NACIONĀLAIS ATTĪSTĪBAS PLĀNS 2020

EIROPAS SAVIENĪBA
Eiropas Reģionālās attīstības fonds

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Projekts: Ar genoma mēroga stehiometrisko modelēšanu sasaistīta bioreaktora vadības sistēma (GenCon)

Projekta Nr. 1.1.1.1/20/A/137

Finansējums avots: Eiropas Reģionālās attīstības fonda 1.1.1.1. aktivitāte "Praktiskas ievirzes pētījumi", 4.kārta.

Projekta vadošais partneris: Latvijas Universitāte

Projekta partneri: A/S "Biotehniskais centrs"

Projekta periods: 01.06.2021. – 30.11.2023. (30 mēneši)

Projekta izmaksas: 540 000 EUR (t.sk. 444 366 EUR ERAF finansējums)

Projekta vadītājs: Profesors, Dr.sc.ing. Egils Stalidzāns, egils.stalidzans@lu.lv

Mērķis: izstrādāt jauna tipa bioreaktoru vadības sistēmu ar ieviestiem izmērāmiem ekonomiskiem, vides un sociāliem ilgtspējīgas metaboliskajiem stacionārā stāvokļa marķieriem. Izmantoto organismu metaboliskos stāvokļus izvēlas, analizējot mikrobu metabolisma matemātisko modelēšanu genoma mērogā.

Kopsavilkums: Pašlaik rūpniecības ķīmisko vielu ražošana no naftas ir dominējoša un būtībā nav ilgtspējīga, jo nafta ir neatjaunojama izejviela, un naftas ķīmijas ražošana un izmantošana ievērojami ietekmē gan vides piesārņojumu, gan klimata pārmaiņas. Vienlaikus tiek lēsts, ka 75% zāļu molekulu un 25% visu ķīmisko vielu ražošanu varētu veikt, biopārstrādē izmantojot atjaunojamos bioresursus vai bioloģiskos atkritumus, lai aizstātu fosilos resursus. Paredzams, ka rūpnieciskā biotehnoloģija ar gada pieauguma tempu 7% sasniegs apgrozījumu 50 BEUR līdz 2030. gadam. Projekts "GenCon" ierosina biotehnoloģiskā procesa izstrādes laikā ņemt vērā biotehnoloģijas ražošanas ekonomiskās, vides un sociālās ilgtspējas aspektus. Vēlamā ražošanas režīma nomērāmie marķieri tiks integrēti jauna tipa bioreaktoru vadības sistēmā, lai nodrošinātu konstruētā bioprocesa praktisko realizēšanu. Lai izvēlētos labāko risinājumu starp plašajām iespējām, tiks izmantota intensīva matemātiskā modelēšana un skaitļošana. Projektā tiks aplūkota Viedās specializācijas stratēģijas (RIS3) prioritārā joma "Zināšanu ietilpīga bioekonomika", un vairākas mērķgrupas izmantos projekta rezultātus. Projekta galvenās darbības ietver genoma mēroga metabolisko modelēšanu mikroorganismiem, lai noteiktu un ieviestu ekonomiski, ekoloģiski un sociāli efektīvākos biotransformācijas iestatījumus (uz modeļa balstītu barotnes sastāva un/vai organisma reakciju tīkla izmaiņas) bioreaktora vadības sistēmā, nodrošinot biotransformācijas ilgtspējīgu rūpniecisku realizāciju. Pieeja tiks pārbaudīta pielietojumu piemēros, kuros kā fermentācijas procesa kandidātus izmanto labi zināmus biotehnoloģiskos organismus: *Bacillus subtilis* Riboflavīna (vitamīna B2) ražošanai, *Escherichia coli* aminoskābes triptofāna ražošanai un *Pichia pastoris* rekombinanto proteīnu ražošanai. Projekta laikā tiks pārbaudīta jauna

bioreaktora vadības sistēma kā koncepcijas pierādījums. Rezultātā, kā jaunās tehnoloģijas prototips (TRL4), tiks piegādāta jauna bioreaktora vadības sistēmas izstrādes tehnoloģija.

