

І. М. Волошина, канд. техн. наук, доцент, І. О. Грецький, канд. біол. наук, доцент,
О. Р. Мокроусова, д-р техн. наук, професор, Д. О. Хейломський, магістр

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ ВІДМИВКИ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН ТА ТІЛЕЦЬ ВКЛЮЧЕННЯ У ВИРОБНИЦТВІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНСУЛІНУ ЛЮДИНИ

Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, Україна

Ключові слова: рекомбінантний інсулін, біопроекти, оптимізація, сепарація, культура бактеріальних клітин, тільця включення, відмивка.

Вступ. Біотехнологія зробила революцію в різних сферах промисловості двадцятого сторіччя [1]. Її вплив сьогодні прослідковується від створення продуктів харчування [2, 3] або розробки та доставки ліків [4, 5, 6] до створення споживчих товарів. Технології рекомбінантної ДНК знайшли активне застосування в медичній галузі шляхом розробки та отримання лікарських засобів на основі терапевтичних білків, які складно отримувати з природних джерел. Терапевтичні білки мають досить різноманітні медичні застосування [7–11]: наприклад, інсулін людини для лікування діабету, еритропоетин для лікування анемії та хронічної ниркової недостатності, інтерферони для лікування або уповільнення прогресування розсіяного склерозу, вакцини для лікування гепатиту В, інтерлейкін-2 для регуляції імунної відповіді шляхом стимуляції росту та диференціації Т-клітин і інших імунних клітин, проурокиназа використовується як тромболітик для розчинення коронарних тромбів, тканинний активатор плазміногену (фермент) для тромболітичної терапії, тобто для розчинення тромбів при інфаркті міокарда, інсульти, легеневої емболії, а також багато різних видів моноклональних антитіл для діагностики та можливого лікування раку молочної залози та легенів, і це лише деякі з них. Багатовекторність та інтенсивність розвитку біотехнологій на основі рекомбінантної ДНК потребує завжди оперативного та ефективного удосконалення важливих технологічних процесів та впровадження обладнання з необхідними функціями та параметрами роботи.

Постановка проблеми. Сучасні технології виробництва рекомбінантного інсуліну людини ґрунтуються на специфічних біопроектих, для яких знайшли ефективне використання бактерії *Escherichia coli* (далі – *E. coli*) і *Bacillus subtilis* [12, 13]. Такі бактерії використовуються як клітини-господарі для техніки рекомбінантної ДНК. *E. coli* має міцну клітинну стінку з зовнішньою і внутрішньою мембраною. Зазвичай *E. coli* має видовжену форму з розмірами 3–5 мкм в довжину і 1 мкм в ширину. Терапевтичний білок може експресуватися цими клітинами-господарями або організмами за допомогою рекомбінантної ДНК. Білок, що отримується із зазначених бактерій, може залишатися в клітині (внутрішньоклітинний) або секретуватися назовні клітини (позаклітинний). Представлений біосинтез забезпечує ефективну інженерну гнучкість, специфічність, універсальність, надійність та економічну ефективність. На жаль, білок, що експресується в результаті біопроектих, знаходиться в дуже малих кількостях, але знаходиться у великому об'ємі суспензії, тобто має низьку концентрацію. В даному випадку слід вказати на існуючі ключові перешкоди в методах рекомбінантної ДНК для

отримання терапевтичного білка [14], які відповідно формулюють головні задачі для вирішення. Перша, це відновлення концентрації (концентрування) білка після ферментації шляхом розділення, та друга – забезпечення високої чистоти білкового продукту за допомогою очищення. Зазначені задачі в представленій біофармацевтичній технології, в основному, можуть бути вирішені оптимізацією процесів сепарації та очищення бактеріальних клітин та тілець включень.

Тому *об'єктом дослідження* є процеси відмивки бактеріальних клітин штаму генно-модифікованого штаму-продуценту рекомбінантного інсуліну людини на основі *Escherichia coli BL21* від компонентів культурального середовища, а також відмивки, виділених в результаті руйнування зазначених бактеріальних клітин тілець включення (ТВ) від компонентів цитоплазми та клітинного дебрису.

Предметом дослідження є режимів роботи відцентрового сепаратора в процесі відмивки бактеріальних клітин штаму-продуценту рекомбінантного інсуліну людини на основі *E.coli BL21* від компонентів культурального середовища, відмивки ТВ, виділених в результаті руйнування зазначених бактеріальних клітин, від компонентів цитоплазми та клітинного дебрису.

