

Д. Б. ШАХНІН

кандидат хімічних наук,
начальник лабораторії фармацевтичних розробок
ПрАТ «Завод по виробництву інсулінів «Індар»
ORCID: 0000-0001-9657-8621

І. М. ВОЛОШИНА

кандидат технічних наук, доцент,
доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра
Київський національний університет технологій та дизайну
ORCID: 0000-0003-1943-8048

Л. А. МАЙСТРЕНКО

кандидат технічних наук, доцент,
доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра
Київський національний університет технологій та дизайну
ORCID: 0000-0002-1643-305X

І. О. ГРЕЦЬКИЙ

кандидат технічних наук, доцент,
доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра
Київський національний університет технологій та дизайну
ORCID: 0000-0003-1943-8048

БІОІНЖИНІРІНГ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ

Робота присвячена обґрунтуванню особливостей технологічних схем, процесів та факторів впливу у виробництві рекомбінантних білків. Зазначено, що сучасні технології рекомбінантних ДНК передбачають отримання моноклональних антитіл та деяких основ лікарських речовин відповідно до біореакцій із використанням клітин ссавців, дріжджів або бактерій. Відповідно до рекомбінантної технології потрібний ген виділяють з одного організму і вставляють у невеликий фрагмент ДНК-носія, який є вектором. Зазначено, що ефективною умовою для розмноження рекомбінованої ДНК є наявність подібної або неспорідненої клітини господаря/реципієнта. Враховуючи, що в результаті біопроцесу, рекомбінантний білок, який експресується, знаходиться в біомасі в низькій концентрації і є дуже розведеним. Розділення систем біомаси є важливою складовою в біотехнології рекомбінантних білків. Розділення можна досягти за допомогою фільтрації, седиментації, сепарації, центрифугуванням. В роботі представлено узагальнену схему біопроектингу. Обґрунтовано технологічну специфіку процесів та обладнання у виробництві рекомбінантних білків та визначено фактори забезпечення ефективного біопроектингу. Доведено, що важливими етапами концентрування білка є фільтрація, сепарація, центрифугування з подальшою ультрафільтрацією або діафільтрацією для отримання концентрованого розчину білка у буферному розчині. Очищення концентрованого білка здійснюється методом іонообмінної або афінної хроматографії. Остаточна стерильна фільтрація з використанням мікрофільтра забезпечує отримання кінцевого продукту рекомбінантного білка. В статті встановлено та обґрунтовано роль факторів продуктивності етапів розділення та концентрування білка, що включає вихід за білком, ступінь відділення твердої фази, продуктивність центрифуги та життєздатність клітин.

Ключові слова: рекомбінантний білок, біомаса, біотехнологія, біоінжиніринг, технологічна схема, розділення, концентрування, очищення, показники виходу продукту.

D. B. SHAKHNIN

Candidate of Chemical Sciences,
Head of Pharmaceutical Development Laboratory
PrJSC "Insulin Production Plant "Indar"
ORCID: 0000-0001-9657-8621

I. M. VOLOSHYNA

Candidate of Technical Sciences, Associate Professor,
Associate Professor at the Department of Biotechnology, Leather and Fur
Kyiv National University of Technologies and Design
ORCID: 0000-0003-1943-8048

L. A. MAISTRENKO

Candidate of Technical Sciences, Associate Professor,
Associate Professor at the Department of Biotechnology, Leather and Fur
Kyiv National University of Technologies and Design
ORCID: 0000-0002-1643-305X

I. O. HRETSKYI

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,
Associate Professor at the Department of Biotechnology, Leather and Fur
Kyiv National University of Technologies and Design
ORCID: 0000-0003-1943-8048

