



I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

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 atjaunojamus 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 īsteno 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 mikroorganismu stāvokļu atpazīšanas likumu ieviešanas forma datu apmaiņai starp modelētājiem un bioreaktora vadības sistēmu. Noris darbs pie automatiskās 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 automatiska 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 automatiskās 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, atkārtotās 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.

Aktivitatē "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 ranžēšanai 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 izvēlētiem 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.

Aktivitatē "Adaptīvās vadības sistēmas izstrāde un iestatīšana" tiek turpināti kultivācijas eksperimenti ar pirmo izvēlēto mikroorganisma celmu. Tiek savākti eksperimentālie dati, kas ļaus identificēt svarīgākos procesa parametrus, kuri savukārt labāk aprakstīs tekošo metabolītisko 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 ilgspējas vērtēšanas metodika, lai būtu iespējams salīdzināt dažādus risinājumus atkarībā no ilgspējas 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 komponentu izvērtēšana pēc ilgspējas 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 metabolītiskā 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 komponentu 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 komponentu 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 metabolītiskā 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 pārskats par paveikto laika periodā no 01.12.2022. līdz 28.02.2023.

Šajā pārskata periodā tika atlasīti bioreaktora eksperimentos ar modificētajiem celmiem pārbaudāmie marķieru likumi. Marķieru kombinācijas tika ranžētas pēc to sagaidāmās lietošanas precizitātes, atkarībā no modificētā celma risinājumu telpas. Substrātu spektrs tiek variēts tā, lai ietvertu vairāk rūpniecības blakusproduktus, piemēram, glicerīnu.

Plūsmu variabilitātes samazināšana tiek realizēta, iekļaujot optimizācijas kritērijā visu plūsmu summai apgriezti proporcionālu lielumu. Tiek vērtētas konverģences īpašības. Plūsmu variabilitāte tiek mazināta ar *optEnvelope* programmas modificētu versiju. Optimizācijas kritērijā ir iekļauti arī ilgtspējas elementi.

Tika uzsākta aktivitāte "Reakciju ieviešana vai delēcija" un jau ir saņemti pirmie E.coli izejas celmi, nepieciešamās nukleotīdu sekvences un ķīmikālijas delēciju realizācijai. Notiek pirmo dizainu ieviešanas eksperimenti.

Projekta partnera institūcijā, AS "Bioreaktors.net" pārskata periodā tika turpināta algoritma testēšana E.coli produkta sintēzes posmam. Tika veikti algoritma darbības korekcijas un noteikti marķieri produkta sintēzei. Minētie marķieri balstās uz biomasas respirācijas procesa rakstura maiņu sekundāro metabolītu veidošanas laikā.

Paralēli tika turpināti baktērijas (E. coli) fermentācijas procesi ar metabolitiskā stāvokļa atpazīšanu. Modeļa darbībā tiek veiktas korekcijas/uzlabojumi, tiek turpināta algoritma testēšana E.coli fermentācijās un eksperimenti ar destabilizācijām. Ir uzsākta produktu sintēzes marķieru ieteigšanu sistēmas prototipā.

Tāpat tiek turpināti BVS vadības sistēmas testi E.coli fermentācijas procesos. Notiek arī papildinātu algoritmu testēšana BVS sistēmas ietvaros un destabilizācijas eksperimenti. Variāciju saraksts tika papildināts ar slāpekļa un fosfora avotiem. Tiek analizēta sistēmas atbilde uz N un P perturbācijām.

Latvijas Universitātes 81. starptautiskās zinātniskās konferences ietvaros, 2023.g. 24. februārī K.Bērziņš uzstājās ar referātu "*Growth coupling* algoritmu pielietošana mikroorganismu celmu izveidē".

Ir publicēts zinātniskais raksts:

Bolmanis, E.; Dubencovs, K.; Suleiko, A.; Vanags, J. Model Predictive Control—A Stand Out among Competitors for Fed-Batch Fermentation Improvement. *Fermentation* 2023, 9, 206. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030206>

Publikācija pieejama šeit: <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/3/206>

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.03.2023. līdz 31.05.2023.

Pārskata periodā turpinās aktīvs darbs pie aktivitātes, kas vērsta uz modelēšanā balstīta marķieru noteikšanu. Viens no izvēlētajiem marķieru likumiem tiek testēts pie sadarbības partnera uz vadības sistēmas. Turpinās darbs pie celmu dizainu realizācijas, ieviešot delēcijas.

