

## **Izmeklētas uz modeli bāzētas substrāta piebarošanas ātruma kontroles sistēmas ar prognozi izstrāde rekombinantu un ne-rekombinantu mikroorganismu fermentācijas procesu produktivitātes uzlabošanai**

Projekta vienošanās Nr. 1.1.1.2/16/I/001

Pētniecības pieteikuma Nr. 1.1.1.2/VIAA/1/16/186

Darbības programma "Izaugsme un nodarbinātība"

Aktivitāte 1.1.1.2. "Pēcdoktorantūras pētniecības atbalsts"

### **Projekta progressa pārskats par periodu 01.07.2019. – 30.09.2019.**

#### **Turpinātas aktivitātes:**

Nr. 2. Uz modeli bāzētas izmeklētas tiešsaistes sistēmas izveidošana, *kas satur sekojošas apakšaktivitātes:*

- Uz modeli bāzētu izmeklētu kontroles algoritmu izraudzīšanās.
- Uz modeli bāzētu izmeklētu kontroles algoritmu programmēšana *Matlab*.
- Uz modeli bāzētu izmeklētu kontroles algoritmu integrēšana bioreaktora kontroles sistēmā.
- Eksperimentālo datu analīze (modeļa un modeļa parametru re-identifikācija, kontroles sistēmas noskaņošana).

Nr. 3. Mikroorganismu kultivēšana bioreaktorā, *kas satur sekojošas apakšaktivitātes:*

- Rekombinantā *P. pastoris* GS115 HBcAg producenta kultivācija bioreaktorā, tiešsaistes un rokas analīžu datu ievākšana un analīze.
- Rekombinantā *P. pastoris* GS115 HBsAg producenta kultivācija bioreaktorā, tiešsaistes un rokas analīžu datu ievākšana un analīze.
- *S. cerevisiae* DY7221 kultivācija bioreaktorā, tiešsaistes un rokas analīžu datu ievākšana un analīze.

Nr. 4. Mērķa produkta ieguve un analīze, *kas satur sekojošas apakšaktivitātes:*

- Hepatīta B kor-antigēna (HBcAg), Hepatīta B virsmas-antigēna (HBsAg) sintēzes daudzuma un kvalitātes analīze, un *S. cerevisiae* DY 7221 biomasas daudzuma analīze.
- Kvantitatīvs HBcAg /HBsAg uzkrāšanās likumsakarību atkarībā no izraudzītās limitējošā substrāta kontroles un tās kvalitātes, novērtējums.
- HBcAg/HBsAg ieguves ar *P. pastoris* GS115 un *S. cerevisiae* DY 7221 biomasas ieguves procesa mērogošanas tehnoloģiskā instrukcija.

## **Veiktās projekta darbības:**

### **Uz modeli bāzētas izmeklētas tiešsaistes sistēmas izveidošana**

Ekspertmentālo datu analīze (modeļa un modeļa parametru re-identifikācija, kontroles sistēmas noskaņošana). Veikts darbs pie tiešsaistes kultūras dielektriskā caurlaidības (Incyte, Hamilton co.) mērījuma aprobācija biomasas koncentrācijas novērtēšanai. Izdarīti sekojoši secinājumi:

- Novērtēts, ka dzīvotspējīgo šūnu tilpuma frakcija (P) labāk korelē ar šūnu sausā svara koncentrāciju (DCW), kā kopumā ar Delta Eps mērījumu. Kamēr šūnu dzīvotspēja ir augsta (pirms indukcijas), DCW labi korelē ar P.
- HBsAg eksperimentos metanola piebarošanas fāzē P un DCW sāk būtiski atšķirties. Tas var būt izskaidrojams ar MutS celmu zemāku dzīvotspēju, kas saistās ar paaugstinātu šūnu stresu ar metanolu inducējot olbaltumvielas sintēzi.
- HBcAg procesos dzīvotspējīgo šūnu tilpuma frakcija (P) labi korelē ar šūnu sausā svara koncentrāciju (DCW). Iepriekšminēto var skaidrot ar Mut+ celmu augstāku metanola toleranci salīdzinājumā ar MutS celmiem, kā rezultātā HBcAg ieguves procesā novērojams augstsāks dzīvotspējīgo šūnu saturs salīdzinājumā ar HBsAg ieguves procesu.
- Aprēķinātais šūnas faktors (Cx) var tikt izmantots, lai korelētu šūnu sausā svara koncentrāciju (DCW) ar DeltaEps līdz metanola piebarošanas fāzes sākumam pēc formulas  $DCW = DeltaEps * 4$ , kas šķietami nav atkarīga no procesa nosacījumiem (celma veida, temperatūras un kultivācijas protokola). Tomēr iepriekšminētais vairs nav spēkā metanola piebarošanas fāzē.