Мета роботи – оптимізація параметрів відмивання тілець включень для підвищення якості відмивки, зменшення втрат цільового продукту та покращення технологічності проведення подальшої стадії даунстрім-процесу – розчинення тілець включень.

Основна частина. Оптимізація режимів роботи відцентрових сепараторів є ключовим завданням на багатьох стадіях біотехнологічних процесів виробництва, особливо у виробництві рекомбінантного інсуліну людини. Найважливішими факторами, що визначають ефективність сепарації, є швидкість подачі стартової суміші та часовий інтервал між автоматичними вивантаженнями барабану (для сепараторів з автоматичним вивантаженням). Правильно підібране співвідношення цих величин забезпечує досягнення прийняттого рівня очищення та запобігає надмірним втратам продукту. Як наслідок, подальший перебіг процесів розчинення відмитих ТВ і рефолдінгу стає більш технологічним і призводить до кращих виходів більш чистого рефолдованого гібридного білка.

Відповідно до напряму дослідження основними критеріями оптимізації процесу сепарації визначено рівень втрат та ступень очищення відмитих ТВ.

Визначення параметрів простору дизайну:

Процес виробництва кожної серії АФІ рекомбінантного інсуліну людини на ділянці ферментації охоплює кілька операцій відцентрової сепарації, зокрема:

- I Сепарація: відділення клітинної маси від культурального середовища;
- II Сепарація: відмивка клітинної маси водою очищеною;
- III Сепарація: відділення ТВ та незруйнованих клітин від клітинного дебрису та дезінтеграційного середовища після першої дезінтеграції;
- IV Сепарація: відділення ТВ від клітинного дебрису та дезінтеграційного середовища після другої дезінтеграції;
- V Сепарація: перша відмивка ТВ від клітинного дебрису водою очищеною;
- VI Сепарація: друга відмивка ТВ від клітинного дебрису водою очищеною.

Для визначення оптимальних параметрів сепарацій розроблено оптимізований план відбору проб на основі редукованого центрального плану дослідження поверхні відгуку для двофакторного експерименту [15].

Типові співвідношення вмісту гібридного білку та загального вмісту білку (мг/мл) у фугатах від швидкості подачі суспензії (л/г) показано на рис. 1.

