracteristicile procesului (cinetică, puritatea materiei prime, numarul de variabile de control, numarul de intervalele egale de timp ales pentru variatia variabilelor de control, obiectivele de optimizare), caracteristicile biomasei [domenii de activitate (temperatura, pH), si de stabilitate, sursa de obtinere] si solutia constructivă aleasa pentru bioreactor [Maria, 2012; Maria, 2020D]. Pe lângă toate acestea, pentru fiecare caz in parte, trebuie să se aleagă una din cele două alternative posibile, respectiv utilizarea de biomasă liberă, sau de biomasă imobilizata pe un suport poros adecvat.

1.1.2 Importanța operării optime a reactoarelor biologice folosind modele cinetice MCSMD deterministe cu variabile continue, hibride, structurate pe mai multe niveluri de detalieri ale bioprocesului

În cazul reactorului biologic (cu biocatalizator culturi celulare libere sau imobilizate pe un suport solid poros), tendinta în industrie este aceea de a utiliza sisteme complexe, cu micro-organisme modificate genetic (**OMG**), si sisteme de imobilizare eficiente (care impiedica inactivarea biomasei datorita stresului mecanic si chimic din mediul de cultura), pentru a putea înlocui cu succes sintezele chimice energofage si poluante, prin utilizarea unor conditii de reactie mai blânde si generand foarte putine deseuri [Gavrilescu si Chisti, 2005; Hempel, 2006; Buchholz and Hempel, 2006]. Astfel, procesele biologice moderne, impreuna cu cele enzimatic se dovedesc a fi eficiente în biosinteza a numerosi compusi chimici, concurand astfel în termeni de eficiență cu sinteza chimică organică, decurgând cu o selectivitate și o specificitate ridicată, producând mai putine produse secundare, diminuând consumul de energie si generând mai puțină poluare a mediului (**Fig. I-1**). Această caracteristică a biosintezelor industriale este exploatată în scopuri economice diverse (industrie, medicină, mediu, agricultură, producerea de combustibili) [Buchholz and Hempel, 2006; Hempel, 2006; Moulijn et al., 2001].

Cu toate acestea, bioprocesele industriale au încă o raspandire limitată datorită costurilor mari de izolare si de stabilizare pe un suport potrivit al biomasei/enzimei, precum si a senzitivității mari a acestora în raport cu conditiile de operare, reproductibilității destul de reduse a procesului biologic datorita modificarilor biomasei de la un ciclu celular la altul, si al controlabilității dificile a bioreactorului. Multe din aceste inconveniente pot fi inasa depasite printr-o i) imobilizare eficientă a biomasei pe suporti potriviți, prin ii) utilizarea de bioprocese cu **OMG**–uri cu activitate catalitica superioara, sau/și iii) prin **optimizarea condițiilor de lucru și a modului de operare al reactorului biologic/enzimatic selectat**, folosind modele matematice avansate ale procesului biologic/enzimatic si reactorului.

Teza de fata se ocupa de acest ultim aspect al problemei de inginerie, folosind tehnici de calcul originale (modele cinetice deterministe, modulare, hibride, structurate pe mai multe niveluri de detalieri, notate **MCSMD**) inspirate din practica de inginerie chimica si biochimica (**ICHB**) [Maria, 2017, 2017B, 2018]. O astfel de abordare de modelare cinetică structurata, modulara, determinista a metabolismului central al carbonului **CCM** permite utilizarea unor instrumente performante, respectiv a algoritmilor numerici și a conceptelor clasice de modelare ale **ICHB** rezumate de catre [Maria, 2017A; Maria, 2017B; Maria, 2018; Maria, 2023B]

În acest fel, **teza de fată aduce o contributie remarcabilă** la soluționarea, folosind instrumentele de calcul ale **ICHB**, a problemelor de inginerie ce apar la ridicarea la scară a noilor procese biologice/biochimice, cunoscându-se faptul că partea de inginerie (proiectare bioreactor/instalatie si **operare optimală**, toate efectuate **in-silico**, **off-line**, prin calcule de inginerie biochimica pe baza unui model matematic) este poate etapa cea mai dificilă în dezvoltarea unui nou bioproces si în operarea unui bioreactor industrial.

După cum s-a dovedit în literatura de specialitate, analiza numerică **in-silico** (bazată pe modele matematice/cinetice) a proceselor biochimice (enzimatic), sau biologice (culturi celulare) s-a dovedit a fi nu numai un instrument esențial, ci si extrem de benefic pentru evaluările

ingineresti care vizează determinarea politicilor optime de functionare a reactoarelor biologice [Maria, 2020A; Maria and Renea, 2021; DiBiasio, 1989; Maria et al., 2018C; Scoban and Maria, 2016] sau a celor multi-enzimatice complexe [Maria, 2012; Maria and Crisan, 2017; Maria, 2020B; Maria and Peptanaru, 2021; Maria and Renea, 2022C; Straathof and Adlercreutz, 2005].

Abordarea clasică (de rutina, „default”) în practica de inginerie biochimica pentru rezolvarea problemelor de proiectare, optimizare și de control bazate pe modele matematice ale reactoarelor biologice industriale utilizează modele nestructurate de tip Monod (pentru bioreactoare cu, culturi celulare) sau de tip Michaelis-Menten (pentru reactoare biochimice, enzimatic) care ignoră reprezentările detaliate ale proceselor celulare. Regulile de inginerie aplicate sunt similare cu cele utilizate pentru procesele chimice (**IChB**) și sunt inspirate din teoria controlului sistemelor neliniare. Cu toate acestea, luând în considerare doar variabilele cheie macroscopice ale procesului (concentrațiile de biocatalizator, substrat și produs), aceste modele nestructurate (aparente, globale) nu reflectă în mod corespunzător modificările metabolice de la nivelul biomasei din bioreactor, fiind nepotrivite pentru a prezice cu acuratețe răspunsul celular la perturbatiile mediului de cultura prin intermediul metabolismului celular auto-reglat. Aceste modele nestructurate pot fi satisfăcătoare pentru o modelare aproximativă a procesului biologic, dar nu și pentru o modelare a proceselor metabolice celulare, neputând face nici o corelație între operarea bioreactorului și adaptarea continuă a metabolismului biomasei la condițiile variabile din bioreactor. De asemenea, precizia predicțiilor acestor modele cinetice globale este una destul de scăzută. În cazul proceselor multi-enzimatice, aceste modele nestructurate nu iau în calcul interacțiunile dinamice dintre modulele reacțiilor enzimatic și nici conexiunea tuturor speciilor cu dinamica reactorului enzimatic.

Tendința actuală. Teza de față urmează tendința actuală pentru rezolvarea cu mai mare precizie a unor astfel de probleme de inginerie, anume aceea de a utiliza modele cinetice deterministe, modulare, (cu variabile continue, și bazate pe mecanismele de reacție metabolice celulare)(**MCSMD**), de tip hibrid, structurate pe mai multe niveluri de detaliere ale procesului, potrivit aplicației abordate, care țin cont de reacțiile metabolice celulare din **CCM** implicate în bioprocesul studiat (la nivel nano-scoptic) în conexiune cu dinamica variabilelor de stare macroscopice ale bioreactorului.

În cazul reactoarelor biologice, aceste modele hibride MCSMD structurate pe cel puțin două niveluri de reprezentare ale procesului biologic, pot simula numeric, cu precizie mai mare, atât etapele cheie din metabolismul central al carbonului (**CCM**) la scară celulară, responsabile cu sinteza metaboliților celulari de interes în biosinteza industrială, precum și dinamica variabilelor de stare macro-scopice ale bioreactorului.

Așa cum o dovedesc și rezultatele din teza de față, modelele **MCSMD** de tip **ODE** (sisteme de ecuații diferențiale ordinare) deterministe cu variabile continue ale **CCM**, chiar dacă sunt complicate și adesea supra-parametrizate, prezintă un număr semnificativ de avantaje, putând reproduce în detaliu, prin simulări numerice, interacțiunile moleculare de la nivel celular, răspunsul continuu lent sau rapid al celulei la perturbațiile continue exo/endo-gene [Styczynski și Stephanopoulos, 2005; Maria, 2017A]. În plus, utilizarea modelelor cinetice **ODE** prezintă avantajul de a fi ușor abordabile din punctul de vedere al calculului numeric, fiind flexibile, ușor de extins și potrivite pentru a fi caracterizate folosind instrumentele **IChB** și ale teoriei sistemelor neliniare [Heinrich and Schuster, 1996]. Astfel, se țin cont de proprietățile sistemului de reglare celular, adică: dinamica, bucle de reglare directă și inversă, și optimalitate. O astfel de abordare de modelare cinetică **ODE** a **CCM** permite utilizarea instrumentelor puternice, respectiv a algoritmilor numerici și a conceptelor clasice de modelare ale **IChB** rezumate în cap. I.4.

În cazul reactoarelor multi-enzimatice, același tip de modele hibride structurate multi-nivel **MCSMD** cuplează modelele cinetice ale modulelor de reacții enzimatic inter-conectate, cu luarea în considerare a tuturor intermediarilor cheie de reacție și a proceselor inhibitorii, toate conectate cu dinamica variabilelor de stare macro-scopice ale reactorului analizat.

Pe de altă parte, folosirea de modele cinetice **MCSMD** cu luarea în calcul a mai multor variabile de control, și a mai multor obiective contrare sporesc dificultatea problemei de optimizare. În acest caz, folosirea tehnicii frontului Pareto, și compararea unui număr mai mare de alternative

de operare optimala, conduc la rezultate net superioare comparativ cu abordările clasice de optimizare a reactoarelor biologice sau multi-enzimatice.

Teza demonstrează în mod stralucit valoarea modelelor cinetice *hibride, structurate MCSMD* în calculele de inginerie biochimică prin soluționarea a două studii de caz privind optimizarea regimului de operare a unor reactoare din industria farmaceutică/alimentară, respectiv: a) biosinteza unui amino-acid esențial (triptofan- TRP) folosind culturi de *E. coli* modificate genetic [Maria și Renea, 2021], și b) fabricarea manitolului din fructoză folosind un amestec de enzime (MDH și FDH) [Maria și Renea, 2022A,B; Renea et al., 2022; Gijiu, Renea, et al., 2025].

Simularea numerică a dinamicii CCM folosind modele cinetice MCSMD

În cazul proceselor reactoarelor biologice, ce folosesc culturi de celule vii, pentru soluționarea problemelor complexe de optimizare a funcționării lor, folosind modele cinetice *hibride MCSMD, deterministe, structurate* (cu variabile continue, și bazate pe mecanismele de reacție metabolice celulare) care țin cont, cu un grad de detaliere potrivit aplicației abordate, de dinamica speciilor celulare cheie implicate în metabolismul celulei, este absolut necesară includerea, drept modul central, a unui model cinetic redus al metabolismului central al carbonului (CCM) din celula respectivă. În modelele MCSMD, de tip *hibrid*, structurate pe mai multe *niveluri de detaliere*, potrivit aplicației abordate, trebuie ținut cont de reacțiile metabolice celulare și de dinamica speciilor celulare cheie ale CCM implicate în bioprocesul studiat (la nivel nano-scoptic), în conexiune cu dinamica variabilelor de stare macro-scopice ale bioreactorului datorită speciilor importate / excretate de celule.

Conform definiției din literatura [Creative proteomics, 2024], CCM este următoarea: „Metabolismul central al carbonului, cunoscut și sub numele de schema centrală de reacții metabolice ale carbonului, sau calea metabolică centrală, se referă la o serie de reacții biochimice interconectate care au loc în celulele vii. Ea implică conversia moleculelor care conțin carbon, cum ar fi zaharurile și alți compuși organici, în energie și molecule precursori necesare creșterii, proliferării și supraviețuirii celulelor.”

Cele mai importante module de reacții enzimatice ale CCM (**Fig. I-3, I-4**), considerate în teza de față (grupat sau detaliat), sunt următoarele: i) Glicoliza (**Fig. I-5**), ce include sistemul PTS (fosfo-transferazei, secvența $GLC \rightarrow F6P$) responsabil cu importul glucozei (GLC) în celulă; ii) modulul PPP (“pentose phosphate pathway”); iii) ciclul acidului citric - TCA (Krebs); iv) sistemul de regenerare al ATP; v) sistemul de regenerare al NADPH; vi) metabolismul lipidelor, etc. Este de subliniat că fiecare intermediar al glicolizei (modul central al CCM) constituie un precursor pentru o biosinteza celulară. De exemplu, G6P este precursor pentru sinteza nucleotidelor (fragmente gene); PEP este precursor pentru sinteza amino-acizilor; PYR este precursorul ciclului TCA, etc.

