

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Масштабирование технологии получения сополимера 3-гидроксипропиридата-  
со-3-гидроксивалерата в условиях опытного производства.

Руководитель

доцент, канд. техн. наук

Е.Г. Киселёв

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

\_\_\_\_\_  
должность, учёная степень

\_\_\_\_\_  
инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

В.А. Востоплец

\_\_\_\_\_  
инициалы, фамилия

Красноярск 2017

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Масштабирование технологии получения сополимера 3-гидроксипропаната-со-3-гидроксивалерата в условиях опытного производства.» содержит 47 страницы и включает в себя 44 литературных источника, 3 таблицы, 3 формулы, 12 рисунков.

БИОРАЗЛОГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ, БИОПЛАСТИКИ, ПГА, ,  
CUPRIAVIDUS EUTROPHUS, ВАЛЕРЬЯНОВАЯ КИСЛОТА, 3-  
ГИДРОКСИБУТЕРАТ, 3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ.

Цель работы: определить технологические параметры процесса производства сополимера 3-гидроксипропаната-со-3-гидроксивалерата в лабораторных и опытно-промышленных условиях.

Актуальность данной работы заключается в получении сополимера 3ГВ, который является более ценным, чем гомополимер 3ГБ потому что, имеет больше полезных свойств, в частности температуру плавления, кристалличность, пластичность и способность к биодegradации. Масштабирование технологии получения сополимеров является сложной и актуальной задачей.

В результате проведенных экспериментов исследован рост штамма-продуцента в культуре и выход полимера у бактерий *Cupriavidus eutrophus* V10646 в гетеротрофных условиях, на опытном производстве Сибирского Федерального Университета. Отработаны режимы культивирования и составы питательной среды, обеспечившие получение линейки сополимеров с различным содержанием мономеров 3-гидроксивалерата. Исследовано влияние содержания мономеров 3-гидроксивалерата в сополимере на физико-химические свойства и установлено, что при увеличении содержания 3ГВ снижается температура плавления сополимера. Установлены оптимальные технологические параметры для масштабирования процесса получения сополимера.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ .....	2
СОДЕРЖАНИЕ .....	3
ВЕДЕНИЕ .....	4
1 Обзор литературы .....	7
1.1 Характеристика ПГА .....	7
1.2 Синтез ПГА.....	13
1.3 Валерьяновая кислота в биосинтезе ПГА.....	16
2 Материалы и методы .....	19
2.1 Объект исследования .....	19
2.2 Процесс культивирования ПГА.....	19
2.3 Анализ проб .....	22
2.3.1 Измерение концентрации клеток в процессе культивирования.....	22
2.3.2 Определение сухой биомассы клеток .....	22
2.3.3 Измерение азота .....	23
2.3.4 Определение содержания и состава полимера.....	23
2.3.5 Определения концентрации глюкозы .....	23
2.3.6 Определение концентрации валерьяновой кислоты .....	24
2.3.7 Расчет кинетических и продукционных параметров культуры. ....	25
2.4 Методы обработки данных .....	26
3 Результаты и обсуждение исследования .....	27
3.1 Определение константы ингибирования .....	27
3.2 Дробные добавки валерьяновой кислоты .....	29
3.3. Выращивание бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> B10646 на смешанном субстрате. ....	31
3.4 Масштабирование процесса синтеза сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) ... <b>Ошибка! Закладка не определена.</b>	
ВЫВОДЫ.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	42

## ВВЕДЕНИЕ

Пластик — материал, которому ещё совсем недавно аплодировал весь мир, превратился сегодня в основную причину его загрязнения — одну из неразрешимых проблем современной цивилизации. Из-за высокой молекулярной массой, пластика устойчивы к биодegradации, поэтому на сегодняшний день остаются актуальными вопросы создания экологически безопасных материалов, удовлетворяющих современным потребностям. Они способны сохраняться в окружающей среде в почве в течение очень длительного времени [1]. Большой спрос на изделия из пластмасс за последние несколько десятилетий вызвал серьезные экологические проблемы. Существующие методы утилизации пластмасс неэффективны. Сжигание пластмасс приводит к выбросу в атмосферу опасных химических веществ, таких как соляная кислота и цианистый водород, так же этот процесс является дорогостоящим. Переработка также имеет некоторые недостатки, из-за изменения конфигурация, переработанные пластмассы имеют ограниченное использование [2]. Между тем, количество производимых и отработанных пластмасс растет. Свалки, как правило, очень быстро достигают своей максимальной мощности.

С конца 60-х годов активно ведутся работы по исследованию биополимеров (биопластиков). Современная биотехнология позволяет получать широкий спектр целевых продуктов различной природы, включая новые экологически чистые биоматериалы с высокими потребительскими свойствами. Существуют два основных вида биополимеров: полимеры, производимые при помощи биологических систем (таких как микроорганизмы) и химически синтезированные полимеры на основе биологического сырья (аминокислот, сахаров, жиров)[3].

В последние годы все более актуальными становятся работы по полимерам биологического происхождения. Замена неразрушаемых

синтетических полимеров, на биоразрушаемые, имеет огромное экологическое значение.

Среди применяемых и активно разрабатываемых в настоящее время биоразрушающихся полимеров можно выделить: алифатические полиэфиры, полиамиды, сегментированные полиэфируретаны, полимеры молочной и гликолевой кислот (полилактиды и полигликолактиды), силикон, полиэтилентерефталат, поли- $\beta$ -гидроксibuтират и другие полимеры гидроксипроизводных жирных кислот, так называемые полигидроксиалканоаты [4,5,6].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластичные линейные полиэфиры микробиологического происхождения, способные разрушаться до нетоксичных продуктов [7]. В 1925 году, Лемуань обнаружил и впервые описал ПГА, который производила культура *Bacillus* [8]. Позже, были найдены многие другие бактерии способные производить различные ПГА. ПГА в настоящее время становятся реальными кандидатами на роль материалов XXI века, с ними связаны большие надежды, так как помимо термопластичности аналогично полипропилену и полиэтилену, эти биопластики обладают пьезоэлектрическим эффектом и характеризуются высокой биосовместимостью. Благодаря такому свойству как биосовместимость, ПГА способны служить материалом не только для различных упаковок, но и для материалов медицинского применения [9].