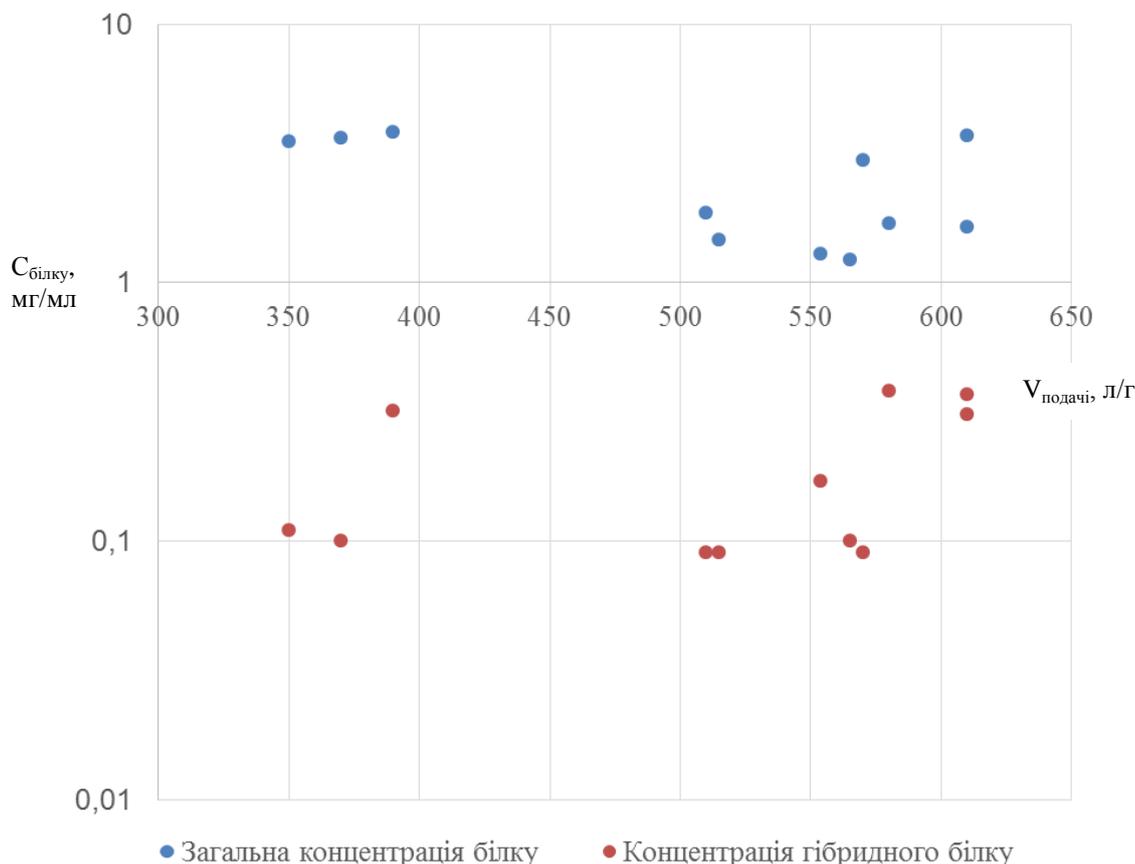


Рисунок 1 – Типові співвідношення вмісту гібридного білку та загального вмісту білку (мг/мл) у фугатах від швидкості подачі суспензії (л/г)

Згідно з рис. 1, типова різниця між вмістом гібридного білку та загальним вмістом білку у фугатах становить порядок величини (за логарифмічною віссю ординат), що свідчить про прийнятний ступінь очищення від баластних білків та низький рівень втрат цільового продукту. Нерегулярний розподіл експериментальних точок пов'язаний із використанням автоматичного регулювання швидкості подачі суспензії.

Таким чином, до простору дизайну оптимальних параметрів відцентрового розділення входить діапазони швидкості подачі суспензії 300–650 л/г та часу між вивантаженнями 250–350 с за максимальної швидкості обертання барабану 11700 об/хв.

Для встановлення в'язкісних характеристик суспензій бактеріальних клітин та ТВ та їх кореляції з вмістом в них сухого залишку, було досліджено залежність в'язкості суспензій на різних етапах їх відмивки та концентрування від швидкості обертання шпінделя за технологічних температур. Характерний вид залежностей наведено на рис. 2.

