

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій  
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему:**

«Оптимізація поживного середовища для культивування рекомбінантного штаму  
*E.coli* BL21»

Рівень вищої освіти другий (магістерський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

Виконав: студент групи МгБТ-23

Бобир І.М

Науковий керівник: к.б.н., доц. Юнгін О.С.

Рецензент: к.т.н., доц. Волошина І.М.

Київ 2024

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>другий (магістерський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри БШХ

\_\_\_\_\_ Олена МОКРОУСОВА  
« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ЗАВДАННЯ  
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ  
Бобирю Ігореві Миколайовичу**

1. Тема кваліфікаційної роботи: Оптимізації поживного середовища для культивування рекомбінантного штаму *E.coli* BL21.

Науковий керівник Юнгін Ольга Сергіївна, к.б.н., доц. затверджені наказом КНУТД від «03» вересня 2024 року №188-уч.

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література що до оптимізації поживного середовища для *E.coli* BL21; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки

4. Дата видачі завдання 03.09. 2024 р.

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	10.09.2024	
2	Розділ 1 Огляд літератури	11.09.2024	
3	Розділ 2 Матеріали та методи	30.09.2024	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	17.10.2024	
5	Висновки	21.10.2024	
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	4.11.2024	
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку (за 14 днів до захисту)	19.11.2024	
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів до захисту)	21.11.2024	
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)	23.11.2024	
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувача кафедри (за 7 днів до захисту)	26.11.2024	

З завданням ознайомлений:

Студент \_\_\_\_\_ Ігор БОБИР

Науковий керівник роботи \_\_\_\_\_ Ольга ЮНГІН

## АНОТАЦІЯ

**Бобир І. М. Оптимізації поживного середовища для культивування рекомбінантного штаму *E.coli* BL21 – Рукопис.**

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2024 рік.

Кваліфікаційна робота присвячена оптимізації поживного середовища для культивування рекомбінантного штаму *Escherichia coli*. У роботі представлено літературний огляд джерел, який присвячений значенню та потенціалу застосування рекомбінантних білків.

У рамках дослідження було визначено оптимальні умови для культивування рекомбінантного штаму *E. coli*. Проаналізовано вплив різних поживних середовищ на продуктивність, суху масу клітин та титр клітин, а також здійснено статистичний аналіз для вибору найбільш ефективних параметрів культивування.

Отримані результати можуть бути використані для оптимізації методів культивування рекомбінантних штамів *E. coli*. Визначення оптимальних умов допоможе підвищити, знизити витрати на культивування та вдосконалити промислові процеси в біотехнологічній та фармацевтичній галузях.

*Ключові слова: оптимізація, поживне середовище, продуктивність, E.coli BL21*

## ABSTRACT

### **Bobyry I. M. Optimisation of the Nutrient Medium for Cultivation of the Recombinant Strain of *E. coli* BL21 - Manuscript**

Qualification work in the speciality 162 Biotechnology and Bioengineering. - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2024.

This qualification work is devoted to optimising the nutrient medium for cultivating a recombinant strain of *Escherichia coli*. The paper presents a literature review of sources on the importance and potential applications of recombinant proteins.

As part of the study, optimal conditions for the cultivation of the recombinant *E. coli* strain were determined. The effect of different nutrient media on productivity, dry cell weight, and cell titer was analysed, and statistical analysis was performed to identify the most efficient cultivation parameters.

The results obtained can be used to optimise the methods of cultivating recombinant *E. coli* strains. Determining the optimal conditions will help reduce cultivation costs and improve industrial processes in the biotechnology and pharmaceutical industries.

*Keywords: optimization, culture medium, productivity, E.coli BL21*

## ЗМІСТ

<b>СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....</b>	<b>8</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>9</b>
1.1 Системи експресії рекомбінантних білків .....	13
1.1.1 Кишкова паличка.....	13
1.1.2 Бацилярні системи.....	15
1.1.3 Дріжджі.....	16
1.1.4 Нитчасті гриби.....	18
1.1.5 Лінії клітин ссавців .....	19
1.1.6 Лінії клітин комах .....	19
1.2 <i>Escherichia coli</i> як модельний організм у біотехнології.....	20
1.3 Поживні середовища для культивування <i>Escherichia coli</i> .....	22
<b>Висновок до розділу 1 .....</b>	<b>24</b>
<b>РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>26</b>
2.1 Поживні середовища, що використовували протягом досліджень .....	26
2.2 Вирощування штаму <i>Escherichia coli</i> BL21 .....	27
2.3 Досліджувані параметри росту культури .....	27
2.3.1 Оцінка приросту біомаси .....	28
2.3.2 Оцінка чисельності мікробної популяції за кількістю КУО .....	28
2.3.2 Визначення біомаси ваговим методом.....	28
2.4 Визначення значень рН культуральної рідини .....	29
2.5 Статистична обробка результатів.....	29
<b>Висновок до розділу 2 .....</b>	<b>29</b>
<b>РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....</b>	<b>30</b>
3.1 Визначення приросту біомаси .....	30
3.2 Визначення титру клітин .....	34
3.3 Визначення сухої маси клітин мікроорганізмів .....	37
3.4 Економічний аспект вибору поживних середовищ.....	38

<b>Висновок до розділу 3 .....</b>	<b>40</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>41</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>42</b>
<b>ДОДАТКИ .....</b>	<b>54</b>

## СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- NB – Nutrient broth (поживний бульйон)
- LB – Lysogeny broth (лізогенний бульйон)
- LB mod – Lysogeny broth modified (лізогенний бульйон модифікований)
- SOB – Super Optimal Broth (супер оптимальний бульйон)
- TB – Terrific broth (чудовий бульйон)
- TB mod. – Terrific broth modified (чудовий бульйон модифікований)
- SB – Super broth (супер бульйон)
- SOC – Super Optimal Broth With Catabolite Repression (супер оптимальний бульйон з катаболічною репресією)
- 2xYT – 2x Yeast Extract Tryptone (подвійний дріжджовий екстракт з триптоном)
- GYT – Glycerol-Yeast Extract-Tryptone (гліцерин-дріжджовий екстракт-триптон)
- HTP – High-Throughput Processing (Високопродуктивна обробка)
- OD – Optical density (оптична густина)
- КУО – Колонієутворююча одиниця



## ВСТУП

Експресія рекомбінантних білків у біотехнології, зокрема для структурних і терапевтичних цілей, є однією з ключових технологій у сучасному виробництві біопрепаратів. Виробництво рекомбінантних білків потребує використання ефективних систем, які забезпечують високий вихід кінцевого продукту. Одним із найбільш досліджених і широко застосовуваних організмів для цього є *Escherichia coli*. Цей мікроорганізм, завдяки своєму швидкому темпу росту, низьким витратам на культивування і легкості генетичних маніпуляцій, став однією з основних платформ для експресії білків. *E. coli* не тільки має добре охарактеризований геном, але й забезпечує високий рівень біомаси за короткий час [1,2]. Однак, процес експресії в *E. coli* може призводити до утворення тілець включення, які ускладнюють очищення та потребують специфічних підходів до вилучення і розчинення білка для забезпечення його біологічної активності [3].

Терапевтичні рекомбінантні білки є незамінними для лікування багатьох захворювань, зокрема онкологічних, аутоімунних, інфекційних та генетичних. Завдяки технологіям генетичної інженерії *E. coli* активно використовується для синтезу білків, що виконують роль антигенів у субодиночних вакцинах. Наприклад, рекомбінантні антигени, такі як *Neisseria meningitidis* і субодиноці холерного токсину, синтезовані в *E. coli*, є ефективними для імунізації проти відповідних інфекцій [4]. Крім того, *E. coli* виступає платформою для синтезу рекомбінантних вакцин-кандидатів проти ряду інших патогенів, зокрема вірусу денге, лептоспірозу, лейшманіозу, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* та *Helicobacter pylori* [5, 6]. На сьогодні близько третини всіх терапевтичних рекомбінантних білків створюються за допомогою *E. coli*, що свідчить про значний потенціал цього мікроорганізму як платформи для експресії [2, 7].

Особлива увага приділяється культивуванню *E. coli* в біореакторах, з акцентом на досягненні високої щільності клітин і максимальної експресії білків. У таких дослідженнях використовуються різні стратегії культивування, включаючи синтетичні та природні середовища. Синтетичні середовища дозволяють більш точно контролювати склад компонентів, сприяючи стабільності та передбачуваності

процесу. У той час, природні середовища, такі які мають у своєму складі триптон і дріжджовий екстракт, забезпечують вищі темпи росту і виробництво білка завдяки наявності комплексних джерел поживних речовин [8, 9]. Крім того, вибір таких середовищ має значний економічний вплив. Синтетичні середовища забезпечують кращий контроль, в той час, як комплексні середовища є дешевшими та можуть знизити загальні виробничі витрати [10, 11].

Для промислових процесів велике значення має вплив температури, концентрації індукторів та поживних речовин, оскільки ці фактори безпосередньо впливають на кінцеві витрати. Наприклад, зміна індукторів або джерел азоту, як показали деякі дослідження, може знижувати загальну вартість виробництва без шкоди для продуктивності [12]. Також важливим фактором є тип процесу — періодичні процеси можна замінювати на безперервні, що знижує витрати та підвищує вихід продукції.

Серед перспективних напрямків досліджень виділяється виробництво білка PspA4Pro, який є кандидатом для вакцини проти *Streptococcus pneumoniae*. Цей білок має стабільну структуру і термостійкі властивості, що підвищує його перспективність як компонента серотип незалежної вакцини. Виробництво PspA4Pro у рекомбінантних системах *E. coli* демонструє, як комбіновані стратегії культивування і контролю витрат можуть підвищити ефективність процесу [13]. Комплексний підхід до оцінки витрат, який враховує середовища, джерела азоту, індуктори та інші параметри, дозволяє оптимізувати процес з точки зору економічності та виходу продукції.

Таким чином, ефективне виробництво рекомбінантних білків потребує постійного вдосконалення технологічних підходів. Враховуючи наявні обмеження та виклики, пов'язані з утворенням тілець включення, вибором поживного середовища та високими витратами на виробництво, необхідно розробляти нові підходи до культивування та оптимізації умов для синтезу рекомбінантних білків.

**Актуальність роботи.** Зростаючий попит на біотехнологічні продукти, такі як білки, ферменти, вакцини та ліки, стимулює пошук ефективних методів виробництва. Оптимізація поживного середовища є ключовим фактором підвищення продуктивності процесів біотехнологічної продукції. Зменшення витрат на виробництво біотехнологічних продуктів є важливим завданням для біофармацевтичних компаній. *E. coli* BL21 є одним з найбільш поширених штамів для експресії рекомбінантних білків завдяки своїй здатності до високої продуктивності і відсутності деяких протеаз. Оптимізація поживного середовища дозволяє знизити витрати на сировину, енергію та підвищити вихід цільового продукту. Оптимізація складу поживного середовища дозволяє впливати на якість кінцевого продукту, такі як його чистота, активність та стабільність.

**Наукова новизна полягає** комплексному порівнянні кількох широко використовуваних поживних середовищ (LB, LB mod, TB, TB mod, SOC) для культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21. Вперше було показано вплив вказаних середовищ на продуктивність та кінетику росту штаму в періодичній культурі.

**Мета дослідження** полягає в оптимізації поживного середовища для культивування рекомбінантного штаму *Escherichia coli* з метою підвищення його продуктивності та ефективності у біотехнологічних процесах.

Для досягнення цієї мети необхідно вирішити наступні завдання:

- визначити оптимальні поживні середовища для культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21;
- оцінити вплив різних поживних середовищ на продуктивність культури та обрати оптимальне на основі результатів досліджень;
- провести статистичний аналіз для вибору найбільш ефективних умов культивування;

**Об'єктом дослідження** є процес культивування рекомбінантного штаму *Escherichia coli* BL21

**Предметом дослідження** є оптимізація компонентів поживного середовища для підвищення продуктивності *E. coli* BL21.

**Методи дослідження**, що використані в роботі: спостереження, аналіз, узагальнення, біологічні методи, спектрофотометричні, мікробіологічні, статистичні методи.

**Практичне значення.** Результати проведених досліджень мають практичне значення для оптимізації умов культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21 на біотехнологічних виробництвах, що сприятиме покращенню технологічних процесів та підвищенню ефективності виробництва рекомбінантних білків.

**Апробацію** наукових результатів здійснено на II Міжнародній науково-практичній конференції «Екологічні проблеми сучасності» (Луцьк, 10 травня 2024 р.) з публікацією тез у збірнику конференції.

Публікації. Результати досліджень опубліковано у статті у фаховому виданні, що внесений до переліку видань категорії «Б».

Бібліографія опублікованої роботи: Bobyr I.M., Bondarenko V.L., Iungin O.S. Optimization of culture media for industrial cultivation of the recombinant strain *Escherichia coli* BL21. Український журнал природничих наук, No 9. 2024. С.17-24. <https://doi.org/10.32782/naturaljournal.9.2024.2> (ДОДАТОК А)

Бобир І., Юнгін О. Оптимізація поживного середовища для промислового культивування рекомбінантної *Escherichia coli*. Екологічні проблеми сучасності [Електронний ресурс] : зб. матер. II Міжнар. наук.-практ. конф. (Луцьк, 10 травня 2024 р.) / Держ. вищ. навч. заклад «Донецький національний технічний університет». – Луцьк : ДВНЗ «ДонНТУ», 2024. – С. 22. (ДОДАТОК Б)

**Структура і обсяг кваліфікаційної роботи.** Основна частина дипломної магістерської науково-дослідницької роботи викладена на 41 сторінці, і включає три основні розділи та висновки. В роботі представлено список використаних джерел, що налічує 101 найменувань публікацій вітчизняних та зарубіжних дослідників.

## РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Системи експресії рекомбінантних білків

Виробництво рекомбінантних білків є важливим етапом у сучасній біотехнології. Ці білки широко використовуються в імунології, діагностиці та біохімічних дослідженнях. Терапевтичні застосування, такі як виробництво інсуліну, гормону росту, інтерферону та моноклональних антитіл, є важливими сферами використання рекомбінантних білків. Виробництво рекомбінантних білків вимагає клонування гена, що цікавить, у вектор експресії під контролем індукбельного промотора. Однак ефективна експресія рекомбінантних генів залежить від ряду факторів, включаючи оптимальні сигнали експресії, правильне згортання білка і властивості клітинного росту [25]. Рекомбінантні білки зазвичай експресуються за допомогою бактеріальних систем, дріжджів, трансгенних рослин, клітин ссавців та комах.

#### 1.1.1 Кишкова паличка

Попри те, що вибір систем експресії поступово збільшується, бактеріальна система експресії з *E. coli* все ще залишається найпоширенішою системою експресії рекомбінантних білків завдяки простоті генетичних маніпуляцій, швидкому зростанню та високій продуктивності [26-29].

*E. coli* характеризується швидким ростом, простою експресією, легкістю культивування та високим рівнем продуктивності, що робить її популярною для масового виробництва комерційних білків [30]. Система чудово підходить для функціональної експресії неглікозильованих білків, оскільки генетика *E. coli* вивчена набагато краще, ніж інших мікроорганізмів. Останні досягнення у вивченні транскрипції, трансляції та згортання білків у *E. coli*, а також вдосконалені генетичні інструменти роблять цю бактерію ще більш цінною для експресії складних білків еукаріотів [31].

Геном *E. coli* легко та точно модифікується, контроль за промоторами не становить труднощів, а кількість копій плазмід можна легко змінювати. Крім того, ця система дозволяє регулювати метаболічний потік вуглецю, уникати вбудовування аналогів амінокислот, формувати внутрішньоклітинні дисульфідні зв'язки та

використовувати комп'ютерний контроль для підвищення продуктивності [32]. *E. coli* здатна накопичувати рекомбінантні білки до 80% від своєї сухої ваги та витримує різноманітні умови середовища.