В настоящее время ведутся активные исследования ПГА. Сферы применения ПГА потенциально широки и могут включать сельское и коммунальное хозяйство, радиоэлектронику, фармакологию, медицину [10].

Наблюдаемый в последние годы интерес к биodeградируемым полимерам связан не только с ухудшением экологической обстановки: серьезные опасения специалистов вызывает неуклонное уменьшение мировых запасов нефти и газа, поэтому возобновляемое растительное сырье могло бы стать решением проблемы. Сегодня по многим физическим и техническим характеристикам биопластики не уступают традиционным пластмассам и при этом безопасны для окружающей среды [11].

Сополимер 3-гидроксивалериановой кислот (ЗГВ) является одним из наиболее перспективных представителей семейства термопластичных и биоразрушаемых полимеров (ПГА) и предназначен для применения в различных областях (медицина, фармакология, сельское и коммунальное хозяйство, пищевая промышленность) [12].

**Цель работы** - исследовать влияние валерьяной кислоты на синтез полигидроксиалканоатов (ПГА) *Cupriavidus Eutrophus* В-10646 при масштабировании технологии в условиях опытного производства.

Для этого необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить влияние солей валериановой кислоты на изменение  $K_s$  в процессе биосинтеза ПГА, штаммом *Cupriavidus Eutrophus* В-10646;
2. Изучить способы введения прекурсора в культуру на опытном производстве. Исследовать влияние солей валериановой кислоты на продукционные характеристики процесса биосинтеза и состав полученного полимера.
3. Масштабировать процесс синтеза сополимера П(ЗГБ/ЗГВ).

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Характеристика ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) –это класс природных полиэфиров, которые синтезируют прокариотические организмы в специфических условиях несбалансированного роста в качестве эндогенного депо энергии и углерода, используя для этого различные субстраты. Они являются гидрофобными, нерастворимыми в воде, инертными и абсолютно стабильными на воздухе, а также термопластичными и / или эластомерными, нетоксичными.

Это семейство полимеров различной химической структуры, различающихся базовыми физико-химическими свойствами. ПГА обладают многими свойствами, привлекательными для различных сфер, включая биомедицинскую. Привлекательность и перспективность ПГА обусловлена наличием весьма существенных преимуществ этого класса

биоматериалов:

- высокая биосовместимость ПГА, в частности, поли-3-гидроксибутирата, связана с тем, что мономер, образующий этот полимер – 3-гидроксимасляная кислота – это естественный метаболит клеток и тканей организмов;
- ПГА не гидролизуются в жидких средах, т.к. деградация ПГА является истинной биологической и происходит клеточным и гуморальными путями; образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают резкого закисления тканей и, следовательно, выраженной воспалительной реакции;
- скорости биорезорбции ПГА значительно ниже, чем полилактидов и полигликолипидов, изделия из ПГА в зависимости от формы и места имплантации *in vivo* могут функционировать от нескольких месяцев до 2-3 лет более того, скоростью деградации ПГА можно управлять;

- ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует таких технологических этапов, как синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов;

- сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>, продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы, производства сахара, пальмового масла, водосодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина.

ПГА ассоциируются в клеточной цитоплазме в виде включений (гранул). Впервые гранулы в микроорганизмах наблюдал под микроскопом Бейеринг еще в 1888г [Chowdhury, 1963]. Изображение гранул в культуре клеток бактерий *Azotobacter chroococcum* представлено на рисунке 1 в качестве примера [Nutti et al., 1972].

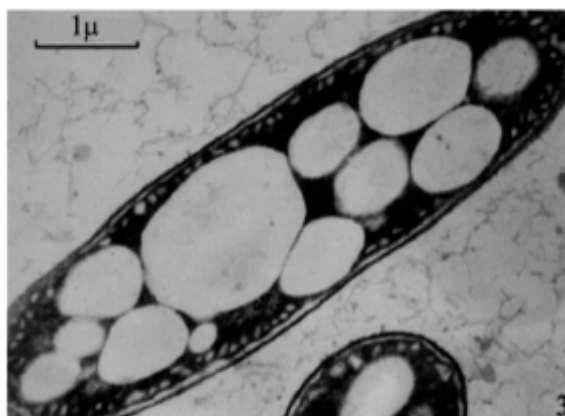


Рисунок 1. — Гранулы ПГА в культуре клеток бактерий *Azotobacter chroococcum*

(трансмиссионный электронный микроскоп) [Nutti et al., 1972]

Основные структуры полигидроксиалканоатов проиллюстрированы на рисунке 2.



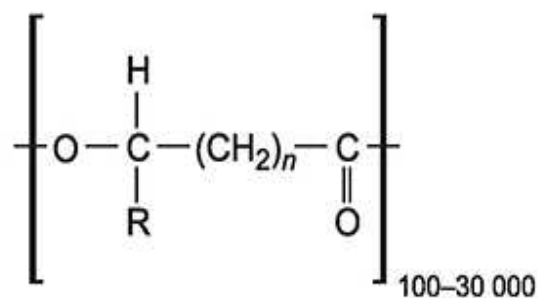


Рисунок 2. — Общая химическая формула ПГА

В зависимости от строения мономеров, входящих в состав ПГА, они разделяются на три основные группы [7]:

- Короткоцепочечные ПГА, в которых есть 3-5 атомов углерода. Наиболее известные представителями этого класса - поли (3-гидроксibuтират)(ПГБ), и его сополимеры с гидроксивалератом. Полигидроксibuтират является гомополимером D(-)-3-β-оксимасляной кислоты и представляет собой полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) [6]. Из всех ПГА, ПГБ наиболее часто встречается в природе [54]. Это самый простой ПГА по отношению к химической структуре, имеющие метилен группу (-CH<sub>2</sub>). В состав полимера входят углерод (81%), водород (7,03%) и кислород (37,16 %). Мономеры, такие как 3-гидроксивалерат и 4-оксибутират, включают в ПГБ цепи с использованием специфических добавок в среде для роста бактерий [40,41].
- Со средней длиной цепи ПГА, которые имеют 6-14 атомов углерода. Для синтеза средней длины цепи в качестве продуцента специально используют псевдомонад, а в качестве субстрата алифатические углеводороды, такие как n-алканы, n-алканоаты, или n-алканола. [42,43].
- Длинноцепочечные, с содержанием 17-18 атомов углерода [44].