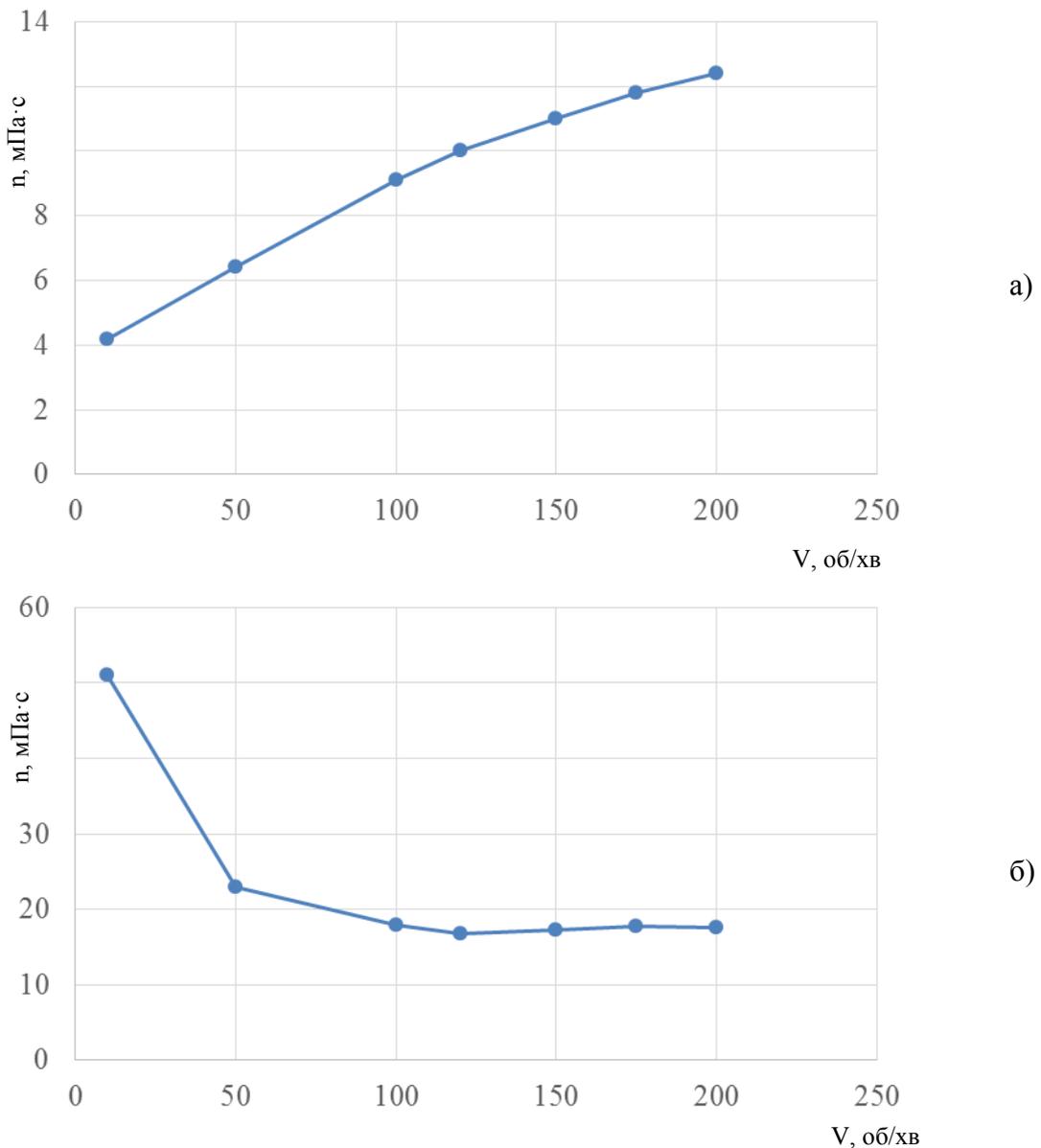


Рисунок 2 – Типові залежності в'язкості суспензій ТВ (мПа·с) від швидкості обертання шпінделя (об/хв) за технологічних температур ($6,0 \pm 1,0$ °C): а) суспензія ТВ після 2-ї дезінтеграції; б) суспензія ТВ після відмивки та концентрування

Встановлено, що, на відміну від суспензії бактеріальних клітин після відмивки та розчину гібридного білку (ГБ) перед рефолдінгом, що характеризуються класичною залежністю в'язкості від швидкості обертання шпінделя, суспензії ТВ, особливо після концентрування, мають неklasичну, гелеподібну поведінку (майже на порядок вища в'язкість при малих оборотах), що, ймовірно, зумовлено вмістом нуклеїнових кислот (їх присутність доведено методом електрофорезу в агарозному гелі в роботі [16]). Така поведінка може обґрунтовувати високі пускові струми мішалок, що, в свою чергу, здатне викликати їх аварійне відключення під час запуску, що неодноразово спостерігалося в ході виробничого процесу в умовах ПрАТ «Завод по виробництву інсулінів «Індар» [17].

В якості потенційного рішення зазначеної проблеми запропоновано використання ДНКазиди під час відмивки суспензії ТВ. Альтернативою може бути використання нового, потужнішого обладнання, конструкція якого враховує можливість виникнення високих пускових струмів.

Як видно з рис. 2, найбільша різниця між в'язкостями суспензій спостерігається при швидкості обертання шпінделя 10 об/хв. Нормалізована відмінність між зазначеними типами суспензій становить порядок величини. Це добре корелює із вмістом в них сухого залишку (16,3 г/л для суспензії ТВ після 2-ї дезінтеграції та 122,3 г/л суспензії ТВ після відмивки та концентрування), нормалізована відмінність між значеннями якого для зазначених типів суспензій також становить порядок величини. Зазначену кореляцію запропоновано для впровадження в якості індикатору якості концентрування ТВ для поточного контролю технологічного процесу.

Для вирішення проблеми присутності залишків нуклеїнових кислот у ТВ після відмивки та концентрування, в модельних експериментах досліджено вплив різних поверхнево-активних речовин (ПАР) під час відмивки ТВ на повноту видалення нуклеїнових кислот, відсутність втрат продукту при відмивці та повноту розчинення ТВ перед рефолдінгом. Для дослідження обрано такі ПАР, як PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1500, ROKamin K15K, ROKwinol 80 та ROKanol CML10.