Pe de altă parte, este însă cunoscut că celulele micro-organismelor folosite pe scară largă în industrie conțin $O(10^3-4)$ compuși celulari, $O(10^3-4)$ factori transcriptionali, activatori, inhibitori și cel puțin un ordin de mărime mai mare de reacții (bio)chimice (enzimatice), toate asigurând o adaptare rapidă a metabolismului celular la mediul aflat într-o continuă schimbare, folosind “circuite de reglare genetică” complexe (GRC), care includ lanțuri de „module de reacții de reglare a expresiei genetice” individuale (GERM), etc. [Maria, 2017B, 2018, 2023B].

Acesta este motivul pentru care, în ciuda numeroaselor încercări din literatura de specialitate, dezvoltarea unor modele cinetice structurate foarte detaliate pentru CCM celular, pe o bază deterministă, pentru a simula în mod adecvat și în detaliu autoreglarea metabolismului celular, creșterea celulelor și replicarea acestora pentru o astfel de complexitate astronomică a metabolismului celular este practic imposibilă datorită lipsei de informații experimentale structurate și cuprinzătoare și a limitărilor de calcul datorate complexității foarte mari a sistemului celular [Maria, 2017B, 2018, 2023B].

În ciuda dificultăților menționate anterior, există însă numeroase încercări de succes pentru simularea dinamicii CCM, într-o formă redusă convenabil [Chassagnole et al., 2002; Jahan et al., 2016; De and Tomar, 2012; Cerbon et al., 2024; Costa et al., 2010; Costa et al., 2009]. O trecere în revista a catorva astfel de încercări este făcută de [Styczynski and Stephanopoulos, 2005; Maria,

2017B; Maria, 2018; Maria, 2014A; Visser et al., 2004]. Aceste modele pot include de la cateva zeci la cateva sute de reactii enzimatice (review cap. III). De exemplu, modelul **CCM** in *E. coli* al lui [Edwards and Palsson, 2000] contine 436 specii celulare ce participa la 720 reactii metabolice celulare.

O forma redusa a **CCM**, cu doar 72 metaboliti, si 95 de reactii, este redată schematic în (**Fig. I-3**). Acest model a fost utilizat de [Maria et al., 2011; Maria, 2014A; Chassagnole et al., 2002; Usuda et al., 2010; Kadir et al., 2010; Ceric and Kurtanek, 2006; Tusek and Kurtanek, 2009] pentru diverse scopuri. In mod similar, o trecere in revista a modului de constructie a unui **GRC** celular care include un anumit numar (de regula sub 25) de module individuale (**GERM**) de reglare a unei expresii genetice, organizate in lanturi cu functiuni celulare multiple, respectiv: comutatoare genetice, expresia operonilor (ansambluri de gene), etc. este facuta de [Maria, 2017A, 2017B, 2018; Xiong, 2006; Rocha et al., 2010].

O reprezentare simplificata a modelului **CCM** a lui [Edwards si Palsson, 2000] include o stoichiometrie ce considera 72 metaboliti, si 95 de reactii, este redată schematic în (**Fig. I-3**). Modelele cinetice deterministe care utilizează variabile continue au fost dezvoltate pentru glicoliză de catre [Maria, 2014A] (**Fig. I-4, I-5**, cap. III) si de catre alti cercetatori (review [Maria, 2020A]). Sunt de amintit si modelele cinetice pentru simularea **CCM** ale lui [Schmid et al., 2004; Chassagnole et al., 2002; Costa et al., 2009, 2010; Machado et al., 2015]. Astfel de modele pot reproduce în mod adecvat răspunsul celulei la perturbatii continue, structura si dimensiunea modelului cinetic **CCM** fiind adaptate in functie de cantitatea/calitatea informatiilor bio–omice disponibile. Chiar dacă astfel de modele structurate extinse sunt utilizate în prezent predominant în scopuri de cercetare, fiind greu de identificat (datorita datelor cinetice celulare incomplete), este o chestiune de timp până când vor fi adaptate în scopuri industriale/ingineresti sub forma unor modele **MCSMD** hibride structurate reduse [Maria, 2023B]. Cele două studii de caz prezentate si discutate în aceasta teza ilustreaza in mod stralucit acest aspect si urmaresc aceasta tendinta din ingineria biochimica si bioingineria moderna.

În acest context, teza își aduce o **contributie remarcabilă** prin elaborarea unei metodologii de constructie a unor **modele cinetice hibride structurate (MCSMD)**, deterministe, care combină caracteristicile procesului metabolic celular de la nivelul nano-scopic al modulelor esentiale din **CCM** celular, cu cele macro-scopice de la nivelul variabilelor de stare ale bioreactorului industrial. In acest fel, se obtin predictii mai precise si mai detaliate, atat pentru dinamica procesului biologic de la nivel celular, cat si pentru cea a variabilelor de stare ale bioreactorului analizat. Aplicatia imediata a acestor modele o constituie determinarea mai precisa a regimului optim de operare al unui bioreactor industrial. Avantajele unei astfel de abordari, sunt mentionate in Cap. I.3.

I.2 Principalele obiective ale tezei

Sintetizând, **obiectivul principal al tezei** constă în elaborarea de modele cinetice structurate hibride, de tip **MCSMD**, pentru a fi utilizate in calcule ingineresti de proiectare si de operare optimală a reactoarelor biologice (ce contin culturi celulare), sau a reactoarelor multi-enzimatice (ce contin enzime libere sau imobilizate). Mai specific, se va urmări:

- **A).** elaborarea unei **metodologii de construire a unui model matematic (cinetic) hibrid structurat (MCSMD)**, determinist, potrivit cu caracteristicile bioprocesului condus intr-un bioreactor analizat, care combină trasaturile procesului metabolic celular de la nivelul nano-scopic al speciilor si reactiilor esentiale din metabolismul central al carbonului (**CCM**) al celulei vi, cu cele macro-scopice de la nivelul variabilelor de stare ale bioreactorului industrial. In acest fel, se obtin predictii mai precise si mai detaliate pentru ambele niveluri de reprezentare ale bioprocesului studiat.
- **B).** Determinarea mai precisa, pe baza modelelor **MCSMD**, a unei **politici optime de operare** a unui bioreactor industrial, dar si prezicerea modului in care metabolismul biomasei se schimba si se auto-adapteaza pe durata a zeci de cicluri celulare, adica a zeci de ore de functionare a unui bioreactor industrial. [Maria, 2021; Maria si Renea, 2021; Maria si Renea, 2022C; Maria si Renea, 2024B, 2024C].
- **C).** Optimizarea reactorului biologic sau a celui enzimatic va tine seama atât de criterii economice, cum ar fi productivitatea (maximizare randament), minimizarea consumului de

materii prime, cât și de criteriile legate de modul său de operare (discontinuu, sau semi-continuu), precum și de influența variației parametrilor de operare (variabilelor de control - cum ar fi debitul și concentrația alimentării cu substrat, sau cu biocatalizator, etc.) asupra performanței reactorului.

Toate aceste aspecte vor fi abordate și soluționate folosind modele dinamice proprii (originale) de tip **MCSMD** adecvate pentru bioprocesul abordat. Problemele de optimizare, ”traduse” într-o formă matematică vor fi soluționate folosind proceduri numerice de estimare parametrică și de optimizare de înaltă performanță ce vor fi descrise în detaliu la soluținerea fiecărui studiu de caz în parte.

În acest fel, teza se remarcă printr-un **grad înalt de originalitate și noutate, cu aplicabilitate** largă în calculele de inginerie biochimică necesare în industria de biosinteză. Modelul **MCSMD** adaptat pentru simularea glicolizei și a unor etape esențiale a **CCM** celular din celulele de *E.coli*, poate fi ușor extins și adaptat și altor bacterii de interes industrial.

Pentru o exemplificare mai ușoară a acestor noi concepte de modelare a proceselor celulare, cu scop ingineresc imediat [Maria și Renea, 2022C], teza își propune și reușește elaborarea și testarea unei **platforme de simulare și optimizare a bioreactoarelor folosind MCSMD**, ce include, într-o formă modulară, modelele cinetice ale etapelor esențiale ale proceselor celulare **CCM**. Aceasta bază de calcul, completată cu reacțiile celulare ce privesc sinteza unui metabolit de interes industrial (ex. TRP aici), este elaborată în așa fel încât să fie ușor de înglobat în modelele matematice dinamice ale principalelor tipuri de reactoare biologice industriale testate (discontinuu - **BR**; semi-continuu, „fed-batch” - **FBR** ; tri-fazic, cu agitare mecanică - **MACR**). Simulări repetate cu modelele **MCSMD** și aplicarea unor proceduri de optimizare specifice ingineriei biochimice vor permite alegerea celei mai bune alternative de operare a reactorului biologic sau biochimic (după caz). Procedura de optimizare a regimului de funcționare a reactorului industrial va considera unul sau mai multe obiective economice (maximizare randament produs util, cu minimizare consumuri de materie primă), evaluările fiind făcute pentru perioade de operare suficient de mari care să pună în evidență adaptabilitatea biomasei și dinamica fluxurilor și speciilor celulare cheie.

Teza exemplifică aceste noi concepte propuse pentru dezvoltarea de modele cinetice **MCSMD** prin soluținerea a catorva studii de caz complexe, anume:

➤ **(Glicoliza).** Adaptarea într-o formă **MCSMD** a unui model cinetic al glicolizei în bacterii de interes industrial (*E. coli* aici). Acest model (**Fig. I-3, I-4, I-5**) descris în detaliu în cap. III este o etapă esențială în dezvoltarea oricărui model celular **CCM**. Un model cinetic adecvat al glicolizei oferă posibilitatea de a prezice condițiile de operare care asigură un **CCM** staționar echilibrat (homeostaza celulară), dar și pe cele care conduc la un regim glicolitic oscilant (**Fig. I-5**) [Maria, 2014A; Maria et al. 2018; Maria, 2020A, 2021; Maria și Renea, 2021] cu implicații imediate în eficiența sintezelor metabolice celulare, transpuse la scara macromoleculară în eficiența bioreactoarelor industriale. Importanța modelului dinamic celular glicolitic adaptat în teza de față este una extraordinară, deoarece glicoliza este elementul central al **CCM**, fiind responsabilă: **(1-a)** de importul de glucoză (principalul substrat) în celulă, **(1-b)** de buna funcționare a ciclului acidului citric (TCA, Krebs) care furnizează „energia” celulară sub formă ATP, agenți reducători (NADH, NADPH), etc., și **(1-c)** de nivelul de concentrație al intermediarilor glicolizei care, în totalitatea lor, sunt precursori pentru caile de reacție care conduc la sinteza majorității metabelitilor celulari, mulți dintre aceștia fiind excretabili prin membrana celulară și de importanță industrială, ca de exemplu diverși amino-acizi (triptofanul- TRP aici), acid succinic (SUCC), acid citric (CIT), vaccinuri monoclonale (MABS), etc. [Maria et al., 2019A; Maria et al., 2011; Maria, 2018, 2020A, 2023B; Maria și Renea, 2021, 2024B].

➤ **(Studiul de caz 1)** Adaptarea din literatura [Maria, 2014A] a unui model cinetic structurat detaliat al glicolizei (cap. III, **Fig. I-4, I-5**), care va fi cuplat cu modulul celular al reacțiilor de sinteză a triptofanului (TRP) (respectiv expresia operonului TRP, **Fig. I-4**). Acest model cinetic celular structurat a fost cuplat într-un model hibrid **MCSMD** cu cel ce descrie dinamica variabilelor de stare dintr-un bioreactor semi-continuu („fed-batch”, **FBR**) [Maria și Renea, 2021; Maria, 2021]. Modelul hibrid rezultat a fost utilizat **în premieră** la optimizarea funcționării bioreactorului **FBR** în vederea maximizării producției de TRP (**Fig. I-4**), cap. IV).