Также ПГА можно систематизировать не только по длине углеродной цепи кислоты, но и по компонентному составу:

- Однокомпонентные, состоят только из короткоцепочечных мономеров, например полигидроксибутират (ПГБ).
- Многокомпонентные, состоящие из коротко- и средне- и длинноцепочечных мономеров или же различные их вариации.

ПГА являются резервными макромолекулами клетки и синтезируются прокариотами в специфических условиях несбалансированного роста при избытке углерода в среде, когда синтез азотсодержащих внутриклеточных молекул ограничен. Среди известных микроорганизмов синтезирующих ПГА аэробные и анаэробные бактерии, гетеротрофы, хемоорганно- и хемоавтотрофы, фототрофные прокариоты, аэробные фотобактерии, олиготрофные полипростековые бактерии, архебактерии, анаэробные фототрофные бактерии и другие. Условия, обеспечивающие изменение направления конструктивного обмена клеток в сторону синтеза и аккумуляции ПГА, определяются окислительно-восстановительным состоянием цитоплазмы, внутриклеточной концентрацией ацетил-СоА и свободного СоА.

В аэробных условиях, ПГА разлагаются до углекислого газа и воды, в то время как в анаэробных условиях, ПГА образуют углекислый газ и метан в результате деградации. Они также способны разрушаться в организме человека. В последние годы ПГА были использованы при изготовлении нескольких медицинских материалов, таких как шовные нити, хирургические сетки, заменители кожи, сосуды, клапаны, костные пластины. Область применения ПГА расширяется.

Так же ПГА чрезвычайно различаются между собой по физическим свойствам (гибкости, кристалличности, температуре плавления и др.) в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических

свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата.

Немало важно отметить то, что ПГА обладают физико-химическими свойствами: кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада, биосовместимость, эластичность, а главное то, что каждым из свойств можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру. ПГА не гидролизуются в жидких средах, так как деградация ПГА является истинной биологической и происходит клеточным и гуморальным путями, более того, скоростью деградации ПГА тоже можно управлять [8, 9] .

Накопление полимера в бактериальной клетке может быть определено достаточно легко. ПГА накапливаются в виде дискретных нерастворимых в воде гранул, так что оптический микроскоп, работая в режиме фазового контраста, может быть использован для обнаружения таких гранул в цитоплазме клетки. Диаметр ПГА гранул составляет от 0,2 до 0,5 мкм в диаметре .

Показано, что основная роль в формировании состава ПГА принадлежит ко субстрату – алкановым кислотам, а на количественный выход ПГА существенно влияют пептон и соединения фосфора [14].

Среди ПГА наиболее распространенным является поли(3- гидроксibuтират) (ПГБ) - полимер 3-гидроксималсялой кислоты, который и был открыт первым. ПГБ является наиболее распространенным типом и лучше характеризует ПГА. Это первый ПГА в котором обнаружено содержание только 3ГБ мономеров. Он сопоставим с обычным пластиком, таким как полипропилен, с точки зрения температуры плавления, кристалличности, молекулярной массы и предела прочности при растяжении. Большинство доступных биоразлагаемых пластиков имеют определенные недостатки, поскольку они водорастворимы и чувствительны к влаге (Lee, 1996). ПГБ преодолел эти проблемы, так как он

проявляет стойкость к влаге, нерастворим в воде и обладает лучшей оптической чистотой (Lindsay, 1992). Он также показывает хорошую кислородную проницаемость (Lindsay, 1992). Помимо термостойкости (до 130 ° C), ПГБ также имеет лучшую стойкость к ультрафиолетовым (УФ) лампам, чем полипропилен (Lee, 1996). Однако практическое применение П(ЗГБ) ограничено из-за его низкой ударной вязкости. ПГБ представляет собой высокожесткий, кристаллический и относительно хрупкий термопластик. Его температура плавления при 175 ° C лишь немного ниже, чем температура деградации, что затрудняет ее термическую обработку. Следовательно, обширные работы направлены на синтез сополимеров, которые обладают лучшими свойствами, чем гомополимер ПГБ. Например, включение субстратов, таких как 3-гидроксивалерат, может привести к большей прочности и гибкости.

Известны способы получения многокомпонентных и разнообразных по составу ПГА, образованных не только мономерами 3-гидроксibuтирата, но и другими мономерами: 2-гидроксibuтиратом, 2-гидроксивалератом, 3-гидроксивалератом, 3-гидроксигексаноатом, 3-гидроксioктаноатом, 3-гидроксидодеканоатом, а также 4-гидроксibuтироатом, 4-гидроксивалератом и их сополимерами, штаммами-продуцентами. Эти ПГА, в отличие от гомогенного П(ЗГБ), характеризуются большей механической прочностью и эластичностью, способностью перерабатываться в разнообразные изделия с высокими физико-механическими характеристиками и более высокой скоростью биodeградации в биологических средах.

Сополимерные ПГА различного химического состава более перспективны, однако их получение – весьма сложная технологическая задача, так как для их получения в состав среды, как правило, необходимо внесение дополнительных источников углерода в качестве субстратов-предшественников целевых мономеров, которые в подавляющем большинстве ингибируют рост

продуцентов. Это негативно сказывается на общей продуктивности процесса биосинтеза (как на приросте биомассы клеток, так и на выходах сополимеров).

## 1.2 Синтез ПГА

Для производства ПГА могут быть использованы простые, возобновляемые ресурсы, такие как сахароза, крахмал и целлюлоза. Напротив, производство синтетических пластмасс требует затрат невозобновляемых ископаемых ресурсов, таких как нефть.