Результати модельних експериментів, які наведені на рис. 3, свідчать про те, що відмінності у масі сухого залишку ТВ після відмивки досліджуваними ПАР та водою очищеною знаходяться в межах похибки експерименту.

Дані модельних досліджень щодо повноти розчинення ТВ після відмивки досліджуваними ПАР та водою очищеною, наведені на рис. 4, демонструють повніше розчинення після відмивки ПАР у порівнянні з водою очищеною.

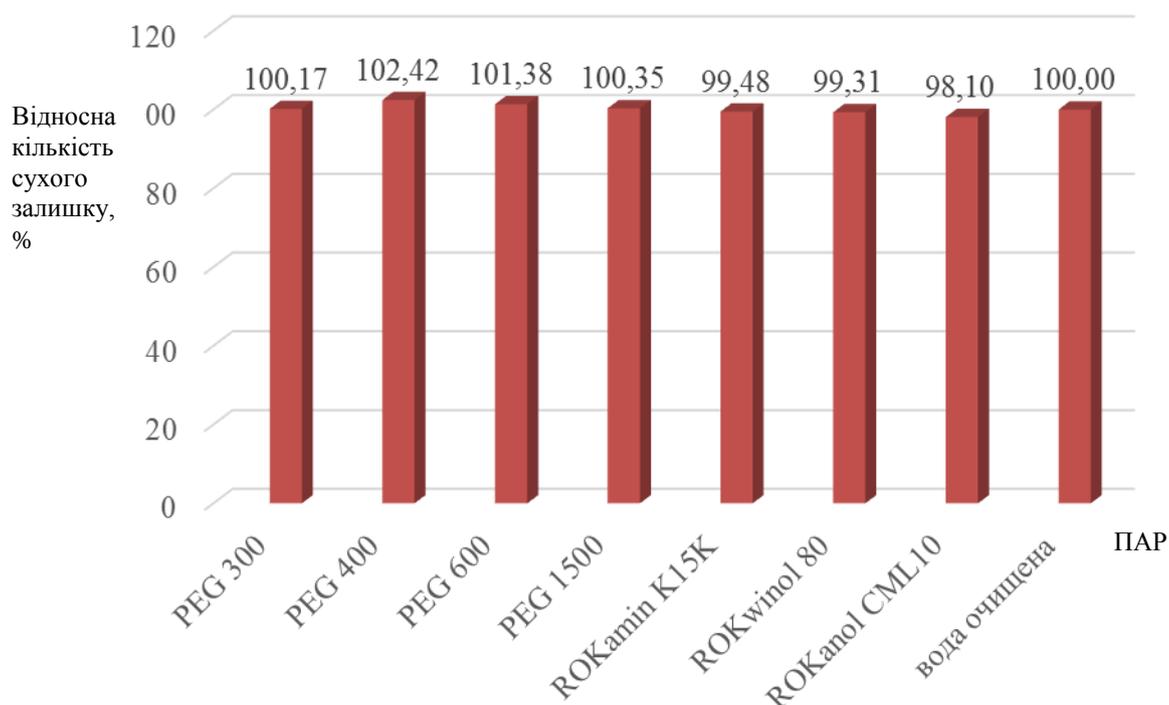


Рисунок 3 – Відсоток маси сухого залишку ТВ після відмивки досліджуваними ПАР до маси сухого залишку ТВ після відмивки водою очищеною