BIOENGINEERING OF RECOMBINANT PROTEINS

The work is devoted to substantiating the peculiarities of technological schemes, processes, and influencing factors in the production of recombinant proteins. It is noted that modern recombinant DNA technologies involve the production of monoclonal antibodies and certain basic medicinal substances through bioreactions using mammalian cells, yeast, or bacteria. According to recombinant technology, the required gene is isolated from one organism and inserted into a small fragment of DNA, which serves as a carrier, known as a vector. It is noted that an effective condition for the reproduction of recombinant DNA is the presence of a similar or unrelated host/recipient cell. Considering that, as a result of the bioprocess, the recombinant protein expressed is found in the biomass at low concentrations and is highly diluted, the separation of biomass systems is a crucial component in recombinant protein biotechnology. Separation can be achieved through filtration, sedimentation, separation, centrifugation, and other methods. The paper presents a generalised scheme for processing recombinant proteins. The technological specificity of the processes and equipment in the production of recombinant protein is substantiated—separation, centrifugation, etc. The paper presents a generalised scheme for processing recombinant proteins. The technological specifics of the processes and equipment used in the production of recombinant proteins are substantiated, and the factors that ensure effective bioprocessing in this process are identified. It has been proven that the critical stages of protein concentration are filtration, separation, centrifugation, followed by ultrafiltration and diafiltration to obtain a concentrated protein solution in a buffer solution. Purification of the concentrated protein is performed using ion-exchange or affinity chromatography. Final sterile filtration using microfiltration ensures the final product is a recombinant protein. The article establishes and substantiates the role of productivity factors in the stages of separation and concentration of primary protein, including protein yield, degree of solid phase separation, and centrifuge productivity.

Key words: recombinant protein, biomass, biotechnology, bioengineering, technological scheme, separation, concentration, purification, product yield indicators.

Постановка проблеми

Одним з найпоширеніших методів у біотехнології є технології рекомбінантної ДНК [1, 2]. Відповідно до зазначених технологій потрібний ген виділяють з одного організму і вставляють у невеликий фрагмент ДНК-носія, який є вектором. При цьому важливо, щоб рекомбінована ДНК (вектор+ген) могла розмножуватися в подібній або неспорідненій клітині господаря/реципієнта.

Технології рекомбінантних ДНК стали дуже популярними для створення білків, що мають певні конформації та функції [1, 3] і які в біофармацевтиці – терапевтичні білки. Існують дві ключові перешкоди для отримання терапевтичного білка [4] – це відновлення невеликої концентрації білка з біомаси після ферментації шляхом розділення та забезпечення високої чистоти білкового продукту за допомогою очищення. В зв'язку з цим основні завдання технологій рекомбінантної ДНК обумовлені тим, що білок, який експресується в результаті біопроцесу, знаходиться в дуже розведеному стані, тобто в низькій концентрації. Для виділення необхідного продукту важливою складовою біотехнологічного виробництва є біоінжиніринг, що полягає у ціленаправленому та оптимізованому виконанні ряду технологічних процесів, серед яких важливе місце займають фільтрування, центрифугування, відмінка тощо, що і обумовило актуальність даного дослідження.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

Сучасні технології рекомбінантних ДНК передбачають отримання моноклональних антитіл та деяких основ лікарських речовин відповідно до біореакцій із використанням клітин ссавців, дріжджів або бактерій.

Клітини ссавців, такі як клітини яєчника китайського хом'яка (СНО), є популярними клітинами-хазяїнами [4, 5]. Характерний розмір клітини ссавців становить близько 10-20 мікрон. На відміну від рослинної клітини, клітини тварин і ссавців не мають клітинної стінки, тому вони покладаються на плазматичну мембрану, щоб зберегти внутрішньоклітинний вміст недоторканим. Висока напруга зсуву, що діє на клітину, може розірвати крихку мембрану, вивільнивши внутрішньоклітинний матеріал. Дріжджі також широко використовуються як клітини-господарі в технологіях рекомбінантних ДНК, знання та досвід щодо яких ми отримали у пивоварній промисловості [6, 7]. На відміну від клітини ссавців, клітина дріжджів має міцну клітинну стінку. Дріжджові клітини менші за клітини ссавців і зазвичай мають розмір від 7 до 10 мікрон. Бактерії, такі як *Escherichia coli* (далі – *E. coli*) і *Bacillus subtilis* використовуються як клітини-господарі для техніки рекомбінантної ДНК [8, 9]. *E. coli* має міцну клітинну стінку з зовнішньою і внутрішньою мембраною. Зазвичай кишкова паличка має видовжену форму з розмірами 3-5 мкм в довжину і 1 мкм в ширину. Терапевтичний білок може «експресуватися» цими клітинами-хазяїнами або організмами за допомогою рекомбінантної ДНК. Білок, що цікавить, може залишатися в клітині (внутрішньоклітинний) або секретуватися назовні клітини (позаклітинний). Вищезгаданий біосинтез забезпечує більшу інженерну гнучкість, специфічність, універсальність, надійність і економічну ефективність.