Для выбора потенциального продуцента ПГА в качестве критериев принято рассматривать следующие показатели: химический состав, выход полимера, затраты углеродного субстрата, концентрацию биомассы клеток в культуре, продуктивность процесса.

ПГА синтезируются в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса, каждую стадию которого катализируют специфические ферменты. Знание закономерностей структурно-функциональной организации внутриклеточного цикла ПГА дает возможности управления этим процессом и основу для синтеза полимеров с новыми свойствами.

Рассмотрим метаболические пути биосинтеза на примере наиболее изученного из полиоксиалканоатов – полимера  $\beta$ -оксимасляной кислоты. Эти пути являются общими практически для всех бактерий-продуцентов. Фермент  $\beta$ -кетотиолаза катализирует образование углерод-углеродной связи двух ацетил-КоА остатков путем конденсации Кляйзена. Молекулы ацетил-КоА поступают при этом из гликолиза через образование пирувата. Далее НАДФН-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза превращает ацетоацетил-КоА в 3-гидроксибутирил-КоА [Findlay R. H., 1983]. На следующем этапе молекулы 3-гидроксибутирил-КоА связываются с ПГБ-полимеразой (рисунок 3). В неактивном состоянии она представляет собой мономерные субъединицы,

которые растворены в цитоплазме. При связывании субстрата эти субъединицы димеризуются и с помощью этого гомодимера начинается синтез полимера. Связывание остатков 3-гидроксимасляной кислоты осуществляется конститутивным остатком цистеина. По мере синтеза полимера и роста цепи, такие комплексы организуются в гранулы, внутри которых находятся гидрофобная цепь растущего ПГБ, а снаружи расположены молекулы ПГБ-полимеразы со вспомогательными белками, которые продолжают синтез на поверхности гранул (рисунок 4). При этом на одну молекулу мономера – 3-гидроксимасляной кислоты – приходится 2 молекулы ацетил-КоА [Shrivastav A., 2013]. ПГБ-полимераза может существовать в двух формах: свободной, растворенной в цитоплазме и гидрофобной, связанной с полимерными гранулами. Во время роста при дефиците углерода фермент существует в растворенном состоянии, однако при наступлении стрессовой ситуации (например, азотного голодания) он переходит в ассоциированную с гранулами форму и приступает к синтезу запасного вещества – ПГБ. Биохимически синтез ПГБ контролируется соотношением НАДФН к НАДФ + в цитоплазме. Когда источник азота иссякает, это соотношение возрастает, что ингибирует ферменты цикла трикарбоновых кислот. Когда поток ацетил-КоА уменьшается, понижается уровень кофермента А и снимается ингибирование β-кетотиолазы и начинается синтез полимера [Lageveen R. G., 1988], [Holmes P. A, 1985]. Однако параллельно с анаболическими процессами протекают и катаболические реакции, то есть происходит также непрерывное разложение ПГБ до мономеров ферментами ПГБ-деполимеразой. Таким образом, регуляция процесса полимерного биосинтеза осуществляется путем смещения равновесия между прямой и обратной реакциями полимеризации и деполимеризации.