➤ **(Studiul de caz 2).** Pentru cazurile reacțiilor multi-enzimatice, determinarea unei politici optime de funcționare a reactorului discontinuu (**BR**) se traduce adesea într-o problemă dificilă de

optimizare multi-obiectiv. Exemplificarea este făcută în cap. V pentru reducerea bi-enzimatică a D-fructozei la manitol prin utilizarea enzimei MDH (manitol-dehidrogenaza) și a cofactorului NADH ca donor de protoni. Regenerarea NAD(+) se face *in situ* prin degradarea enzimatică a formiatului de amoniu în prezența formiat-dehidrogenazei (FDH). Pentru un astfel de sistem multi-enzimatic cuplat, evaluările *in-silico* de inginerie vor lua în considerare mai multe obiective de optimizare concurente (opuse) și restricții tehnologice multiple. Teza de față prezintă **o metodologie originală** pentru a genera **politica optima de operare a reactorului enzimatic** folosind, într-un mod original, tehnica frontului Pareto, sau a cea clasică a programării neliniare (**NLP**) cu luarea în considerare a mai multor perechi de obiective economice opuse și a mai multor variabile de control. Operarea optimă a reactorului **BR**, astfel obținută, este comparată cu operarea optimă a unui reactor semi-continuu ("fedbatch", **FBR**) cu alimentare variabilă sau cu o serie de **BR** de volum egal (**SeqBR**). După cum s-a dovedit, „punctul de ruptură” (schimbare de pantă) al frontului optim Pareto s-a dovedit a fi o opțiune avantajoasă [Maria și Renea, 2022B; Gijiu și Renea, 2025].

I.3 Semnificația și avantajele modelelor hibride **MCSMD** propuse în cadrul tezei

Un compromis rezonabil, adoptat și în lucrarea de față, îl constituie utilizarea unor *modele cinetice hibride MCSMD* pentru procesele enzimatică sau biologică care combină caracteristicile procesului nestructurat cu o reprezentare structurată a sa (detaliată, pe bază de mecanism de reacție) pentru a genera predicții mai precise ale dinamicii (bio)reactorului studiat [Maria, 2023B; Maria și Renea, 2022C]. Practic, modelele hibride folosesc o ierarhie pe două niveluri de simulare dinamică: a) variabile de stare macroscopice ale bioreactorului, conectate la b) variabilele de stare nanoscopice care descriu dinamica proceselor metabolice celulare de interes [vezi studiul de caz nr.1, cap. IV]. Este și cazul reacțiilor multi-enzimatică inter-conectate, care descriu dinamica reactorului pe două niveluri ierarhice: a) evoluția intermediarilor reacțiilor enzimatică observabili sau neobservabili, dar b) conectați la variabilele de stare macroscopice ale reactorului [vezi studiul de caz nr. 2, cap. V].

AICI !!!

Prin studiile de caz abordate, lucrarea de față pune în evidență **avantajele** modelelor cinetice *hibride structurate MCSMD* folosite la simularea dinamicii bioreactoarelor și, implicit, a dinamicii proceselor metabolice celulare ale biomasei din bioreactor, astfel:

i.)- Gradul mare de detaliere și de precizie al predicției modelelor *hibride MCSMD* sunt remarcabile, atât la nivel macro-sopic (variabilele de stare ale bioreactorului), cât și nano-sopic (dinamica speciilor celulare ce tin de **CCM**), așa cum o probează câteva exemple de mai jos.

ii.)- Pentru studiul dinamicii glicolizei în *E. coli* (cap. III), modelul **MCSMD** al lui [Maria, 2014A, 2020A; Maria et al., 2018B, 2018C; Maria and Renea, 2021] realizează un grad mai mare de detaliere al predicției dinamicii speciilor din bioreactor, respectiv poate prezice, prin simulare, dinamica a [9(specii celulare) + 1 specie (în lichid bioreactor)], comparativ cu dinamica a doar 1 specie (în lichid bioreactor) prezisă de un model macroscopic clasic **FBR**. În același timp, modelul structurat acoperă un interval de operare mai larg, respectiv, $[GLC]_{ext} = [0-1] \text{ mM}$, și $[GLC]_{feed} = 100-1000 \text{ mM}$.

iii.)- Pentru studiul de caz no. 1 (cap.IV), privind maximizarea producției de TRP într-un **FBR** folosind o cultură de *E. coli* „wild”, sau **OMG** [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021]), modelul **MCSMD** al lui [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021; Maria și Gheorghe, 2024] realizează un grad mai mare de detaliere al predicției comportării bioreactorului, caracterizând dinamica a [14 (specii celulare) + 4 (specii în lichid bioreactor)] comparativ cu numai [3 (specii în lichid bioreactor)] printr-un model **FBR** macroscopic clasic (ne-structurat), acoperind în același timp un interval mai larg de operare și o gamă mai mare de variabile de control și diferite tulpini de celule *E. coli* („wild” sau **OMG**), astfel: diluție bioreactor (debit de alimentare/evacuare raportat la volumul de lichid din bioreactor) = $[10^{-5} - 0.01] \text{ 1/min}$; $[GLC]_{feed} = [200-3500] \text{ mM}$; $[GLC]_{ext} = [0-10] \text{ mM}$; $[X] = 10-100 \text{ gDW/L}$; $[GLC]_{initial} = [1-200] \text{ mM}$; $FL = [0.015-0.040] \text{ L/h}$ [Maria și Renea, 2021; Maria, 2021]). Pentru comparație, modelul bioreactorului **FBR** al lui [Chassagnole et al., 2002] simulează comportarea acestui sistem cu un model **MCSMD** similar (dar cu alt model al glicolizei), însă cu intervale de operare mult mai restrânse (cu cca. un ordin de mărime mai mici, vezi [Maria et al., 2018C]).

iv).- Pentru acelasi studiu de caz no. 1(cap.IV), privind maximizarea productiei de TRP intr-un **FBR** folosind o cultura de *E. coli* „wild”, sau **OMG** [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021]), teza de fata probeaza superioritatea si posibilitatile sporite ale modelelor cinetice structurate hibride **MCSMD** de a oferi predictii cu o acuratete mai mare atunci când sunt utilizate pentru calcule de inginerie biochimica (optimizarea off-line a operarii bioreactorului) comparativ cu modelele nestructurate de tip Monod. De exemplu, **(a)** modelul **MCSMD** poate prezice o politica optimă de operare a unui bioreactor **FBR** pentru maximizarea productiei de triptofan (TRP) cu o alimentare constanta ce satisface simultan mai multe obiective economice (folosind tehnica frontului Pareto) [Maria et al., 2018A; Maria et al., 2018C; Maria si Gheorghe, 2024]; **(b)** modelul **MCSMD** prezice o politica optimă de alimentare variabila „în trepte” (ca debit si concentratie substrat GLC) a unui bioreactor **FBR** pentru maximizarea productiei de TRP net superioara unei operari cu alimentare constanta [Maria and Renea, 2021; Maria, 2021]. **(c)** Aceeasi concluzie este valabila si pentru un reactor **FBR** bi-enzimatic (studiul de caz nr. 2). Intr-un studiu de caz similar, modelul **MCSMD** poate prezice o politica optimă de operare a unui bioreactor **FBR** pentru maximizarea productiei de manitol (M) din fructoza, în alternativede operare multiple, folosind tehnica frontului Pareto [Gijiu, Maria si Renea, 2025]

v).- Literatura de specialitate contine si alte studii de caz care vin în sustinerea utilizarii de modele **MCSMD**, în ciuda complexitatii lor si a efortului sustinut experimental si de calcul pe care îl presupune elaborarea unor astfel de modele dinamice extinse. Aici sunt de mentionat urmatoarele exemple: **(a)** Modelul **MCSMD** [72 (specii celulare), implicate în 95 de reactii celulare + 1 (specie în vrac, adică biomasa)] folosit pentru a proiecta *in-silico* de tulpini **OMG** de *E. coli* folosite în scopul optimizarii productiei de acid succinic (SUCC) simultan cu productia de biomasa într-un reactor discontinuu (**BR**) [Maria et al., 2011]; **(b)** Modelul **MCSMD** [26 (specii celulare) + 3 (specii în vrac)] folosit pentru optimizarea unui **FBR** utilizat la retinerea ionilor de mercur de catre *E.coli*. Acelasi model a fost folosit si pentru a prezice gradul de clonare cu plasmide de mercur a celulei de *E. coli* **OMG** pentru a maximiza randamentul de indepartare a ionilor de mercur din apele uzate, fara a pune în pericol metabolismul celular. [Maria, 2023B; Maria si Luta, 2013]. **(c)** Un model **MCSMD** folosit la optimizarea unui **FBR** folosit pentru productia de anticorpi monoclonali (mAbs). [Maria, 2020D; Maria si Renea, 2024B].

vi).- Modelele celulare *structurate* de tip **MCSMD** sunt de asemenea utile pentru înțelegerea bioprocesului celular în legătură directă cu modul de functionare al bioreactorului. De exemplu, în studiul de caz nr. 1(cap.IV), se pot determina *in-silico* (prin simulare cu ajutorul modelului matematic) conditiile de aparitie a oscilatiilor glicolitice în directa legatura cu concentratia de substrat din mediul de cultura [GLC]env, si cu caracteristicile celulare, [Maria et al., 2018B; Maria, 2020A], precum si inflenta acestora asupra oscilatiilor din expresia operonului TRP [Maria, 2020A; Maria et al., 2018A], sau cele care conduc la o crestere echilibrată a celulelor (în stare cvasi-stationară - **QSS**, adică la homeostază) [Maria et al., 2018C].

În concluzie, printr-o **abordare moderna si originala** a unor probleme dificile de inginerie biochimica, teza se remarcă printr-un **grad înalt de originalitate si noutate**, cu aplicabilitate largă în industria de biosinteză.

Nu în ultimul rand, trebuie mentionat ca tehnicile numerice de estimare a parametrilor modelelor cinetice, de simulare a dinamicii bioproceselor precum si cele utilizate la optimizarea bioreactorului sunt de complexitate înaltă, folosind optimizarea neliniară în prezenta restrictiilor multiple, precum si tehnica frontului Pareto.

CAP. II.- Bioreactoare si reactoare enzimatice industriale

Acest capitol este dedicat descrierii sumare a principalelor tipuri de reactoare biochimice (enzimatice), sau biologice (avand culturi de celule vi) folosite în industria de biosinteza. Sunt trecute în revista caracteristicile lor, avantajele si dezavantajele utilizarii fiecarui tip în parte, cu exemple. Tot aici se trec în revista cele mai utilizate obiective de optimizare folosite în literatura de specialitate în calculele de inginerie dedicate optimizarii functionarii reactoarelor enzimatice sau biologice. Efortul autoarei de a sistematiza literatura de specialitate este unul foarte laudabil.

CAP. III – GLICOLIZA - Etapa esențială a CCM. Descrierea unui modelului cinetic din literatura aplicat în celulele de *E. coli*.

Glicoliza este etapa esențială a metabolismului central al carbonului (**CCM**) într-o celulă vie (**Fig. I-3**). Ea asigură importul de substrat (GLC) necesar tuturor sintezelor metabolice celulare. În acest scop, toți intermediarii glicolizei sunt puncte de plecare (precursori) pentru sinteza celulară a majorității metabolitelor sale.

Atunci când se dezvoltă un model cinetic *hibrid structurat* de tip **MCSMD**, acesta trebuie să includă în mod obligatoriu modulele de reacție esențiale ale **CCM**.

În acest capitol sunt trecute în revistă principalele tipuri de modele cinetice ale glicolizei, existente în literatura de specialitate, cu accent pe modelul redus al lui [Maria, 2014A] (**Fig. I-5**) pentru celula de *E. coli* – model identificat experimental, și adoptat și în teza de față. O atenție specială se va acorda condițiilor de mediu din bioreactor, și a celor ce țin de fenotipul bacteriei de *E. coli* care induc oscilații glicolitice.

Folosind un model al sintezei triptofanului (TRP) (descriș pe larg în cap. IV; **Fig. I-4**), cuplat cu modelul glicolizei, acest capitol exemplifică cum oscilațiile glicolitice se repercutează și asupra oscilațiilor și randamentului sintezei TRP [Maria et al, 2018A, 2018B, 2018C].

