

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

Влияние соотношения C:N в среде на синтез ПГА в культуре бактерий
Cupriavidus eutrophus

Руководитель

подпись, дата

доцент, канд. техн. наук

должность, учёная степень

С.В.Барановский

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

О.Д.Петровская

инициалы, фамилия

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Влияние соотношения C:N в среде на синтез ПГА в культуре бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646» содержит 44 страницы и включает в себя 40 литературных источников, 3 таблицы, 6 формул, 14 рисунков.

C:N, БИОСИНТЕЗ, ПГА, CUPRIAVIDUS EUTROPHUS, БИОПОЛИМЕР.

Цель работы - исследовать влияние соотношения C:N в среде на процесс биосинтеза ПГА.

Актуальность данной работы заключается в исследовании влияния соотношения C:N на процесс биосинтеза, одного из наиболее перспективного для производства биоразрушаемых пластиков, штамма бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646, так как соотношение углерода и азота в питании микроорганизмов оказывает существенное влияние на биологические процессы, происходящие в клетке, и подбор оптимального соотношения C:N для каждого биологического объекта позволяет получить максимальные ростовые и продукционные характеристики производственного штамма.

В результате проведённых исследований определено влияние соотношения C:N на ростовые характеристики культуры *Cupriavidus eutrophus* B10646. Установлены параметры C:N, обеспечивающие усиленный рост культуры и накопление полимера. Исследовано влияние соотношения C:N на накопление ПГА в биомассе. Установлено, что с увеличением C:N содержание ПГА в клетках также увеличивается. Исследовано влияние содержания ПГА в клетках на удельную скорость роста культуры. Установлено, что с увеличением содержания ПГА в клетке ростовые характеристики культуры снижаются.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1 Обзор литературы	6
1.1 Характеристика ПГА	6
1.2 Синтез ПГА.....	11
1.3 Соотношение С: N в культивирование различных микроорганизмов ...	15
2 Материалы и методы	17
2.1 Расчет кинетических параметров культуры.....	17
2.2 Сырье и материалы для культивирования.....	19
2.3 Приготовление питательных сред.....	21
2.4 Приготовление инокулята.....	22
2.5 Анализ проб	23
2.5.1 Измерение концентрации клеток в ходе культивирования	23
2.5.2 Определение сухой биомассы клеток.....	23
2.5.3 Определение концентрации глюкозы	24
2.5.4 Измерение азота	25
2.5.5 Определение содержания полимера	25
3 Результаты.....	26
3.1 Соотношение С:N в культивированиях проведенные на опытном производстве.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Процессы культивирований при несбалансированном соотношении С:N	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Влияние соотношения С:N на ростовые и продукционные характеристики бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> В10646	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Результаты культивирования проведенного на опытном производстве СФУ	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ.....	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	28

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует глобальная задача по разработке новых экологически чистых и биосовместимых материалов для медицины. Одними из таких биоматериалов являются полигидроксиалканаты (ПГА), синтезируемые многими видами бактерий. Полигидроксиалканаты могут применяться для создания костных имплантов, использование его в качестве материала для создания транспортной системы доставки препаратов, биополимер может быть использован в виде пленок для быстрого заживления пораженных частей кожи и для многих других целях [4-14].

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) [37].

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 [1].

Полигидроксиалканаты (ПГА) – термопластичные линейные полиэфиры микробиологического происхождения, способные разрушаться до нетоксичных продуктов [8]. В 1925 году, Лемуань обнаружил и впервые описал ПГА, который производила культура *Bacillus* [17]. 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 [27].

Для накопления бактериями полигидроксиалканоатов необходимо производить процесс культивирования в определенном режиме. Для этого необходимо поддерживать определенное соотношение источника углерода и азота.

Цель работы - исследовать влияние соотношения C:N в среде на процесс биосинтеза ПГА.

Для этого необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние соотношения C:N в среде на ростовые характеристики культуры *Cupriavidus eutrophus* B10646.
2. Установить влияние соотношения C:N на накопление ПГА в биомассе.
3. Определить влияние содержания ПГА в клетках на удельную скорость роста культуры.

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, перечислим основные из них.

1) 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 [9]. Саморазрушающиеся медицинские материалы и изделия должны не только быть абсолютно безвредными для организма, но также иметь необходимые механофизические характеристики. При этом скорость биодеструкции материала *in vivo* должна соответствовать скорости регенерации тканей [25].

2) 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.

3) Скорость биорезорбции ПГА значительно ниже, чем полилактидов и полиглицколипидов, 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.

