

Projekts nr. 1.1.1.1/21/A/044 “Efektīvas pilot-mēroga leghemoglobīna ražošanas tehnoloģijas izstrāde uz rekombinanto *Pichia pastoris* un *Kluyveromyces lactis* fermentācijas procesu ar piebarošanu bāzes. (BioHeme)”

2. ceturkšņa progress (01.04.2022. - 30.06.2022.)

Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūts

Tiek veikti kolbu eksperimenti ar LegH producējošu *P. pastoris* rauga celmu. Galvenais mērķis minētajiem eksperimentiem ir noteikt atsevišķus fermentācijas vides komponentus, kuri ietekmē hemoproteīnu sintēzes efektivitāti. Vadoties no tā, ka heme molekula tiek sintezēta rauga šūnās klasiskajos metaboliskajos ceļos, tika identificētas reakcijas un attiecīgi enzīmi, kuri iesaistās heme sintēzē. Balstoties uz iepriekš minēto, tika identificētas vielas, kuras šūnām ir nepieciešamas iegūt no apkartējas vides, un kuras ir vajadzīgas attiecīgo enzīmu radīšanai/funkcionēšanai. Rezultātā, tiek veikti fermentācijas eksperimenti, kuros variētas (1) peridoksīna, (2) folijskābes, (3) glikozes, (4) ciankobolamīna un (5) vitamīna C koncentrācijas. Dati tiks turpmāk analizēti un apkopoti.

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Tika izstrādāta ātra un efektīva sojas leghemoglobīna (LegHb) attīrīšanas metode no *Pichia pastoris* šūnām, kas rezultējās par ~50% attīrītā produktā. Tika konstatēts, ka pašreizējos apstākļos iegūst ~1 mg LegHb proteīna no 1 g mitru šūnu. Šāds iznākums vērtējams kā vidēji augsts.

Turpinājās mēģinājumi iegūt LegHb produkciju raugā *Kluyveromyces lactis*. Sākotnēji tika uzskatīts, ka šajā raugā sintēze nav detektējama, tomēr, veicot attīrīšanu pēc izstrādātās shēmas, tika konstatēts neliels LegHb daudzums. Tika veiktas arī vairākas *K. lactis* fermentācijas dažādos apstākļos, un arī šeit tika konstatēta LegHb klātbūtne. Iegūtais daudzums gan ir krietni zemāks nekā *P. pastoris*.

Kā alternatīva *K. lactis* tika dizainēti gēni un konstruēti attiecīgie vektori LegHb intracelulārai ekspresijai *Saccharomyces cerevisiae* un *Hansenula polymorpha* raugu sistēmās. Abos gadījumos tika iegūti transformanti - *S. cerevisiae* gadījumā episomālai ekspresijai, bet *H. polymorpha* gadījumā ar integrāciju rauga hromosomā. Virkne transformantu tika salīdzinoši kultivēti standarta ekspresijas apstākļos, lai atlasītu perspektīvākos producentu klonus. Pagaidām abos gadījumos LegHb sintēze nav droši pierādīta. Turpinās ekspresijas apstākļu optimizācija.

A/S Biotehniskais centrs

Norit darbs pie pilot-mēroga bioreaktora konstrukcijas projektēšanas. Tiek meklēti potenciālie funkcionālo elementu un detaļu ražotāji/piegādātāji. Bioreaktora, kā arī proteīnu attīrīšanas sistēmas mezglu konstrukcijas tiek izstrādātas, iesaistot dalībniekus no pārējām projekta darba grupām. Paralēli ar pilot-mēroga bioreaktora projektēšanu norisinās darbs, kas veltīts vadības algoritmu (programmatūras) izstrādei. Programmatūras sākotnējā versija tiks aprobēta nākotnēs laboratorijas mēroga bioreaktora fermentācijas eksperimentos.

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA

Eiropas Reģionālās
attīstības fonds

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Vadošais partneris: APP Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūts

Sadarbības partneri: APP Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs un A/S Biotehniskais centrs

Projekta īstenošanas ilgums: 01.01.2022. - 30.11.2023. jeb 23 mēneši

Projekta kopējās attiecināmās izmaksas: 540 540 EUR, t.sk. ERAF līdzfinansējums 81.96 % apmērā – 443 026.58 EUR.