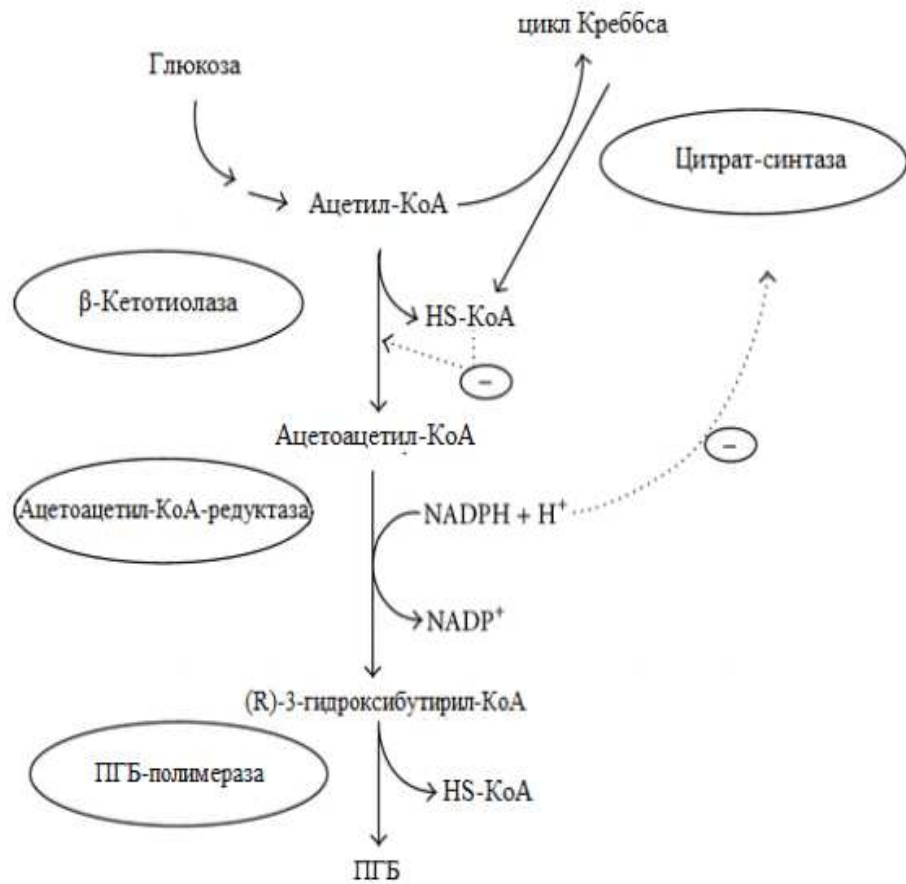


Рисунок 3. - Схема биосинтеза ПГБ, проходящего в бактериальных клетках

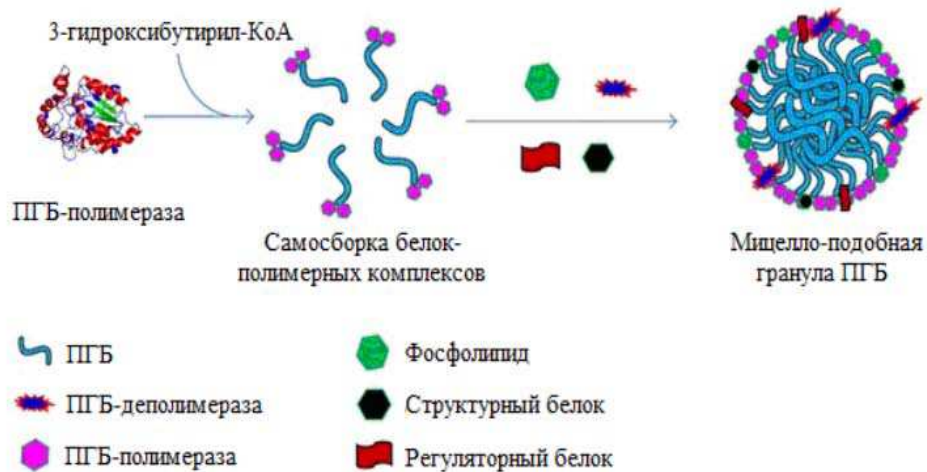


Рисунок 4. Схема формирования полимерных гранул в цитоплазме бактериальных клеток при синтезе ПГБ

Фермент ПГБ-синтаза стереоспецифичен – только R-изомеры 3-гидроксимасляной кислоты могут участвовать в реакции. Также, у ПГБ-

синтазы различных организмов могут включать в полимерную цепь не только остатки 3- гидроксипропионата, но и, например 3-гидроксивалерата и более длинноцепочечных 3-гидроксикарбоновых кислот [Shiraki M., 2006], [Rehm В.Н., 2002], [Tsuge T., 2000]. Именно за счет этого возможно получение сополимеров ПГА, обладающих уникальными свойствами.

Валериановая кислота включается в состав сополимера через  $\beta$  путь окисления: валерил КоА > 3 кетовалерил КоА > D 3 гидроксвалерил КоА > ГВ, то есть 3 кетовалерил КоА, промежуточный продукт  $\beta$  окисления валериановой кислоты, не расщепляется далее на ацетил КоА и пропионил КоА, а направляется на синтез ПГА при участии ацетоацетил КоА редуктазы.

### **1.3 Валерьяновая кислота в биосинтезе ПГА**

Как правило, для получения сополимера путем микробиологического синтеза, в качестве основных, либо дополнительных источников углерода используют органические кислоты или спирты с нечетным числом атомов углерода.

П(3ГБ-со-3ГВ) является наиболее широко изученным ПГА-сополимером. Его механические свойства зависят от мольной доли 3ГБ. Введение мономеров с 3-5 углеродными атомами в полимер, состоящий в основном из 3ГБ, приводит к снижению кристалличности и температуры плавления, но улучшает гибкость, прочность и упрощает процесс обработки, без ущерба для температуры разложения (Lee, 1996b). П(3ГБ-со-3ГВ) сополимер намного более гибок, чем гомополимер П(3ГБ), поскольку он демонстрирует пятикратное уменьшение модуля Юнга до 0,7 ГПа по мере увеличения доли 3ГВ-звеньев (Williams and Peoples, 1996). Сообщается также, что по мере увеличения доли сомономера возрастает относительное удлинение при разрыве (Lee, 1996b).

Для сырьевых материалов, сополимер 3ГВ является более ценным, чем гомополимер ПГБ потому что, имеет больше полезных свойств, в частности



температуру плавления, кристалличность, пластичность и способность к биодegradации.

Валериановая кислота включается в состав сополимера через путь окисления: валерил КоА > 3 кетовалерил КоА > D 3 гидроксвалерил КоА > ГВ, то есть 3 кетовалерил КоА, промежуточный продукт  $\beta$  окисления валериановой кислоты, не расщепляется далее на ацетил КоА и пропионил КоА, а направляется на синтез ПГА при участии ацетоацетил КоА редуктазы.

Описана технология синтеза 3ГВ бактериями *Ralstonia eutropha* в ферментёре объемом 5 л на среде с глюкозой в качестве основного ростового субстрата и соли валерата натрия в качестве субстрата предшественника. Использовались несколько способов добавления валерата, для устранения ингибирования роста клеток. Варьируя концентрацию глюкозы, а также концентрацию соли валерьяновой кислоты, в периодическом режиме удалось оптимизировать процесс, позволяющий получать общий урожай биомассы и выход полимера, соответственно до 50 и 25 г/л; включение валерата в полимер составило около 11 мол. %.

Так же известен способ синтеза 3-компонентных ПГА - П(3ГБ/3ГВ/4ГБ) в культуре *Ralstonia eutropha* при культивировании в ферментёре на глюкозе; обеспечивший высокий выход по биомассе (136 г/л) и сополимера (62%). Доминирующими в 3-компонентном сополимере были мономеры 3ГБ, а содержание мономеров 3ГВ и 4ГБ были на низком уровне, 2 и 5 мол. % соответственно.

Проводились исследования в которых использовали культуру *Alcaligenes eutrophus* H16. Предварительно культуру бактерий выращивали в обогащенной азотом среде, содержащей 10 г / л дрожжевого экстракта, 10 г / л полипептона, 5 г / л мясного экстракта и 5 г / л сульфата аммония, в колбах объёмом 500 мл. Клетки центрифугировали и промывали для удаления остаточного азота. Далее клетки инокулировали на среду того же состава в 5-литровом ферментёре (KMJ-5B, Mitsuwa, Japan). В качестве источников

углерода использовали масляную и валериановую кислоту, и в качестве источника азота в культуре использовали сульфат аммония. При внесении жирных кислот, в концентрации 1,5 г/л включение мономеров ЗГВ в сополимере составило 6,7 мол. %, общий выход сополимера – 40 %.