Рекомбінантний людський інсулін був першим терапевтичним білком, отриманим за допомогою кишкової палички в 1978 році, і був схвалений для лікування діабету в 1982 році [33]. Незважаючи на свої переваги, *E. coli* має деякі обмеження, які необхідно долати для ефективної експресії білків. Висока щільність клітин призводить до накопичення ацетату, що викликає токсичність, хоча цього можна уникнути контролем рівня кисню та подачею глюкози в контрольованих кількостях [34]. Білки, що формуються у вигляді тілець включення, часто неактивні, нерозчинні й потребують рефолдингу для повернення активності. Додатково, *E. coli* не здатна виробляти білки з великим числом дисульфідних зв'язків, що створює труднощі при експресії білків ссавців. Ця бактерія також не забезпечує глікозилювання, тому деякі антитіла, отримані в *E. coli*, можуть не розпізнавати білки ссавців [35].

Періодичне та безперервне культивування, дозволяють виробляти велику кількість біомаси та білкових продуктів і підвищують ефективність виробництва. При ферментації з високою щільністю клітин *E. coli* досягає сухої ваги від 20 до 175 г/л [36, 37]. Проблему токсичності ацетату можна вирішити, подаючи глюкозу в геометричній прогресії та утримуючи швидкість росту нижче рівня, що викликає накопичення ацетату. Цей метод дозволяє отримати  $\alpha$ -консенсусний інтерферон у бульйоні до 5,5 г/л [31].

Гетерологічні білки, що утворюються у вигляді тілець включення в *E. coli*, часто є неактивними та нерозчинними, що вимагає проведення солубілізації та рефолдингу за допомогою відновлювальних агентів та денатурантів [38]. Ці процеси включають окислення повітрям, використання глутатіонової системи реоксидації, та системи дисульфідних зв'язків з протеїн-S-сульфонатом. Гетерологічні білки можуть бути отримані у розчинній та активній формі за високих рівнів експресії при використанні злиття з тіоредоксином *E. coli* [39]. Зниження температури до 30 °C є ефективним методом зменшення утворення тілець включення [40]. Вироблені білки

також можна експортувати в периплазму або середовище, що полегшує очищення і сприяє правильному формуванню дисульфідних зв'язків у периплазматичному просторі

### 1.1.2 Бациллярні системи

Іншими корисними бактеріальними системами є системи грампозитивних паличок. Вони переважно використовуються для гомологічної експресії ферментів, таких як протеази та амілази. Такі системи мають низку переваг, зокрема: сильну секрецію білків без утворення внутрішньоклітинних тілець включення, простоту генетичних маніпуляцій, добре охарактеризовані генетичні особливості, високорозвинені технології трансформації та заміни генів, чудові характеристики росту та метаболічну стабільність. Більшість з цих переваг притаманні промисловим штамам, які, недоступні для академічних цілей [41].

Крім того, геноми *Bacillus subtilis* і *B. licheniformis* були секвеновані, і вони не виробляють шкідливих екзотоксинів або ендотоксинів. Секреція бажаних білків у ферментаційне середовище забезпечує легку подальшу обробку, усуваючи потребу в руйнуванні клітин або хімічних методах обробки. Це робить відновлення відносно ефективним і економічно вигідним. Для експресії зазвичай використовують такі види, як *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* і *Bacillus brevis*. Вони не мають ліпополісахаридвмісних зовнішніх мембран, як грамнегативні бактерії. Промислові штами *B. subtilis* є високосекреторними, а штами-господарі, що використовуються для успішної експресії рекомбінантних білків, часто видаляють гени *amyE*, *aprE*, *prpE*, *sroPAS*, *srfC* і трансформують за допомогою природної компетенції. Вихід білків бацил досягає 3 г/л. Проте існує проблема з *B. subtilis* через те, що вона продукує багато протеаз, які здатні руйнувати рекомбінантні білки. Вони включають сім відомих протеаз [42], п'ять з яких є позаклітинними:

1. Субтилізин (ген *aprE*): основна лужна серинова протеаза.
2. Нейтральна протеаза (*prpE*): основна металопротеаза, містить Zn.
3. Мала серинова протеаза (*erg*); інгібується фенілметансульфонілфторидом (PMSF) та етилендіамінтетраоцтовою кислотою (EDTA).

4. Бацилопептидаза F (bpf): інша мала серинова протеаза/естераза; інгібується PMSF.
5. Мала металоестераза (mpe).
6. ISP-I (isp-I): основна внутрішньоклітинна серинова протеаза, потребує Ca.
7. ISP-II (isp-II): мала внутрішньоклітинна серинова протеаза.

На перші два ферменти припадає 96-98% позаклітинної протеазної активності. Для генної інженерії був розроблений штам *B. subtilis*, який не має семи позаклітинних протеаз [43]. Слід бути обережним щодо надмірної швидкості росту та аерації. Виробництво позаклітинного людського альфа-інтерферону *B. subtilis* пригнічується високою швидкістю росту і надлишком кисню [44]. Дефіцитний по екзопротеазі штам хазяїна *B. licheniformis* був спеціально пристосований для експресії гетерологічних генів. Він є аспорогенним і дає високі рівні позаклітинної експресії з мінімальними втратами продукту через протеолітичне розщеплення після секреції.

Для отримання більш генетично стабільної системи після трансформації та підвищення рівня продукції ген  $\alpha$ -амілази також було видалено. Було проведено порівняння організмів-хазяїв для виробництва інтерлейкіну-3 [45] серед *E. coli*, *B. licheniformis*, *S. cerevisiae*, *K. lactis* та клітин ссавців C127. Найкращою системою виявилася *B. licheniformis*. *Bacillus brevis* використовується для експресії гетерологічних генів завдяки низькій протеазній активності та здатності продукувати інгібітори протеїназ, що запобігає деградації рекомбінантних білків [46]. У ньому було успішно експресовано різні білки, включаючи фермент MomL із широким спектром антибактеріальної активності [47]. Також досліджено експресію факторів росту і ферментів із бактерій *Pseudomonas* та інших бактерій для контролю патогенності [48,49].

### 1.1.3 Дріжджі

Дріжджі є гарною системою для експресії рекомбінантних білків завдяки кільком ключовим факторам: швидкому росту, легкості генетичного маніпулювання, повністю секвенованому геному і можливості посттранскрипційних та посттрансляційних модифікацій [50-53]. Найбільш поширеними дріжджовими



системами для виробництва рекомбінантних білків є *Pichia pastoris* та *Saccharomyces cerevisiae*. Останній є комерційно важливим у виробництві терапевтичних препаратів, а його системи експресії, як було доведено, виробляють велику кількість білка, часто досягаючи значень грамів на літр. Генетичні дослідження *S. cerevisiae* виявили кілька генів, що регулюють шляхи транспортування та секреції, які можуть бути використані для збільшення виробництва білка [54]. Також є значні досягнення у створенні інструментарію для синтетичної біології з метою підвищення продуктивності рекомбінантних систем для біофармацевтичної продукції. Використання *S. cerevisiae* у цій галузі супроводжується численними інноваціями, серед яких зниження внутрішньоклітинного накопичення рекомбінантних білків завдяки інженерії транспорту з ендосом до апарату Гольджі [55].

Глікозилювання рекомбінантних білків у дріжджах часто призводить до гіперманнозилювання, що може спричинити прискорене виведення білка з крові, що є недоліком у терапевтичному застосуванні. Це питання частково вирішується завдяки вилученню гена манозилтрансферази, що контролює гіперманнозилювання [56].

Транспоновані дріжджі (*P. pastoris*) також показали значну перспективність для експресії рекомбінантних білків завдяки своїй здатності секретувати правильно згорнуті функціональні білки, пригнічувати надмірне глікозилювання та досягати високої щільності клітин [57; 58]. Незважаючи на те, що моделі N-зв'язаного глікозилювання в *P. pastoris* відрізняються від таких у ссавців, цей організм було генетично змінено для досягнення людського типу N-глікозилювання [59].

Інженерні підходи також стали важливим фактором у подоланні проблеми протеолізу експресованих продуктів у *P. pastoris*. Різні методи, такі як додавання інгібіторів протеаз та контроль рН і температури під час ферментації, були використані для покращення загального виходу та стабільності білка [60]. Широко обговорюється метаболічна інженерія *P. pastoris*, яка дозволяє покращувати процеси експресії за допомогою генетичних маніпуляцій [61].

Надмірна експресія білків може створювати значне навантаження на клітини, викликаючи фізіологічний стрес. На основі транскриптомного аналізу було виділено

фактори, що можуть посилити стійкість до стресу та підвищити продуктивність у мультикопійних штаммах *K. phaffii* [62].

Сучасні розробки включають платформу для НТР експресії, яка дозволяє здійснювати швидкі маніпуляції з генами та виділення плазмід без складних процедур виділення продукту [63]. Інновації, як от новий плазмідний вектор з автономною реплікацією для *P. pastoris*, дозволяють прискорити процеси клонування та генної інженерії, що є важливим кроком у високопропускнуому виробництві білків [64,65].

Завдяки технології CRISPR-Cas9 у *P. pastoris* вдалося досягти значних покращень в об'ємах клітинної маси при культивуванні, що сягає до 120 г сухої клітинної маси на літр культури, що є одним із найвищих показників для дріжджових систем експресії [66].

#### **1.1.4 Нитчасті гриби**

Нитчасті гриби служать клітинними платформами для промислового виробництва ферментів. Однак через певні характеристики, такі як швидкий ріст і здатність вивільняти велику кількість білка безпосередньо субстрати, ця платформа більш широко використовується для виробництва рекомбінантних білків [67, 68]. Відомо, що такі гриби, як *Aspergillus niger*, здатні виробляти та виділяти близько 25-30 г/л глюкоамілази, тоді як *Trichoderma reesei* здатна виробляти й виділяти навіть 100 г/л позаклітинного білка [67]. Однак існують деякі недоліки використання ниткоподібних грибів як платформ-господарів для виробництва рекомбінантних білків, включаючи дуже низьку частоту трансформації, обміну або морфологічні дефекти. Крім того, кінцевий продукт може відрізнятися від білків ссавців через неправильний рН, активність грибкової протеази або ефекти відмінностей у моделях глікозидних клітин [67, 69]. Що стосується проблеми глікозилування, *A. nidulansi* та *A. niger* було зроблено кілька успішних спроб [69]. Подібним чином, у випадку *Neurospora crassa* весь виробничий процес був оптимізований для запобігання протеолітичній деградації кінцевого продукту, включаючи важливі параметри, такі як рН, які впливають на активність грибкової протеази [67]. Нині *A. nidulansi*, *A. niger*, *N. Crassai*, *T. Reesei* використовуються переважно як системи експресії для отримання рекомбінантних білків, наприклад, антитіл [68,69].

### 1.1.5 Лінії клітин ссавців

Системи експресії ссавців часто використовують для отримання рекомбінантних білків, для яких характер глікозилування має певне відношення до внутрішньої активності молекули. Вони також розглядаються як основний ресурс для дуже складних і високомолекулярних білків, таких як фактори згортання крові або мультимерні антитіла.

Культури клітин ссавців здатні синтезувати великі та складні білкові молекули. Найбільш часто використовуваними лініями клітинних культур є системи клітин мієломи миші та яєчників китайського хом'яка. Однак останнім часом відбувся зсув до ліній клітин людини. Це збільшує ймовірність того, що цільовий білок отримає посттрансляційні модифікації, характерні для білків людини [70].

Іншою перевагою культур ссавців є можлива секреція гетерологічних білків у місці екстракції шляхом лізису клітин. Крім того, система експресії білка ссавців характеризується високою толерантністю до змін температури, кисню, рН або рівня тиску на стадії виробництва.

Однак система не позбавлена обмежень, а саме ризику зараження вірусами тварин або низького рівня виробничого процесу [71]. Нарешті, середовище, присвячене клітинним лініям, створює ще одну складність. Було підраховано, що цей тип клітинної лінії вимагає понад п'ятдесят різних компонентів, що ускладнює оптимізацію їх концентрації. Клітини ссавців часто вимагають додаткових факторів росту, амінокислот, відновників або вітамінів, тоді як мікроби часто вимагають простої комбінації основних елементів, таких як азот, вуглець, фосфор або мінеральні солі [72], і, як правило, більше швидко зростають.

### 1.1.6 Лінії клітин комах

Платформа клітин комах є компромісним рішенням між двома іншими системами: бактеріальними клітинами та клітинами ссавців. Клітинні лінії комах, такі як Sf-9 і High-Five, широко використовуються для виробництва рекомбінантних білків завдяки можливості підтримувати ріст клітин на чітко визначених поживних середовищах без компонентів тваринного походження. Такий підхід забезпечує

вищий рівень вірусної безпеки порівняно з клітинами ссавців, зменшуючи ризик забруднення пріонами та онкогенною ДНК [73]. Важливим технологічним досягненням стало впровадження системи бакуловірусних експресійних векторів (BEVS), яка дозволяє отримувати різноманітні терапевтичні білки, зокрема тканинний активатор плазміногену (tPA), декарбоксилазу глютамінової кислоти людини (hGAD65), а також вірусні та паразитарні білки. Серед найпоширеніших ліній клітин є клітини *Spodoptera frugiperda*, які сприйнятливі до бакуловірусів. Рідше використовуються клітини комах *Trichoplusia ni* та *Bombyx mori* [74, 75].

Клітинні лінії комах характеризуються швидким ростом, що дозволяє досягти високої щільності клітин та отримати високий вихід білка у відносно невеликому об'ємі культури [75]. У клітинах комах, як і у ссавців, відбувається розщеплення сигнальних пептидів та формування дисульфідних зв'язків в ендоплазматичному ретикулумі. Проте обмеженнями системи є неспроможність клітин комах здійснювати складні посттрансляційні модифікації, зокрема N-глікозилювання, що є критично важливим для деяких білків. Для подолання цієї проблеми було запропоновано введення в клітини комах глікозилтрансфераз ссавців або коекспресію цих ферментів разом з GOI у бакуловірусах [76].

Однак, якщо клітинні лінії комах в теорії здатні виконувати деякі модифікації глікопротеїнів, такі як сіалілювання, це функція залишається рідкісною. Попри численні переваги, застосування системи є досить дорогим через витрати на середовище для культивування.

## **1.2 *Escherichia coli* як модельний організм у біотехнології**

Значна частина сучасних знань про біологічні системи була отримана завдяки вивченню кишкової палички (*Escherichia coli*). Цей мікроорганізм є важливою моделлю для вивчення генетичних, метаболічних та регуляторних мереж завдяки своєму добре вивченому геному, відносно не великому розміру та простоті генетичних маніпуляцій [14]. Крім того, легкість експресії рекомбінантних білків робить *E. coli* надзвичайно корисною не тільки для вивчення основних біологічних процесів, але й для виробництва гетерологічних білків для дослідницьких і терапевтичних цілей [15]. Важливо, що трансгенні штами *E. coli* можуть продукувати

різноманітні білкові молекули, що використовуються в промисловій біотехнології, включаючи ферменти, антитіла та інші біологічно активні сполуки [16]. На додаток до цих важливих застосувань для розуміння біологічних процесів, організм є модельною системою, що використовується для тестування нових аналітичних методів, особливо в галузі синтетичної біології та метаболічної інженерії [17].

Наприклад, *E. coli* був одним з перших геномів, запропонованих для повного секвенування, завдяки відносно невеликому розміру геному та широкому використанню в лабораторії, що сприяло розвитку високопродуктивних методів секвенування та забезпечило основу для дослідження геномів інших організмів [18]. Крім того, *E. coli* слугує зручною платформою для оптимізації метаболічних шляхів, що дозволяє розробляти нові методи виробництва біопалива, полімерів та фармацевтичних препаратів на основі біотехнологічних підходів [19]. *E. coli* залишається важливим інструментом у багатьох біотехнологічних процесах завдяки простоті маніпуляцій та високій продуктивності [20].