Розділення систем біомаси є важливою складовою [10] в біотехнології рекомбінантних білків. Зазначене на практиці є складним завданням через низьку концентрацію присутнього білка і великий об'єм рідини, крихкість клітин, наявність клітинних залишків, дрібних частинок і колоїдів, а також високу в'язкість через розчинення внутрішньоклітинних речовин, таких як РНК. Як правило, розділення можна досягти за допомогою фільтрації та седиментації. Існують певні специфічні проблеми, пов'язані з кожним з цих методів, що будуть охарактеризовані в цьому дослідженні. В зв'язку з цим, в статті буде окреслено ключові моменти щодо забезпечення ефективних технологій рекомбінантного білку.

Формулювання мети дослідження

Метою роботи є: дослідження особливостей технологічних схем, процесів та факторів впливу у виробництві рекомбінантних білків.

Об'єктом дослідження є технологічні схеми та специфіка технологічного обладнання у виробництві рекомбінантних білків.

Предмет дослідження – особливості забезпечення ефективного біопроектингу у виробництві рекомбінантних білків.

Для дослідження використано загальнонаукові та спеціальні методи аналізу, системного підходу, наукового узагальнення та порівняння даних наукових джерел (публікації вітчизняних та закордонних науковців).

Викладення основного матеріалу дослідження

Різні рекомбінантні білки зазвичай експресуються генно-інженерною культурою, такою як дріжджі, бактерії (наприклад, *E. coli*) і живі клітини (наприклад, клітини ссавців і рослин). При цьому позаклітинний (зовнішньоклітинний) білок, що експресується дріжджами та клітинами ссавців, знаходиться в рідкій фазі, тоді як білок, що експресується генно-інженерними штамми бактерій, знаходиться всередині бактеріальних клітин, які згодом потребують лізису для вивільнення білка. Процесінг клітинної культури здійснюється в певному діапазоні температури, тиску та інтенсивності перемішування, при цьому ферментація (культивування бактерій) зазвичай відбувається протягом коротшого часу та в більш інтенсивних умовах (вища температура процесу, тиск, і інтенсивніше перемішування), тоді як біореакція (культивування клітин дріжджів, рослин або ссавців) відбувається протягом тривалішого часу та за м'якших умов (нижча температура процесу, тиск, і лише помірне перемішування).

На рис 1. представлено узагальнену схему процесінгу рекомбінантного білка, в якому білок експресується позаклітинно, а цільовим продуктом є рідина.



Рис. 1. Загальна технологічна схема рекомбінантного білка

Безпосередній перший етап – етап розділення – також називають первинним виділенням білка. Після сепарації твердої та рідкої фази за допомогою будь-якого з вищезазначених можливих методів, буферний розчин з білком можна замінити або розбавити більш відповідним буфером з іншим рН та іонною силою з подальшим концентруванням за допомогою комбінації ультрафільтрації та діалізації. Кінцевим продуктом є концентрований

розчин білка у відповідному буферному розчині. На цій стадії, білок можна очистити за допомогою іонообмінної або афінної хроматографії для видалення будь-яких домішок і забруднень. Остаточна стерильна фільтрація передбачає використання мікрофільтра з розміром 0,2 мікрона для видалення бактерій, які могли з'явитися під час обробки. Кінцевий продукт зазвичай є лікарською субстанцією.

Окрім первинного виділення в подальшому процесінгу рекомбінантного білка, відцентрова сепарація також використовується в багатьох біотехнологічних процесах розділення твердої та рідкої фаз у виробництві ліків, зокрема гормонів (таких як інсулін) та багатьох інших. У процесі виробництва, препарати (у твердому вигляді) часто містять солі та інші домішки. У таких випадках, субстанції необхідно промивати шляхом ресуспендування з подальшим відцентровим відділенням. Крім того, кристалізація та осадження на стадії очищення вимагають розділення твердої та рідкої фаз центрифугуванням. Завданнями цих процесів є повне зв'язування або виділення цінних суспендованих твердих речовин, на відміну від виділення розчинного білка, що експресується в культуральне середовище дріжджами та клітинами ссавців, де цільовим продуктом є рідка фаза. Інша не менш важлива задача полягає в тому, щоб зменшити рівень вмісту домішок в кристалах до прийняттого рівня для наступного виготовлення фармацевтичної композиції, наприклад промиванням з подальшим відцентровим відділенням.