Недостаток способов аналогов - невысокий общий выход сополимера и невысокое содержание в них мономеров ЗГВ.

## 2 Материалы и методы

### 2.1 Объект исследования

В работе исследовался процесс получения сополимера 3-гидроксивалериановой кислоты. Исследован штамм *Cupriavidus eutrophus* В10646, обладающий способностью синтезировать сополимерные ПГА, образованные коротко- и среднецепочечными мономерами гидроксипроизводных алкановых кислот различного строения, и имеющий широкий органотрофный потенциал (Volova et al., 2013, 2014). Процесс включает культивирование штамма-продуцента на жидкой солевой среде, содержащей углеродосодержащий ростовой субстрат с добавлением соли валериановой кислоты. Все исследования проводились в условиях опытного производства Сибирского Федерального Университета.

### 2.2 Процесс культивирования ПГА

Бактерии выращивали в условиях, разработанных для синтеза ПГА [Волова с соавт., 1992]. Инокулят получали в строго стерильных условиях в периодическом режиме с использованием шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США, рисунок 3) в стеклянных колбах объемом от 0,5 до 2,0 л с коэффициентом заполнения 0,5 при 30 °С и 200 об/мин. Посевной материал получали ресуспендированием музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля при стартовой концентрации глюкозы или фруктозы 10 г/л.

Для выращивания бактерий за основу принята солевая среда Шлегеля:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$  – 9.1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.5;  $\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.025 (г/л) и сбалансированная кислотнo-солевая среда, готовящаяся на основе (Волова, 2004). Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5

г/л), который вводят из расчета 5 мл/л. Микроэлементы вводили по прописи Хоаглана из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 литр среды. Стандартный раствор содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.288;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.030;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0.08;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.008;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.176;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.050;  $\text{NiCl}_2$  – 0.008 (г/л). В качестве источника азота использовали хлористый аммоний и мочевины.



Рисунок 5. Фото шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova®» для культивирования бактерий в колбах объемом от 1 до 3 л.

Культивирование бактерий проводили в стерильном режиме на опытном производстве Сибирского Федерального Университета, с использованием ферментёра фирмы Bioengineering NLF 22 (Швейцария)(рисунок 4, А) с объемом аппарата 30 л, рабочий объем от 5 до 20 л, при температуре 30°C, затем ферментёра фирмы Bioengineering P 150 (Швейцария)(рисунок, Б) с объемом аппарата 150 л, рабочий объем от 10 до 110 л.



А

Б

Рисунок 6. А) Фото ферментера «Bioengineering NLF 22», объемом 30 л

Б) Фото ферментера «Bioengineering NLF 22», объемом 150 л

Провели два эксперимента, где в качестве основного источника углерода и энергии использована кристаллическая глюкоза. Валерьяновую кислоту добавили в глюкозный субстрат в виде натриевой соли, в первом эксперименте концентрация валерьяновой кислоты в этом растворе составила 0,01 г/л. Во втором, 0,025 г/л.

Третий эксперимент так же включал в себя культивирование на глюкозном субстрате, валерьяновую кислоту так же в виде натриевой соли дробно вносили в культуру после 30 ч культивирования. Каждый час добавляли по 50 мл кислоты, продолжительность опыта составила 70 ч.

Так же произвели ряд экспериментов синтеза ПГА на привычном для этого глюкозном субстрате.

В ходе экспериментов периодически отбирали пробы культуры (каждые 5 ч). Контроль оптической плотности и азота, определение содержания и состава полимера, определение сухой биомассы клеток в обоих опытах производили методами, описанными в параграфе 2.3 Анализ проб.

Экстракцию ПГА из клеточной биомассы проводили различными методами с применением различных реагентов.

## **2.3 Анализ проб**

### **2.3.1 Измерение концентрации клеток в процессе культивирования.**

Изменение биомассы клеток в процессе развития культуры регистрировали оптическими показателями культуры. Для измерения оптической плотности периодически отбирали пробы культуры, использовали фотоколориметр КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и  $\lambda=440$  нм (длина оптического пути 1 мм).

### **2.3.2 Определение сухой биомассы клеток**

Концентрацию клеток  $X$ , г/л, регистрировали весовым способом. Для этого брали аликвоты бактериальной суспензии, объемом 10-25 мл, центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин; дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Пробы сушили при температуре 105 °С в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий в культуре определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

### **2.3.3 Измерение азота**

Один миллилитр фугата залить 10 мл дистиллированной воды. Добавить 1-2 капли 33% КОН и 0,5 мл реактива Неслера. Результат наблюдать по цветовой реакции.

### **2.3.4 Определение содержания и состава полимера**

Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца на хромато-масс-спектрометрической системе «Agilent 7820». Метанолиз проб полимера проводили следующим образом: к навеске полимера (4 мг) добавляли один миллилитр внутреннего стандарта (0,5 мг бензойной кислоты один миллилитр хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты, кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч 40 мин. По окончании в пробу добавляли 3 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивали полученный раствор. При этом происходило разделение жидкостей. Нижний хлороформенный слой использовался для анализа. Его получали путем промывки проб дистиллированной водой, с помощью делительных воронок и пропускали через слой сернокислого натрия.

### **2.3.5 Определения концентрации глюкозы**

Концентрацию глюкозы определяли с помощью набора «Глюкоза – ФКД». В комплект набора входит:

- таблетка с ферментно–хромогенной смесью;
- калибратор (раствор глюкозы с известной концентрацией).

Таблетку ферментно-хромогенной смесью растворяли в 100 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивая.

Два миллилитра культуральной жидкости центрифугируют в течение двух минут при 6000 оборотах. В первую пробирку наливаю 0,02 мл фугата, два миллилитра ферментно–хромогенной смеси, во вторую пробирку 0,02 мл калибратора и два миллилитра ферментно–хромогенной смеси, третья пробирка (холостая проба) 0,02 мл дистиллированной воды, и два миллилитра ферментно–хромогенной смеси. Пробы тщательно перемешивают и инкубируют в течение 20 мин. при 37 °С. После окончания инкубации измеряли величину оптической плотности рабочей и калибровочной проб против холостой пробы в кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 490 нм.