Завдяки своїм унікальним властивостям кишкова паличка також відіграла важливу роль у розвитку технології редагування геному CRISPR/Cas9, яка не лише поглибила дослідження функціональної геноміки, а й прискорила створення нових штамів для промислового використання [21]. Крім того, використання *E. coli* в синтетичній біології включає розробку штучних генетичних схем і біосенсорів для виявлення та контролю метаболічних процесів [22]. Ці досягнення дозволили створити складні біотехнологічні системи для синтезу цінних продуктів з відновлюваної сировини. Наприклад, генетично модифіковані штами *E. coli* вже використовуються для біосинтезу важливих промислових сполук, таких як ароматичні амінокислоти, біопластику полігидроксиалканоати (PHA), які є основою біорозкладних полімерів [23].

Іншим важливим напрямком використання *E. coli* в біотехнології є створення вакцин. За допомогою технології рекомбінантної ДНК організм використовують для масового виробництва вакцин, у тому числі проти гепатиту В та інших захворювань [24]. У біофармацевтиці *E. coli* є ключовим організмом для експресії рекомбінантних

білків, таких як інсулін і різні антитіла, що використовуються в лікуванні багатьох хронічних захворювань [20].

### 1.3 Поживні середовища для культивування *Escherichia coli*

Поживні середовища є основою для вирощування мікроорганізмів, клітин та тканин у лабораторних умовах. Вони створюють оптимальні умови для метаболічних процесів, забезпечуючи необхідні поживні речовини, енергію та підтримуючи стабільне середовище для росту. Поживне середовище має включати всі елементи, з яких складається бактеріальна клітина. В перерахунку на масу сухої речовини припадає 50% вуглецю, 20% кисню, 10-14% азоту, 8% водню, 3% фосфору, 1% сірки, калію, натрію, 0,5% магнію і хлору, 0,2% заліза, а також близько 0,3% решти мінорних елементів [77].

Необхідно ретельно розробити склад середовища росту клітин і контролювати його, оскільки воно може мати значний вплив як на метаболізм клітини. Наприклад, на трансляцію мРНК по-різному впливає температура, а також зміни в культуральному середовищі [78]. Загалом відомо, що середовище з визначеним хімічним складом дає повільніший ріст і низькі титри білка, ніж складні середовища [79]. Незважаючи на це, використання синтетичних середовищ для виробництва рекомбінантних білків є загальноприйнятою практикою [80, 81], оскільки ці середовища досягають більших титрів, дозволяють легше контролювати процес і моніторинг, а також спрощують подальше відновлення цільового білка. Склад поживних речовин і змінні ферментації, такі як температура, рН та інші параметри, можуть впливати на протеолітичну активність, секрецію та рівні виробництва [82]. Специфічні маніпуляції з поживним середовищем посилюють вивільнення білка. Таким чином, додавання гліцину в середовище росту посилює вивільнення периплазматичних білків у середовище, не викликаючи значного лізису клітин [83, 84].

Деякі поживні речовини, такі як джерела вуглецю та азоту, пригнічують ріст клітин, при надмірній концентрації. Це пояснює, чому збільшення поживних речовин у поживних середовищах не призводить до збільшення щільності клітин. Високий

рівень глюкози викликає ефект Кребтрі та призводить до накопичення ацетату, який пригнічує ріст клітин [85].

Зазвичай для експресії рекомбінантних білків використовують складні середовища, такі як Luria-Bertani також відома як Lysogeny broth (LB) [86, 87], Super Optimal Broth (SOB), Super Optimal Broth With Catabolite Repression (SOC), 2x Yeast Extract Tryptone (2xYT), Glycerol-Yeast Extract-Tryptone (GYT), MBL, Terrific broth (TB), Super broth (SB), сольове середовище M9 та середовище Enbase Flo для посилення експресії білків [33, 88, 89]. Для експресії рекомбінантних білків в *E. coli* різні дослідники також використовували визначені та напіввизначені середовища. Як правило, визначене середовище містить глюкозу як джерело вуглецю, сульфат амонію та/або хлорид амонію як джерело азоту, а також сульфат магнію та фосфатні солі [90, 91]. Напівсинтетичне середовище містить глюкозу або гліцерин як джерело вуглецю, дріжджовий екстракт та/або триптон як комплексне джерело азоту, а також солі сульфату магнію та фосфату [92]. Компоненти середовища, такі як гліцерин, можуть збільшити ріст клітин і вихід рекомбінантного білка. Синтетичні середовища, такі як TB і SB, містять гліцерин, що призводить до вищих концентрацій білка порівняно з іншими середовищами, які використовують для експресії рекомбінантного білка в *E. coli* [92,93]. Однак у деяких випадках середовище LB також призводило до вищих концентрацій білка порівняно з середовищем TB [94]. Культивування на напівсинтетичному середовищі призводило до кращого виходу продукції порівняно з визначеним середовищем для експресії поверхневого білка [95]. Деякі поживні речовини, якщо вони присутні у надмірній концентрації, можуть пригнічувати ріст клітин. Використовуючи дріжджовий екстракт у середовищі культивування, дослідники повідомили про значне збільшення виходу білка. Це допомагає зменшити секрецію оцтової кислоти під час росту *E. coli*, підвищує питомий клітинний вихід, знімає клітинний стрес, а також допомагає в утилізації оцтової кислоти під час обмеження вуглецю [96].

Також було виявлено, що залишок, який утворюється під час виробництва дистильованого лікеру сетю (японський напій на основі батату), який прийнято розглядати як промислові відходи, можна використовувати як високопродуктивне

середовище для культури *Escherichia coli*. В порівнянні з середовищем LB, яке зазвичай використовується в лабораторіях для культивування *E. coli* і Terrific Broth, який використовується для досягнення надвисоких концентрацій мікроорганізмів. Настій залишків сетю показав значно кращі результати під час культивування, забезпечуючи швидший ріст і більшу щільність культури. Для цього було видалено тверду речовину з відстою сетю і доведено рН суміші до 7. Результати свідчать про те, що солодка картопля сетю як культуральне середовище для *E. coli* набагато краще за середовище LB з точки зору підтримки клітинної проліферації та виробництва плазмід і ферментів [97].

Проаналізувавши склад більшості з вищезазначених поживних середовищ можна помітити, що компонентами, які найчастіше зустрічаються є триптон, хлорид натрію і дріжджовий екстракт.

Триптон – це набір пептидів, отриманий методом ферментного розщеплення казеїну протеазою трипсином [98]. Казеїн – головний білковий компонент молока. Триптон є найпопулярнішим компонентом в складі вищенаведених поживних середовищ. Маючи в своєму складі всі необхідні амінокислоти, а також доступний карбон на азот, він виступає головним компонентом субстрату, так як забезпечує клітину як матеріалом для структурних потреб, так і для регуляторних функцій. Хлорид натрію в складі середовища забезпечує іонну силу і тримає осмотичний тиск на необхідному рівні. Дріжджовий екстракт служить додатковим джерелом вітамінів, амінокислот та мікроелементів [99, 100].

## **Висновок до розділу 1**

Незважаючи на широкий вибір модельних об'єктів *Escherichia coli* займає провідну позицію як модельний організм у біотехнології. 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 ефективнішого виробництва біомаси та білків, а також для розробки нових



терапевтичних і промислових застосувань. Незважаючи на деякі обмеження, пов'язані з білковою експресією та глікозилюванням, численні інженерні підходи та оптимізація умов культивування допомагають подолати ці виклики. Вивчення і вдосконалення *E. coli* сприяють подальшому розвитку в біотехнології, створюючи перспективи для виробництва різноманітних цінних продуктів і розробки нових методів, які можуть вплинути на розвиток фармацевтики, сільського господарства та промисловості.

## РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Об'єктом дослідження** є процес культивування рекомбінантного штаму *Escherichia coli* BL21

**Предметом дослідження** є оптимізація компонентів поживного середовища для підвищення продуктивності *E.coli* BL21.

### 2.1 Поживні середовища, що використовували протягом досліджень.

Для вирощування штаму *E.coli* BL21 використовували середовище LB. Середовище LB є загальним мінімальним середовищем, яке використовується для культивування бактерій. LB ідеально підходить для культивування рекомбінантних бактерій, оскільки сприяє високим темпам росту, швидкому поділу клітин і реплікації плазмід, що є вирішальним фактором у дослідженнях клонування та експресії білків.

Крім стандарту LB використовували подібні поживні середовища, які містять альтернативні джерела карбону і застосовують для культивування *E.coli* з біотехнологічною метою.

Склад поживного середовища LB включає наступні компоненти: Пептон ферментативний – 10 г/л, дріжджовий екстракт – 5 г/л, хлорид натрію (NaCl) – 10 г/л. Кінцеве значення рН  $7,0 \pm 0,2$ .

LB з модифікованим складом: Пептон ферментативний – 12.5 г/л, дріжджовий екстракт – 6.25 г/л, хлорид натрію (NaCl) – 10 г/л, MgSO<sub>4</sub> 2 мМ/л, глюкоза 5 г/л. Кінцеве значення рН  $7,0 \pm 0,2$ .

Terrific Broth (TB) такого складу: Триптон 12 г/л, дріжджовий екстракт 24 г/л, гліцерол 4 мл/л, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> 2.31 г/л, К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> 12.54 г/л. Кінцеве значення рН (при 25° С)  $7,2 \pm 0,2$ .

Terrific Broth (TB) модифікованого складу: Триптон 12 г/л, дріжджовий екстракт 24 г/л, гліцерол 4 мл/л, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> 2.31 г/л, К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> 12.54 г/л, лактоза 1 г/л, казеїнат 0.05 г/л, буферна система HEPES. Кінцеве значення рН (при 25° С)  $8,2 \pm 0,2$ .

Super Optimal Broth з катаболічною репресією (SOC): Триптон 2%, дріжджовий екстракт 0.5%, NaCl 10 мМ, KCl 2.5 мМ, MgCl<sub>2</sub> 10 мМ, MgSO<sub>4</sub> 10 мМ, глюкози 20 мМ, L-триптофан 10 мМ. Кінцеве значення (при 25° C) 7,0±0,2.

## 2.2 Вирощування штаму *Escherichia coli* BL21

В роботі використовували рекомбінантний штам *Escherichia coli* BL21, що використовують для отримання інсуліну на ПрАТ «Індар». Штам був переданий в рамках виконання кваліфікаційної роботи в пробірках для зберігання у формі гліцеринового стоку, та в подальшому зберігався за температури -20°С.

Для отримання стартової культури штам попередньо вирощували в рідкому поживному середовищі LB протягом 1 доби у колбі при температурі 37°С 140 об/хв. Приготовані середовища-порівняння (250 мл) та контроль росту (середовище LB) інокулювали 5 мл стартової нічної культури та культивували протягом 14 годин за температури 37°С та режимі перемішування 140 об/хв. Параметри росту культури в різних варіантах середовищ оцінювали кожні 1.5 години.

Для визначення щільності мікробної суспензії використовували R092 McFarland Standard Set (Himedia, Індія). Щільність суспензій порівнювали зі стандартом 1.0, що відповідає  $1,5 \times 10^8$  колонієутворювальних одиниць (КУО) на кубічний сантиметр суспензії [101]. Щільність суспензії вимірювали також спектрофотометрично (ULAB, Китай) до досягнення оптичної щільності в діапазоні 0.1 – 0.2 OD при довжині хвилі 620 нм.

## 2.3 Досліджувані параметри росту культури

Ефективне вирощування бактеріальних культур, зокрема *Escherichia coli*, потребує постійного моніторингу фізіологічного стану клітин та умов середовища. Точна оцінка стану культури є ключовим елементом для розуміння динаміки її росту, метаболічної активності та продуктивності, що є особливо важливим у біотехнологічних дослідженнях і промислових процесах. Регулярний контроль основних параметрів дозволяє вчасно виявляти зміни в популяції бактерій на початкових стадіях, що допомагає уникнути зупинок росту чи зниження ефективності експериментів. Крім того, оцінка стану культури допомагає оптимізувати умови

культивування, такі як температура, рівень кисню, концентрація поживних речовин та інші критичні фактори, що впливають на ріст клітин

### **2.3.1 Оцінка приросту біомаси**

Для кількісної оцінки росту клітин мікроорганізмів використовували спектрофотометричний метод. Оптичну густину (OD) суспензії клітин вимірювали при довжині хвилі 600 нм, оптичний шлях 0.5 см. Ця довжина хвилі є оптимальною для більшості мікроорганізмів, оскільки білки та нуклеїнові кислоти, що входять до складу клітини, поглинають світло саме в цій області спектра. Збільшення оптичної густини пропорційне збільшенню концентрації клітин у суспензії, що дозволяє оцінити динаміку росту мікробної популяції.

### **2.3.2 Оцінка чисельності мікробної популяції за кількістю КУО**

Для оцінки чисельності мікробної популяції використовували метод секторальних посівів (метод Голда-Родомана-Родомана). Важливість методу полягає в тому, що він дозволяє виявити кількість метаболічно активних клітин, що може суттєво відрізнятись від оцінки приросту біомаси за збільшенням оптичної густини рідини. Кожна колонія, що проростає, свідчить про те, що у зразку були присутні живі клітини, здатні до розмноження.

### **2.3.2 Визначення біомаси ваговим методом**

Цей метод широко використовується для оцінки росту мікроорганізмів у рідких поживних середовищах. Процес визначення біомаси складається з трьох послідовних етапів:

1. Відділення біомаси з точно визначеного об'єму культуральної рідини за допомогою центрифугування.
2. Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до стабільного значення.
3. Відокремлення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини та визначення їх маси.

Даний метод досить тривалий, тому використовується для визначення біомаси наприкінці процесу або для визначення біомаси клітин (актиноміцети, міцеліальні гриби), що важко проводити іншими методами, наприклад, нефелометрично.

#### **2.4 Визначення значень рН культуральної рідини**

Значення рН культуральної рідини визначали за допомогою йонометру рН – 301 (ПБФ ДЕСКК, Україна).

#### **2.5 Статистична обробка результатів**

Усі дослідження проводили щонайменше у трикратній повторності. Показники стандартних відхилень і т. п. обчислювалися за загальноприйнятими формулами.

### **Висновок до розділу 2**

У цьому дослідженні для оцінки росту та властивостей мікроорганізмів *in vitro* були застосовані різноманітні мікробіологічні методи. Використані методи, такі як спектрофотометричний вимір, секторальні посіви та ваговий метод, є стандартизованими та надійними, що дозволяє отримувати об'єктивні результати про вплив досліджуваних мікроорганізмів на процеси росту. Регулярний моніторинг фізіологічного стану й умов середовища забезпечує точність оцінки динаміки росту та метаболічної активності. Це особливо важливо в біотехнологічних дослідженнях, оскільки дозволяє вчасно виявляти зміни у популяціях бактерій, оптимізувати умови культивування та уникати зупинок у рості. Застосування цих методів надає наукову обґрунтованість досліджень і дозволяє робити точні висновки про властивості мікроорганізмів.

## РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Оптимізація процесів культивування мікроорганізмів є ключовим завданням у багатьох галузях біотехнології, сільського господарства та медицини. Одним з найважливіших факторів, що визначають успіх культивування, є склад поживного середовища. Правильно підібране середовище забезпечує організми необхідними поживними речовинами, стимулює ріст і розвиток, а також впливає на кінцеві продукти метаболізму. Оптимальне поживне середовище забезпечує інтенсивний ріст, оскільки достатня кількість поживних речовин стимулює швидке розмноження клітин. Як наслідок, правильний баланс компонентів середовища сприяє накопиченню великої кількості біомаси. Крім того, оптимальне середовище забезпечує умови для ефективного синтезу цільових продуктів (ферментів, білків, антибіотиків тощо).

В нашому дослідженні основним критерієм оптимізації середовища визначали продуктивність культури.