Marķieru skrīninga algoritms tiek realizēts ar projekta ietvaros izstrādātās OptEnvelope programmas uzlaboto versiju, kombinējot to ar modificētu optGene versiju, kurā ir iestrādāti ilgtspējas kritēriji. Substrātu spektra variācijas uzrāda lielu substrātu izvēles ietekmi uz ilgtspējas parametriem. Līdz ar to, vairāki substrāti skrīningā netiek izvēlēti.

Variabilitātes samazināšana tiek alternatīvi realizēta ar augšanai piesaistīto produkta ražošanas metodi, kas nodrošina variabilitātes samazināšanu punktā ar lielāko augšanas ātrumu.

Tāpat ir modificēta optGene programma, kurā ir iekļauti ilgtspējas kritēriji. Rezultātā risinājumi tiek automātiski ranžēti saskaņā ar ekonomisko, vides un sociālo ilgtspēju.

Paralēli notiek dizainu ieviešanas eksperimenti, kuri pagaidām nav sekmīgi. Līdz ar to, ir nepieciešamas pagarināt darbu pie šīs aktivitātes. Eksperimenti pie sadarbības partnera notiek ar celmu, kurš jau ir iegādāts ar vienu delēciju un inhobitots bloķē otru nepieciešamo reakciju.

Partnera uzņēmumā tika turpināta algoritma testēšana E.coli produkta sintēzes posmam. Tiek meklēti papildus marķieri, kas uzlabotu algoritma darbības efektivitāti.

Iepriekš atrastais marķieru saraksts tiek papildināts, lai uzlabotu stāvokļa atpazīšanas algoritma darbību. Saraksts tiek papildināts ar at-line metabolītu izdalīšanas datiem.

Pārskata periodā tika identificēts, ka iepriekšējo marķieru saraksts bija par mazu, lai veiktu efektīvu stāvokļa atpazīšanu un uzturēšanu. Tiek turpināti eksperimenti ar E.coli, ar papildinātu marķieru sarakstu. Tāpat tiek turpināta algoritma testēšana ar atjaunotu marķieru izlasi.

Paralēli tika veikti eksperimenti ar sintēzes posma atpazīšanu E.coli gadījumam. Tiek turpināti eksperimenti, ar papildinātu marķieru sarakstu, lai uzlabotu algoritma efektivitāti. E.coli eksperimenti tiek turpināti. Stāvokļu atpazīšanas algoritmi tika papildināti ar jaunajiem datiem, kas tika integrēti BVS sistēmā. Šobrīd ir nepieciešams papildināt eksperimentālo datu kopu, lai noteikt BVS sistēmas atbildi uz P un N perturbācijām.

Projekta ietvaros ir publicēts vēl viens zinātniskais raksts:

Muiznieks, R., Dace, E., Stalidzans, E. (2023). Integrated sustainability score implementation as an objective function in sustainable metabolic engineering, *Fermentation*, 9(6), 548, <https://doi.org/10.3390/fermentation9060548>

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.06.2023. līdz 31.08.2023.

Pārskata periodā modelēšanā balstīta marķieru noteikšanā ir realizēta viena dizaina ieviešana E.coli celmā, kas ir realizēta vairākos veidos - ar delēcijām un inhibitoriem. Celmi tiek testēti pie sadarbības partnera. Turpinās celmu projektēšanas algoritmu izstrāde. Bez tam ir izstrādāts algoritms, kas iekļauj daudzdimensionālu iespējamās risinājumu telpas analīzi marķieru kombināciju meklēšanai. Skrīninga rezultātā labākos rezultātus ilgtspējas ziņā uzrāda glikoze, kas ļauj darboties izvēlētajam un realizētajam dizainam ar mazu plūsmu variabilitāti. Savukārt variabilitātes samazināšana tiek realizēta pie maksimālās biomasas ražības, kas ir visiespējamākais fermentācijas stacionārais stāvoklis risinājumu telpā. Līdz ar to, variabilitāte pārējā risinājumu telpā kļūst nebūtiska.

Attiecībā uz stacionāro stāvokļu ranžēšanu pēc plūsmu variabilitātes samazināšanas, ir izstrādāts ranžēts stacionāro stāvokļu saraksts ar marķieriem. Ranžējums veikts E.coli celmiem saskaņā ar ekonomisko, vides un sociālo ilgtspēju. Paralēli turpinās izvēlēta dizaina dažādu realizācijas alternatīvu ieviešana, kas ļautu stabilizēt vēlamo stacionāro stāvokli un padarīt marķiera atpazīšanu vienkāršāku.