### **Mikroorganismu kultivēšana bioreaktorā**

Rekombinantā *P. pastoris* GS115 HBsAg producenta kultivācija bioreaktorā, tiešsaistes un rokas analīžu datu ievākšana un analīze.

Realizēja *P. pastoris* GS115 HBsAg (MutS) laboratorijas bioreaktora kultivācijas procesu (94 h) pie 30 °C (kultivācija pēc Gurramkonda et al. (2009), *Microbial Cell Factories*, 8, 1–8, <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-13>), ar uzstādīto metanola koncentrāciju 2 g/l. Uzkrāja un analizēja tiešsaistes mērījumus – metanola koncentrācija (BCP-EtOH, Bluesens), kultūras duļķainība (ASD19-EB-01, Optek), O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> koncentrācijas izejas gāzēs (EasyFerm, Bluesens). Veikta jauniegūtā metanola sensora (Raven) aprobācija: kalibrācija, kalibrācijas iešūšana kontroles programmā, sensora fiziska savienošana ar bioreaktora kontrolieri.

### **Mērķa produkta ieguve un analīze**

Hepatīta B virsmas-antigēna (HBsAg) sintēzes daudzuma un kvalitātes analīze.

No aprakstītā *P. pastoris* GS115 HBsAg (MutS) procesa kultūras 2. reizi dalīja un tīrīja HBsAg. Mērķis – pamainot tīrīšanas shēmu, sekmēt izdalāmā produkta ieguvu.

Izdalīts un tīrīts HBsAg; mērķis – pamainot tīrīšanas shēmu, sekmēt izdalāmā produkta ieguvu.

### **Projekta realizācija**

- No 15.-19. septembrim ņemta dalība 5. Eiropas Bioķīmisko Inženierzinātņu Biedrības (ESBES) Kongresā un stenda referāta formātā prezentēti Pēcdoktorantūras pētniecības projekta (Nr. 1.1.1.2/VIAA/1/16/186) rezultāti ar nosaukumu “Recombinant Mut+ *P. pastoris* GS115 hepatitis B virus core-antigen (HBcAg) obtainment in methanol PID-controlled fed-batch process”. Kongresa ietvaros ieguva jaunu informāciju par aktuāliem

pētījumiem ķīmijas- un bio-tehnoloģijas jomās, dibināja kontaktus ar jomas kolēģiem, ieguva informāciju par tehniskām iekārtām, kas noderīgas pēcdoktorantūras pētījumu tematikas tālākai attīstībai.

- Analizēta zinātniskā literatūra par HBcAg un HBsAg ieguves procesiem. Turpināta rezultātu apkopošana zinātniskajai publikācijai. Turpinās darbs pie projekta rezultātu noformēšanas zinātniskās publikācijas veidā. Veica patentmeklējumus un analizēja paptentliteratūru saistībā ar metanola kontroli rūpnieciskajos rekombinanto olbaltumvielu ieguves procesos.

#### **Projekta īstenošanas vietas –**

- Latvijas Valsts Koksnes Ķīmijas Institūts (LV KĶI), Dzērbenes iela 27, Rīga, LATVIJA, LV-1006 (<http://www.kki.lv>, [koks@edi.lv](mailto:koks@edi.lv)).
- Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs (LV BMC), Rātsupītes iela 1, Rīga, LATVIJA, LV-1067 (<http://biomed.lu.lv/>, [bmc@biomed.lu.lv](mailto:bmc@biomed.lu.lv)).
- Kauņas Tehnoloģiju Universitāte (KTU), K. Donelaičio g. 73, Kauņa, LIETUVA, LT-44249 (<https://ktu.edu/>, [ktu@ktu.lt](mailto:ktu@ktu.lt)).

**Plānotais kopējais projekta īstenošanas ilgums – 36 mēneši.**

**Projekta realizētājs:** Dr.Sc.Ing. Oskars Grīgs ([oskars.grigs@edu.rtu.lv](mailto:oskars.grigs@edu.rtu.lv))

**Institūcijas atbildīgā persona par pētniecības pieteikuma zinātnisko pētījumu:**

Dr.Sc.Ing. Juris Vanags ([btc@edi.lv](mailto:btc@edi.lv))

**Projekta vadītājs:** Dr.Sc.Ing. Uģis Cābulis ([cabulis@edi.lv](mailto:cabulis@edi.lv)).

**Projekts uzsākts:** 02.10.2017.

**Pārskats sagatavots:** 30.09.2019.