### 3.1 Визначення приросту біомаси

*Escherichia coli* BL21 вирощували на п'яти поживних середовищах, що відрізнялися за складом та були рекомендовані для культивування штамів *E.coli*, а саме LB, LB mod, TB, TB mod, SOC.

На всіх використаних середовищах спостерігали класичні фази розвитку періодичної культури (Рис.1).

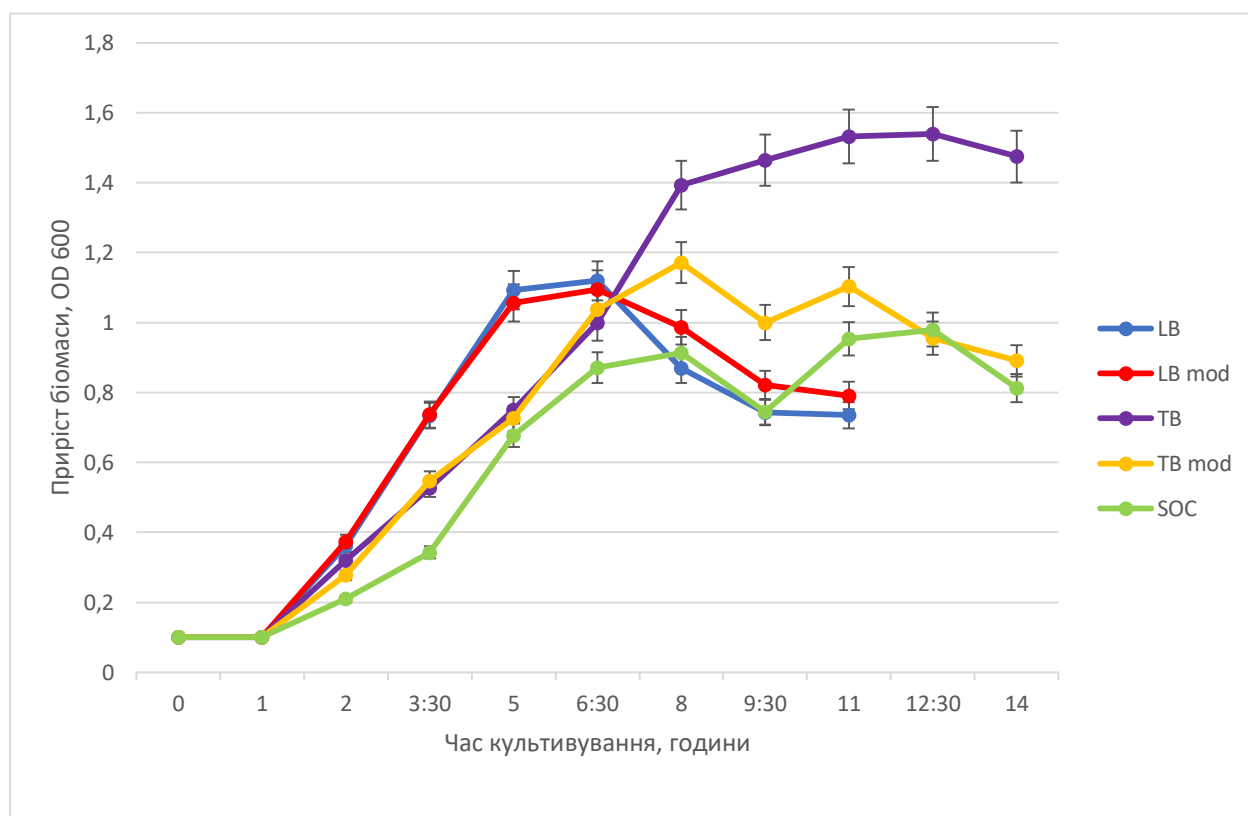


Рис 3.1 Приріст біомаси за 14 годин культивування.

Проведені дослідження демонструють значну різницю в кінетиці росту мікроорганізмів на різних поживних середовищах. Отримані дані дозволяють зробити ряд висновків щодо складу середовищ та їхнього впливу на фізіологічні процеси мікробних клітин. Цікаво, що тривалість фази адаптації культури до різних середовищ була подібною та складала до 1 години часу. Найбільшу продуктивність культури за оптичною густиною спостерігали на середовищі ТВ.

Середовища LB і LB mod мали схожу динаміку росту з піковими значеннями оптичної густини на 6,5 годині культивування межах 1,12 для LB mod та 1,09 для LB. Після цього почався поступовий спад оптичної щільності, що свідчить про виснаження поживних речовин та наближення кінця експоненційної фази росту.

Середовище SOC демонструвало проміжний рівень росту мікроорганізмів. Хоча оптична щільність досягала рівнів, подібних до LB та LB mod, період культивування на SOC був довшим, а ріст – більш поступовим та рівномірним. Це

робить SOC ефективним для тривалого культивування, хоч і з меншим рівнем біомаси порівняно з ТВ і ТВ mod.

Середовища ТВ та ТВ mod виявилися оптимальними для росту досліджуваних мікроорганізмів, забезпечуючи найвищий рівень біомаси та тривалий період культивування. Це свідчить про високу концентрацію поживних речовин, необхідних для росту і розмноження мікроорганізмів поживні. Тривалий період стаціонарної фази росту вказує на те, що в цих умовах мікроорганізми досягають стану фізіологічної рівноваги, що дозволяє їм підтримувати високу метаболічну активність протягом тривалого часу. Вже на 8-й годині приріст біомаси для ТВ та ТВ mod було на 60,11 % та 34,71% вище, ніж для LB , та на 5.06% і 13.45% для SOC й LB mod у той самий період. Детальні данні представлені в табл 3.1.1

Таблиця 3.1.1

### Динаміка приросту біомаси для різних середовищ

Час (год)	LB (OD600)	LB mod (%)	ТВ (%)	ТВ mod (%)	SOC (%)
0	0.1	Час адаптації культури			
1	0.1				
2	0.362	3.31%	-11.33%	-23.20%	-41.99%
3.5	0.734	0.41%	-28.20%	-25.48%	-53.27%
5	1.093	-3.39%	-31.38%	-33.58%	-37.97%
6.5	1.12	-2.32%	-10.80%	-7.32%	-22.23%
8	0.87	13.45%	60.11%	34.71%	5.06%
9.5	0.743	10.50%	97.17%	34.59%	0.27%
11	0.735	7.62%	108.44%	50.07%	29.66%
12.5	0.735	7.62%	109.52%	30.07%	33.33%
14	0.735	7.62%	100.68%	21.22%	10.61%

Від'ємні значення в таблиці для середовища ТВ протягом 2-6.5 годин росту культури у порівнянні з контролем свідчило про довшу тривалість логарифмічної фази росту культури, що також є перевагою при культивуванні промислового штаму



мікроорганізму. Наявність в складі середовищ ТВ та ТВ mod буферних систем впливає на тривалість культивування. Буферні системи відіграють критичну роль у забезпеченні оптимальних умов для росту та розвитку мікроорганізмів, зокрема *E. coli*, під час промислового культивування. Їхня основна функція полягає у стабілізації рН середовища, що є одним з найважливіших фізико-хімічних параметрів, які впливають на біохімічні процеси в клітині.

Таблиця 3.1.2

### Динаміка зміни рН для різних середовищ

Час (год)	LB	LB mod	ТВ	ТВ mod	SOC
0	7	7	7.4	8.5	7.0
1	6.8	6.9	7.4	8.5	6.9
2	6.485	6.034	7.231	7.8	6.244
3.5	5.577	5.464	7.147	7.8	6.074
5	5.136	5.211	7.012	7.723	5.8
6.5	5.146	5.057	6.94	7.67	5.757
8	5.2	5.1	6.8	7.59	5.6
9.5	5.1	5	6.8	7.5	5.1
11	5.1	5	6.7	7.3	5.3
12.5	-	-	6.7	7.3	5.3
14	-	-	6.6	7.3	5.3

Під час росту мікроорганізмів відбувається виділення різних метаболітів, що призводить до зміни рН середовища. Значні відхилення від оптимального значення рН можуть негативно вплинути на активність ферментів, проникність клітинної мембрани, а також на експресію генів. Буферні системи, нейтралізуючи ці зміни, забезпечують стабільне середовище для росту бактерій та підвищують ефективність процесу культивування. Крім того, буфери можуть впливати на розчинність поживних речовин, а також на стабільність білкових продуктів, які утворюються в

процесі біотехнологічної продукції. Так, наприклад, на кінець культивування значення рН для середовищ ТВ та ТВ mod значно відрізнялися від інших використаних середовищ – 6.6 та 7.3, відповідно, у порівнянні з 5.1, 5.0 та 5.3 для LB, LB mod та SOC, відповідно.

На основі критерію приросту біомаси, кінетики росту культури та тривалості культивування середовище ТВ було визначене як оптимальне для культивування штаму *E.coli* BL21 за зазначених умов.

### 3.2 Визначення титру клітин

Титр клітин у процесі культивування визначали методом Голда-Родомана, який базується на секторному посіві зразків для підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО). Цей метод дозволяє оцінити кількість життєздатних клітин у культурі шляхом розподілу зразка на кілька секторів чашки Петрі та посіву на тверде поживне середовище.

У процесі експерименту було виявлено, що в середовищах LB та LB mod титр клітин протягом експоненціальної фази росту залишався відносно стабільним і досяг значення  $5 \times 10^6$  КУО/мл.

Це свідчить про швидке виснаження поживних речовин та зміну рН до рівня, що не є оптимальним для подальшого росту клітин. На початку фази відмирання титр клітин також залишався на рівні  $5 \times 10^6$ , що додатково підтверджує неможливість продовження активного росту за умов виснаженого середовища.

На відміну від LB та LB mod, середовища ТВ, ТВ mod демонстрували поступове збільшення титру клітин протягом культивування. У лаг-фазі титр залишався на рівні  $10^6$ , що свідчить про початковий етап адаптації клітин до середовища. Однак з початком експоненціальної фази спостерігалось значне збільшення титру клітин до  $5 \times 10^6 - 10^7$  КУО/мл. Максимальний титр клітин на середовищі ТВ досяг  $10^8$  КУО, що свідчить про високий вміст поживних речовин і сприятливі умови для тривалого культивування.

Середовище SOC також показало гарні результати щодо підтримки росту клітин. На ранніх стадіях експоненціальної фази титр клітин у SOC досягав  $10^7$

КУО/мл, що свідчить про наявність достатньої кількості поживних речовин для підтримки активного росту. SOC відрізнялося плавним збільшенням кількості клітин протягом тривалого періоду, що робить його ефективним для довготривалого культивування. Хоча рівень титру у SOC був дещо нижчим порівняно з ТВ і ТВ mod, середовище забезпечувало стабільний ріст протягом усього експерименту.

Найвищий титр клітин був зафіксований у середовищах ТВ та ТВ mod (до  $10^8$  КУО/мл), що вказує на ефективність цих середовищ для тривалого культивування.

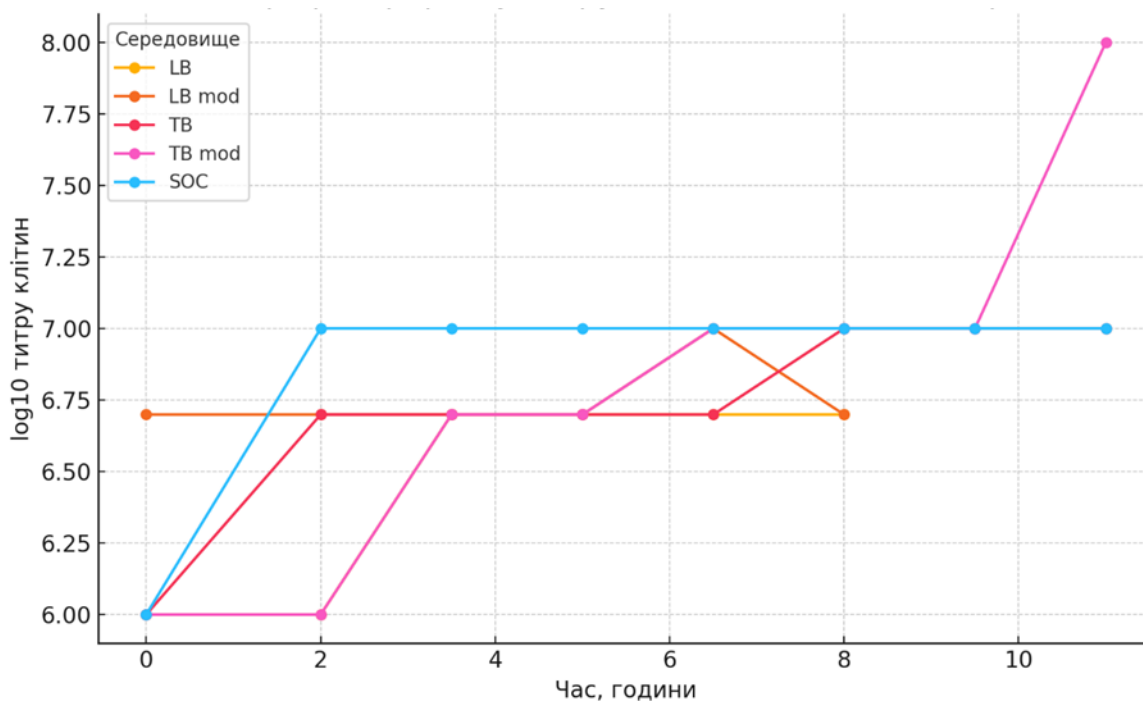


Рис 3.2 Графік приросту  $\log_{10}$  титру клітин протягом всього періоду культивування

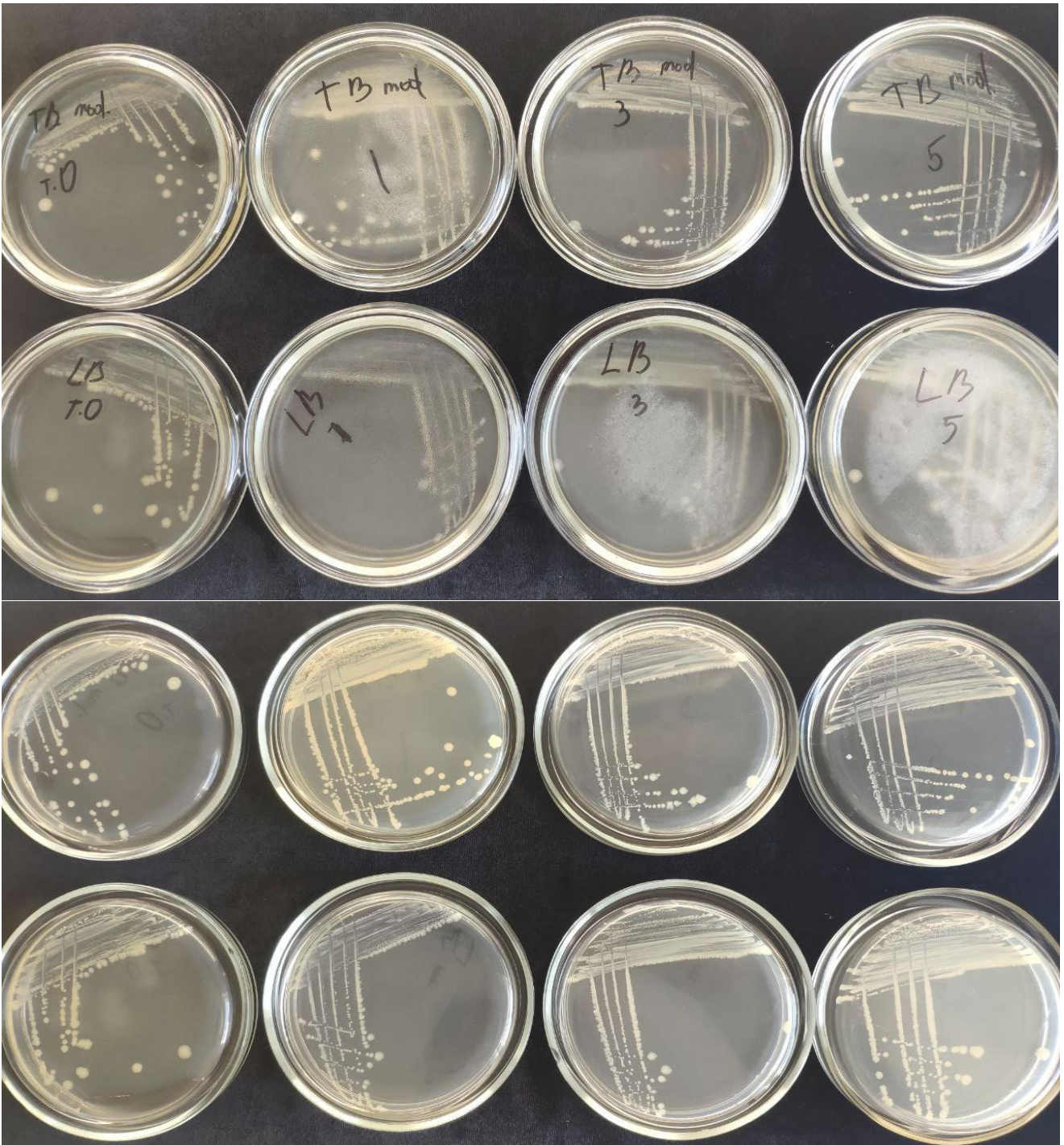


Рис 3.2.1 Визначення титру життєздатних клітин на різних поживних середовищах.