Tāpat tiek turpināta algoritma testēšana E.coli produkta sintēzes posmam. Tika izstrādāts gāzu cirkulācijas kontūrs, kas tiks izmantots CO₂ gāzes koncentrācijas izmaiņu dinamikas noteikšanai. Tas ir nepieciešams, lai pārbaudītu pēdējā marķiera (CO₂ uzņemšana) pārbaudei.

Fermentācijas procesu stāvokļu marķieru saraksts tika papildināts ar pēdējo marķieri (CO₂ uzņemšana). Šobrīd tiek veikti eksperimenti, lai pierādītu, ka minētais marķieris tieši nosaka produkta sintēzes dinamiku. Šobrīd tiek veikti eksperimenti ar E.coli, lai atstrādātu CO₂ marķiera darbību. Savukārt stāvokļu maiņas algoritmu pārbaudes marķieru aktuālais saraksts tika papildināts ar gāzu uzņemšanas/izdalīšanas datiem. Tiek turpināta algoritma testēšana E.coli procesos.

Partnera institūcijā attiecībā uz adaptīvās vadības sistēmas izstrādi un iestatīšanu turpinās eksperimenti. Aktuālā sistēma tika papildināta ar gāzu uzņemšanas/izdalīšanas datiem (CO₂ gadījumam). Caur metaboliskiem modeļiem tika noteikts, ka CO₂ uzņemšanai ir jāpastāv

E.coli produkta sintēzes posmā. Ņemot vērā, ka CO₂ izdalīšanu/uzņemšanu ir samērā vienkārši mērīt on-line, minētais marķieris varētu kļūt par noteicošo efektīvai fermentācijas procesa vadībai.

Paralēli tiek turpināti eksperimenti ar P un N perturbācijām. Turklāt, tiek ieviestas jaunas perturbācijas, t.i. gāzu sastāvs (O₂:N:CO₂).

Projekta ietvaros tika organizēti semināri/apmācību kursi "Biomodelling Spring 2023", lai popularizētu projektā izmantotās vielmāiņas matemātiskās modelēšanas metodes. Pasākums tika organizēts hibrīdā režīmā - ar klātienes un attālinātu dalību. Pasākums notika 12.-14.jūnijā. Tajā piedalījās 16 dalībnieki. Dalībnieku saraksts pievienots atsevišķi. Pasākuma programma: <https://www.biosystems.lv/post/biomodelling-spring-2023>

Tāpat pēc dalības starptautiskā konferencē ar projekta rezultātu prezentēšanu ir publicētas tēzes: Stalidzans, E., Muiznieks, R., Dace, E. Implementation of Sustainability Score in the Strain Design Process. The 9th Metabolic Pathway Analysis International Conference (MPA 2023). July 24-27, 2023, Seoul, South Korea, p.55.

Projekta pārskats par paveikto laika periodā no 01.09.2023. līdz 30.11.2023.

Projekta noslēguma posmā tika pabeigts darbs vēl īstenošanā esošajās aktivitātēs.

Ir veiktas fermentācijas ar izstrādāto E.coli celmu, kurā bloķēti divi gēni, kas ļauj samazināt metabolisko procesu alternatīvos variantus tā, lai, ar izstrādātā fermentācijas stāvokļa marķiera palīdzību, būtu iespējams pārliecināties, ka šūnu vielmāiņas rezultātā tiek ražots sukcināts plānotajā apjomā.

Vadības sistēmas realizācijā marķiera likuma pārbaude ir realizēta tā, lai likums būtu atbilstošs aktuālajam glikozes patēriņam. fermentācijas tiek realizētas divās fāzēs - aerobajā, kurā tiek saražota biomasa un anaerobajā, kuras ietvaros notiek produkta sintēze.

Ir sagatavots jauna tipa bioreaktora vadības sistēmas tehnoloģija prototipa apraksts, kas ir viens no svarīgākajiem projekta rezultātiem.

2023.gada 15.novembrī tika organizēts informatīvs seminārs plašākam interesentu lokam, kur tika prezentēti galvenie projekta rezultāti. Tāpat projekta rezultāti tika prezentēti divās starptautiskajās konferencēs - ICSB 2023: The 22nd International Conference on Systems Biology, ASV un "Infoday: Food Proteins from Biotechnology" Vācijā.

Ir publicēts vēl viens zinātniskais raksts par projekta rezultātiem:

Motamedian, Ehsan; Berzins, Kristaps; Muiznieks, Reinis; Stalidzans, Egils, 2023. OptEnvelope: A target point guided method for growth-coupled production using knockouts. PLoS ONE 18(11): e0294313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294313>

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

30.11.2023.