CAP. IV - Studiul de caz 1. Modelarea dinamicii unor etape esențiale ale CCM și a procesului metabolic de sinteză a triptofanului (TRP) în celulele de *E. coli*. Contribuții privind optimizarea bioreactorului industrial FBR de sinteză a TRP folosind un model *hibrid*, multi-nivel, de tip MCSMD

Modelele cinetice *modulare, deterministe* (cu variabile continue, și bazate pe mecanismele de reacție metabolice celulare) (**MCSMD**), de tip *hibrid, structurate* pe mai multe *niveluri de detaliere* (cap. I.1.2), conectează dinamica proceselor metabolice celulare (reacții enzimatice la nivel nano-scoptic) cu dinamica variabilelor de stare macro-scopice ale bioreactorului. Aceste modele matematice (cinetice), dezvoltate și în capitolul de față, sunt din ce în ce mai utilizate în evaluările de inginerie biochimică sau biologică pentru a obține predicții mai precise ale dinamicii bioreactorului și biomasei în condiții variabile de operare. În funcție de complexitatea modelului celular, un astfel de instrument matematic poate fi utilizat pentru a evalua și fluxurile metabolice celulare (adică vitezele de reacție în condiții cvasi-stationare) în relație cu condițiile de operare ale bioreactorului, sugerând astfel modalități de modificare genetică a microorganismului pentru a îmbunătăți eficiența bioreactorului industrial. Chiar dacă un astfel de model extins necesită mai multe eforturi experimentale și de calcul pentru a fi construit, utilizarea lui este avantajoasă. Exemplul probator abordat în acest capitol, se referă la un model *hibrid MCSMD* care descrie dinamica la scară nano-metrică a unor specii cheie ce țin de metabolismul central al carbonului (**CCM**) în celulele de *E. coli*, conectate cu dinamica variabilelor de stare macro-scopice ale unui bioreactor industrial semi-continuu („fed-batch” - **FBR**) utilizat pentru producția de triptofan (TRP). Se obțin astfel predicții ale dinamicii bioprocesului celular și a bioreactorului mult mai precise și mai detaliate (ca număr de specii considerate în model), comparativ cu folosirea unui model cinetic clasic („default”) ne-structurat (Monod).

Aplicatia imediată a unui astfel de model *hibrid structurat MCSMD* îl constituie folosirea sa în determinarea cu mai mare precizie a politicilor optime de operare a bioreactoarelor **BR** sau **FBR**. Capitolul de față exemplifică în mod stralucit valoarea modelelor *hibride, structurate MCSMD* în soluționarea acestor probleme de optimizare a performanțelor bioreactoarelor industriale. Studiul de caz analizat abordează problema maximizării producției de triptofan (TRP) într-un reactor de tip **FBR** [Maria și Renea, 2021].

Tulpina de *E. coli* naturală („wild”) utilizată, a fost modificată genetic pentru a maximiza sinteza celulară de TRP excretabil. În acest scop, sistemul PTS DIN **CCM** (reacția grupată V1 din **Fig. I-3, Fig. I-5**) de import a glucozei (GLC) în celulă a fost înlocuit cu unul mai eficient, bazat pe sistemul de import controlat de galactoz-permează/glucokinază (GalP/Glk), prin modularea expresiei genice a GalP/Glk. Studiul prezintă multiple elemente de noutate: (i) modelul matematic (cinetic) *hibrid MCSMD* modular propus este unul original; (ii) Acesta a fost validat pe baze experimentale, folosind datele experimentale ale unui colectiv de cercetare de la TU Hamburg cu

care conducatorul de doctorat colaboreaza (vezi „Acknowledgements” de mai jos); (iii) A fost testata eficiența modelului (cinetic) *hibrid MCSMD* in a determina *in-silico* politica optimă de funcționare a **FBR**.

Dupa sublinierea importante si avantajului abordarii *in-silico* a studiului de caz analizat, se descriu caracteristicile bioreactorului **FBR** analizat, operat la TU Hamburg (Germania), precum si seturile de date cinetice experimentale obtinute de la partenerul strain al colaborarii, penru care a fost adresat urmatoarele „Acknowledgements”.

The authors of the papers [Maria and Renea,2021; Maria, 2021] are deeply grateful to Prof. An-Ping Zeng and to their research group (dr. Minliang Chen, dr. Lin Chen, dr. Chengwei Ma) from the Hamburg University of Technology (Institute of Bioprocess and Biosystems Engineering, Germany) for providing on a free basis, and without any claim of any kind (including no claim of authorship) experimental data from their published works on the TRP synthesis in a fed-batch bioreactor using a genetically modified E.coli (T5 strain) cell culture. Especially I want to thank to Prof. An-Ping Zeng for the constructive comments and discussions on the manuscript.

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. This work did not receive any kind of funding under any circumstances, from any source. The authors confirm that his paper has **no conflict of interest** of any kind, and of any nature. While the advice and information in this work are believed to be true and accurate at the date of publication, the entire responsibility for the work content lies with the authors. The authors' institutions have no responsibility for the content of this work.

In continuare, se descrie modelul cinetic *structurat hibrid MCSMD* al bioprocesului celular si al bioreactorului **FBR**. S-a pus accent pe descrierea principalelor module ale modelului *structurat hibrid MCSMD*, respectiv: i) Creșterea biomasei [X]; ii) modelul dinamic al FBR; iii) modulul [A] – Glicoliza; iv) modulul [B] - sistemul de regenerare al ATP; v) modulul [C] - sinteza TRP. In continuare se descrie modul in care au fost estimate cele 49 de constante de viteza, pentru intreg modelul cinetic *hibrid MCSMD* [A+B+C+X+ **FBR**], conform [Maria, 2021].

Problema optimizarii bioreactorului FBR este tratata in mod gradual, detaliind etapele aplicarii algoritmului de calcul, respectiv: i) Formularea problemei de optimizare; ii) Selectarea variabilelor de control; iii) Alegerea funcției obiectiv; iv) Restrictiile problemei de optimizare; v) Alegerea celei mai potrivite valori pentru parametrul “Ndiv” (numarul de diviziuni egale ale duratei sarjei, folosite la alimentarea variabila a FBR pe fiecare diviziune in parte); vi) Algoritmi numerici utilizați la solutionarea problemei de optimizare; vii) Particularitățile soluției problemei de optimizare in cazul bioreactorului **FB**; viii) Rezultate optimizarii **FBR** și discuția acestora.

CAP. V - Studiul de caz 2. Modelarea dinamicii procesului bi-enzimatic de sinteză a manitolului din fructoza cu regenerarea continua a cofactorului NADH. Contribuții privind optimizarea reactorului industrial discontinuu (BR) sau semi-continuu (FBR) folosind un model hibrid, multi-nivel, de tip MCSMD

Reacțiile enzimatice pot înlocui cu succes sintezele chimice complexe, utilizând condiții de reacție mai blânde și generând mai puține deșeuri. Analiza numerică *in-silico, off-line* dezvoltată in acest capitol se bazează pe un model cinetic complex, *hibrid*, de tip **MCSMD** (determinist, cu variabile continue, modular, cu doua niveluri de detaliere, corespunzatoare celor doua procese enzimatice inter-conectate si conectate cu variabilele de stare ale reactorului in care sunt conduse aceste reactii). Acest model cinetic complex s-a dovedit a fi un instrument de calcul ingineresc extrem de benefic si util pentru determinarea *in-silico, off-line* a politicilor optime de funcționare ale reactoarelor multi-enzimatice. După cum s-a dovedit in literatura de specialitate, pentru cazurile multi-enzimatice, determinarea unei politici de operare optimă chiar și in cazul simplu al reactorului discontinuu (**BR**) corespunde unei probleme de optimizare multi-obiectiv, ne-convexa, multi-modala, dificil de rezolvat. Lucrarea de fata dovedeste cum utilizarea unui model cinetic *hibrid*, de tip **MCSMD**, precum si a unor proceduri de optimizare performante ce tin de programarea neliniara (**NLP**), sau a tehnicii fronturilor **Pareto-optimale** (cu funcii obiectiv contrare) pot conduce la optimizarea operarii reactoarelor **BR** sau **FBR** (cu alimentare constanta, sau variabila).

Pentru exemplificare s-a ales procesul complex de reducerea enzimatică a D-fructozei la manitol prin utilizarea MDH (manitol dehidrogenază), și a cofactorului nicotinamidă adenin dinucleotidă (NADH). Co-factorul epuizat NAD^+ se regenerează continuu *in-situ*, printr-o reacție enzimatică de degradare a formiatului de amoniu în prezența FDH (formiat dehidrogenază). Pentru un astfel de sistem cuplat, evaluările *in-silico* de inginerie trebuie să țină cont de obiective de optimizare multiple și contrare, precum și de multiple restricții tehnologice. Această lucrare prezintă o metodologie de generare a politicilor de operare Pareto-optime ale **BR** cu luarea în considerare a mai multor obiective economice opuse și implicând un număr moderat de variabile de control. Printre multiplele elemente de noutate sunt de amintit: i) Utilizarea tehnicii fronturilor Pareto-optime multiple poate conduce la obținerea unei politici optime de operare a unui **BR** cu performanțe ridicate. ii) Compararea acestui **BR** optim cu rezultatele raportate în literatura de specialitate pentru același proces, dar operat într-un reactor **FBR**, sau operat optim într-o serie de reactoare **BR** de volum egal („batch-to-batch”, **SeqBR**), a relevat superioritatea operării **BR** folosind fronturi Pareto-optime multiple. iii) Alegerea „punctului de ruptură” a pantei frontului Pareto-optim ca și soluție a problemei de optimizare a operării reactorului **BR**, se dovedește a conduce la beneficii economice consistente. iv) Modelul cinetic *modular, determinist, hibrid, structurat* **MCSMD** se dovedește și în aceste cazuri de reacții multi-enzimatice a fi un instrument de calcul performant și eficient în solutionarea unor astfel de analize de inginerie biochimică.

CONCLUZII GENERALE

Indeplinirea obiectivelor principale ale tezei

Utilizând conceptele, principiile, și metodele de calcul numeric ale **Ingineriei Chimice și Biochimice (ICHB)** enunțate în secțiunea I.4 [Maria and Renea, 2022C], teza de față reușește, prin solutionarea a două studii de caz complexe (cap. IV, și cap. V) să demonstreze într-un mod elocvent și cu eleganța unui cercetător format, *multiplele avantaje* oferite de utilizarea modelelor cinetice *hibride* **MCSMD** *structurate* multi-nivel dezvoltate în cadrul tezei, pentru solutionarea unor probleme de inginerie biochimică, în cazul de față cele referitoare la optimizarea regimului de funcționare al unor reactoare biologice (cu biomasa vie), sau al unor reactoare biochimice (enzimatice). În acest fel, sunt îndeplinite într-un mod strălucit și în totalitate principalele obiective ale tezei, anume:

1.- Elaborarea unei **metodologii de construire a unui model matematic (cinetic/dinamic) hibrid structurat (MCSMD)**, modular, determinist (cu variabile continue și bazat pe un mecanism de reacție), cu cel puțin 2 niveluri de detaliere ale procesului biologic condus într-un bioreactor analizat, respectiv un model care combină cinetica procesului metabolic celular de la nivelul nano-scoptic al speciilor și reacțiilor esențiale din metabolismul central al carbonului (**CCM**) al celulelor vii, cu cinetica variabilelor de stare macro-scopice ale bioreactorului industrial. În acest fel, se obțin predicții mai precise atât pentru dinamica procesului biologic de la nivel celular, cât și pentru dinamica parametrilor de operare (variabile de stare) ale bioreactorului industrial considerat. Metodologia de asamblare a modulelor modelului **MCSMD** este descrisă în detaliu în cap. IV (studiul de caz 1).

2.- Determinarea mai precisă, pe baza modelelor **MCSMD**, a unei **politici optime de operare** a unui **bioreactor industrial** (Studiul de caz 1, cap. IV), dar și prezicerea modului în care metabolismul biomasei se schimbă și se auto-adaptează pe durata a zeci de cicluri celulare, adică pe durata a zeci de ore de funcționare ale bioreactorului industrial [Maria, 2021; Maria și Renea, 2021; Maria și Renea, 2022C; Maria și Renea, 2024B, 2024C]. Superioritatea utilizării modelelor structurate multi-nivel în raport cu cele clasice ne-structurate (de tip Monod, cu doar 3 variabile cheie) se traduce atât printr-o precizie mai mare a predicției dinamicii speciilor considerate în model, dar și printr-un grad de detaliere mult sporit (13 specii nano-celulare și 4 specii macro-scopice din faza lichidă a bioreactorului în studiul de caz 1, comparativ cu doar 3 specii macro-scopice în cazul utilizării unui model Monod nestructurat).

3.- Determinarea mai precisă, pe baza modelelor cinetice *hibride* **MCSMD**, structurate, a unei **politici optime de operare** a unui **reactor multi-enzimatic industrial** (Studiul de caz 2, cap. V),

printr-o abordare structurata, determinista, a celor doua procese enzimatice inter-corelate, si corelate cu variabilele de stare macroscopice cheie, ce tine seama:

- de criterii economice, cum ar fi productivitatea (maximizare randament in produs util), minimizarea consumului de materii prime (enzime, cofactor);
 - de criterii legate de modul de operare al reactorului (discontinuu, sau semi-continuu);
 - de influenta variatiei variabilelor de control (debitul de alimentare si concentratia alimentarii cu substrat si cu biocatalizator) asupra performantei reactorului;
 - de influenta algoritmului de optimizare folosit asupra calitatii solutiei problemei de optimizare.
- Astfel, pe langa utilizarea unor algoritmi clasici de programare neliniara (NLP), cu o singura functie obiectiv (maxim productie produs util), studiul a pus in evidenta si valoarea deosebita a folosirii tehnicilor fronturilor Pareto optime, ce considera simultana a mai multe functii obiectiv de optimizare contrare.