За критерієм кількості життєздатних клітин середовища ТВ та ТВ mod були оцінені як оптимальні. Проте, середовище ТВ відповідало попереднім даним про кінетику росту культури та відображало закономірне збільшення титру клітин в процесі культивування. Даний факт також свідчить на користь використання середовища ТВ як оптимального для культивування дослідного штаму.

### 3.3 Визначення сухої маси клітин мікроорганізмів

Важливим етапом оцінки ефективності культивування досліджуваного мікроорганізму є визначення кількості сухої біомаси, яка утворюється після завершення процесу, що також є критерієм продуктивності культури. Для цього культуральну рідину центрифугували, щоб відокремити клітини від поживного середовища. Отриману після цього біомасу висушували до постійної ваги і зважували. Визначення кількості сухої біомаси дозволяє порівняти ефективність різних поживних середовищ, оскільки воно прямо вказує на здатність середовища підтримувати ріст клітин та їх розмноження. Крім того, частиною сухого залишку можуть бути клітинні метаболіти, які були здатні до осадження центрифугуванням. Дані щодо сухої маси клітин після завершення процесу культивування представлені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

#### Вага сухої біомаси, г після завершення культивування

Назва поживного середовища	Вага сухої біомаси, г
SOC	0,017
LB	0,028
LB mob	0,012
TB	0,178
TB mod	0,277

За результатами досліджень найбільша кількість сухої біомаси була отримана на середовищі TB mod та TB. Вага сухої біомаси, отриманої на цих середовищах, переважала інші варіанти щонайменше в 10 разів (0,277 та 0,178 г АСМ, відповідно). Це підтверджує результати, отримані за іншими критеріями продуктивності культури, та свідчить про те, що середовища модифіковане середовище TB mod та TB є найбільш поживним і сприятливим для росту клітин досліджуваного штаму. Це

підкреслює значну поживну цінність цих середовищ, які сприяють тривалому та інтенсивному росту клітинної маси.

Натомість, середовища LB, LB mod, та SOC продемонстрували значно нижчі результати. У середовищі LB було отримано лише 0,028 г біомаси, що свідчить про обмежену здатність цього середовища підтримувати ріст мікроорганізмів. Ще гірші результати були у LB mod (0,012 г) та SOC (0,017 г), що вказує на виснаження поживних речовин і можливі обмеження у складі цих середовищ для підтримки інтенсивного росту.

За всіма досліджуваними критеріями продуктивності культури - приріст біомаси, кінетика росту культури, титр клітин та вихід біомаси - середовище TB було визначено як оптимальне для культивування штаму *E. coli* BL21. Середовище TB mod також забезпечувало стабільні відтворювані результати культивування з високим виходом біомаси культури.

### **3.4 Економічний аспект вибору поживних середовищ.**

При виборі поживного середовища для вирощування мікроорганізмів важливу роль відіграють як вартість компонентів, так і мета експерименту чи виробничого процесу. Для проведення експериментів із культивуванням штаму *E. coli* BL21 було використано кілька видів поживних середовищ: LB, LB mod, TB, TB mod та SOC. Основними критеріями оцінки їх ефективності стали: приріст біомаси, титр клітин і вага сухої маси.

В ході дослідження ефективності різних поживних середовищ для культивування штаму *Escherichia coli* BL21 було розраховано вартість поживних середовищ, що використовувалися (Табл 3.4.).

### Ціна використаних поживних середовищ за 1 літр.

Поживне середовище	Вартість за 1л, у.о.
LB	140
LB mod	143
TB	240
TB mod	244
SOC	200

Базові середовища типу LB та LB mod хоча й мають найнижчу вартість (140 та 143 у.о. за літр відповідно), але менш ефективні, тоді як складніші середовища, наприклад, TB, TB mod чи SOC, демонструють вищу продуктивність за значно більших витрат.

За всіма досліджуваними показниками, поживне середовище Terrific Broth (TB) було визнано як оптимальний варіант для культивування *E. coli BL21*. Незважаючи на значно вищу вартість (240 у.о. за 1л), яка виправдовується високою продуктивністю, зокрема значного приросту біомаси та тривалого підтримання активного росту культури. Модифіковане середовище Terrific Broth (TB mod) демонструвало трохи нижчу ефективність, маючи вищу вартістю (244 у.о. за літр). Висока вартість цих середовищ пояснюється кількома складовими:

1. Підвищена концентрація поживних речовин. TB середовище містить високі концентрації триптонну (12 г/л) та дріжджового екстракту (24 г/л), які є основними джерелами азоту, амінокислот, пептидів та вітамінів. Це значно перевищує кількість, що використовуються в інших середовищах, таких як LB, LB mod або SOC.
2. Додаткові джерела Карбону. У складі середовищ TB та TB mod у порівнянні з базовими середовищами LB, LB mod присутні додаткові компоненти, що можуть виступати як додаткові джерела Карбону – гліцерол, лактоза та казеїнат, що також підвищує вартість даних середовищ.

3. Наявність буферної системи для стабілізації рН. У ТВ mod використовується буферна система на основі НЕРЕС, а у середовищі ТВ – на основі сполук дигідрогенфосфату калію ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.31 г/л) та гідрофосфату калію ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 12.54 г/л), що забезпечує стабільність рН середовища протягом тривалого культивування. Це дозволяє клітинам залишатися активними при змінних умовах, але додає вартості через використання великої кількості високоякісних буферних солей.

### **Висновок до розділу 3**

Дослідження культивування *Escherichia coli* на п'яти різних поживних середовищах продемонструвало суттєві відмінності у динаміці росту мікроорганізмів, титрі клітин та продуктивності біомаси. Найвищі показники приросту біомаси та титру клітин досягалися на середовищах ТВ та ТВ mod, що підтверджує їх ефективність для культивування дослідного штаму з метою підвищення продуктивності. Вони забезпечували як високий титр клітин (до  $10^8$  КУО/мл), так і максимальну кількість сухої біомаси, що вказує на їхню ефективність.



## ВИСНОВКИ

1. На підставі результатів дослідження було виявлено значні відмінності в ефективності різних поживних середовищ для культивування *Escherichia coli* BL21, що вказує на широкий діапазон поживного потенціалу цих середовищ та можливість забезпечення активного росту клітин.
2. Було виявлено найбільш оптимальне поживне середовище для культивування дослідного штаму. Поживне середовище Terrific Broth (ТВ) проявило себе найкраще в усіх показниках, що свідчить про велику кількість поживних речовин та здатність підтримувати ріст мікроорганізмів тривалий період часу. Високий вміст триптоні та дріжджового екстракту в ТВ, ймовірно, забезпечував ізолят необхідним набором амінокислот, вітамінів та інших ростових факторів.
3. Велика кількість сухої біомаси, що була отримана на модифікованому Terrific Broth (ТВ mod) з відповідним титром клітин, може свідчити про синтез великої кількості екзополісахаридів.
4. Середовище SOC, хоча й не забезпечило таких високих показників які продемонстрували ТВ і ТВ mod, проте забезпечило стабільний ріст клітин протягом тривалого часу. Це може вказувати на можливу ефективність середовища SOC для підтримки стабільного відтворюваного титру клітин протягом тривалого культивування.
5. Середовища LB та LB mod виявилися найменш ефективними за використаного режиму культивування, демонструючи обмежений приріст біомаси та низький титр клітин, незважаючи на широке застосування середовища LB для культивування даного штаму. З іншого боку, середовище LB Це свідчить про недостатню концентрацію поживних речовин та нездатність цих середовищ підтримувати активний ріст клітин протягом тривалого часу, що обмежує їхнє використання в промисловому виробництві.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Baeshen M., AlHejin A.M., Bora R.S., Ahmed M.M.M., Ramadan H.A.I., Saini K.S., Baeshen N.A., Redwan E.M. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 25. – P. 953-962.
2. Niazi S.K., Magoola M. Advances in *Escherichia coli*-Based Therapeutic Protein Expression: Mammalian Conversion, Continuous Manufacturing, and Cell-Free Production // *Biologics*. – 2023. – Vol. 3, No. 4. – P. 380-401. DOI: <https://doi.org/10.3390/biologics3040021>.
3. Cardoso V.M., Campani G., Santos M.P., Silva G.G., Pires M.C., Gonçalves V.M., Giordano R.C., Sargo C.R., Horta A.C.L., Zangirolami T.C. Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using *Escherichia coli* BL21(DE3) // *Biotechnology Reports*. – 2020. – Article e00441. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00441>.
4. Tripathi N.K., Shrivastava A. Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – Article 1919. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01919>.
5. Lagousi T., Basdeki P., Routsias J., Spoulou V. Novel Protein-Based Pneumococcal Vaccines: Assessing the Use of Distinct Protein Fragments Instead of Full-Length Proteins as Vaccine Antigens // *Vaccines*. – 2019. – Vol. 7, No. 1. – Article 9. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines7010009>.
6. 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*. – 2019. – First published: 12 June 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.28870>
7. 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. — DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>.

8. 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. — DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>.
9. Lee S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* (Review). // Trends in Biotechnology. — 1996. — Vol. 14, Iss. 3. — P. 98–105.
10. Zhang J., Greasham R. Chemically defined media for commercial fermentations. // Applied Microbiology and Biotechnology. — 1999. — Vol. 51. — P. 407–421.
11. 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. — DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017>.
12. 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. — DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.10.020>.
13. 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.
14. 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>
15. Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14(3), 98-105. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9)
16. Keasling, J. D. (2010). Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, 330(6009), 1355-1358. <https://doi.org/10.1126/science.1193990>

17. Moon, T. S., Dueber, J. E., Shiue, E., & Prather, K. L. (2010). Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 12(3), 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.01.003>
18. Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 195-201. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00199-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00199-1)
19. Keasling, J. D. (2010). Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, 330(6009), 1355-1358. <https://doi.org/10.1126/science.1193990>
20. Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14(3), 98-105. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9)
21. Moon, T. S., Dueber, J. E., Shiue, E., & Prather, K. L. (2010). Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 12(3), 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.01.003>
22. 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>
23. Keasling, J. D. (2010). Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, 330(6009), 1355-1358. <https://doi.org/10.1126/science.1193990>
24. Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 195-201. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00199-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00199-1)
25. Schumann, W., & Ferreira, L. C. S. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics of Microorganisms, Genet. Mol. Biol.*, 27(3), 442-453. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000300022>
26. Jana, S., & Deb, J. K. (2005). RETRACTED ARTICLE: Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 289-298. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1814-0>

27. Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
28. Rathore, A. S., Bade, P., Joshi, V., Pathak, M., & Pattanayek, S. K. (2013). Refolding of biotech therapeutic proteins expressed in bacteria: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(10), 1794-1806. <https://doi.org/10.1002/jctb.4104>
29. Rosano G. L., Ceccarelli E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 172. – doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
30. Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond // *Biotechnology Advances*. – 2011. – Vol. 29, №6. – P. 702–709. – doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.013.
31. Xu, X., Liu, Y., & Wang, Z. (2021). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 98.
32. Tripathi, N. K. (2016). Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Reviews*, 3(3), 116–133. <https://doi.org/10.1002/cben.201600002>
33. Yoon, S. H., et al. (2020). Strategies for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 215
34. Gupta, S. K., & Shukla, P. (2020). Advances in recombinant protein expression technologies for improved productivity in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4171-4181.
35. Khalilzadeh, R., Shojaosadati, S. A., Maghsoudi, N., Mohammadian Mosaabadi, J., Mohammadi, M. R., Bahrami, A., Maleksabet, N., Nassiri-Khalili, M. A., Ebrahimi, M., & Naderimanesh, E. H. (2004). Process development for production of recombinant human interferon- $\alpha$  expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 63-69. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0117-x>

36. Zhang, H. C., Yang, J., Yang, G. W., Wang, X. J., & Fan, H. T. (2015). Production of recombinant protein G through high-density fermentation of engineered bacteria as well as purification. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 3132–3138. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3688>
37. Baneyx F., Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli* // *Nature Biotechnology*. – 2004. – Vol. 22, №11. – P. 1399–1408. – doi: 10.1038/nbt1029. – PMID: 15529165.
38. LaVallie E. R., DiBlasio E. A., Kovacic S., Grant K. L., Schendel P. F., McCoy J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm // *Bio/Technology*. – 1993. – Vol. 11. – P. 187–193.
39. Schein C. H. Production of soluble recombinant proteins in bacteria // *Bio/Technology*. – 1989. – Vol. 7. – P. 1141–1149.
40. Demain A. L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms // *Biotechnology Advances*. – 2009. – Vol. 27, №3. – P. 297–306. – doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
41. He X.-S., Brückner R., Doi R. H. The protease genes of *Bacillus subtilis* // *Research in Microbiology*. – 1991. – Vol. 142, Issues 7–8. – P. 797–803. – doi: 10.1016/0923-2508(91)90058-I.
42. Murashima K., Chen C.-L., Kosugi A., Tamaru Y., Doi R. H., Wong S.-L. Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – Vol. 184. – P. 76–81.
43. Meyer H. P., Fiechter A. Production of cloned human leukocyte interferon by *Bacillus subtilis*: optimal production is connected with restrained growth // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1985. – Vol. 50. – P. 503–507.
44. van Leen R. W., Bakhuis J. G., van Beckhoven R. F. W. C., Burger H., Dorssers L. C. J., et al. Production of human interleukin-3 using industrial microorganisms // *Bio/Technology*. – 1991. – Vol. 9. – P. 47–52.