Laboratorijas mēroga ražošanu īstenos kopā ar rūpniecisko partneri – pieredzējušu bioreaktoru ražotāju, 1996. gadā dibināto AS "Biotehniskais centrs".

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.06.2021. līdz 31.08.2021.

Pārskata periodā ir uzsākta projekta īstenošana, adaptēti pirmie *Escherichia coli* un *Pichia pastoris* genoma mēroga metaboliskie modeļi (GMMM). Tiek attīstīti modeļu svarīgāko atzaru reakciju plūsmu vizualizācijas varianti. Adaptējot GMMM, uzlabota funkcionalitāte GMMM salīdzināšanas un apvienošanas rīkam "Moderator" interaktīvai modeļu apvienošanai.

Tāpat tiek detalizēta integrētās vērtēšanas kritērija ekonomiskā komponente substrātu un produktu izmaksu/ieņēmumu aspektā. Izstrādātas pirmās versijas ekenomiskās komponentes vektoru ieviešanai, lai paplašinātu stehiometrisko modeļu optimizācijas kritēriju. Pārskata periodā pētnieku komanda uzsāka darbu pie apskata raksta sagatavošanas par raugu izmantošanu biovirsmaktīvo vielu ražošanai no pārtikā izmantotajām eļļām un taukiem un ražošanas procesa ietekmes uz vidi vērtējumu. Tika veikti vairāki komunikācijas pasākumi, kā arī notika trīs projekta komandas sanāksmes, kurās apspriests projekta kopējais progress, riski, kas var kavēt projekta rezultātu sasniegšanu, un darbības šo risku mazināšanai.

Savukārt projekta partnera, AS "BTC", institūcijā ir izstrādāti bioreaktora vadības sistēmas analizējamo procesu strukturēti saraksti tālākai ieviešanai SCADA sistēmā, sadarbojoties ar fermentācijas procesu un matemātiskās modelēšanas speciālistiem. Izveidota metaboliskās modelēšanas rezultātā iegūto mikroorgaismu stāvokļu atpazīšanas likumu ieviešanas forma datu apmaiņai starp modelētājiem un bioreaktora vadības sistēmu. Noris darbs pie automātiskās fermentācijas stāvokļu reģistrēšanas un arhivēšanas sistēmas strukturēšanas.

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.09.2021. līdz 30.11.2021.

Pārskata periodā tika testēti kritērija ekonomiskās komponentes ieviešanas varianti adaptētajos modeļos, notika vides kritēriju kopas definēšana. Tika izveidots automātiska substrātu un produktu spektra papildināšanas algoritms, kas adaptē GMMM tālākajām optimizācijas operācijām. Vēl vairāku organismu modeļi ir tikuši adaptēti. Tiek transformētas metabolītu nosaukumu sistēmas ar MODEARTOR rīku. Integrētās vērtēšanas kritērija vides komponentes detalizācijas pakāpe tiek adaptēta substrātiem un produktiem ar dažādu pieejamo informācijas daudzumu. Vides komponente tiek rēķināta paralēli ar ekonomisko komponenti, mazinot augstu jutību uz vides ziņā ietekmīgu substrātu ražošanas plūsmu variabilitāti.

Projekta partnera uzņēmumā, AS "BTC", tika plānoti un realizēti provizoriski eksperimenti, izmantojot pirmo mikroorganisma celma kandidātu, kā arī organizēta un optimizēta eksperimentālo datu apmaiņas plūsma starp projektā iesaistītajām grupām. Tāpat noris darbs pie automātiskās fermentācijas stāvokļu reģistrēšanas un arhivēšanas sistēmas projektēšanas. Balstoties uz eksperimentālo datu pieejamību, sistēma tiek optimizēta un pielāgota.

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.11.2021. līdz 28.02.2022.

Šajā periodā tika paplašināts kritēriju spektrs ar vides komponentēm. Kritērijs tiek ieviests metabolsikās modelēšanas un optimizācijas rīkos. Adaptēto genoma mēroga metabolisko modeļu kopa tika uzlabota pēc kvalitātes saskaņā ar MEMOTE kritērijiem, kas ļauj identificēt kļūdas, atkārtošanās un cita veida problēmas, kas mēdz būt sastopamas modeļos. Īpaši tiek testētas biomasas reakcijas masas nezūdamības nodrošināšanas ziņā.