Після центрифугування центрат (супернатант або верхній потік), що містить невелику кількість зважених твердих речовин, залишає центрифугу разом із вологим концентратом (вологим кеком або нижнім потоком), як це зображено на рис. 2. Можуть вводитись також інші речовини, зокрема хімічні речовини (коагулянти та флокулянти), додані для флокуляції вхідної суспензії (не показано на рис. 2). Як відомо, цільовий білковий продукт може бути у дрібнодисперсних суспендованих твердих компонентах (таких як тільця включення, кристали або осадки, що містять білок), або в рідкій фазі центрату, як у випадку позаклітинної експресії білка (в клітинах дріжджів і ссавців).

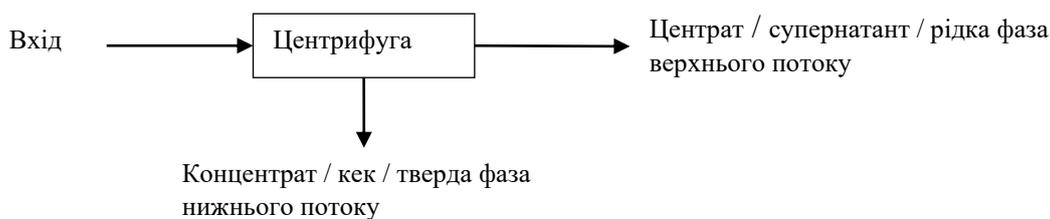


Рис. 2. Типові вхідні та вихідні потоки центрифугування

Центрифугу потрібно налаштувати таким чином, щоб відокремити продукт від решти (відходів або потоку для повторного використання). Залежно від конкретного процесу, для оцінки відцентрового розділення зазвичай використовуються деякі якісні або кількісні показники. Існує кілька загальних показників продуктивності центрифуги – вихід за білком, вміст суспендованих твердих речовин у центраті або ступінь відділення твердої фази, продуктивність або потужність центрифуги, а також життєздатність клітин.

Вихід за білком. Для розчинного білка, експресованого позаклітинно, одним з важливих показників ефективності розділення центрифуги є вихід за білком, який визначається як відношення кількості (наприклад, кг/хв або г/хв) білку, виділеного в рідкому продукті, до кількості (кг/хв або г/хв) білку у вхідному потоці в центрифугу. Повне виділення білка без втрат дасть 100%. Зазвичай має бути дуже високим, перш ніж процес виділення можна вважати придатним. Вихід 90% або вище не є нетиповим. Конкретна величина виходу залежить від того, наскільки складним є сепарування.

Для розрахунку виходу для центрифуги з безперервною подачею, необхідно виміряти об'ємну швидкість (л/м) і концентрацію протеїну як у вхідному потоці, так і у центраті, відповідно. Для розрахунку виходу для центрифуги з періодичною подачею, об'єм і концентрацію білка слід виміряти як на вході, так і у супернатанті (тобто у центраті), відповідно. Очевидно, що втрати рідини в концентраті або кеці впливає на вихід, оскільки білок розчинений в рідині, тому кількість рідини в концентраті має бути мінімізована.

Вміст суспендованої твердої фази в центраті. Слід звести до мінімуму концентрацію суспендованих твердих речовин у центраті, якщо тільки не проводиться класифікація, коли дрібніші тверді частки в центраті відокремлюються від більших твердих частинок у концентраті, як робиться для відділення клітинного дебрису від тілець включення. Мірою прозорості рідкого центрату є кількість суспендованих твердих речовин за вагою або за об'ємом після того, як цей центрат обертався в трубчастій центрифугі протягом заданого часу. Для клітинної культури, лише дрібні тверді частки в субмікронному діапазоні вивільняються з центратом або супернатантом, щоб бути остаточно затриманими наступним фільтром. Непрямим методом оцінки вмісту суспендованої твердої фази у центраті є вимірювання оптичної непрозорості (або каламутності) центрату. Вимірювання каламутності слід часто калібрувати за стандартом. Наслідком хорошого освітлення є те, що відношення кількості твердої фази,