45. Hang, X.-H., et al. (2019). "Heterologous Expression of the Marine-Derived Quorum Quenching Enzyme MomL Can Expand the Antibacterial Spectrum of *Bacillus brevis*." *Marine Drugs*, 17(2), 128
46. Tang, Y., et al. (2021). "Efficient heterologous protein production in *Bacillus brevis* systems for biotechnological applications." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 48(4), 333-345.
47. Lin, P., et al. (2023). "Advancements in *Bacillus* strains as hosts for heterologous protein expression." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(2), 559-573.
48. Wang, Q., et al. (2020). "Secretion and optimization of therapeutic proteins in *Bacillus brevis*." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 477.
49. Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A. A., Hoseinpoor, R., et al. (2019). Yeast expression systems: overview and recent advances. *Mol. Biotechnol.* 61, 365–384. doi: 10.1007/s12033-019-00164-8
50. Fletcher, E., Krivoruchko, A., and Nielsen, J. (2016). Industrial systems biology and its impact on synthetic biology of yeast cell factories. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 1164–1170. doi: 10.1002/bit.25870
51. Huertas, M. J., and Michán, C. (2019). Paving the way for the production of secretory proteins by yeast cell factories. *Microb. Biotechnol.* 12, 1095–1096. doi: 10.1111/1751-7915.13342
52. Vieira Gomes, A. M., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., and Parachin, N. S. (2018). Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms* 6:E38. doi: 10.3390/microorganisms6020038
53. Huang, M., Wang, G., Qin, J., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2018). Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E11025–E11032. doi: 10.1073/pnas.1809921115
54. Chen, B., Lee, H. L., Heng, Y. C., Chua, N., Teo, W. S., Choi, W. J., et al. (2018). Synthetic biology toolkits and applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Adv.* 36, 1870–1881. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.07.005

55. Gupta, S. K., and Shukla, P. (2017c). Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: a review. *Front. Pharmacol.* 8:419. doi: 10.3389/fphar.2017.00419
56. Juturu, V., and Wu, J. C. (2018). Heterologous protein expression in *Pichia pastoris* : latest research progress and applications. *ChemBioChem* 19, 7–21. doi: 10.1002/cbic.201700460
57. Werten, M. W. T., Eggink, G., Cohen Stuart, M. A., and de Wolf, F. A. (2019). Production of protein-based polymers in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Adv.* 37, 642–666. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.03.012
58. Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast. *Bioengineered* 4, 207–211. doi: 10.4161/bioe.22856
59. Zhang, Y., Liu, R., and Wu, X. (2007). The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Ann. Microbiol.* 57, 553–560. doi: 10.1007/BF03175354
60. Schwarzhans, J.-P., Luttermann, T., Geier, M., Kalinowski, J., and Friehs, K. (2017). Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Adv.* 35, 681–710. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.009
61. Yu, X.-W., Sun, W.-H., Wang, Y.-Z., and Xu, Y. (2017). Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy *Komagataella phaffii* based on transcriptomic analysis of overexpression effects. *Sci. Rep.* 7:16249. doi: 10.1038/s41598-017-16577-x
62. González, M., Brito, N., Hernández-Bolaños, E., and González, C. (2018). New tools for high-throughput expression of fungal secretory proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Microb. Biotechnol.* 12, 1139–1153. doi: 10.1111/1751-7915.13322
63. Nakamura, Y., Nishi, T., Noguchi, R., Ito, Y., Watanabe, T., Nishiyama, T., et al. (2018). A stable, autonomously replicating plasmid vector containing *Pichia pastoris* centromeric DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e02882–17. doi: 10.1128/AEM.02882-17



64. Weninger, A., Hatzl, A. M., Schmid, C., Vogl, T., and Glieder, A. (2016). Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 235, 139–149. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.027
65. García-Ortega, X., Cámara, E., Ferrer, P., Albiol, J., Montesinos-Seguí, J. L., and Valero, F. (2019). Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free GAP promoter. Where do we stand? *N. Biotechnol.* 53, 24–34. doi: 10.1016/j.nbt.2019.06.002
66. Havlik D., Brandt U., Bohle K., and Fleißner A., Establishment of *Neurospora crassa* as a host for heterologous protein production using a human antibody fragment as a model product, *Microbial Cell Factories.* (2017) 16, no. 1, <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0734-5>.
67. Magana-Ortiz D., Fernandez F., Loske A. M., and Gomez-Lim M. A., Extracellular expression in *Aspergillus niger* of an antibody fused to Leishmania sp. antigens, *Current Microbiology.* (2018) 75, 40–48, <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1348-1>.
68. Anyaogu D. C. and Mortensen U. H., Manipulating the glycosylation pathway in bacterial and lower eukaryotes for production of therapeutic proteins, *Current Opinion in Biotechnology.* (2015) 36, 122–128, 2-s2.0-84940526410, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.012>, 26340101.
69. Zubieta M. P., Contesini F. J., Rubio M. V., Gonçalves A. E. D. S. S., Gerhardt J. A., Prade R. A., and Damasio A. R. D. L., Protein profile in *Aspergillus nidulans* recombinant strains overproducing heterologous enzymes, *Microbial Biotechnology.* (2018) 11, no. 2, 346–358, 2-s2.0-85042133519, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13027>.
70. Sodoyer, R. Expression Systems for the Production of Recombinant Pharmaceuticals / R. Sodoyer // *BioDrugs.* – 2004. – Vol. 18, № 1. – P. 51–62. – doi:10.2165/00063030-200418010-00005

71. Dumont J., Eewart D., Mei B., Estes S., Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives / J. Dumont, D. Eewart, B. Mei, S. Estes, R. Kshirsagar // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2016. – Vol. 36, № 6. – P. 1110–1122. – doi:10.3109/07388551.2015.1084266
72. Zhang J., Baltz R. H., Deamin A. L. Mammalian cell culture for biopharmaceutical production // *Manual of Industrial Microbiology*. – Washington : ASM Press, 2010. – Vol. 12. – P. 157–178.
73. Le L. T. M., Nyengaard J. R., Golas M. M., and Sander B., Vectors for Expression of Signal Peptide-Dependent Proteins in Baculovirus/Insect Cell Systems and Their Application to Expression and Purification of the High-Affinity Immunoglobulin Gamma Fc Receptor I in Complex with Its Gamma Chain, *Molecular Biotechnology*. (2018) 60, no. 1, 31–40, 2-s2.0-85034081825, <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0041-8>
74. Gecchele E., Merlin M., Brozzetti A., Falorni A., Pezzotti M., and Avesani L., A Comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: bacteria, insect cells and plant systems, *Journal of Visualized Experiments*. (2015) 97, <https://doi.org/10.3791/52459>.
75. Contreras-Gómez A., Sánchez-Mirón A., García-Camacho F., Molina-Grima E., and Chisti Y., Protein production using the baculovirus-insect cell expression system, *Biotechnology Progress*. (2014) 30, no. 1, 1–18, 2-s2.0-84893778142, <https://doi.org/10.1002/btpr.1842>, 24265112.
76. Owczarek B., Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K. A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals / B. Owczarek, A. Gerszberg, K. Hnatuszko-Konka // *Journal*. – 2019. – P. 4216060. – doi:10.1155/2019/4216060.
77. В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько. Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології рекомендації до виконання практичних робіт // Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського – 2022. – С. 6.

<https://ela.kpi.ua/server/api/core/bitstreams/e9693989-ba49-4440-b3ef-c86df7681c00/content>

78. Corisdeo, S & Baiyang, Wang, B. Functional expression and display in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. *Prot. Exp. Purif.*, 2004, 34, 70-279.
79. Zanette, D.; Dundon, W.; Soffientini, A.; Sottani, C.; Marinelli, F.; Akeson, A. & Sarubbi, E. Human IL-1 receptor antagonist from *Escherichia coli*: large-scale microbial growth and protein purification. *Journal of Biotechnology*. 1998, 64, 187-96
80. Cserjan-Puschmann, M.; Kramer, W.; Duerrschmid, E.; Striedner, G. & Bayer, K. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 53, 43-50.
81. Kweon, D.H.; Han, N.S.; Park, K.M. & Seo, J.H. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*.
82. Bird, P. I.; Pak, S. C.; Worrall, D. M.; Stephen, P. & Bottomley, S. P. Production of recombinant serpins in *Escherichia coli*. *Methods*, 2004, 32, 169-76.
83. Karyolaimos, A., Ampah-Korsah, H., Hillenaar, T., Mestre Borrás, A., Dolata, K. M., Sievers, S., Riedel, K., Daniels, R., & de Gier, J. W. (2019). Enhancing recombinant protein yields in the *E. coli* periplasm by combining signal peptide and production rate screening. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 1511. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01511>
84. Schottroff, F., Kastenhofer, J., Spadiut, O., Jaeger, H., & Wurm, D. J. (2021). Selective release of recombinant periplasmic protein from *E. coli* using continuous pulsed electric field treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, Article 586833. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.586833>
85. Carteni, F., Occhicone, A., Giannino, F., Vincenot, C. E., de Alteriis, E., Palomba, E., & Mazzoleni, S. (2020). A general process-based model for describing the metabolic shift in microbial cell cultures. *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 521368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.521368>

86. Manderson, D., Dempster, R., Chisti, Y. (2006). A recombinant vaccine against hydatidosis: Production of the antigen in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 173-182. doi: 10.1007/s10295-005-0046-3.
87. Tripathi, N. K., Shrivastava, A., Biswal, K. C., & Rao, P. V. L. (2011). Recombinant dengue virus type 3 envelope domain III protein from *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*, 6(5), 604-608. <https://doi.org/10.1002/biot.201000399>
88. Mazumdar, S., Sachdeva, S., Chauhan, V. S., & Yazdani, S. S. (2010). Identification of cultivation condition to produce correctly folded form of a malaria vaccine based on Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 33(3), 719-730.
89. Tripathi, N. K., Priya, R., & Shrivastava, A. (2014). Immunogenicity of *Escherichia coli* expressed envelope 2 protein of Chikungunya virus. *Bioengineered*, 5(3), 198-203. doi: 10.4161/bioe.28336
90. Wang, H., Wang, F., Wang, W., Yao, X., Wei, D., Cheng, H., & Deng, Z. (2015). Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS ONE*, 10(11), e0112777. doi: 10.1371/journal.pone.0112777
91. Castellanos-Mendoza, A., Castro-Acosta, R. M., Olvera, A., Zavala, G., Mendoza-Vera, M., García-Hernández, E., Alagón, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2016). Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 142. doi: 10.1186/s12298-016-0279-4
92. Tripathi, N. K., Priya, R., & Shrivastava, A. (2014). Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(11), 2461-2471.
93. Volontè, F., Pollegioni, L., Molla, G., Frattini, L., Marinelli, F., & Piubelli, L. (2010). Production of recombinant cholesterol oxidase containing covalently bound FAD in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 10(1), 33.

94. Tripathi, N. K., Priya, R., & Shrivastava, A. (2014). Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1 98(11), 2461-2471. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5426-4>
95. Tripathi, N. K. (2016). Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Reviews*, 3(3), 116-133. doi: 10.1002/cben.201600002
96. Huang, C.-J., Lin, H., & Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(4), 917-927. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>
97. Elbing, K. L., & Brent, R. (2019). Recipes and tools for culture of *Escherichia coli*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 125(1), e83. <https://doi.org/10.1002/cpmb.83>
98. Acumedia Technical Information. (2017). Tryptone (7351). Retrieved from [https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7351\\_pi.pdf](https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7351_pi.pdf)
99. M. Bonnet, J.C. Lagier, D. Raoult, S. Khelaifia. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 2020 Mar; 34: 100622. doi: 10.1016/j.nmni.2019.100622.
100. Omid Zarei, Siavoush Dastmalchi, Maryam Hamzeh-Mivehrouda. A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media. *Iran J Pharm Res.* 2016 Autumn; 15(4): 907–913.
101. МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ НАКАЗ 15.04.2005 № 170 Про затвердження методичних вказівок з мікробіологічної діагностики менінгококової інфекції та гнійних бактеріальних менінгітів. (Із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства охорони здоров'я № 2415 від 03.11.2021)

## ДОДАТКИ

## ДОДАТОК А

Ukrainian Journal of Natural Sciences № 9  
Український журнал природничих наук № 9



Ukrainian Journal of Natural Sciences  
№ 9  
Український журнал природничих наук  
№ 9

ISSN: 2786-6335 print  
ISSN: 2786-6343 online

UDC 579.663

DOI <https://doi.org/10.32782/naturaljournal.9.2024.2>

**OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIA FOR INDUSTRIAL CULTIVATION  
OF THE RECOMBINANT STRAIN *ESCHERICHIA COLI* BL21**

**I. M. Bobyr<sup>1</sup>, V. L. Bondarenko<sup>2</sup>, O. S. Iungin<sup>3</sup>**

*This study presents a comprehensive analysis of scientific literature published between 2019 and 2024, indexed in Web of Science and Scopus databases. The review focuses on identifying optimization strategies for culture media to enhance the industrial cultivation of Escherichia coli BL21 strain for the production of recombinant proteins. This strain is widely used in industry due to its lack of certain proteases, making it ideal for producing stable protein products. The research highlights key factors influencing protein expression and biomass growth, including carbon and nitrogen sources, trace elements, additional components, and pH levels. Altering these key factors can increase cell yield and product quality. The analysis revealed that optimizing the culture medium composition through the use of alternative carbon and nitrogen sources can significantly improve bacterial cell growth and impact the quantity and quality of the recombinant protein. Alcohols such as mannitol and glycerol, sugars like lactose, as well as sugar-containing by-products from the food industry can be used as alternative carbon sources (blackstrap molasses, corn-steep liquor and whey). Additionally, complex compounds like lignocellulose can be utilized. Many alternative carbon sources can also provide nitrogen. The use of alternative carbon and nitrogen sources, on the one hand, can reduce the cost of recombinant protein production and thus affect bioeconomy, but on the other hand, can influence metabolic pathways for the assimilation of other elements and alter the duration of growth phases, which is crucial for industrial microbial cultivation. Optimization of the culture medium has complex consequences, and this process should be considered holistically.*

*Key words: Escherichia coli BL21, media optimization, alternative carbon source, alternative nitrogen source, recombinant protein.*

<sup>1</sup> Chief technologist PrJSC «Indar»,  
Master Degree student  
(Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv)  
e-mail: [ibobyr@ukr.net](mailto:ibobyr@ukr.net)

ORCID: 0009-0006-2394-8189

<sup>2</sup> Laboratory Technologist, Kyiv City Clinical Hospital № 6,  
Master Degree student

(Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv)  
e-mail: [bondarpulemet@gmail.com](mailto:bondarpulemet@gmail.com)

ORCID: 0009-0002-4107-8368

<sup>3</sup> PhD, Associate Professor, Associate Professor at the Biotechnologies, Leather and Fur Department  
(Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv)

e-mail: [olgaungin@gmail.com](mailto:olgaungin@gmail.com)

ORCID: 0000-0001-8876-6075

## ОПТИМІЗАЦІЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ПРОМИСЛОВОГО КУЛЬТИВУВАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ШТАМУ *ESCHERICHIA COLI* BL21

I. М. Бобир, В. А. Вондаренко, О. С. Юнгін

В роботі відображено комплексний аналіз даних наукової літератури, опублікованої в період між 2019 і 2024 роками, відображено в виданнях, що індексуються в базах даних Web of Science та Scopus. Огляд літератури зосереджено на визначенні можливостей оптимізації поживного середовища для промислового культивування штаму *Escherichia coli* BL21 з метою отримання рекомбінантних білків. Вказаний штам широко використовується в промисловості. Відсутність в цьому штамі певних протеаз робить його ідеальним інструментом для отримання стабільних білкових продуктів. Дослідження звертає увагу на ключові фактори, що впливають на експресію білків та приріст біомаси, включаючи джерела карбону та нітрогену, мікроелементи та додаткові компоненти, а також значення рН поживного середовища. Результатом змін цих ключових факторів є підвищення кількості клітин та якості продукту. В результаті аналізу літератури встановлено, що оптимізація складу поживного середовища через використання альтернативних джерел карбону та нітрогену може значно підвищити врожай клітин штаму бактерії та впливати на якість та кількість рекомбінантного білку. Як альтернативні джерела карбону можуть бути використані спирти – манітол, гліцерин, цукри – лактоза, а також цукровмісні сполуки, що є відходами харчової промисловості (патока, кукурудзяний екстракт, сироватка). Крім того, можливе використання комплексних сполук – лігнінцелюлози. Часто альтернативні джерела карбону можуть слугувати і джерелами нітрогену. Використання альтернативних джерел карбону та нітрогену може, з одного боку, бути одним з біоекономічних факторів здешевлення виробництва рекомбінантних білків, а з іншого боку, може впливати на метаболічні шляхи засвоєння інших елементів, та змінювати тривалість фаз росту культури, що важливо за промислового культивування мікроорганізму. Оптимізація поживного середовища має комплексні наслідки, і саме так необхідно розглядати цей процес.