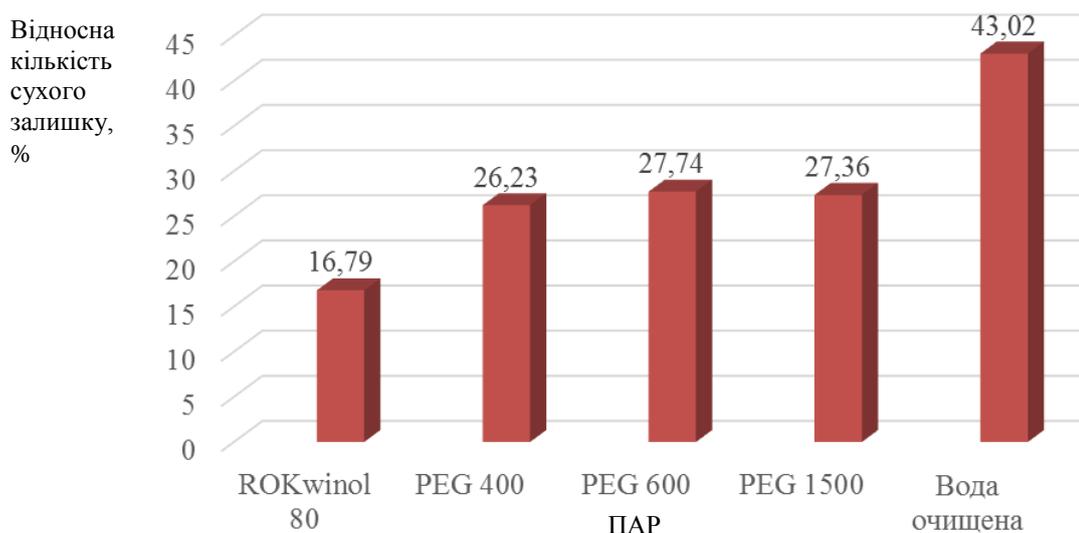


Рисунок 4 – Відсоток маси сухого залишку після розчинення ТВ, відмитих досліджуваними ПАР до маси сухого залишку після розчинення ТВ, відмитих водою очищеною

Дослідження повноти видалення нуклеїнових кислот у модельних експериментах з відмивки ТВ досліджуваними ПАР показали певну доцільність їх застосування в складі розчину для відмивки, хоча досліджувані системи не забезпечили повного видалення нуклеїнових кислот. Кількісна оцінка ступеню видалення є напрямом подальших досліджень. В даному випадку, перспективним способом вирішення проблеми залишків нуклеїнових кислот у відмитих ТВ може бути використання специфічних ферментів для їх гідролізу складі відмивочних розчинів, що також потребує експериментальної перевірки в подальших дослідженнях.

Висновки

Результати досліджень визначили простір дизайну оптимальних параметрів відцентрового розділення, що використовується в процесі виробництва ПрАТ «Завод по виробництву інсулінів «Індар». За результатами визначення параметрів в'язкості технологічних середовищ запропоновано гіпотезу та потенційні шляхи оптимізації параметрів роботи ємнісного обладнання. Встановлено оптимальні параметри відцентрового розділення з урахуванням швидкості подачі суспензії 300–650 л/г та часу між вивантаженнями 250–350 с за максимальної швидкості обертання барабану. Виявлено характерну поведінку суспензії бактеріальних клітин після відмивки та розчину гібридного білку (ГБ) перед рефолдінгом, що характеризуються класичною залежністю в'язкості від швидкості обертання шпінделя, суспензії тілець включення, особливо після концентрування, які мають некласичну, гелеподібну структуру. Запропоновано оптимізувати ефективність процесу видалення залишків нуклеїнових кислот шляхом використання ДНКаз під час відмивки суспензії тілець включення. Виявлено взаємозв'язок між в'язкостями суспензій, швидкістю обертання шпінделя та вмістом в них сухого залишку, що доцільно запровадити як індикатор ефективності концентрування тілець включень для поточного контролю технологічного біопроцесу. Порівняльні дослідження наявних ПАР щодо їх використання у розчині для відмивки ТВ дозволили сформулювати перспективні напрямки подальших досліджень, які передбачатимуть встановлення кількісного впливу ПАР на видалення нуклеїнових кислот, а також застосування специфічних ферментів для їх гідролізу у складі відмивочних розчинів.

Література

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. 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.28870>
7. Overton T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*. 2014. Vol. 19, No. 5. P. 590–601. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>.
8. Marco A. Recent advances in recombinant production of soluble proteins in *E. coli*. *Microb Cell Fact*. 2025. Vol. 24. Article 21. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02646-8>.
9. 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*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2020. No. 9(4), P. 761–68. DOI: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.761-768>.
10. Galkin A. Biosafety Management: Emphasis on Medicine, Pharmacy, and Biotechnology. *Innov Biosyst Bioeng*. 2025. No. 9 (2). P. 2-3. URL: <https://ibb.kpi.ua/article/view/329014>.
11. Galkin O. I., Savchenko A. A., Nikitina K. I., Dugan O. M. Obtaining and study of properties of new monoclonal antibodies against human IgE. *Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal*. 2013. No. 85(5), P. 81–87.
12. Walsh G., Walsh E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature Biotechnology*. 2022. Vol. 40. P. 1722–1760. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>.
13. Kothari M., Wanjari A., Acharya S. A comprehensive review of monoclonal antibodies in modern medicine: tracing the evolution of a revolutionary therapeutic approach. *Cureus*. 2024. Vol. 16, No. 6. Article 61983. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.61983>.
14. Lee S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* (Review). *Trends in Biotechnology*. 1996. Vol. 14, Iss. 3. P. 98–105.
15. Пузир В. Г., Крашенінін О. С., Жовтий Ю. В. Планування експерименту під час наукових досліджень: метод. вказ. Харків : УДУЗТ, 2020. 55 с.