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

5) Сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO₂ и H₂, продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы, производства сахара, пальмового масла, водосодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина [9]. Самые высокие выходы биомассы бактерий (7.8-8.6 г/л) и полимера (7.3-7.9 г/л) получены при использовании в качестве ростовых субстратов сахаров и олеиновой кислоты, что согласуется с данными других авторов (Muzaiyanah and Amirul, 2013). При использовании в качестве субстрата подсолнечного масла конечные концентрация биомассы и полимера были ниже и не превышали 3.9 и 1.8 г/л соответственно. При выращивании бактерий *C. eutrophus* B-10646 максимальное содержание полимера (86-96 % от веса сухой биомассы) получено при культивировании бактерий на сахарах и олеиновой кислоте. При росте на подсолнечном масле содержание полимера не превышало 47 % от веса сухой биомассы [33]. Изучено, что состав ПГА зависит от типа дополнительного субстрата. Жирные кислоты с нечётным количеством атомов углерода стимулируют бактерии синтезировать многокомпонентные ПГА, состоящие из таких основных компонентов, как 3-гидроксibuтират, 3-гидроксивалерат и 3-гидроксигексаноат, и второстепенных, эпизодических компонентов: 3-гидроксигептаноата и 3-гидроксиоктаноата. Жирные кислоты с чётным количеством атомов углерода стимулируют синтез как соответствующих им мономеров (3-гидроксигексаноата и 3-гидроксиоктаноата), так и 3-

гидроксивалерата, что позволяет получать четырёхкомпонентные ПГА, содержащие 3-гидоксибутират и 3-гидроксигексаноат в качестве основных компонентов [30].

В бактериальных клетках ПГА синтезируется и накапливается в виде гранул, локализованных в цитоплазме (рисунок 1). Полигидроксиалканаты по своей химической структуре являются полиэфирами гидроксикислот (рисунок 2) [4].

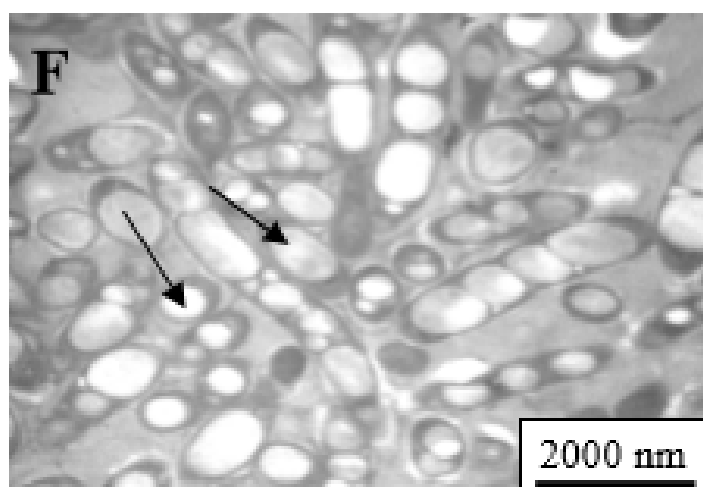


Рисунок 1 - Гранулы ПГА, локализованных в цитоплазме [5]

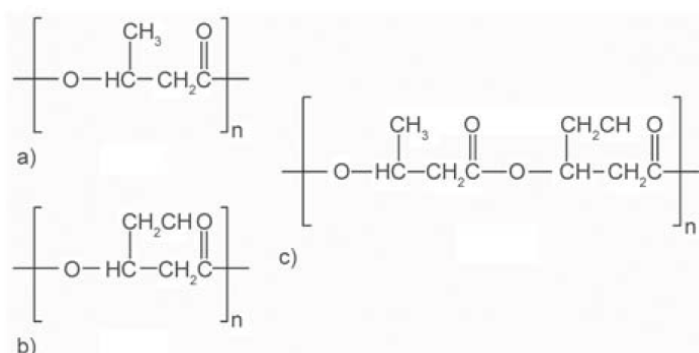


Рисунок 2 - Химическая структура некоторых ПГА: а) ПЗГБ, б) ПГВ, с) ПГВБ [4]

Список известных типов ПГА пополняется, и в настоящее время появляется информация о возможности микробного синтеза полимеров этого класса, содержащих новые, в том числе необычные, мономеры [29].

В зависимости от строения мономеров, входящих в состав ПГА, они разделяются на три основные группы [18]:

1) Короткоцепочечные ПГА, в которых есть 3-5 атомов углерода. Наиболее известные представителями этого класса - поли (3-гидроксибутират) (ПГБ), и его сополимеры с гидроксивалератом. Полигидроксибутират является гомополимером D(-)-3- β -оксимасляной кислоты и представляет собой полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами (C₄H₆O₂) [21]. Из всех ПГА, ПГБ наиболее часто встречается в природе. Это самый простой ПГА по отношению к химической структуре, имеющие метилен группу (-CH₂). 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 [19,10].