**Ключові слова:** *Escherichia coli* BL21, оптимізація середовища, альтернативне джерело вуглецю, альтернативне джерело азоту, рекомбінантний білок.

### Introduction

*Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 is a widely utilized bacterial strain for heterologous protein expression. It's a derivative of the *E. coli* B lineage and has been engineered to lack several proteases, enzymes that break down proteins. This characteristic is crucial for maintaining the stability of the target protein being produced. Due to its favorable characteristics, such as ease of cultivation, high growth rate, and the ability to express a broad spectrum of proteins, *E. coli* BL21 has become an indispensable tool in biotechnology.

The efficiency of protein expression in *E. coli* BL21 is significantly influenced by the composition of the culture medium. Optimization of the culture medium composition can lead to a substantial increase in protein yield, improved quality, and reduced production costs.

A considerable body of research has been dedicated to the optimization of culture media for *E. coli* cultivation. These studies have demonstrated that the composition of the culture medium can significantly impact protein expression, including yield, solubility, activity, and complexity.

The aim of this study is to analyze scientific publications on the optimization

of culture media for industrial cultivation of the recombinant strain *Escherichia coli* BL21, published between 2019 and 2024 in peer-reviewed journals indexed in the *Web of Science* and *Scopus* databases.

### Material and methods

The search of scientific literature published between 2019 and 2024, indexed in *Web of Science* and *Scopus* databases for this review was conducted using the following primary keywords: «*Escherichia coli* BL21», «recombinant protein expression», «culture medium optimization», and «industrial cultivation» in Google scholar and Connected papers publication resources. Additionally, supplementary keywords such as «nutrient composition», «metabolic engineering» and «fermentation parameters» were used.

In order to select relevant publications, the following search strategies were used:

1) Phrase searching – keywords were enclosed in quotation marks to search for exact matches;

2) Use of Boolean operators AND, OR, and NOT to combine keywords and refine the search;

3) Use of the wildcard character (\*) to substitute for one or more unknown characters within a keyword.

## Results

*Escherichia coli* BL21 is a widely used bacterial strain for various biotechnological applications, including protein production and biofuel synthesis. Some of the key factors that influence protein expression in *E. coli* BL21 include carbon sources, nitrogen sources, trace elements, and pH. Studies have shown that supplementing defined media with yeast extract can reduce lag phase and increase biomass production (Shukla & Mishra, 2021). Optimization techniques like Plackett-Burman and Box-Behnken designs have been used to identify significant factors, such as yeast extract and mineral concentrations, leading to increased enzyme production (Duan et al., 2020). The choice of expression system, including promoter strength and plasmid copy number, significantly impacts recombinant protein production (Lozano Terol et al., 2021). Balancing these factors is essential to maximize soluble protein expression while minimizing metabolic burden. Optimized media and expression systems can result in higher protein yields, improved stability, and enhanced product specificity, which are crucial for industrial-scale production of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (Shahzadi et al., 2021).

**Carbon sources.** Manipulating carbon and nitrogen sources can increase recombinant protein production in *E. coli* BL21 (Lozano Terol et al., 2019). Traditionally, glucose and ammonium salts have been the primary carbon and nitrogen sources used for *E. coli* cultivation. However, exploring alternative carbon and nitrogen sources can offer several advantages, such as reduced cost, improved sustainability, and the potential to enhance recombinant protein production. One promising alternative carbon source is glycerol, a byproduct of the biodiesel industry. Glycerol has been shown to support robust growth of *E. coli* BL21 and can be utilized as a carbon source for the production of various recombinant proteins. Furthermore, the use of glycerol as a carbon source has been reported to improve the quality and yield of recombinant proteins in *E. coli*. (Lozano Terol et al., 2019)

Besides, Höhmann et al. (2024) investigated glycolate as a sole carbon source, observing that *E. coli* BL21 required extensive adaptation time but eventually reached growth rates comparable to other strains.

Lactose, another inexpensive and renewable carbon source, has also been explored as an alternative to glucose for *E. coli* BL21

cultivation. Lactose-based media can induce the *lac* operon, leading to improved recombinant protein production in *E. coli* BL21 strains engineered for lactose utilization. Moreover, combining lactose with other carbon sources, such as glucose or glycerol, can enhance bacterial growth rates and biomass production. Lactose, employed at a concentration of 10% (w/v), served as the carbon source to optimize recombinant truncated SpA expression in *E. coli*.

Previous research has shown that modifying the signal peptide, which guides the translocation of recombinant proteins across the cell membrane, can significantly improve the secretory production of these proteins in *E. coli* BL21. Continuous biomanufacturing processes utilizing *E. coli* often encounter a decline in productivity after approximately four to five days of cultivation, with the specific timeframe influenced by dilution rate. Glucose is a commonly employed carbon source for *E. coli* cultivation and is frequently paired with isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for protein induction in these systems (Kittler et al., 2020). Khani & Bagheri (2020) proposed skimmed milk as an alternative to IPTG for inducing protein expression, reporting high levels of recombinant protein production and improved bacterial growth rates. Supplementation of critical amino acids (AAs) improves uptake rate of glycerol and lactose in wild type *E. coli* BL21(DE3) in defined medium. A feeding strategy of mixed glycerol-lactose feed along with supplement of critical AAs enhances recombinant production of pramlintide multimer. High cell density cultivation of *E. coli* using mixed glycerol-lactose feed and critical AAs supplement resulted in final cell density of  $52.2 \pm 0.90$  g L<sup>-1</sup> (Kumar et al., 2021)

Autoinduction using lactose as an inducer, combined with glycerol, glucose, and glycine as carbon sources, significantly enhanced nanobody expression compared to traditional LB medium and also reduce impurities and toxicity compared to IPTG (Rezaei et al., 2020). Surprisingly, acetate, typically considered detrimental, proved effective as a carbon source when coupled with yeast extract, resulting in high yields of a sweet protein (Leone et al., 2015). The choice of carbon and nitrogen sources greatly impacts protein production, with complex medium supplemented with glycerol showing promising results. Additionally, genetic manipulation of acetate metabolism, particularly the deletion of the *ackA* gene,



led to a fivefold increase in protein yield and reduced acetate accumulation (Lozano Terol et al., 2019). These findings highlight the importance of optimizing carbon sources and strain engineering to enhance recombinant protein production in *E. coli* BL21. Optimizing carbon sources, including glycerol, glucose, and lactose, can significantly enhance protein yield (Rezaei et al., 2020). The choice of expression system, including promoter strength and plasmid copy number, impacts protein production, with a balance needed to maximize soluble protein expression (Lozano Terol et al., 2021). While glucose-fed continuous cultivations show a productivity drop over time, glycerol-fed systems demonstrate a «Lazarus effect», recovering productivity after approximately 150 hours of induction (Kittler et al., 2020). This phenomenon may enable stabilization of continuous *E. coli* cultivation. Additionally, galactose utilization in *E. coli* BL21(DE3) might cause fluctuating productivity due to its weak induction properties (Li et al., 2021). In glucose and yeast extract combination the strain reached maximum viable cell count of 11.8 log CFU ml<sup>-1</sup> and biomass yield of 5.25 g L<sup>-1</sup> at the end of 24 hours. The next best combination with malic acid and yeast extract showed cell count of 9.25 log CFU ml<sup>-1</sup> and biomass yield of 4.13 g L<sup>-1</sup> at 24 h time. Mannitol was identified as an effective carbon source that could increase the production of CypA protein in *E. coli* BL21 recombinant strain cultivation. Interestingly, it was shown that glutamate can serve as an alternative for both carbon and nitrogen source for high production of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (Chiang et al., 2022). More complex compounds could be used as well like, for example, the study (Wang et al., 2021) successfully demonstrated the production of bovine and human  $\alpha$ -casein proteins in *E. coli* using lignocellulosic sugars as the carbon source. This proof-of-concept is a promising starting point for producing high-value food or feed proteins from bulk residual biomass like lignocellulose, supporting a sustainable bioeconomy.

**Nitrogen sources.** While these studies focused on carbon sources, Nagappa et al. (2022) showed that common microbiology rich media (tryptone, peptone, yeast extract, and casamino acids) can effectively replace commercial amino acid sources in cell-free expression systems. However, amino acid composition of cell culture media affects trace metal tolerance and cholesterol synthesis in *E. coli* BL21 (Rawat et al., 2023). The change

in amino acid composition affected not only the expected pathways related to cell cycle and amino acid response, but also had an unexpected impact on genes involved in zinc transport. Among potential nitrogen sources that could be used for recombinant strain *E. coli* BL21 are peptone, tryptone, cheese whey, corn steep liquor. The use of some byproducts such as blackstrap molasses, corn-steep liquor and cheese whey, as an alternative for carbon and nitrogen sources of medium, were found to enhance the cell growth. In the study (Carranza-Saavedra et al., 2021) deproteinized whey as a source of carbon and nitrogen provided the highest specific growth rate of recombinant *E. coli*. Deng et al. (2022) achieved high-level expression of nitrile hydratase in *E. coli* BL21 through systematic optimization of fermentation conditions.

**Trace elements and supplements.** To ensure efficient cultivation and maximize the yields of desired products, researchers have explored various strategies to optimize the growth conditions and medium composition for *E. coli* BL21. Specifically, the supplementation of trace elements and other key nutrients has been identified as a critical factor in supporting the growth and productivity of *E. coli* BL21 cultures (Basiony et al., 2022). These micronutrients play essential roles in cellular metabolism, enzyme activity, and overall physiological function. Specifically, trace elements such as iron, magnesium, calcium, and zinc serve as cofactors for various enzymes, while vitamins like thiamine, riboflavin, and biotin act as co-enzymes, co-substrates, and regulators of metabolic pathways (Ge et al., 2023).

The appropriate selection and supplementation of these micronutrients can have a significant impact on the growth, viability, and productivity of *E. coli* BL21. For instance, insufficient levels of iron can lead to reduced cell growth and impaired respiration, as the metal is a critical component of enzymes involved in electron transport and energy production. On the other hand, optimizing the concentration of iron and other trace elements in the medium has been shown to enhance cell viability and improve the secretion of recombinant proteins, as these micronutrients provide the necessary support for efficient growth (Corless et al., 2020). Interestingly, the unintentional introduction of trace elements into the media lends further credence to this idea. Thus, trace impurities in the reagents used to prepare M9 minimal medium affected physiological activities of *E. coli*, such as cell growth,

substrate consumption, and byproduct formation (Soma et al., 2023).

One prominent study has demonstrated the potential of an integrated modeling approach to rationally optimize the bioprocess conditions for *E. coli* BL21 cultivation (Yeoh et al., 2020). The researchers developed a comprehensive model that coupled the kinetics of the cell factory with the computational fluid dynamics of the bioreactor, allowing them to capture the spatiotemporal distributions of bioproduction. Through this model-driven approach, the researchers were able to perform full-factorial predictions to identify the optimal operating conditions that yielded a bioconversion efficiency of 94% when using ferulic acid as the precursor, which represents one of the highest reported values for recombinant *E. coli* (Yeoh et al., 2020). In addition to these model-based optimization strategies, recent studies have also explored the role of specific trace elements and supplements in enhancing the viability and productivity of *E. coli* BL21 cultures. The study (Sapavatu & Kakkerla, 2023) found that a rich media combined with the trace element zinc sulfate was effective for achieving high cell density growth and high expression of the target protein (CRM197) in recombinant *E. coli*. Vitamins as well as metals could be used for media optimization. Addition of plant extracts and liposomal vitamin K1 can stimulate protein synthesis (Motronenko et al., 2020). Most defined media formulations for *E. coli* cultivation already include a basic vitamin mix (often referred to as vitamin B complex) to support general growth and metabolism. However, the specific impact of

individual vitamins on recombinant protein yield and quality in *E. coli* BL21 is still needed to be studied.

Besides nutrient availability, pH and buffering capacity also play a role in cell and product yields. Optimal pH conditions are essential for enzyme activity, protein folding, and overall cellular homeostasis. Deviations from the optimal pH can lead to reduced growth rates, decreased protein yield, and even cell death. The ideal pH range for *E. coli* BL21 is typically between 6.8 and 7.2. Augmenting the buffering capacity of M9 minimal medium resulted in approximately a twofold enhancement of heterologously expressed protein yield in *E. coli* BL21(DE3) cells (Azatian et al., 2019). The protein yield was correlated with the ability of the medium to resist changes in pH over time, with the most buffered media producing the highest yields.

#### Conclusions

This study demonstrates the critical role of culture medium optimization in enhancing recombinant protein production in *E. coli* BL21. The possible carbon sources for media optimization could be lactose, glycerol and mixture of those two. The supplement of cas-aminoacids as nitrogen source and protein inducers could have valuable effect in industrial environment. Besides, an important thing is to control pH level and buffer capacity. The findings provide valuable insights for developing efficient both academic and industrial applications, while also highlighting certain limitations that must be considered.

#### Bibliography

- Azatian S.B., Kaur N., Latham M.P. Increasing the buffering capacity of minimal media leads to higher protein yield. *Journal of biomolecular NMR*. 2019. № 73. P. 11–17. <https://doi.org/10.1007/s10858-018-00222-4>.
- Basiony M., Ouyang L., Wang D., Yu J., Zhou L., Zhu M., ... Zhang L. Optimization of microbial cell factories for astaxanthin production: Biosynthesis and regulations, engineering strategies and fermentation optimization strategies. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2022. № 7 (2). P. 689–704. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.01.002>.
- Chiang C.J., Hu M.C., Ta T., Chao Y.P. Glutamate as a non-conventional substrate for high production of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 2022. № 13. 991963. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.991963>.
- Corless E.L., Mettert E.L., Kiley P.J., Antony E. (2020). Elevated expression of a functional Suf pathway in *Escherichia coli* BL21 (DE3) enhances recombinant production of an iron-sulfur cluster-containing protein. *Journal of Bacteriology*. 2020. № 202 (3). p. 10–1128. <https://doi.org/10.1128/jb.00496-19>.
- Deng S., Zhu S., Zhang X., Sun X., Ma X., Su E. High-level expression of nitrile hydratase in *Escherichia coli* for 2-amino-2, 3-dimethylbutyramide synthesis. *Processes*. 2022. № 10 (3). p. 544. <https://doi.org/10.3390/pr10030544>.

Duan M., Wang Y., Yang G., Li J., Wan Y., Deng Y., Mao Y. High-level production of  $\gamma$ -cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3): culture medium optimization, enzymatic properties characterization, and product specificity analysis. *Annals of Microbiology*. 2020. № 70. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01610-8>.

Ge J., Wang X., Bai Y., Wang Y., Wang Y., Tu T., ... Zhang J. Engineering *Escherichia coli* for efficient assembly of heme proteins. *Microbial Cell Factories*. 2023. № 22 (1). P. 59. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02067-5>.

Hari Priya S.K., Vijila K. Effect of Different Carbon Sources and Growth Supplements on Growth and Biomass Production of Bioinoculant *Azospirillum lipoferum* Az204. *International Journal of Plant & Soil Science*. 2023. № 35 (20). p. 467–473. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i203828>.

Höhmann S., Briol T.A., Ihle N., Frick O., Schmid A., Bühler B. Glycolate as alternative carbon source for *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2024. № 381. P. 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.01.001>.

Khani M.H., Bagheri M. Skimmed milk as an alternative for IPTG in induction of recombinant protein expression. *Protein expression and purification*. 2020. № 170. 105593. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105593>.

Kittler S., Kopp J., Veelenturf P.G., Spadiut O., Delvigne F., Herwig C., Slouka C. The Lazarus *Escherichia coli* effect: Recovery of productivity on glycerol/lactose mixed feed in continuous bio-manufacturing. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2020. № 8. P. 993. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00993>.

Kumar J., Chauhan A.S., Gupta J.A., Rathore A.S. Supplementation of critical amino acids improves glycerol and lactose uptake and enhances recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*. 2021. № 16 (8). 2100143. <https://doi.org/10.1002/biot.202100143>.