отриманої шляхом седиментації (кг/год; суха основа), до вхідної кількості твердої фази (кг/год; суха основа), має бути дуже високим. Цей коефіцієнт називається виділенням твердої фази R_s . Якщо R_s дорівнює 100%, це означає ідеальне розділення та відсутність твердої фази у центраті / супернатанті від отримання продукту. Для клітинної культури, ми можемо досягти, скажімо, 99,9% виділення клітин шляхом центрифугування, залишаючи мінімальну кількість клітин, що потрапили у центрат / супернатант.

Продуктивність центрифуги. Об'ємна швидкість або продуктивність центрифуги в л/хв є важливою мірою об'ємної пропускної здатності по рідині, яку може досягти центрифуга. Після встановлення загальної потужності (розміру та кількості) ферментерів / біореакторів, визначається необхідна швидкість відцентрової сепарації, що, у свою чергу, визначає загальну потужність (розмір та кількість) центрифуг. Високошвидкісні центрифуги більшого об'єму знадобляться у меншій кількості порівняно з низькошвидкісними центрифугами меншого об'єму. З іншого боку, необхідно запланувати резервну потужність відцентрової сепарації на заміну робочих центрифуг, якщо одна з них потребуватиме технічного обслуговування. Таким чином, для планування роботи конче необхідна інформація про продуктивність центрифуг.

Життєздатність клітин. Клітини ссавців набувають популярності в експресії білка, оскільки існує більша гнучкість у цьому шляху. Однак, на відміну від клітин рослин або дріжджів, клітини ссавців дуже чутливі до тангенціальної напруги, оскільки вони не мають клітинної стінки. Вони дуже чутливі до тангенціальної напруги, наприклад під час прискорення вхідного потоку. Клітини можуть бути знищені під час цього, вивільняючи внутрішньоклітинну білкову речовину, яка може бути шкідливою для подальшого очищення (перехресне забруднення цільового білка), і більш дрібне сміття, що ускладнює проблему розділення і призводить до збільшення вмісту суспендованих твердих частинок, які завантажують глибинний фільтр. Як мінімум, під час розділення за допомогою виробничих центрифуг, життєздатність клітин клітинних ліній ссавців повинна підтримуватися на найвищому досяжному рівні.

Незважаючи на широкий вибір модельних об'єктів для рекомбінантних технологій бактерія *Escherichia coli* займає провідну позицію як модельний організм. Завдяки своїм унікальним властивостям: легкість генетичних маніпуляцій, здатність до високої продуктивності та широкого спектра застосування – цей мікроорганізм залишається найпопулярнішим для виробництва рекомбінантних білків. Дослідження в галузі метаболічної інженерії та синтетичної біології дозволили покращити характеристики *E. coli* для ефективного виробництва біомаси та білків, а також для розробки нових терапевтичних і промислових застосувань. Незважаючи на деякі обмеження, пов'язані з білковою експресією та глікозилюванням, інженерні підходи та оптимізація умов культивування допомагають подолати ці виклики.

Висновки

В роботі досліджено характерну специфіку та особливості технологічних схем, процесів та факторів впливу у виробництві рекомбінантних білків. Показано, що рекомбінантні біотехнології ґрунтуються на використанні гену, який виділяють з одного організму і інтегрують у невеликий фрагмент ДНК-носія, тобто вектор. Виявлено особливість біопроектів, відповідно до якого рекомбінантний білок, який експресується, знаходиться в низькій концентрації і є дуже розведеним. В зв'язку з цим розділення систем біомаси як важлива складова виробництва рекомбінантних білків досягається методами фільтрації, седиментації, сепарації, центрифугуванням, мікрофільтрації. Відповідно до узагальненої схеми виробництва рекомбінантних білків обґрунтовано специфіку процесів, обладнання та визначено фактори забезпечення ефективного біопроектингу. Встановлено та обґрунтовано роль факторів продуктивності етапів розділення та концентрування первинного білка, що включає вихід за білком, ступінь відділення твердої фази, продуктивність центрифуги та життєздатність клітин.