Расчёт концентрации глюкозы в пробах рассчитывали по формуле:

$$C=(E_0/E_k)\cdot 9,8 \quad (2.1)$$

где:

$C$  – концентрация глюкозы, г/л;

$E_0$  – оптическая плотность опытной пробы, ед. оп. плотн.;

$E_k$  – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. оп. плотн.;

9,8 – концентрация глюкозы в калибраторе, г/л.

### **2.3.6 Определение концентрации валерьяновой кислоты методом газожидкостной хроматографии ГЖХ.**

Для определения концентрации валерьяновой кислоты, 2 мл культуры откручивали с помощью центрифуги в течении 2 мин. В эппендорф объёмом 2 мл переносили 1 мл надосадочной жидкости, добавляли каплю серной кислоты ,хорошо взбалтывали, затем добавляли 1 мл гексана. Верхний слой анализировали с помощью хроматомасс-спектрометра Agilent 5975Inert,фирмы «Agilent» (США).



### 2.3.7 Расчет кинетических и продукционных параметров культуры.

Критериями оценки процесса биосинтеза ПГА служили: концентрация биомассы клеток в культуре, выход полимера, затраты основного ростового субстрата, длительность и продуктивность процесса. Для этого находили общепринятыми методами кинетические и продукционные параметры культуры [3, 28].

Удельную скорость роста культуры ( $m, ч^{-1}$ ) определяли по уравнению:

$$\mu = \ln \left( \frac{x_k}{x_n} \right) / \Delta t, \quad (1.1)$$

где:

$x_n$ , - начальная концентрация бактерий, г/л;

$x_k$  –конечная концентрация бактерий, г/л;

$\Delta t$  – время культивирования, ч.

Удельную скорость синтеза полимера ( $,ч^{-1}$ ) определяли по формуле:

$$\mu = \ln \left( \frac{ПГА_k}{ПГА_n} \right) / \Delta t. \quad (1.2)$$

где:

$ПГА_n, ПГА_k$  – начальная и конечная концентрация полимера в клетках, кг/м<sup>3</sup>.

Экономический коэффициент культуры субстрату  $Y$ , г/г рассчитывали по формуле:

$$Y = \frac{x_k - x_n}{c_k - c_n}, \quad (1.3)$$

где:

$x_n$ , - начальная концентрация бактерий, г/л;

$x_k$  –конечная концентрация бактерий, г/л;

$C_k$  –конечное содержание используемого субстрата, г/л;

$C_n$  – начальное содержание используемого субстрата, г/л.

## **2.5 Методы обработки данных**

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 7.

## ВЫВОДЫ

1. В ходе проделанных экспериментов установлено, что с увеличением концентрации валерьяновой кислоты идёт увеличение субстратной константы от 0,35 до 0,71 г/л, что свидетельствует о ингибировании валерьяновой кислотой роста культуры. При добавление валерьяновой кислоты в различных концентрациях наблюдается ингибирование смешанного типа. Константа ингибирования для валерьяновой кислоты составила 0,73 г/л.
2. Исследованы, дробный способ внесения валерьяновой кислоты и способ добавления прекурсора совместно с основным глюкозным субстратом. Внесение солей валерьяновой кислоты в культуру в качестве прекурсора, привело к снижению выхода биомассы. Дробная добавка прекурсора дает выход биомассы в 2 раза ниже, чем при культивирование на чистой глюкозе, 56,6 г/л. Максимальная удельная скорость роста по каталитической биомассе в этом случае составляет  $0,175 \text{ ч}^{-1}$ . Выход биомассы при культивирование на смешанном субстрате так же снижается до 68 - 82 г/л. Максимальная скорость роста в данном случае  $0,19-0,2 \text{ ч}^{-1}$ . Варьируя режим углеродного питания и количество вносимых добавок дополнительного углеродного субстрата, удалось синтезировать двухкомпонентный полимер с различным содержанием мономеров ЗГВ.
3. По результатам проведённых исследований, установлены оптимальные технологические параметры для дальнейшего масштабирования при промышленном производстве сополимера. Полученные результаты позволяют производить до 85 г/л биомассы с выходом сополимера 3-гидроксипропириата-со-3-гидроксивалерата до 80 %. с включением 3-гидроксивалерата около 20 %.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Волова, Т.Г. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие для самостоят. работы [для студентов программы подг. 020400.68 «Биология»] / Сиб. федерал. ун-т ; сост.: Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. - Красноярск : СФУ, 2013. - С. 73.
2. Вторичные ресурсы: проблемы, перспективы, технология, экономика: Учеб. пособие / Г. К. Лобачев [и др];– Волгоград, 1999. – С. 180.
3. Волова, Т.Г. Физико-Химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения. / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов, А. Д. Васильев, А. Г. Суковатый, А. J. Sinsky // Высокомолекулярные соединения, Серия А, 2013, том 55, № 7, с. 775–786.
4. Steinbüchel, A.; Fichtenbusch, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. Trends Biotechnol. 1998, С. 16, 419-427.
5. Doi, Y. Microbial polyesters; VCH: New York, 1990.
6. Noisshiki Y., Komatsuzaki S. Medical materials for soft tissue use // Japanese Patent Application. № JP 7275344 A2. 1995.
7. Dawes, E.A. Novel biodegradable microbial polymers. Kluwer Academic, Dordrecht / E.A. Dawes. - Netherlands, 1990.- С. 287.
8. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // Proc. Biochem., 2004. – С. 607 – 619.
9. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh., H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci. - 2000.- С.1503-1555.
10. Page, W.J. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/ W.J. Page, A Cornish. // Appl. Environ Microbiol. 2003. - 4236-4244 с.
11. Bhubalan K., Lee W.H., Loo C.Y., Yamamoto T., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K. (2008) Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-

- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polym. Degrad. Stabil.*, 1993. - C.17-23.
12. Lee, S. Y.; Chang, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). *Adv. Biochem. Eng.* 1995. - C. 52, 27-58.
  13. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh., H. Abe, Y. Doi // *Prog. Polym. Sci.* - 2000. - 1503-1555 c.
  14. Choi J., Lee S.Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1999. -C. 13–21.
  15. Dai Y., Yuan Z., Jack K., Keller J. Production of targeted poly(3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source. *Journal of Biotechnology*, 2007. -C. 489–497.
  16. Huisman G.W., Madison L.L. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999. -C. 21–53.
  17. Волова, Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Красноярск.: СО РАН, 2002. – 267 с.
  18. Koning, G. D. Physical properties of bacterial poly((R)-3hydroxyalkanoates). *Can. J. Microbiol.* 1995. - 303-309 c.
  19. Mergaert, J.; Webb, A.; Anderson, C.; Wouters, A.; Swing, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. -C. 3233-3238.
  20. Yamane, T.; Chen, X. F.; Ueda, S. Growth-associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from n-pentanol by a methylotrophic bacterium. *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 380-384 c.
  21. Елинов Н. П. Основы биотехнологии. СПб: Наука, 1995, 149-152 с.

22. Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C. (1995) Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology (N Y)*13, 142–150 с.
23. Slater, S., Gallaher, T. and Dennis, D. (1992) Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* 58, 1089–1094 с.
24. Abe, H., Doi, Y., Yamamoto, Y. 1992. Controlled release of lastet, an anticancer drug, from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres containing acylglycerols. *Macromolec. Rep. A29*: 229-235 с.
25. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. (1972) Методы биохимического исследования растений. Л., Колос, 306 с.
26. Chia K.-H., Ooi T.-F., Saika A., Tsuge T., Sudesh K. Biosynthesis and characterization of novel polyhydroxyalkanoate polymers with high elastic property by *Cupriavidus necator* PHB- 4 transformant. *Polymer Degradation and Stability*, 1995: 222-229 с.
27. Lee, S.Y. Plastic bacteria. Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria (Reviews)/ S.Y Lee // *Tibtech.*-1996.- 431-438 с.
28. Madison, L.L. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic / L.L. Madison, G.W. Huisman // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999: 63,21-53 с.
29. Poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates): Biorefinery polymers in search of applications / R.H Marchessault // *Macromol. Chem., Macromol.Symp.* , 2002.Vol.19.-P. 235-254.
30. Page, W.J. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/ W.J.Page, A Cornish. // *Appl. Environ Microbiol.*-1993: 4236-4244 с.
31. Lee, S.Y. Poly (3-hydroxyalkanoate) production from xylose by recombinant *E. coli*/ S.Y. Lee. // *Bioprocess Engin.*-1998: 397-399 с.


32. Севастьянова, В.И. Биосовместимость / В.И. Севастьянов; под ред. В.И. Севастьянова - М.:ИЦ ВНИИГеосистем, 1999.-368 с.
33. Anderson, A. J.; Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 1990, 54, 450-472 с.
34. Kobayashi, G.; Tanaka, K.; Itoh, H.; Tsuge, T.; Sonomoto, K.; Ishizaki, A. Fermentative production of P(3HB-co-3HV) from propionic acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed-batch culture with pH-stat continuous substrate feeding method. *Biotechnol. Lett.* 2000, 22, 1067-1069 с.
35. Shang, L.; Do, J. H.; Fan, D. D.; Jiang, M.; Chang, H. N. Optimization of propionic acid feeding for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in fed-batch of *Ralstonia eutropha*. *Chin. J. Chem. Eng.* 2003, 11, 220-223 с.
36. Rhee, Y. H.; Jang, J. H.; Rogers, P. L. Production of copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by fed-batch culture of *Alcaligenes* SP. SH-69. *Biotechnol. Lett.* 1993, 15, 377-382 с.
37. Ramsay, B. A.; Lomaliza, K.; Chavaric, C.; Dube, B.; Bataille, P.; Ramsay, J. A. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 293-298 с.
38. High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: growth and production of poly (3-hydroxyalkanoates) in two-liquid phase batch and fed-batch systems / H. Preusting [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.*-1992: 550-556 с.
39. Shimizu, H.; Kozaki, Y.; Kodama, H.; Shioya, S. Maximum production strategy for biodegradable copolymer P(HB-HV) in fed-batch culture of *A. eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 62, 518-525 с.
40. Lee, E. Y.; Kang, S. H.; Choi, C. Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by newly isolated *Agrobacterium* sp. SH-1 and GW-04 from structurally unrelated single carbon substrates. *J. Ferment. Bioeng.* 1995, 79, 328-334.

41. Doi, Y.; Kunioka, M.; Nakamura, Y.; Soga, K. Nuclear magnetic resonance studies on poly( $\alpha$ -hydroxybutyrate) and a copolyester of  $\alpha$ -hydroxybutyrate and  $\alpha$ -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules* 1986, 19, 2860-2864.
42. Yim, K. S.; Lee, S. Y.; Chang, H. N. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 49, 495-503 c.
43. Shang, L.; Do, J. H.; Fan, D. D.; Jiang, M.; Chang, H. N. Optimization of propionic acid feeding for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in fed-batch of *Ralstonia eutropha*. *Chin. J. Chem. Eng.* 2003, 11, 220-223 c.
44. Du, G. C.; Chen, J.; Yu, J.; Lun, S. Y. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. *Biochem. Eng. J.* 2001, 8, 103-110 c.



Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
 Т. Г. Волова

« 21 » июня 2017 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Масштабирование технологии получения сополимера 3-гидроксипропиридата-  
со-3-гидроксивалерата в условиях опытного производства.

Руководитель

  
подпись, дата

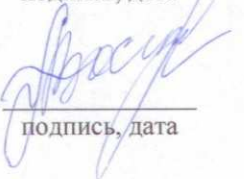
доцент, канд. техн. наук

должность, учёная степень

Е.Г. Киселёв

инициалы, фамилия

Выпускник

  
подпись, дата

В.А. Востоплец

инициалы, фамилия

Красноярск 2017