2) 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 [32-24].

3) Длинноцепочечные, с содержанием 17-18 атомов углерода [11].

Полигидроксиалканоаты как высокомолекулярные соединения характеризуются комплексом физико-химических и механических свойств, обусловленных высокой молекулярной массой полимеров, цепным строением и гибкостью макромолекул, главные из которых это:

- способность образовывать высокопрочные высокоориентированные волокна и пленки;
- способность к большим длительно развивающимся деформациям;
- способность к набуханию и растворению [35];
- термопластичность;

-биосовместимость и, следовательно, подходит для медицинских целей;

-растворим в хлороформе и других хлорированных углеводородах;

-тонет в воде, что облегчает его анаэробной биodeградации в отложениях;

-нетоксичен [4].

Имея данные характеристики, полимер широко применим для медицинских целей. Семейство ПГА представлено полимерами различного химического строения, существенно различающихся физикохимическими свойствами. Среди них различные материалы – от высококристаллических термопластов до конструкционных эластомеров, что определяется химическим строением мономеров, образующих эти полимеры (Sudesh, 2004; Volova et al., 2013). Сополимеры, образованные мономерами бета- и гамма-производных масляной кислоты, в зависимости от соотношения мономеров различаются физико-механическими свойствами. С увеличением содержания в них мономеров 4-гидроксимасляной кислоты возрастает эластичность получаемых изделий и их привлекательность для разработки биоразрушаемых пленочных раневых покрытий [2].

Из высокоочищенных ПГА разработывают хирургические нити, резорбируемые трубчатые стенты, 2D и 3D плотные и пористые матриксы, полимерные покрытия. Полимерные изделия различной формы и массы имплантируют в мышцы, костную ткань, внутривенно, во внутренние органы и исследуют ответ тканей на различные имплантаты. Исследования показали, что ПГА обладают высокой биосовместимостью по отношению к различным тканям и их имплантация на длительные сроки не вызывает реактивных изменений со стороны клеток, тканей и крови [26].

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.

Продуцентами ПГА являются многие бактерии и имеют различные свойства. Так, например, ПГА-деполимеразы *Hydrogenophaga pseudoflava* обладают специфичностью к следующим мономерам, снижающейся в ряду ЗГБ>ЗГВ>4ГБ (Yoon and Choi, 1999). ПГА-деполимеразы *Pseudomonas oleovorans* характеризуются различной специфичностью по отношению к короткоцепочечным и среднецепочечным ПГА, а также обладают несходной структурой (Stuart et al., 1996; Foster et al., 1996) [34]. *Cupriavidus necator* является наиболее широко изученной и широко используемой бактерией для производства ПГА. В 1980-х годах мутированная форма *C. necator* был использован Imperial Chemical Industries (UK) для промышленного производства поли (3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерата) [P (ЗНВ-со-ЗНВ)], который был продан под торговой маркой BiopolTM [20]. Генетически сконструированные бактерии, такие как рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, которые продуцируют ПГА, содержащие различные в составе полимера мономеры [15].

ПГА синтезируются в ходе сложного 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.

Бактериальные клетки способны накапливать до 90% ПГА от сухой биомассы [Steinbüchel and Lütke-Eversloh 2003]. Накопление ПГА является естественным способом для бактерий хранить энергетические запасы, когда запасы питательных веществ являются несбалансированными. Данные полиэферы накапливаются, когда рост бактерий ограничен истощением азота, фосфора или кислорода. ПГА не растворимы в воде. Полимеризацией растворимых промежуточных соединений в нерастворимые молекулы, клетка не претерпевает изменений в ее осмотическом состоянии. Таким образом, предотвращается утечка этих ценных соединений для клетки [Peters and Rehm 2005].

Рассмотрим метаболические пути биосинтеза на примере наиболее изученного из полиоксиполлимеров – полимера β -оксимасляной кислоты. Эти пути являются общими практически для всех бактерий-продуцентов. Фермент β -кетотиолаза катализирует образование углерод-углеродной связи двух ацетил-КоА остатков. Молекулы ацетил-КоА поступают при этом из гликолиза через образование пирувата. Далее НАДФН-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза превращает ацетоацетил-КоА в 3-гидроксипропионил-КоА [Findlay R. H., 1983]. На следующем этапе молекулы 3-гидроксипропионил-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 - полимеразы могут

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 -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 ферментов ПГБ-деполимеразой. Таким образом, регуляция процесса полимерного биосинтеза осуществляется путем смещения равновесия между прямой и обратной реакциями полимеризации и деполимеризации [28].