Подальші наукові дослідження будуть направлені на вивчення і вдосконалення ефективності використання бактерії *E. coli* в біотехнології рекомбінантного інсуліну людини. Зазначене створить перспективи для виробництва різноманітних продуктів і розробки нових методів, які можуть вплинути на розвиток біофармацевтики.

Список використаної літератури

1. Berlec A., Štrukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 40, Iss. 3-4. P. 257–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>.
2. Huang C.-J., Lin H., Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 39, Iss. 3. P. 383–399. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>.
3. Keikha M., Eslami M., Yousefi B., Ghasemian A., Karbalaei M. Potential antigen candidates for subunit vaccine development against *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Cellular Physiology*. First published: 12 June 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.28870>
4. Lee S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* (Review). *Trends in Biotechnology*. 1996. Vol. 14, Iss. 3. P. 98–105. [10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9)

5. Zhang J., Greasham R. Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999. Vol. 51. P. 407–421. <https://doi.org/10.1007/s002530051411>
6. Kim J., Kim K.H. Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 2017. Vol. 57. P. 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017>.
7. Campani G., Santos M.P.d., Silva G.G.d., Horta A.C.L., Badino A.C., Giordano R.d.C., Gonçalves V.M., Zangirolami T.C. Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2015. Vol. 98. P. 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.10.020>.
8. Figueiredo D.B., Carvalho E., Santos M.P., Kraschowetz S., Zanardo R.T., Campani G., Silva G.G., Sargo C.R., Horta A.C.L., Giordano R.d.C., Miyaji E.N., Zangirolami T.C., Cabrera-Crespo J., Gonçalves V.M. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 42. P. 1399–1408. [10.1007/s00253-016-7983-9](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7983-9)
9. Shiloach, J., & Fass, R. Growing *E. coli* to high cell density – a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 2005. 23(5), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>
10. Lardeux H., Duivelshof B.L., Colas O., Beck A., McCalley D.V., Guillarme D., D'Atri V. Alternative mobile phase additives for the characterization of protein biopharmaceuticals in liquid chromatography – Mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 2021. 1156, 338347. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338347>

References

1. Berlec, A., Štrukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. 40, Iss. 3-4. P. 257–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>.
2. Huang, C.-J., Lin H., Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. 39, Iss. 3. P. 383–399. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>.
3. Keikha, M., Eslami M., Yousefi, B., Ghasemian, A., Karbalaei, M. (2019). Potential antigen candidates for subunit vaccine development against *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Cellular Physiology*. First published: 12 June 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.28870>
4. Lee S.Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli* (Review). *Trends in Biotechnology*. Vol. 14, Iss. 3. P. 98–105. [10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9)
5. Zhang, J., Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 51. P. 407–421. <https://doi.org/10.1007/s002530051411>
6. Kim, J., Kim, K.H. (2017). Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. Vol. 57. P. 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017>.
7. Campani, G., Santos, M.P.d., Silva, G.G.d., Horta, A.C.L., Badino, A.C., Giordano, R.d.C., Gonçalves, V.M., Zangirolami, T.C. (2015). Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. Vol. 98. P. 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.10.020>.
8. Figueiredo, D.B., Carvalho, E., Santos, M.P., Kraschowetz, S., Zanardo, R.T., Campani, G., Silva, G.G., Sargo, C.R., Horta, A.C.L., Giordano, R.d.C., Miyaji, E.N., Zangirolami, T.C., Cabrera-Crespo, J., Gonçalves, V.M. (2015). Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. 42. P. 1399–1408. [10.1007/s00253-016-7983-9](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7983-9)
9. Shiloach, J., & Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23(5), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>
10. Lardeux, H., Duivelshof, B.L., Colas, O., Beck, A., McCalley, D.V., Guillarme, D., D'Atri, V. (2021). Alternative mobile phase additives for the characterization of protein biopharmaceuticals in liquid chromatography – Mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 1156, 338347. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338347>.

Дата першого надходження рукопису до видання: 28.11.2025

Дата прийнятого до друку рукопису після рецензування: 14.12.2025

Дата публікації: 31.12.2025