Leone S., Sannino F., Tutino M.L., Parrilli E., Picone D. Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. *Microbial cell factories*. 2015. № 14. p. 1. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0299-0>.

Li Z., Geffers R., Jain G., Klawonn F., Kökpınar Ö., Nimtz M., ... Rinas U. Transcriptional network analysis identifies key elements governing the recombinant protein production provoked reprogramming of carbon and energy metabolism in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Engineering Reports*. 2021. № 3 (9). e12393. <https://doi.org/10.1002/eng2.12393>.

Lozano Terol G., Gallego-Jara J., Sola Martínez R.A., Martínez Vivancos A., Cánovas Díaz M., de Diego Puente T. Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in microbiology*. 2021. № 12. 682001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>.

Motronenko V., Lutsenko T., Galkin A., Gorshunov Y., Solovjova V. Optimization of the culture medium composition to increase the biosynthesis of recombinant human interleukin-7 in *Escherichia coli*. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2020. № 9 (4). 761 p. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.761-768>.

Nagappa L.K., Sato W., Alam F., Chengan K., Smales C.M., Von Der Haar T., ... Moore S.J. A ubiquitous amino acid source for prokaryotic and eukaryotic cell-free transcription-translation systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022. № 10. 992708. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.992708>.

Rawat J., Bhambrani A., Pandey U., Banerjee S., Pillai B., Gadgil M. Amino acid abundance and composition in cell culture medium affects trace metal tolerance and cholesterol synthesis. *Biotechnology Progress*. 2023. № 39 (1). e3298. <https://doi.org/10.1002/btpr.3298>.

Sapavatu S.N., Kakkerla A. Media selection, optimization for the expression of diphtheriae toxin in recombinant *E.coli*. *IJBPA*, June, Special Issue, 2023. № 12 (6). P. 307–317. <https://doi.org/10.31032/ijbpas/2023/12.6.1045>.

Shukla S., Mishra D. Media Optimization for Production of Recombinant Carrier Protein (CRM 197) in *Escherichia coli*. *Journal of Scientific Research*. 2021. № 13 (1). <https://doi.org/10.3329/JSR.V13I1.48996>.

Shahzadi I., Al-Ghamdi M.A., Nadeem M.S., Sajjad M., Ali A., Khan J.A., Kazmi I. Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Scientific reports*. 2021. № 11 (1), 7145. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86000-z>.

Soma Y., Tominaga S., Tokito K., Imado Y., Naka K., Hanai T., ... Bamba T. Trace impurities in sodium phosphate influences the physiological activity of *Escherichia coli* in M9 minimal medium. *Scientific reports*. 2023. № 13 (1), 17396. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44526-4>.

Rezaei L., Shojaosadati S.A., Farahmand L., Moradi-Kalbolandi S. Enhancement of extracellular bispecific anti-MUC1 nanobody expression in *E. coli* BL21 (DE3) by optimization of temperature and carbon sources through an autoinduction condition. *Engineering in life sciences*. 2020. № 20 (8). P. 338–349. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900158>.

Wang Y., Kubiczek D., Horlamus F., Raber H.F., Hennecke T., Einfalt D., ... Rosenau F. Bioconversion of lignocellulosic 'waste' to high-value food proteins: Recombinant production of bovine and human  $\alpha$ S1-casein based on wheat straw lignocellulose. *GCB Bioenergy*. 2021. № 13 (4). P. 640–655. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12791>.

Yeoh J.W., Jayaraman S.S.O., Tan S.G.D., Jayaraman P., Holowko M.B., Zhang J., ... Poh C.L. A model-driven approach towards rational microbial bioprocess optimization. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021. № 118 (1). p. 305–318. <https://doi.org/10.1002/bit.27571>.

Zapata Montoya J.E., Carranza Saavedra D., Sánchez Henao C.P. Kinetic analysis and modeling of L-valine production in fermentation batch from *E. coli* using glucose, lactose and whey as carbon sources. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00642> in English.

### References

Azatian, S.B., Kaur, N., & Latham, M.P. (2019). Increasing the buffering capacity of minimal media leads to higher protein yield. *Journal of biomolecular NMR*, 73, 11–17. <https://doi.org/10.1007/s10858-018-00222-4> [in English].

Basiony, M., Ouyang, L., Wang, D., Yu, J., Zhou, L., Zhu, M., ... & Zhang, L. (2022). Optimization of microbial cell factories for astaxanthin production: Biosynthesis and regulations, engineering strategies and fermentation optimization strategies. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 7 (2), 689–704. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.01.002> [in English].

Chiang, C.J., Hu, M.C., Ta, T., & Chao, Y.P. (2022). Glutamate as a non-conventional substrate for high production of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 991963. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.991963> [in English].

Corless, E.L., Mettert, E.L., Kiley, P.J., & Antony, E. (2020). Elevated expression of a functional Suf pathway in *Escherichia coli* BL21 (DE3) enhances recombinant production of an iron-sulfur cluster-containing protein. *Journal of Bacteriology*, 202 (3), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/jb.00496-19> [in English].

Deng, S., Zhu, S., Zhang, X., Sun, X., Ma, X., & Su, E. (2022). High-level expression of nitrile hydratase in *Escherichia coli* for 2-amino-2, 3-dimethylbutyramide synthesis. *Processes*, 10 (3), 544. <https://doi.org/10.3390/pr10030544> [in English].

Duan, M., Wang, Y., Yang, G., Li, J., Wan, Y., Deng, Y., & Mao, Y. (2020). High-level production of  $\gamma$ -cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3): culture medium optimization, enzymatic properties characterization, and product specificity analysis. *Annals of Microbiology*, 70, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01610-8> [in English].

Ge, J., Wang, X., Bai, Y., Wang, Y., Wang, Y., Tu, T., ... & Zhang, J. (2023). Engineering *Escherichia coli* for efficient assembly of heme proteins. *Microbial Cell Factories*, 22 (1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02067-5> [in English].

Hari Priya, S.K., & Vijila, K. (2023). Effect of Different Carbon Sources and Growth Supplements on Growth and Biomass Production of Bioinoculant *Azospirillum lipoferum* Az204. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35 (20), 467–473. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i203828> [in English].

Höhmann, S., Briol, T. A., Ihle, N., Frick, O., Schmid, A., & Bühler, B. (2024). Glycolate as alternative carbon source for *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 381, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.01.001> [in English].

Khani, M.H., & Bagheri, M. (2020). Skimmed milk as an alternative for IPTG in induction of recombinant protein expression. *Protein expression and purification*, 170, 105593. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105593> [in English].

Kittler, S., Kopp, J., Veelenturf, P.G., Spadiut, O., Delvigne, F., Herwig, C., & Slouka, C. (2020). The Lazarus *Escherichia coli* effect: Recovery of productivity on glycerol/lactose mixed feed in continuous biomanufacturing. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 993. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00993> [in English].

Kumar, J., Chauhan, A.S., Gupta, J.A., & Rathore, A.S. (2021). Supplementation of critical amino acids improves glycerol and lactose uptake and enhances recombinant protein production in

*Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*, 16 (8), 2100143. <https://doi.org/10.1002/biot.202100143> [in English].

Leone, S., Sannino, F., Tutino, M.L., Parrilli, E., & Picone, D. (2015). Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. *Microbial cell factories*, 14, 1. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0299-0> [in English].

Li, Z., Geffers, R., Jain, G., Klawonn, F., Kökpınar, Ö., Nimtz, M., ... & Rinas, U. (2021). Transcriptional network analysis identifies key elements governing the recombinant protein production provoked reprogramming of carbon and energy metabolism in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Engineering Reports*, 3 (9), e12393. <https://doi.org/10.1002/eng2.12393> [in English].

Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R.A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in microbiology*, 12, 682001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001> [in English].

Motronenko, V., Lutsenko, T., Galkin, A., Gorshunov, Y., & Solovjova, V. (2020). Optimization of the culture medium composition to increase the biosynthesis of recombinant human interleukin-7 in *Escherichia coli*. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9 (4), 761. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.761-768> [in English].

Nagappa, L.K., Sato, W., Alam, F., Chengan, K., Smales, C.M., Von Der Haar, T., ... & Moore, S.J. (2022). A ubiquitous amino acid source for prokaryotic and eukaryotic cell-free transcription-translation systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 992708. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.992708> [in English].

Rawat, J., Bhambri, A., Pandey, U., Banerjee, S., Pillai, B., & Gadgil, M. (2023). Amino acid abundance and composition in cell culture medium affects trace metal tolerance and cholesterol synthesis. *Biotechnology Progress*, 39 (1), e3298. <https://doi.org/10.1002/btpr.3298> [in English].

Sapavatu, S.N., & Kakkerla, A. (2023). Media selection, optimization for the expression of diphtheriae toxoid in recombinant *E.coli*. *IJBPAS*, June, Special Issue, 12 (6), 307–317. <https://doi.org/10.31032/ijbpas/2023/12.6.1045> [in English].

Shukla, S., & Mishra, D. (2021). Media Optimization for Production of Recombinant Carrier Protein (CRM 197) in *Escherichia coli*. *Journal of Scientific Research*, 13 (1). <https://doi.org/10.3329/JSR.V13I1.48996> [in English].

Shahzadi, I., Al-Ghamdi, M.A., Nadeem, M.S., Sajjad, M., Ali, A., Khan, J.A., & Kazmi, I. (2021). Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Scientific reports*, 11 (1), 7145. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86000-z> [in English].

Soma, Y., Tominaga, S., Tokito, K., Imado, Y., Naka, K., Hanai, T., ... & Bamba, T. (2023). Trace impurities in sodium phosphate influences the physiological activity of *Escherichia coli* in M9 minimal medium. *Scientific reports*, 13 (1), 17396. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44526-4> [in English].

Rezaei, L., Shojaosadati, S.A., Farahmand, L., & Moradi-Kalbolandi, S. (2020). Enhancement of extracellular bispecific anti-MUC1 nanobody expression in *E. coli* BL21 (DE3) by optimization of temperature and carbon sources through an autoinduction condition. *Engineering in life sciences*, 20 (8), 338–349. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900158> [in English].

Wang, Y., Kubiczek, D., Horlamus, F., Raber, H.F., Hennecke, T., Einfalt, D., ... & Rosenau, F. (2021). Bioconversion of lignocellulosic 'waste' to high-value food proteins: Recombinant production of bovine and human  $\alpha$ S1-casein based on wheat straw lignocellulose. *GCB Bioenergy*, 13 (4), 640–655. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12791> [in English].

Yeoh, J.W., Jayaraman, S.S.O., Tan, S.G.D., Jayaraman, P., Holowko, M.B., Zhang, J., ... & Poh, C.L. (2021). A model-driven approach towards rational microbial bioprocess optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, 118 (1), 305–318. <https://doi.org/10.1002/bit.27571> [in English].

Zapata Montoya, J.E., Carranza Saavedra, D., & Sánchez Henao, C.P. (2021). Kinetic analysis and modeling of L-valine production in fermentation batch from *E. coli* using glucose, lactose and whey as carbon sources. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00642> [in English].

Отримано: 26.07.2024

Прийнято: 19.08.2024

## ДОДАТОК Б

**Секція 2.  
Екологічні аспекти промислових  
технологій в галузях економіки**

<sup>1,2</sup>Бобир І., <sup>1</sup>Юнгін О., кандидат біологічних наук  
<sup>1</sup>ПрАТ «ІНДАР»

<sup>2</sup>Київський національний університет технологій та дизайну

**ОПТИМІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ  
ПРОМИСЛОВОГО КУЛЬТИВУВАННЯ РЕКОМБІНАНТНОЇ  
*ESCHERICHIA COLI***

*E. coli* є одним з найпоширеніших мікроорганізмів, що широко використовують в біотехнології рекомбінантних ДНК як систему для виробництва різних продуктів, таких як ферменти, антибіотики, інсулін та інші біологічно активні речовини. Мета покращення та оптимізації такого виробництва полягає у виробництві більшої кількості функціонального продукту на одиницю об'єму на одиницю часу. Для *E. coli* або будь-якої іншої системи ферментації рівень внутрішньоклітинного накопичення рекомбінантного білка залежить від кінцевої щільності клітин та питомої активності білка. Розроблено кілька методів для збільшення виробництва рекомбінантного білка, які можна класифікувати за чотирма стратегіями: (1) вибір поживного середовища, (2) режим культивування, (3) розробка штаму та (4) контроль системи експресії [1]. Промислове культивування *E. coli* потребує оптимального поживного середовища, яке забезпечуватиме ріст продуцента та його максимальну продуктивність. Процес оптимізації середовища є штамозалежним та має забезпечувати потреби мікроорганізму для синтезу відповідного продукту.

Мета нашої роботи полягала в узагальненні літературних даних щодо розробки оптимального поживного середовища для промислового культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21, що є продуцентом рекомбінантного білку, з урахуванням його складу, економічної ефективності, умов культивування згідно з технологічною схемою виробництва та екологічних аспектів. Для цього було опрацьовано більше 30 наукових дослідних статей, що були опубліковані за період 2012-2023 роки та відображалися у пошуку через систему Google Scholar.

В результаті було узагальнено, що для культивування *E. coli* BL21 широко використовують такі середовища як Luria-Bertani (LB) [2], Mann-Rogosa [3] та багато інших [4]. Різні середовища, такі як LB, TB і 2YT використовують для оптимізації концентрації білка шляхом додавання

сольового буфера для підтримки рН для оптимального росту бактерій. Додавання кофакторів або простетичних груп має вирішальне значення для стабільності білка, відповідного згортання та розчинності білка [1]. Крім того, оптимізація складу середовища має вирішальне значення за незмінності інших параметрів культивування, і може призводити до підвищення виходу продукту більше ніж в 2 рази [5].

Таким чином, було показано перспективність оптимізації середовища як одного з бюджетних факторів для підвищення ефективності виробництва рекомбінантних білків.

#### Список використаної літератури:

1. Maksum I.P., Latifah F.P.U., Nabel A., Sriwidodo S., Lestari N.F., Azizah M.I. and Utami D.F. An Overview of Culture Conditions for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2023.10. №1. P.864-875. URL: [https://www.biotechrep.ir/article\\_170140.html](https://www.biotechrep.ir/article_170140.html) (Дата звернення: 09.05.2024)
2. Son M.S. and Taylor R.K. Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. *Current Protocols in Microbiology*. 2012. 27. №1. P.5A-4. URL: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780471729259.mc05a04s27> (Дата звернення: 09.05.2024)
3. Kim S., Jeong H., Kim E.Y., Kim J.F., Lee S.Y. and Yoon S.H. Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Nucleic acids research*. 2017. 45. №9. P.5285-5293. URL: <https://academic.oup.com/nar/article/45/9/5285/3097906> (Дата звернення: 09.05.2024)
4. Jing J., Chen Y., Sheng L. and Wu M. Optimized production of insulin variant, a recombinant platelet aggregation inhibitor, by high cell-density fermentation of recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2018. № 152. P.7-12. URL: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592818302869?casa\\_token=BhGaLPjz5IAAAAAA:37ricQkbmqhobSHL\\_qGsULsoYGpiRMHCg1JaZhgyvifliqooKebCc4dAtAEvh\\_cMp\\_b-p9GGYjqOI](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592818302869?casa_token=BhGaLPjz5IAAAAAA:37ricQkbmqhobSHL_qGsULsoYGpiRMHCg1JaZhgyvifliqooKebCc4dAtAEvh_cMp_b-p9GGYjqOI) (Дата звернення: 09.05.2024)
5. Ranjbari J., Babaeipour V., Vahidi H., Moghimi H., Mofid M.R., Namvaran M.M. and Jafari S. Enhanced production of insulin-like growth factor I protein in *Escherichia coli* by optimization of five key factors. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2015.14. №3. P.907. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4518120/> (Дата звернення: 09.05.2024)