Darbā pie integrētas vērtēšanas skalas izveides redzams, ka biotehnoloģisko procesu negatīvā ietekme uz vidi un sabiedrību pazemina integrēto vērtējumu, novedot to pie negatīvām vērtībām. Notiek kritēriju svara sabalansēšana integrētajā rādītājā, lai novērstu kādas komponentes dominanci.

Ir uzsākti risinājumu integrētās vērtības aprēķini ar nesacītam kritēriju vērtībām, veidojot matemātisko aparātu aprēķinu veikšanai, tiek meklēti piemēroti algoritmi plūsmu variabilitātes mazināšanai, kas ir marķieru meklēšanas priekšnosacījums.

Bioreaktorā nepārtraukti automātiski mērāmo parametru saraksts tiek salāgots ar GMMM optimizācijas metodēm automātisku aprēķinu realizācijai. Tiek veidoti modelim atbilstoši sintētisko barotņu varianti, lai noteiktu tām raksturīgās ietekmes uz GMMM reizinājumu telpu un mērāmo metabolītu ražošanas variabilitāti.

Partnera institūcijā, AS "BTC", tika turpināta kultivācijas eksperimentu realizācija, izmantojot pirmo mikroorganisma celma kandidātu. Tika organizēta un optimizēta eksperimentālo datu apmaiņas plūsma starp projektā iesaistītajām grupām. Tiek veiktas eksperimentālo datu analīze. Paralēli noris darbs pie automātiskās fermentācijas stāvokļu reģistrēšanas un arhivēšanas sistēmas projektēšanas/izveides.

Projekta zinātniskais asistents Kristaps Bērziņš LU 80. ikgadējās zinātniskās konferences un Vidzemes Inovāciju nedēļas ietvaros (http://innovation.vidzeme.lv/lv/) š.g. 25. februārī uzstājās ar referātu par tēmu "Metaboliskās inženierijas sasaiste ar bioreaktora vadības sistēmu". http://innovation.vidzeme.lv/lv/pasakumi/2022-02-25/kas-vienam-lieks-otram-prieks-bet-ko-darit-ar-razosanas-blakus-produktiem-un-bioatkritumiem.html

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.03.2022. līdz 31.05.2022.

Šajā pārskata periodā turpinājās vērtēšanas skalas modifikācijas, tika pārbaudīti efektīvi risinājumu meklēšanas algoritmi. Tāpat darbs turpinājās arī ar *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis* un *Escherichia coli* genoma mēroga modeļu precizēšanu un literatūras avotu pārbaudi. Skalā tiek ieviesti metaboliskās inženierijas parametri, kas raksturo delēciju un insertu ietekmi uz risinājuma vērtību. Tiek analizēts ģenētiskās modifikācijas fakta sociālās ietekmes ieviešana. Veikta aprēķinu metodikas uzlabošana, ieviešot optimizācijas kritērija vektora formu matricu aprēķinos, kā arī LAMOS optimizācijas pieejas adaptācija.

Aktivitātē "Modelēšanā balstīta marķieru noteikšana" plūsmu variabilitātes mazināšanā tika izveidotas vēlamā fermentācijas režīma reakciju kopas, pēc to variabilitātes un nulles plūsmas pieļaujamības. Nepārtaukti mērāmo parametru kombinatoriālais skrīnings marķieru ranzēšanai tika veikts ar dažādu algoritmu palīdzību, izvērtējot to efektivitāti un ātrdarbību. Savukārt, barotņu kombinatoriālā testēšana modeļa līmenī tika veikta, lai meklētu barotnes ar apmierinošu produkta ražošanas intensitāti un pieņemamu plūsmu variabilitāti.

Projekta partnera uzņēmumā, AS "BTC", tika uzsāktas darbības, kas saistītas ar metabolītisko stāvokļu un attiecīgo marķieru atpazīšanas algoritmu testēšanu un validāciju izvelētiem mikroorganismu celmiem un fermentācijas procesu gadījumiem. Tiek analizēti fermentācijas

procesu eksperimentālie dati, lai identificētu potenciālus marķierus. Secīgi tiek konstruēti stāvokļu korekcijas algoritmi, kuri tiek aprobēti eksperimentos.

