



**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)”**

1. ceturkšņa progress (01.01.2022. - 31.03.2022.)

Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūts

Tiek apkopota informācija no zinātniskās literatūras avotiem par iespējamiem veidiem kā intensificēt sērohēma un protohēma biosintēzi *P. pastoris* šūnās. Balstoties uz apkopoto informāciju tiks izstrādāta eksperimentu matrica, kas ļaus identificēt ārējo faktoru (ķīmisko un fizikālo) ietekmi uz hēma sintēzi *P. pastoris* kultūrā. Tika apkopoti pieejamie dati par *P. pastoris* metaboliskiem ceļiem un apkopoti metaboliskā modelī, caur kuru tika identificēti fermenti, kuri tiešā veidā piedalās hēma sintēzē. Turpmāk uz izveidotā metaboliskā modeļa bāzes tiks izstrādāti potenciālie hēma biosintēzes stimulācijas mehānismi.

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Tika dizainēti gēni un konstruēti attiecīgie vektori sojas leghemoglobīna (LegHb) intracelulārai un sekretorai ekspresijai *P. pastoris* un *K. lactis* raugu sistēmās. Visos gadījumos tika iegūti transformanti ar multikopiju gēnu integrāciju rauga hromosomā. Virkne transformantu tika salīdzinoši ekspresēti standartapstākļos, lai atlasītu perspektīvākos producentu klonus. *K. lactis* gadījumā LegHb sintēze netika droši pierādīta ne intracelulāri, ne sekretori. *P. pastoris* šūnās intracelulāri tika konstatēta visai augsta mērķa proteīna sintēze. Tomēr mēģinājumi uzlabot ekspresiju, izmantojot pazeminātu temperatūru, dzelzs jonu klātbūtni un palielinātu kultivēšanas ilgumu nedeva gaidīto rezultātu. Tika veikta LegHb gēna salīdzinoša ekspresija *P. pastoris* kolbās ar aerāciju un 5 L galda fermentierī. Lai gan arī fermentierī sintēze bija skaidri detektējama, tomēr ievērojami augstāka tā bija kolbās. *P. pastoris* tika pierādīta arī sekretorā LegHb proteīna sintēze, tomēr barotnei nebija raksturīgā sarkanbrūnā krāsa. Tādējādi, visticamāk, tas nesatur hēma grupu un līdz ar to nav izmantojams uzstādītajiem mērķiem. Pagaidām vienīgā perspektīvā ir LegHb gēna intracelulāra ekspresija *P. pastoris*. Nav izslēgta citu alternatīvu saimnieku, piemēram, *S. cerevisiae* izpēte tuvākajā nākotnē.

A/S Biotehniskais centrs

Tika izstrādātā pilot-mēroga bioreaktora konstrukcijas specifikācija, ka arī tehnoloģiska shēma (*P&ID*). Tiek meklēti galveno sistēmas sastāvdaļu piegādātāji/ražotāji. Pateicoties informācijas apmaiņai ar citiem projektā iesaistītiem partneriem, tika izstrādāta bāzes koncepcija vadības algoritmiem, kuri nākotnē tiks integrēti gan laboratorijas, gan pilot-mēroga bioreaktoru sistēmās.

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.