16. Хейломський Д. О., Майстренко Л. А., Мокроусова О. Р. Комплексна оптимізація відмивки бактеріальних клітин Та тілець включення у виробництві рекомбінантного інсуліну людини: збірник тез II Міжнародної науково-практичної конференції «Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія» (30-31 жовтня 2025 р., КНУТД). Київ : КНУТД. 2025. С. 85.

17. Виробництво. ПрАТ «Індар». 2025. URL: <https://indar.com.ua/ua/manufacture>.

Bibliography (transliterated)

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. 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., Karbalaee M. Potential antigen candidates for subunit vaccine development against *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Cellular Physiology*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.28870>.

7. Overton T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*. 2014. Vol. 19, No. 5. P. 590–601. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>.

8. Marco A. Recent advances in recombinant production of soluble proteins in *E. coli*. *Microb Cell Fact*. 2025. Vol. 24. Article 21. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02646-8>.

9. 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*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2020. No. 9(4), P. 761–68. DOI: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.761-768>.

10. Galkin A. Biosafety Management: Emphasis on Medicine, Pharmacy, and Biotechnology. *Innov Biosyst Bioeng*. 2025. No. 9 (2). P. 2-3. URL: <https://ibb.kpi.ua/article/view/329014>.

11. Galkin O. I., Savchenko A. A., Nikitina K. I., Dugan O. M. Obtaining and study of properties of new monoclonal antibodies against human IgE. *Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal*. 2013. No. 85(5), P. 81–87.

12. Walsh G., Walsh E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature Biotechnology*. 2022. Vol. 40. P. 1722–1760. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>.

13. Kothari M., Wanjari A., Acharya S. A comprehensive review of monoclonal antibodies in modern medicine: tracing the evolution of a revolutionary therapeutic approach. *Cureus*. 2024. Vol. 16, No. 6. Article 61983. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.61983>.

14. Lee S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* (Review). *Trends in Biotechnology*. 1996. Vol. 14, Iss. 3. P. 98–105.

15. Puzyr V. H., Krashenin O. S., Zhovtyi Yu. V. Planuvannia eksperymentu pid chas naukovykh doslidzhen: metod. vказ. Kharkiv : UDUZT, 2020. 55 p.

16. Kheilomskiy D. O., Maistrenko L. A., Mokrousova O. R. Kompleksna optymizatsiia vidmyvky bakterialnykh klityn Ta tilets vkluchennia u vyrobnytstvi rekombinantnoho insulynu liudyny: zbirnyk tez II Mizhnarodnoi naukovo-praktychnoi konferentsii «Innovatsiini materialy ta tekhnolohii: biotekhnolohiia, prykladna khimiia, ekolohiia» (30-31 zhovtnia 2025 r., KNUTD). Kyiv : KNUTD. 2025. P. 85.

17. Vyrobnytstvo. PrAT «Indar». 2025. URL: <https://indar.com.ua/ua/manufacture>.

УДК 615.014.2

І. М. Волошина, канд. техн. наук, доцент, І. О. Грецький, канд. біол. наук, доцент,
О. Р. Мокроусова, д-р техн. наук, професор, Д. О. Хейломський, магістр

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ ВІДМИВКИ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН ТА ТІЛЕЦЬ ВКЛЮЧЕННЯ У ВИРОБНИЦТВІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНСУЛІНУ ЛЮДИНИ