Aktivitātē "Adaptīvās vadības sistēmas izstrāde un iestatīšana" tiek turpināti kultivācijas eksperimenti ar pirmo izvelēto mikroorganisma celmu. Tiek savākti eksperimentālie dati, kas ļaus identificēt svarīgākos procesa parametrus, kuri savukārt labāk aprakstīs tekošo metabolitisko stāvokli (marķieri). Īpaša uzmanība arī tiek pievērsta mērķa produkta kvantificēšanai, t.i. analītisko metožu izstrādei, kas ļautu ātri un at-line režīmā noteikt glikolipīdu sintēzes ātrumu.

Tika pabeigta BVS sistēmas arhitektūras izveide un darba pakas ietvaros tika uzbūvēts sākotnējais sistēmas prototipa variants, ar kuru būtu iespējams gan automātiski noteikt tekošo metabolītisko stāvokli, gan novirzīt fermentāciju atpakaļ optimālā stāvoklī, ja tiek konstatēta nobīde. Sākotnējā BVS vadības sistēmas versija tiek gatavota pirmajiem izmēģinājumiem.

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.06.2022. līdz 31.08.2022.

Pārskata periodā ir izveidoti četru organismu modeļi un adaptēti vēlākam iespējamajam pielietojumam jaunā tipa bioreaktora vadības sistēmā pēc marķieru meklēšanas. Adaptētie modeļi ir: *Escherichia coli* modelis iJO1366, *Saccharomyces cerevisiae* modelis iMM904, *Bacillus subtilis* modelis iYO844 and *Pichia pastoris* modelis iMT1026. Tāpat ir izstrādāta ilgtspējas vērtēšanas metodika, lai būtu iespējams salīdzināt dažādus risinājumus atkarībā no ilgtspējas ekonomiskās, vides un sociālās komponentes. Aprēķina metode ir pielietojama COBRA vidē un ieviešama matricu aprēķinu formā. Līdz ar to, kļūst iespējams COBRA ietvaros iekļaut komplekso kritēriju stacionārā stāvokļa aprēķinos. Papildus paveiktajam ir izstrādāti arī dažādu produktu stacionāro stāvokļu dizaini un veikta to ranžēšana. Tālāk dizaini tiks pielietoti marķieru meklēšanā. Dizains ar izdevīgākajiem marķieriem tiks izmantots tālākajos pētījumos.

Turpinot modelēšanā balstītu marķieru noteikšanu, tiek izstrādāta jauna metode plūsmu variabilitātes mazināšanai augstas produkta ražošanas plūsmas apgabalā, vienlaikus mazinot metabolisma variabilitāti. Ir izstrādāta jauna augšanas/produktivitātes telpas ierobežošanas metode optEnvelope, ar kuras palīdzību tiek plānots ierobežot metabolisma variabilitāti, kas noved pie ātrākas marķieru meklēšanas. Notiek barotnes komponenšu izvērtēšana pēc ilgtspējas parametriem, lai agrā variabilitātes samazināšanas pētījumu fāzē izslēgtu neperspektīvus substrātus. Papildus notiek evolucionāro algoritmu analīze, lai noteiktu to piemērotību delēciju ieviešanā. Galvenā uzmanība ir vērsta uz algoritmu konverģences īpatnībām un jauniem risinājumu ierobežojumiem.

Tiek turpinātas aktivitātes, kas saistītas ar metabolītisko stāvokļu un attiecīgo marķieru atpazīšanas algoritmu testēšanu uz reālo baktēriju (E. coli) fermentācijas procesiem. Tāpat tiek turpinātas fermentācijas procesu eksperimentālo datu analīzes, lai identificētu potenciālos marķierus; tiek analizēti tādi marķieri kā CO2 izdalītais daudzums, O2 patērētais daudzums, izdalīto CO2 un patērēto O2 attiecība. Ir uzsākti pirmie baktērijas (E. coli) fermentācijas procesi ar metabolitiskā stāvokļa atpazīšanu.