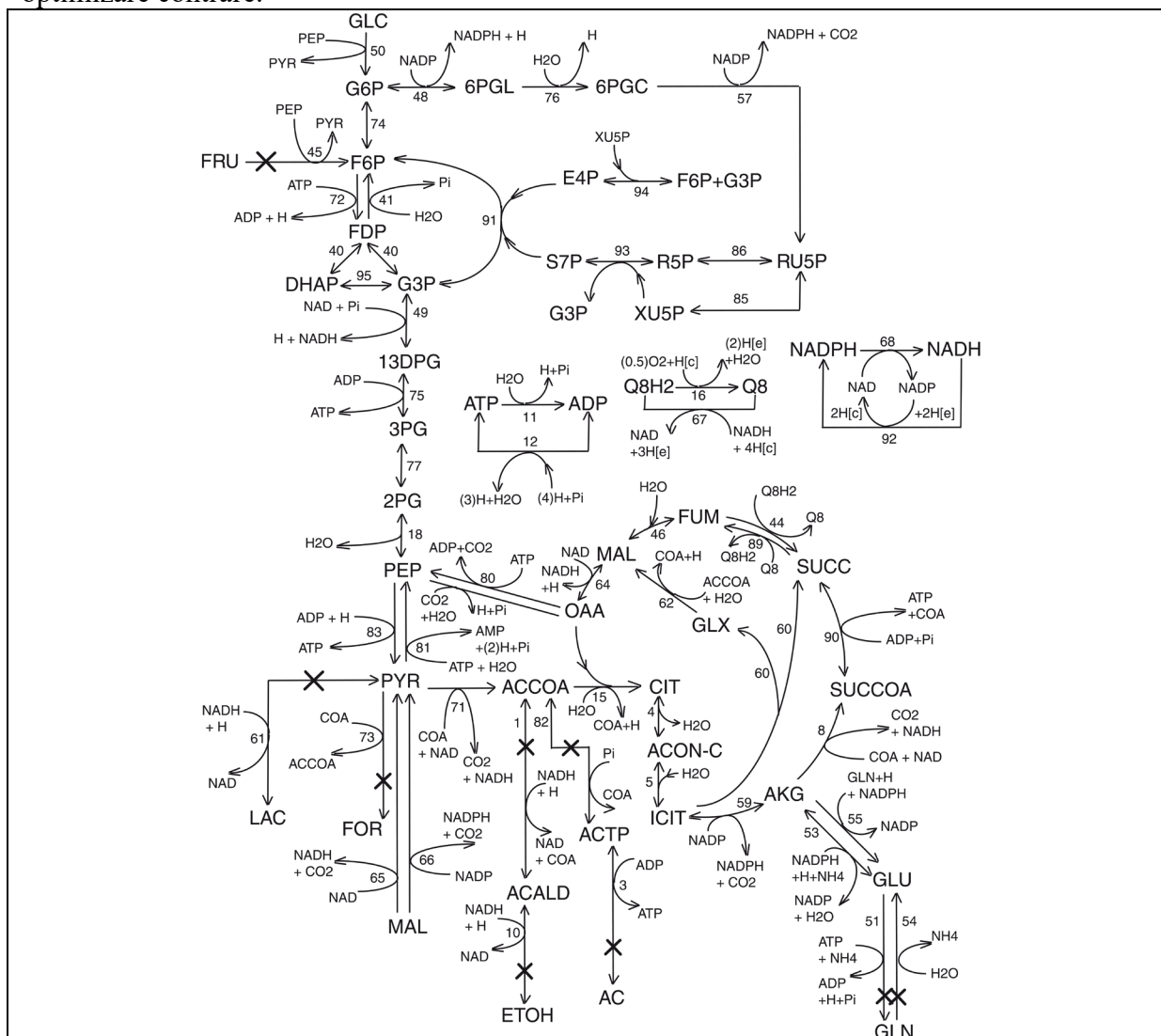


Fig. I-3. Schema simplificata a principalelor reactii din **CCM** in *E. coli* considerate in teza de fata si in modelul cinetic al lui [Maria et al., 2011; Maria et al., 2014A]. Acest model a simplificat al lui [Edwards si Palsson, 2000] se refera la tulpina "wild" ce include sistemul PTS de import glucoza (GLC), respectiv secventa de reactii successive $GLC \rightarrow F6P$. Fluxurile ce caracterizeaza transportul membranal $[Metabolite(envir.) \leftrightarrow Metabolite(cyt.)]$ si schimbul cu mediul au fost omise. Vezi [Maria et al., 2011; Maria, 2014A] pentru detalii si explicatii privind numerotarea celor 95 de reactii in care sunt implicati cei 72 metaboliti cheie considerati in modelul cinetic. Notatii: [e]= mediul extern celulei; [c]= citosol. Adaptat dupa [Maria et al., 2011] cu aprobarea CABEQ JI. Reactia V2 (**Fig. I-4**) este „nodul” generator al oscilatiilor glicolitice, asupra caruia se exercita bucle de reglare inversa / inainte, pozitive si negative [Maria, 2020C; Maria et al., 2018B; Maria, 2021]. **GLC** = glucoza; **F6P**= fructoza-6-fosfat; **FDP** = fructoza-1,6-difosfat. Vezi lista cu abrevieri a lui [Maria et al., 2011]. **V1-V6** = viteze de reactie grupate (**Fig. I-4**) discutate de [Maria, 2021, 2014A]. Abrevierile speciilor sunt explicate de [Maria, 2021, 2014A].

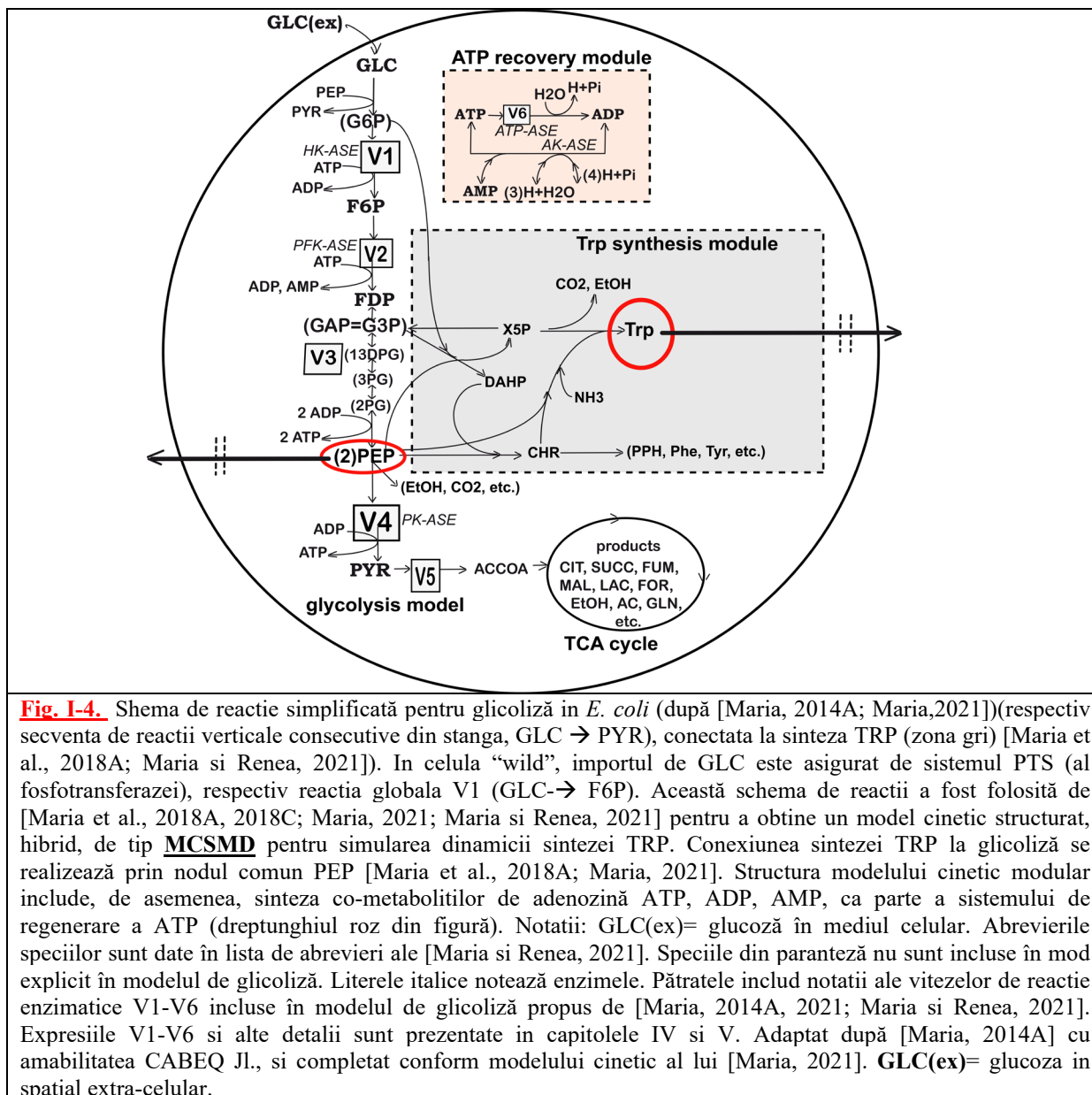


Fig. I-4. Shema de reacție simplificată pentru glicoliză în *E. coli* (după [Maria, 2014A; Maria, 2021]) (respectiv secvența de reacții verticale consecutive din stanga, $GLC \rightarrow PYR$), conectată la sinteza TRP (zona gri) [Maria et al., 2018A; Maria și Renea, 2021]). În celula “wild”, importul de GLC este asigurat de sistemul PTS (al fosfotransferazei), respectiv reacția globală V1 ($GLC \rightarrow F6P$). Această schemă de reacții a fost folosită de [Maria et al., 2018A, 2018C; Maria, 2021; Maria și Renea, 2021] pentru a obține un model cinetic structurat, hibrid, de tip **MCSMD** pentru simularea dinamicii sintezei TRP. Conexiunea sintezei TRP la glicoliză se realizează prin nodul comun PEP [Maria et al., 2018A; Maria, 2021]. Structura modelului cinetic modular include, de asemenea, sinteza co-metabolitilor de adenozină ATP, ADP, AMP, ca parte a sistemului de regenerare a ATP (dreptunghiul roz din figură). Notatii: $GLC(ex)$ = glucoză în mediul celular. Abrevierile speciilor sunt date în lista de abrevieri ale [Maria și Renea, 2021]. Speciile din paranteză nu sunt incluse în mod explicit în modelul de glicoliză. Literele italițe notează enzimele. Pătratele includ notatii ale vitezelor de reacție enzimatică V1-V6 incluse în modelul de glicoliză propus de [Maria, 2014A, 2021; Maria și Renea, 2021]. Expresiile V1-V6 și alte detalii sunt prezentate în capitolele IV și V. Adaptat după [Maria, 2014A] cu amabilitatea CABEQ JI., și completat conform modelului cinetic al lui [Maria, 2021]. $GLC(ex)$ = glucoza în spațial extra-celular.

4).- Testarea în premieră cu rezultate deosebit de pozitive în calculele de optimizare a reactoarelor biologice/biochimice a modelelor cinetice *hibride*, structurate multi-nivel, de tip **MCSMD**. Acestea, au oferit posibilitatea obținerii *in-silico* a unui număr mai mare de alternative de operare pentru reactoarele **FBR**, toate fiind determinate cu o precizie crescută comparativ cu utilizarea unor modele clasice ne-structurate de tip Monod (vezi studiul de caz 1, cap. IV), sau de tip Michaelis-Menten (vezi studiul de caz 2, cap. V). Avantajele modelelor hibride **MCSMD** propuse în cadrul tezei ce se desprind din soluționarea celor două studii de caz sunt descrise pe larg în cap. I.3.