В роботі представлено результати досліджень оптимізації параметрів процесу відмивки бактеріальних клітин штаму генно-модифікованого штаму-продуценту рекомбінантного інсуліну людини на основі *Escherichia coli* BL21 від компонентів культурального середовища та відмивки виділених в результаті руйнування зазначених бактеріальних клітин тілець включення від компонентів цитоплазми й клітинного дебрису. Обґрунтовано доцільність досліджень щодо технологічності, виходу та якості очищення цільового продукту на подальших етапах даунстрім-процесу біотехнологічного виробництва рекомбінантного інсуліну людини. В результаті проведених досліджень показано, що діапазони швидкості подачі суспензії на відцентровий сепаратор з автоматичним вивантаженням 300–650 л/г та часу між вивантаженнями 250–350 с за максимальної швидкості обертання барабану 11700 об/хв визначають напрям оптимізації параметрів відцентрового розділення. В процесі оптимізації визначено потенційну причину виникнення високих пускових струмів мішалок в реакторах під час відмивки та розчинення гібридного білку перед рефолдінгом. Запропоновано альтернативні рішення зазначеної проблеми: використання ДНКазиди під час відмивки суспензії тілець включення або використання нового, потужнішого обладнання, конструкція якого враховує можливість виникнення високих пускових струмів. Результати досліджень дозволили запропонувати кореляцію порядків величин нормалізованої відмінності між значеннями в'язкості суспензій та вмістом в них сухого залишку для впровадження в якості індикатору якості концентрування тілець включення для контролю біопроецесу. В модельних експериментах досліджено вплив ПАР під час відмивки тілець включення на повноту видалення нуклеїнових кислот, відсутність втрат продукту при відмивці, та повноту розчинення тілець включення перед рефолдінгом. Найбільший рівень повноти розчинення (83,21 %) встановлено після відмивки тілець включення розчином ПАР ROKwinol80. Результати досліджень окреслити простір дизайну оптимальних парамет-

рів відцентрового розділення відповідно до фактичних виробничих умов. За результатами оцінювання параметрів в'язкості технологічних середовищ запропоновано гіпотезу та потенційні шляхи оптимізації параметрів експлуатації ємнісного обладнання. Сформовано перспективні напрямки подальших досліджень щодо кількісного аналізу впливу ПАР на видалення нуклеїнових кислот та застосування специфічних ферментів для їх гідролізу у складі відмивочних розчинів.

Ключові слова: рекомбінантний інсулін, біопроцеси, оптимізація, сепарація, культура бактеріальних клітин, тільця включення, відмивка.

I. M. Voloshyna, I. O. Hretskyi, O. R. Mokrousova, D. O. Kheilomskyi

OPTIMIZATION OF WASHING PARAMETERS FOR BACTERIAL CELLS AND INCLUSION BODIES IN THE PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN INSULIN

The paper presents the results of research on the optimisation of the parameters of the washing process of bacterial cells of the genetically modified strain producing recombinant human insulin based on *Escherichia coli BL21* from the components of the culture medium and washing of inclusion bodies isolated as a result of the destruction of the specified bacterial cells from the components of the cytoplasm and cell debris. The feasibility of research on the technological aspects, yield, and quality of purification of the target product at subsequent stages of biotechnological recombinant human insulin production is substantiated. The research has shown that the ranges of suspension feed rates to a centrifugal separator with automatic unloading, 300–650 l/h, and the time between unloading, 250–350 s, at a maximum drum rotation speed of 11,700 rpm, determine the direction of optimisation of the centrifugal separation parameters. During the optimisation process, the potential cause of high starting currents in agitators of reactors during the washing and dissolution of hybrid proteins before refolding was identified. Alternative solutions to this problem were proposed, including the use of DNase during the washing of inclusion body suspensions and the development of new, more powerful equipment that takes into account the possibility of high starting currents. The research results enabled the proposal of a correlation between the orders of magnitude of the normalized difference in viscosity values between suspensions and their dry residue content, which can serve as an indicator of the quality of inclusion body concentration for bioprocess control. In model experiments, the influence of surfactants on the completeness of nucleic acid removal during the washing of inclusion bodies, the absence of product loss during washing, and the completeness of dissolution of inclusion bodies before refolding was investigated. The highest level of dissolution completeness (83.21 %) was established after washing the inclusion bodies with ROKwinol80 surfactant solution. The research results outline the design space for optimal centrifugal separation parameters in accordance with actual production conditions. Based on the results of the assessment of the viscosity parameters of technological media, a hypothesis and potential ways to optimise the operating parameters of capacitive equipment were proposed. Promising directions for further research have been identified regarding the quantitative analysis of the effect of surfactants on the removal of nucleic acids and the use of specific enzymes for their hydrolysis in washing solutions.

Keywords: recombinant insulin, bioprocesses, optimisation, separation, bacterial culture, inclusion bodies, washing.