Paralēli tiek turpināta eksperimentālo datu vākšana, kas ļaus identificēt svarīgākos procesa parametrus, kuri, savukārt, labāk aprakstīs tekošo metabolītisko stāvokli (marķieri). Tika pabeigta sistēmas prototipa izveide, ar kuru iespējama automātiska fermentācijas procesa stāvokļa noteikšanai. Tika uzsākti fermentācijas procesi ar destabilizācijas darbībām. Fermentācijas procesos tika izmēģināti destabilizācijas procesi (ph, t) un BVS vadības sistēmas reakcija uz to.

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.09.2022. līdz 30.11.2022.

Šajā periodā aktivitātē "Modelēšanā balstīta marķieru noteikšana" piemērotu marķieru noteikšanā tika izmantota *growth-coupling* tipa metodes, kur sasaistīti tiek dažādi metabolīti savā starpā. Marķieru meklēšanā tika sekvenciāli iesaistīti vairāki metabolīti, izmantojot dažādas *optEnvelope* modifikācijas. Tika pielietoti mākslīgā intelekta algoritmi. Barotnes komponenšu izvērtēšanā tika ņemts vērā, ka gāzu analizatori (O2 un CO2) ir ērti marķieru noteicēji, tādēļ substrāta sastāvs tika vērsts uz to, lai notiktu gāzu apmaiņa. Paralēli notika dizainu ģenerēšana ar delēcijām un ievietotām reakcijām, modificējot izstrādāto *optEnvelope* pieeju. Tika variēts pievienojamo reakciju kopas apjoms, lai novērtētu konverģences īpašības. Papildus tika izstrādāts ranžēšanas algoritms atkarībā no marķieru komponenšu mērāmības un mērīšanas izmaksu ziņā.

Aktivitātē "Manuāla marķieru un stāvokļu korekciju noteikšana fermentāciju laikā" tika turpinātas aktivitātes, kas saistītas ar metabolītisko stāvokļu un attiecīgo marķieru atpazīšanas algoritmu testēšanu. Pārskata periodā tika pabeigta testēšana *E.coli* biomasas augšanas posmam un tika uzsākta produkta sintēzes posmam. Tika identificēti raksturīgākie marķieri, uz kuru bāzes var identificēt procesa stāvokli attiecībā uz biomasas augšanu. Turpmāk līdzīgi tiks noteikti marķieri produkta sintēzei. Tāpat tika uzsākti pirmie baktērijas (*E. coli*) fermentācijas procesi ar metabolitiskā stāvokļa atpazīšanu. Tika uzbūvēta pirmā versija algoritmam procesa stāvokļa pārslēgšanai. Minētais algoritms tiks testēts *E.coli* fermentācijās (procesam pārslēdzoties no biomasas augšanas uz produkta sintēzi).

Savukārt partnera institūcijā tika turpināti eksperimenti ar destabilizācijām. Tika identificēti raksturīgākie marķieri, uz kuru bāzes var identificēt procesa stāvokli attiecībā uz biomasas augšanu. Minētie marķieri tika integrēti sistēmas prototipā. Turpmāk, sistēmas prototips tiks papildināts ar produkta sintēzes marķieru komplektiem. Tika turpināta BVS vadības sistēmas testēšana uz reāliem fermentācijas procesiem (*E.coli*). Pēc eksperimentāliem datiem, tika veiktas nepieciešamās korekcijas, kas ļauj precīzāk atpazīt tekošo procesa stāvokli. Turpinājās arī destabilizācijas eksperimenti, kuros tika variēti gan fizikālie (pH, t un DO), gan ķīmiskie (substrāta koncentrācija) parametri un tika analizēta sistēmas atbilde uz to.

Vēl agrāk tika organizētas apmācības "Biomodelling spring 2022" (22.-24.03.).

Informācija tiešsaistē pieejama šeit: https://www.biosystems.lv/post/biomodelling-spring-2022

Projekta informācija sadarbības partnera tīmekļa vietnē:
https://www.bioreactors.net/gencon

Projekta zinātniskais vadītājs: Egils Stalidzāns, e-pasts: egils.stalidzans@lu.lv

Projekta administratīvā vadītāja: Agnese Kukela, e-pasts: agnese.kukela@lu.lv

30.11.2022.