5).- Dovedirea validității principiilor/conceptelor și algoritmilor de calcul de **IchB (cap. I.4) folosiți la construcția modelelor cinetice structurate deterministe de tip *hibrid* **MCSMD**.**

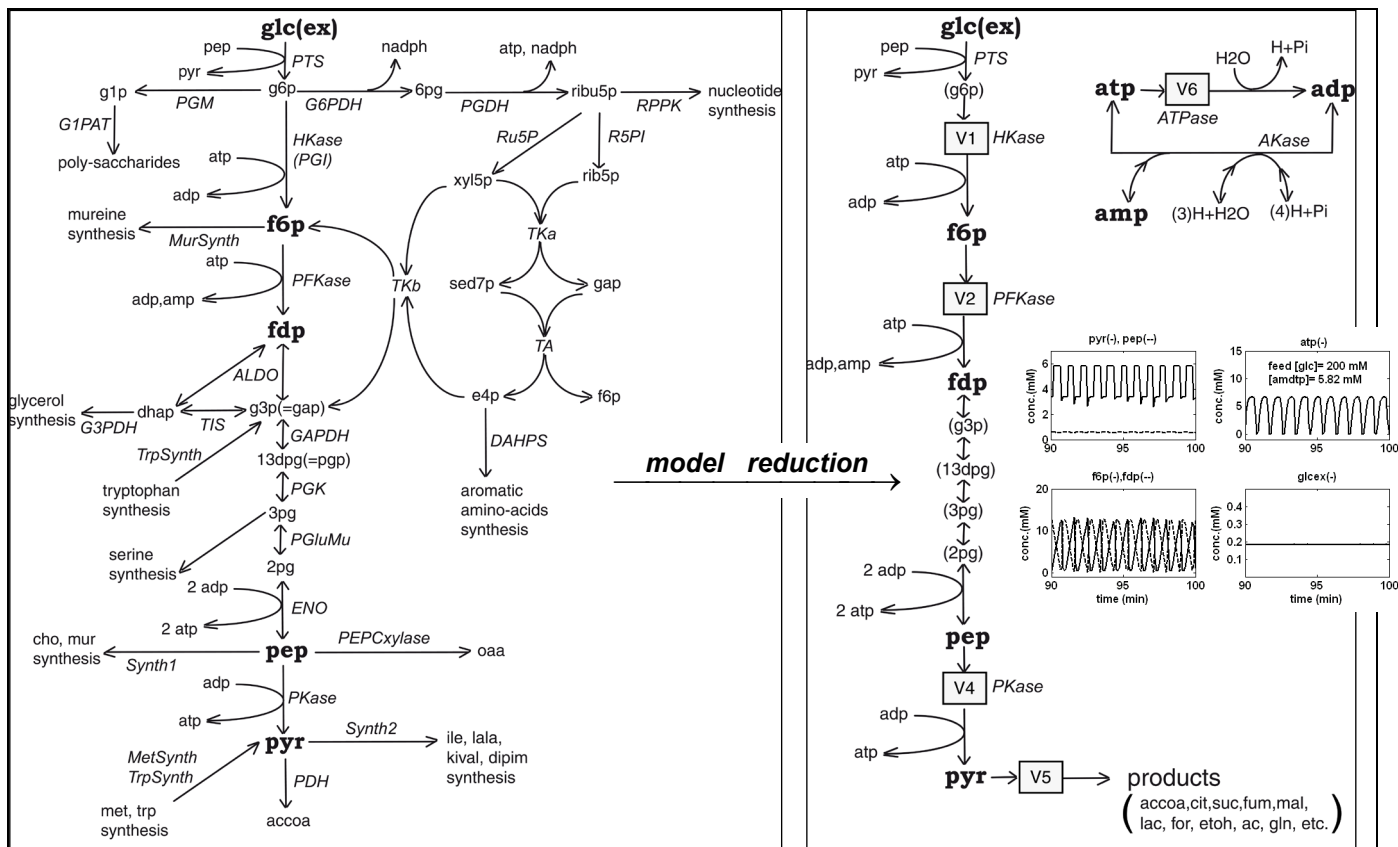


Fig. 1-5. Modele extinse si simplificate ale glicolizei in *E. coli* utilizate de catre:

(stanga) modelul extins **ChassM**, ce include si “pentose-phosphate pathway” (PPP)[Chassagnole et al., 2002];

(dreapta) modelul redus **mTRM** al lui Maria [2014A] ce include si sistemul regenerarii ATP prin intermediul sintezei co-metabolitilor ADP, AMP.

Patratele noteaza reactiile enzimactice din modelul **mTRM** (dreapta). Speciile din paranteze nu sunt incluse in mod explicit in modelul **mTRM**. Literele cursive noteaza enzimele.

Notatii metaboliti (ne-inclusi in lista de abrevieri a lui [Maria, 2014A]): 6pg = 6-phosphogluconate; ac = acetate; cho = chorismate; cit = citrate; dhap = dihydroxyacetonephosphate; dipim = diaminopimelate; e4p = erythrose-4-phosphate; etoh = ethanol; for = formate; fum = fumarate; glp = glucose-1-phosphate; gln = glutamine; ile = isoleucine; kival = α -ketoisovalerate; lac = lactate; lala = L-alanine; mal = malate; met = methionine; mur = mureine; oaa = oxaloacetate; rib5p = ribose-5-phosphate; ribu5p = ribulose-5-phosphate; sed7p = sedoheptulose-7-phosphate; trp = tryptophan; xyl5p = xylulose-5-phosphate.

Notatii enzime: AK-ase = adenylate kinase; ALDO = aldolase; DAHPS = DAHP synthases; ENO = enolase; G1PAT = glucose-1-phosphate adenylyltransferase; G3PDH = glycerol-3-phosphate dehydrogenase; G6PDH = glucose-6-phosphate-dehydrogenase; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MetSynth = methionine synthesis; MurSynth = mureine synthesis; PDH = pyruvate dehydrogenase; PEPCxylase = PEP carboxylase; PGDH = 6-phosphogluconate dehydrogenase; PGI = glucose-6-phosphate isomerase; PGK = phosphoglycerate kinase; PGluMu = phosphoglycerate mutase; PGM = phosphoglucomutase; R5PI = ribose-phosphate isomerase; RPPK = ribose-phosphate pyrophosphokinase; Ru5P = ribulose-phosphate epimerase; Synth1,2 = synthesis 1,2; TA = transaldolase; TKa = transketolase, reaction a; TKb = transketolase, reaction b; TIS = triosephosphate isomerase; TrpSynth = tryptophan synthesis.

Utilitatea modelelor hibride structurate MCSMD în calcule de inginerie biochimica

Prezenta teză de doctorat prezintă rezultatele unor cercetări ample, teoretice, *in-silico* (bazate pe folosirea de modele cinetice ale unor procese biologice sau biochimice preluate din literatura de specialitate, dar validate experimental, fie prin cercetări multiple efectuate de

către cercetători referențiați în această lucrare, fie de către cercetători referențiați cu care conducatorul de doctorat are colaborari științifice (cap. V), atât sub aspectul mecanismului de reacție, cât și sub aspectul formei expresiilor vitezelor de reacție ale procesului enzimatic de la nivel celular, ce țin de „metabolismul central al carbonului” (**CCM**). Această cercetare amplă dezvoltată aici are ca principal scop elaborarea unei metodologii privind construcția de modele matematice (cinetice) celulare modulare, deterministe structurate, hibride (MCSMD), similare cu cele folosite în ingineria chimică și biochimică (**IChB**) ce pot caracteriza satisfăcător dinamica etapelor esențiale ale **CCM**, dar și a modulelor de reacții de la nivel celular responsabile cu sinteza metaboliților de interes industrial. De asemenea, teza își propune să testeze eficiența noilor modele cinetice hibride MCSMD în aplicații de calcul ingineresc ce vizează optimizarea unor bioreactoare sau reactoare enzimatice.

Luând în considerare doar variabilele cheie macroscopice ale procesului (concentrațiile de biomasă, substrat și produs), modelele clasice („default”) nestructurate (aparente, globale, de tip Monod) nu reflectă în mod corespunzător modificările metabolice de la nivelul biomasei din bioreactor, fiind nepotrivite pentru a prezice cu acuratețe răspunsul celular la perturbațiile mediului de cultura prin intermediul metabolismului celular auto-reglat. Aceste modele nestructurate pot fi satisfăcătoare pentru o modelare aproximativă a procesului biologic, dar nu și pentru o modelare a proceselor metabolice celulare, neputând face nici o corelație între operarea bioreactorului și adaptarea continuă a metabolismului biomasei la condițiile variabile din bioreactor. În cazul reactoarelor multi-enzimatice, modelele nestructurate (de tip Michaelis-Menten) nu pot simula corespunzător interacțiunea dintre mai multe reacții enzimatice conduse simultan, și nici interacțiunea acestora cu variabilele de stare ale reactorului enzimatic.

În acest context sunt de evidențiat câteva concluzii legate de rezultatele pozitive ale studiului in-silico obținute în cadrul tezei privind avantajele utilizării de modele hibride MCSMD în ingineria biochimică (cap. I.3).

6.- Pe baza celor 2 studii de caz soluționate, teza de față recomandă utilizarea de modele cinetice hibride, structurate, modulare MCSMD în calcule de inginerie biochimică. Prin comparație cu cele nestructurate, modelele **MCSMD** oferă predicții de precizie sporită, cu un grad mai mare de detaliere (nr. specii considerate), și pe o durată de reacție mai mare.

În acest context, teza își aduce o contribuție remarcabilă în domeniul modelării proceselor biologice celulare la scara nano-molară, prin cuplarea într-un model dinamic hibrid a modelelor cinetice celulare structurate (ce includ dinamica speciilor și a reacțiilor metabolice de la nivel celular, ce țin de **CCM**), cu modelul dinamic al variabilelor de stare macro-scopice de la nivelul bioreactorului industrial. Din punct de vedere structural, modelele cinetice structurate **MCSMD** sunt unele deterministe, mecanistice, cu variabile continue deoarece se bazează pe mecanismul bioprocesului celular studiat. Ele sunt construite prin aplicarea conceptelor/principiilor și regulilor/procedurilor **IChB** și ale teoriei controlului sistemelor neliniare, pentru a caracteriza răspunsul sistemului bioreactor-biomasă celulară la perturbațiile compoziției din faza lichidă a bioreactorului (mediul extern celular) [Maria and Renea, 2022C].

7.- Modelele complexe **MCSMD** pot reprezenta satisfăcător etapele cheie din metabolismul central al carbonului (**CCM**) desfășurat la scară celulară. Abordarea este una modulară, extensibilă, și poate include, pe lângă modulele esențiale ale **CCM** [glicoliza, sistemul de fosfotransferază (**PTS**) sau unul echivalent pentru importul substratului (GLC) din mediu, ciclul acidului tricarboxilic (**TCA**), sistemul de regenerare al ATP, etc.], și modulele de reacție responsabile cu sinteza metaboliților celulari de interes pentru biosinteza industrială

(de exemplu sinteza triptofanului TRP în studiul de caz nr. 2, din cap. IV). Conform literaturii de specialitate [Maria, 2018; Maria, 2023B], modele cinetice celulare structurate de tip **MCSMD** *pot simula satisfăcător* pe o bază deterministă și auto-reglarea metabolismului celular **CCM** ce asigură o adaptare rapidă a sa la mediul de reacție din bioreactor aflat într-o continuă schimbare, folosind “circuite de reglare genetică” complexe (**GRC**), care includ lanțuri de „module de reacții de reglare a expresiei genetice individuale” (**GERM**). Aceste aspecte nu au fost abordate aici.

8).- Modelele **MCSMD** realizează un *grad mai mare de detaliere (nr. specii considerate) și de precizie* a predicției dinamicii bioprocesului analizat, atât la nivel macroscopic (variabilele de stare ale bioreactorului), cât și nanoscopic (dinamica speciilor celulare ce țin de **CCM**). Astfel, pentru studiul de caz nr. 2, privind maximizarea producției de TRP într-un bioreactor **BR**, sau **FBR** folosind o cultură de *E. coli* „wild” [Maria et al., 2018C], sau **OMG** [Maria, 2021; Maria și Renea, 2021], modelul *structurat, hibrid* **MCSMD** al lui [Maria, 2021; Maria și Renea, 2021] caracterizează dinamica a 13 (specii celulare) + 4 (specii macroscopice în lichidul din bioreactor), comparativ cu dinamica a numai 3 specii macroscopice (în lichidul din bioreactor) obținute prin aplicarea unui model dinamic macroscopic *nestructurat* clasic (Monod). În același timp, predicțiile modelului *structurat, hibrid* **MCSMD** acoperă *un interval mai larg de operare*, implicând o *gamă mai largă de variabile de control*, și diferite tulpini de celule *E. coli* („wild”, sau **OMG**). Astfel, intervalele de variație a variabilelor de control ale bioreactorului studiat sunt mult mai largi [Maria și Renea, 2021; Maria, 2021; Maria et al., 2018C], respectiv $[GLC]_{ext} = [0-1] \text{ mM}$, și $[GLC]_{feed} = [100-1000 \text{ mM}]$, cu o gamă mai largă de variabile de control (GLC, debit alimentare FL, diluție bioreactor $D=FL/V$), și o gamă largă de fenotipuri ce conțin sisteme de regenerare ATP modulabile prin intermediul caracteristicilor enzimei *ATP-ază* (având ca echivalent constantele de reacție **k6** și **K**) din modelul procesului celular (**Tabelul IV-2**), comparativ cu cele cu cca. un ordin de mărime mai mici, permise de un model *structurat* **MCSMD** similar folosit la simularea dinamicii unui bioreactor **FBR** de către Chassagnole et al. [2002]. Astfel, în studiul de caz 2, referitor la maximizarea producției de triptofan (TRP) într-un bioreactor continuu de tip **FBR**, modelul *hibrid structurat* **MCSMD** poate prezice diverse politici optime de operare ale bioreactorului, respectiv:

(a) o politica optimă de operare pentru o alimentare constantă [Maria și Renea, 2021; Maria et al., 2018C];

(b) o politica optimă de alimentare variabilă, „în trepte” (ca debit și substrat GLC), superioară operării cu alimentare constantă [Maria și Renea, 2021].

9).- Așa cum evidențiază și literatura de specialitate, un model *structurat hibrid* **MCSMD** este un instrument valoros pentru evaluarea fluxurilor metabolice celulare în vederea determinării modului de utilizare a substratului GLC în celula, conducând la proiectarea *in-silico* a unui **OMG** cu caracteristici superioare în ceea ce privește producția de metabolit dorit excretabil (ex. TRP) [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021].

Pentru studiul de caz nr. 2, speciile și fluxurile de interes sunt cele ce țin de glicoliză, de sistemul PTS de import al GLC, de sistemul de regenerare al ATP, și de expresia operonului TRP [Maria et al., 2018B; Mihalachi and Maria, 2019]. În acest fel, se poate direcționa proiectarea *in-silico* de celule modificate genetic **OMG** cu caracteristici (“motifs”) dezirabile [Maria și Renea, 2021]. Într-un alt studiu din literatură, un model *hibrid* **MCSMD** a fost utilizat pentru proiectarea *in-silico* de **OMG** *E. coli* clonate cu plasmide de *mercur*-operon în vederea creșterii capacității celulei de preluare a mercurului din apele uzare [Maria and Luta, 2013; Maria, 2010].

10). Modelele cinetice structurate, hibride **MCSMD** sunt utile și pentru înțelegerea bioprocesului celular în legătură directă cu modul de funcționare al bioreactorului. De exemplu, în studiul de caz nr. 2, se pot determina in-silico condițiile de apariție a oscilațiilor glicolitice în directă legătură cu concentrația de substrat din mediul de cultură [GLC]_{env} și cu caracteristicile celulare [Maria et al., 2018A; Maria et al., 2018B; Maria, 2021]. Interesul pentru un astfel de subiect este cu atât mai mare cu cât majoritatea intermediarilor din procesul de glicoliză celulară reprezintă în fapt „noduri de pornire” pentru producția internă a multor metaboliți celulari (de exemplu, aminoacizi, acid succinic, acid citric etc.) [Maria et al., 2018A; Maria et al., 2011; Maria, 2023B].

În același studiu de caz (cap. III), teza de față studiază și interferența oscilațiilor glicolitice cu oscilațiile din expresia operonului TRP [Maria, 2020A; Maria et al., 2018A], precum și condițiile de operare ale bioreactorului care conduc la o creștere echilibrată a celulelor (în stare cvasi-staționară - QSS, adică la homeostază) [Maria et al., 2018C; Mihalachi și Maria, 2019]. Într-un studiu de caz din literatură [Maria și Luță, 2013], modelul hibrid **MCSMD** extins poate prezice nivelurile de expresie a enzimelor mer și viteza de reducere a ionilor de mercur din bioreactorul folosit la îndepărtarea mercurului din apele uzate de către biomasa de *E. coli* în funcție de nivelul de mer-plasmide din celulele **OMG** *E. coli* clonate (aici „mer” = “mercur”).

Confruntarea cu rezultate similare din literatura și perspective ale utilizării modelelor hibride MCSMD în ingineria biochimică

Modelele cinetice hibride **MCSMD** prezentate în studiul de caz 1 (cap. IV), precum și în studiile de caz nr. (1-3) ale lucrării lui Maria [2023B] sunt structurate și sunt hibride deoarece sunt extinse pe două niveluri ale reprezentării bioprocesului: (1) unul la scară nanoscopică, celulară, care utilizează ca variabile de stare concentrațiile speciilor celulare cheie; (2) celălalt se referă la dinamica variabilelor de stare ale bioreactorului (adică concentrațiile măsurabile ale metaboliților din faza lichidă). Într-un astfel de model cinetic hibrid, variabilele de stare celulare sunt conectate direct cu cele ale bioreactorului prin procesele celulare de import/export (excreție) de substraturi/nutrienți/metaboliți prin membrana celulară.

În timp ce dinamica speciilor macro-moleculare, poate fi determinată experimental cu ușurință prin utilizarea tehnicilor analitice clasice, în schimb, dinamica speciilor (metaboliților) la nivel celular este mult greu de măsurat, atât la starea staționară (QSS), de creștere celulară echilibrată (homeostază), cât și în condiții dinamice, deși s-au înregistrat progrese recente remarcabile în acest domeniu [Niklas et al., 2011]. Aceste progrese permit măsurarea simultană a unui număr mare (600) de metaboliți celulari și monitorizarea evoluției acestora în timp. Aceste măsurători rafinate permit evaluarea fluxurilor metabolice, în condiții QSS sau dinamice, ale unei scheme **CCM** extinse/reduce prezentate în (**Fig. I-3**), prin utilizarea metodei clasice de calcul a lui [Stephanopoulos et al., 1998].

Pe scurt, studiile de caz prezentate în lucrarea de față, precum și a celor din literatura de specialitate [Maria, 2023B], solutionate folosind modele cinetice structurate, hibride **MCSMD** dovedesc ca acestea sunt instrumente de calcul moderne, precise și valoroase, atunci când se dezvoltă simulatoare numerice structurate pentru diverse aplicații de inginerie, cum ar fi:

(a).- Analiza fluxurilor metabolice celulare în condiții variabile de funcționare a bioreactorului [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021; Maria and Luta, 2013; Maria, 2010];

- (b).- Optimizarea sintezei metabolitului dorit prin optimizarea funcționării bioreactorului și/sau prin modificarea genetică a culturii celulare (studiul de caz 1 din cap. IV) [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021];
- (c).- Reprogramarea *in-silico* (pe baza modelului matematic a fluxurilor metabolice stationare) a metabolismului celular prin proiectarea de **OMG**-uri cu caracteristicile dorite [Maria, 2017, 2017B, 2018; Maria et al., 2019A; Maria, 2021; Maria and Renea, 2021; Maria and Luta, 2013; Maria, 2010; Maria et al., 2011].
- (d).- Interpretări ale modificărilor metabolice ale **OMG**-urilor în legătură directă cu modul de funcționare al bioreactorului [Maria and Renea, 2021; Maria, 2023B];
- (e).- Optimizarea mai precisă a funcționării bioreactorului (studiul de caz 1, cap. IV) [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021];
- (f) .- Extrapolări mai precise ale dinamicii bioproceselor, pe durata a zeci de cicluri celulare [Maria and Luta, 2013; Maria, 2010; Maria and Renea, 2021, 2024B, 2024C].
- (g) .- Determinarea condițiilor optime de funcționare ale bioreactorului, în raport cu mai multe obiective, având ca scop minimizarea consumului de substrat, dar menținând o productivitate ridicată pentru metabolitul dorit, și pentru biomasa. De exemplu, cazul sintezei TRP în studiul de caz 1 din cap. IV [Maria and Renea, 2021; Maria și Gheorghe, 2024], sau a acidul succinic în studiul de caz al lui [Maria, 2023B], sau a mAbs – vaccinuri monoclonale, în studiul de caz al lui [Maria, 2020D; Maria and Renea, 2024B].

CONTRIBUȚII ORIGINALE

În literatura de specialitate există puține studii sistematice privind construcția de *modele matematice (cinetice) structurate modulare, deterministe **hibride**, bi-nivel*, de tip **MCSMD**, și utilizarea lor la soluționarea unor probleme practice de inginerie biochimică, cum este și cea de determinare cu mai mare precizie a politicilor optime de operare a bioreactoarelor industriale.

Nu există niciun studiu sistematic privind modul de construcție a unui astfel de model *structurat, celular **MCSMD*** și nici a modului în care acesta (care prezice dinamica proceselor metabolice la scara nano-molară celulară) este cuplat cu modelul dinamic macroscopic al bioreactorului industrial, pentru a rezulta un model *hibrid* capabil să prezică, cu acuratețe sporită și la modul simultan, atât dinamica variabilelor de stare de la nivel celular cât și pe cea a variabilelor de stare de la nivelul macroscopic al bioreactorului.

În acest context, studiul de față se remarcă printr-un grad foarte mare de originalitate, pe mai multe planuri, abordând și soluționând în detaliu, o serie de aspecte esențiale legate de dinamica și performanța procesului metabolic celular în conexiune cu cea a bioreactorului industrial utilizat, folosind modele cinetice adaptate din literatura de specialitate, sau proprii (studiul 1 de caz, cap. IV).

În acest sens, contribuțiile originale aduse în cadrul acestei teze constau în următoarele:

1.- Elaborarea în premieră a unei metodologii de construcție pas-cu-pas a modelelor cinetice structurate, modulare, deterministe **hibride**, de tip **MCSMD**. Aceasta metodologie este exemplificată în mod stralucit în studiul de caz 1 (cap. IV). Astfel, se construiesc mai întâi modulele cinetice ce privesc etapele esențiale ale **CCM**, conectate între ele și la modulul cinetic al sintezei metabolitului tinta (TRP). Apoi, acestea sunt conectate cu variabilele de stare macroscopice ale modelului dinamic al bioreactorului prin intermediul modelului de creștere a biomasei (X), și prin intermediul speciilor importate (GLC) sau excretare de celula (TRP, PYR). Apoi, constantele cinetice sunt estimate în raport cu datele experimentale, considerând tot modelul **MCSMD** ca un întreg. [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021].

Mai mult, teza demonstrează într-un mod elocvent și strălucit cum un astfel de model cinetic *structurat hibrid* **MCSMD** poate fi construit cu succes folosind principalele concepte și reguli ale **IChB** (cap. I.4) [Maria and Renea, 2022C].

2).- Testarea în premieră în calculele de optimizare a reactoarelor biologice/biochimice a folosirii cu succes a modelelor cinetice *structurate*, *hibride*, bi-nivel, complexe de tip **MCSMD**. Acestea, au oferit posibilitatea obținerii *in-silico* a unui număr mai mare de alternative optime de operare pentru reactoarele **BR** sau **FBR**, toate politicile de operare fiind determinate cu o precizie crescută, și cu un grad de detaliere sporit (număr de specii considerate în model), comparativ cu utilizarea unor modele clasice („default”) ne-structurate, simpliste, globale, aparente, de tip Monod (vezi studiul de caz 1, cap. IV), sau de tip Michaelis-Menten simplu (vezi studiul de caz 2, cap. V). Semnificația și avantajele modelelor *hibride* **MCSMD** propuse în cadrul tezei ce se desprind din soluționarea celor două studii de caz sunt descrise pe larg în cap. I.3; I.1.2. [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021].

3).- Modelele cinetice hibride bi-nivel MCSMD propuse în cadrul tezei, contin în premiera în literatura de specialitate mai multe *caracteristici*, folosite *simultan* într-un mod *original* în calculele de inginerie biochimică. Acestea sunt următoarele:

- a).- *structurate* = includ mecanismul de reacție și dinamica speciilor celulare (considerate individual sau grupat) ce influențează într-un mod direct și major sintezele metabolice celulare de interes pentru aplicația industrială studiată (de ex. sinteza metabolitului țintă TRP în studiul de caz 1).
- b).- *modulare* = conțin module cinetice inter-conectate ce reprezintă module de reacții enzimice celulare ce guvernează etapele esențiale ale **CCM**, direct conectate cu modulul cinetic de sinteză ale unui metabolit țintă (de interes industrial), sau care controlează sistemele de reglare celulară **GRC** („genetic regulatory circuits”). Aceste module cinetice de la nivel celular sunt conectate și cu modulele cinetice ce reprezintă dinamica variabilelor de stare ale bioreactorului (**BR** sau **FBR**) Abordarea modulară în construcția de modele *hibride* **MCSMD** facilitează extinderea / adaptarea lor atunci când se studiază un nou bioproces. O astfel de abordare este una naturală, deoarece multe sisteme de reglare celulară **GRC**, sau cele ce țin de **CCM** [Maria, 2018; Maria, 2023B] sunt organizate *modular* [Kholodenko et al., 2002; Maria, 2017].
- c).- *deterministe*, bazate pe mecanismele de reacție, pentru a interpreta mai ușor rezultatele de simulare numerică. Modelele acestea sunt cu variabile continue, pentru a putea folosi principalele concepte, principii, proceduri și algoritmi ai **IChB** (cap. I.4) [Maria and Renea, 2022C].
- d).- *hibride*. Sub acest aspect, teza își aduce o **contribuție remarcabilă** prin elaborarea, pentru prima oară în literatura de specialitate, a unei metodologii bazate pe principiile și tehnicile **IChB** de construcție a unor *modele matematice (cinetice)* **MCSMD**, deterministe, care combină două niveluri de reprezentare a procesului studiat. Astfel, se combină caracteristicile procesului metabolic celular de la nivelul *nanoscopic* al modulelor esențiale din **CCM** celular, cu cele *macroscopice* de la nivelul variabilelor de stare ale bioreactorului industrial. În acest fel, se obțin predicții mai precise atât pentru dinamica procesului biologic de la nivel celular, cât și pentru dinamica parametrilor de operare ai bioreactorului industrial analizat. Acest lucru se datorează speciilor conectate la ambele niveluri de reprezentare. Pentru studiul de caz 1, aceștia sunt: substratul (GLC), biomasa (X) și produsii excretați de celulă (TRP, PYR). Aplicația imediată a acestor modele structurate hibride o constituie *determinarea mai precisă a regimului optim de operare al unui bioreactor industrial*. Avantajele unei astfel de abordări, folosind modele **MCSMD**, pentru soluționarea unor probleme de bioinginerie sunt descrise în Cap. I.3.

Aceasta abordare hibrida (la doua niveluri) a procesului studiat este una originala, deoarece în literatura de specialitate astfel de abordări sunt foarte rare. Trebuie remarcat faptul că, într-un astfel de model cinetic hibrid, variabilele de stare celulară sunt conectate direct cu cele ale bioreactorului prin intermediul proceselor celulare de import/export (excreție) de substraturi/nutrienți (GLC), sau metaboliți (TRP= triptofan, PYR= acid piruvic) prin membrana celulară.

e).- sunt extensibile. Construcția modulară a modelelor cinetice hibride de tip **MCSMD** permite atasarea de noi module cinetice, în cazul în care este necesară o detaliere a schemei **CCM** celulare folosite, sau a includerii și a altor sinteze de metaboliți celulari.

4).- Prin soluționarea in-silico demonstrativă a 2 studii de caz (dintre care cel din cap. IV a fost verificat cu date experimentale), lucrarea de față probează superioritatea modelelor dinamice structurate, hibride **MCSMD** comparativ cu modelele dinamice nestructurate, atunci când sunt aplicate la simularea unui bioproces industrial. Astfel, modelele structurate **MCSMD** realizează un grad mai mare de detaliere și precizie a predicției modelului dinamic, atât la nivel macroscopic (variabilele de stare ale bioreactorului), cât și nanoscopic (dinamica speciilor celulare ce țin de **CCM**). De exemplu, în studiul de caz nr.1, privind maximizarea producției de TRP într-un bioreactor **FBR** folosind o cultură de *E. coli* „wild” [Maria et al., 2018C], sau **OMG** [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021], modelul **MCSMD** al lui [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021] realizează un grad mai mare de detaliere al predicției comportării bioreactorului, respectiv poate prezice dinamica a 13 (specii celulare) + 4 (specii în lichid în bioreactor), comparativ cu numai 3 specii (în lichidul din bioreactor) obținute prin aplicarea unui model macroscopic nestructurat (global) clasic (Monod), acoperind în același timp un interval mai mare de timp de operare și o gamă mai largă de variabile de control, precum și diferite tulpini de celule *E. coli* („wild” sau **OMG**), astfel: (i) diluție bioreactor {debit de alimentare/evacuare FL raportat la volumul de lichid VL din bioreactor} = $[10^{-5} - 0.01]$ 1/min. {identică cu diluția celulară, calculată cu relația $\ln(2)/(\text{durata ciclului celular})$ }; (ii) concentrație substrat glucoză [GLC]_{feed} = [200-4500] mM; [GLC]_{ext} = [0-10] mM; (iii) concentrație biomasă [X] = 10-100 gDW/L; (iv) condiții inițiale [GLC]_{inițial} = [1-200] mM; FL = [0.01-0.04] L/h [Maria and Renea, 2021; Maria, 2021]. Pentru comparație, modelul parțial structurat **MCSMD** al bioreactorului **FBR** al lui [Chassagnole et al., 2002] simulează comportarea acestuia în intervale de operare mai restrânse cu cca. un ordin de mărime [Maria et al., 2018C]. Această abordare de precizie ridicată dezvoltată în cadrul tezei de față își are explicația în numeroasele elemente de originalitate ale construcției modelului structurat **MCSMD** menționate anterior. În plus, simulările pe durate mari de operare ale bioreactorului oferă posibilitatea vizualizării modului în care biomasa se adaptează mediului din bioreactor, aflat într-o continuă schimbare [Maria, 2020A; Maria, 2021; Maria and Renea, 2021].

Ca o observație importantă, modelul matematic (cinetic) structurat hibrid **MCSMD** din cadrul studiului de caz 1 (cap.IV) a fost validat experimental utilizând un set extins de date cinetice oferite cu generozitate de TU Hamburg, printr-o colaborare internațională [Chen, 2020; Maria, 2021; Maria and Renea, 2021]. La fel, și modelul matematic (cinetic) structurat hibrid **MCSMD** din cadrul studiului de caz 2 (cap.V) a fost validat experimental utilizând seturi mari de date experimentale din literatura de specialitate [Maria and Renea, 2022B; Slatner et al., 1998].

Pentru modelul matematic (cinetic) structurat hibrid **MCSMD** din cadrul studiului de caz 1 (cap.IV), s-a propus și validat o modificare a modulului cinetic structurat din literatura, utilizat pentru simularea sintezei oscilatorii a TRP [Maria et al., 2018A, 2018C; Maria and Renea, 2021]. Noul modul cinetic structurat a fost re-identificat utilizând informațiile experimentale cinetice ale lui [Bhartiya et al., 2006].

- 5).-** Aplicarea modelului matematic (cinetic) structurat hibrid **MCSMD** (cu 4 module cinetice inter-conectate) din cadrul studiului de caz 1 (cap.V, optimizarea bioreactorului **FBR** de sinteza a triptofanului TRP) prezinta numeroase elemente de noutate si originalitate in raport cu literatura de specialitate, astfel:
- 5i).- Exemplificarea metodologiei de constructie modulara a modelului cinetic *structurat hibrid* **MCSMD**. Modelul bi-nivel rezultat este suficient de complex pentru a reprezenta în mod adecvat dinamica speciilor-cheie ce aparțin modulelor esențiale ale **CCM** celular ([a] glicoliză, [b] sistem de recuperare ATP, [c] expresia operonului TRP, ciclul TCA), precum și pe cele ale fazei lichide ale **FBR**, adică creșterea biomasei, epuizarea GLC, acumularea de TRP excretat și PYR.
- 5ii).- Deși producția de TRP prin folosirea de **OMG** de *E. coli* a fost studiată pe larg, nevoia de precursori multipli pentru sinteza sa și reglementările complexe ale căilor de biosinteză fac ca obținerea unui randament ridicat în produs să fie încă o problema foarte dificilă. Această problemă de inginerie a fost rezolvată aici cu succes prin utilizarea unei abordări *in-silico* bazate pe un model cinetic *structurat hibrid* **MCSMD**, completată cu o îmbunătățire biologică cu un **OMG** [Chen,2020] a culturii de celule *E. coli* utilizate.
- 5iii).- Politica de operare optimă variabilă a **FBR** este dată pe intervale de timp (așa-numitele „arcuri de timp”) de lungime egală și în număr redus ($N_{div} = 5$), pentru a fi ușor de implementat. Variabilele de control prezintă niveluri optime, dar constante pe fiecare arc de timp (diferite între arcurile de timp) în timpul funcționării **FBR**.
- 5iv).- Cultura de biomasă utilizată se referă la o tulpină **OMG** de *E.coli* T5 modificată genetic, care înlocuiește sistemul PTS de import a substratului (GLC) în celula, cu altul mai eficient bazat pe sistemul galactoz-permeazei/glucokinazei (GalP/Glk), prin modularea expresiei genice a GalP/Glk. Caracteristicile acestei tulpini au fost reflectate în constantele vitezelor de reacție estimate de [Maria, 2021]. Această noua tulpină T5 a fost produsă de [Chen, 2016; Chen et al., 2021]. Tulpina T5 rezultată a arătat o creștere a producției de TRP într-un **FBR** operat ne-optimal cu 52,93% (25,3 mg/gDW biomasă/h) comparativ cu tulpina inițială „wild” [Chen et al., 2021], și cu 70% pentru un **FBR** operat optimal așa cum s-a determinat *in-silico* în lucrarea de față, folosind un model *structurat hibrid* **MCSMD**, (studiului de caz 1, cap. IV)[Maria and Renea, 2021].
- 6).-** Propunerea unei metodologii sistematice (vezi studiile de caz 1 și 2 solutionate) de selecție a celui mai potrivit tip de bioreactor pentru un proces biologic sau enzimatic dat și determinarea *in-silico*, *off-line*, pe baza unui model cinetic *hibrid* **MCSMD**, *structurat* al procesului studiat, a politicii optime de operare a reactorului selectat [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021; Maria and Renea, 2022B, 2022C, 2024B].
- 7).-** Modul original în care cele 2 studii de caz abordate în cadrul acestei teze, completate cu cele câteva studii imilare din literatura de specialitate [Maria and Luta, 2013; Maria, 2023B] exemplifică în mod elocvent utilitatea unui model cinetic structurat hibrid **MCSMD** al procesului studiat, de dimensiuni moderate, bazat pe etapele esențiale ale **CCM** celular. Un astfel de model cinetic este un instrument de calcul modern, precis și valoros atunci când se dezvoltă simulatoare structurate pentru diverse aplicații de inginerie, și bioinformatică, cum ar fi:
- (7a).- Analiza fluxurilor metabolice celulare în condiții variabile de funcționare a bioreactorului [Chen, 2016,2020; Maria,2021; Maria and Renea, 2021]. Ele rezultă prin soluționarea modelului dinamic **MCSMD** rescris pentru condiții staționare (cu derivatele concentrațiilor speciilor din bilanțul de masă egale cu zero). Pe baza acestei analize, este posibilă reprogramarea *in-silico* a metabolismului celular prin proiectarea de **OMG**-uri cu aplicații industriale [Chen, 2020; Maria, 2018,2021; Maria & Renea, 2021].

- (7b).- Optimizarea sintezei metabolitului dorit prin optimizarea funcționării bioreactorului (**BR** sau **FBR**) și/sau prin modificarea genetică a culturii celulare (teza de față, si [Maria, 2021; Maria and Renea, 2021]).
- (7c).- Optimizarea mai precisă a funcționării bioreactorului, așa cum exemplifica studiul de caz nr.2 din cap.IV, și lucrările autoarei [Maria and Renea, 2021; Maria and Renea, 2022B; Maria and Renea, 2024B, 2024C]. În plus, este posibilă determinarea politicilor optime de funcționare ale unui bioreactor, în raport cu mai multe obiective economice simultane, folosind tehnica fronturilor optime Pareto, având ca scop minimizarea consumului de materii prime (biomasa, enzime), dar menținând o productivitate ridicată pentru metabolitul dorit (de ex. TRP în studiul de caz 2, cap.IV).
- (7d).- Modelele *structurate hibride* **MCSMD** ale bioprocesului studiat permit extrapolări mai precise ale dinamicii proceselor din bioreactorul studiat, pe durata a zeci/sute de cicluri celulare ale biomasei (cca. 200 pentru studiul de caz nr.1, cap. IV). [Maria and Renea, 2021; Maria, 2010; Maria and Luta, 2013].