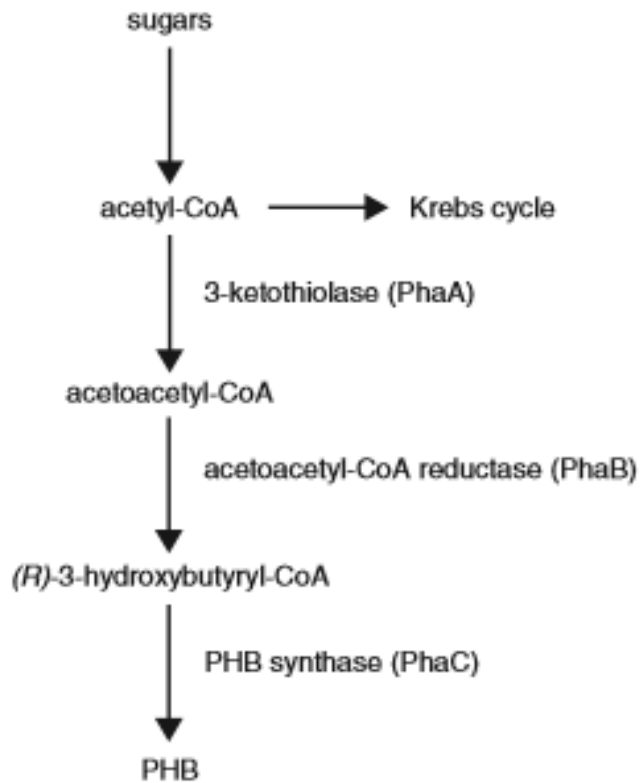


Рисунок 3 - Схема биосинтеза ПГБ, проходящего в бактериальных клетках [28]

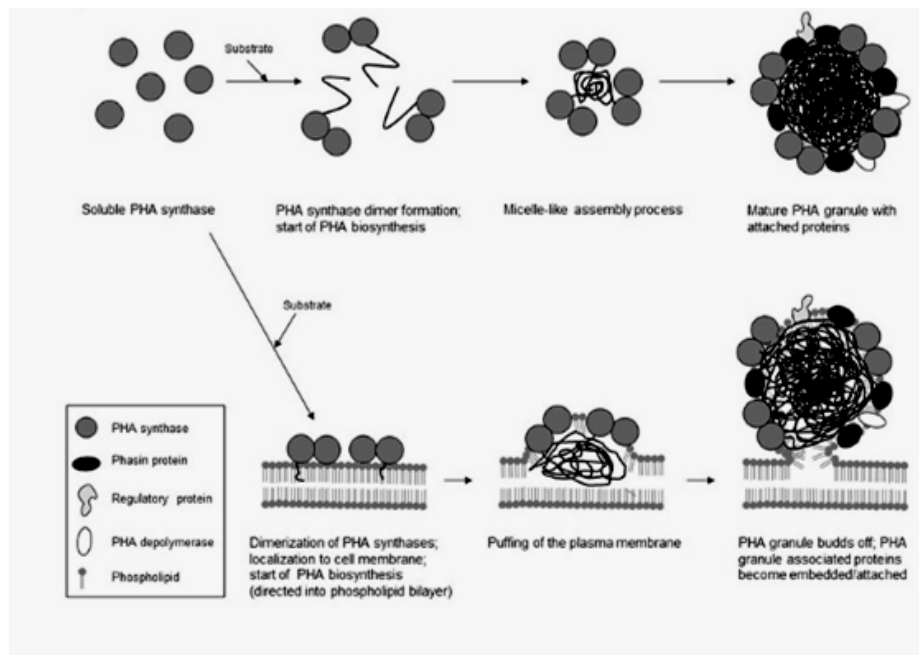


Рисунок 4 - Схема формирования полимерных гранул в цитоплазме бактериальных клеток при синтезе ПГБ [23]

1.3 Соотношение С: N в культивирование различных микроорганизмов

Соотношение углерода к азоту является важным показателем не только для роста и накопления полимера культурой бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646, но и для других организмов и биоценозов в целом.

Возьмем к примеру группу фотолитотрофных водорослей, обитающие в океане. Для их роста главным являются соотношение углерода к азоту в водной среде. Если в среде обитания соотношение углерода к азоту около 5, то данные бактерии будут содержать в себе много белка. Если больше, то бактерии содержат больше энергоемких молекул [22].

Для роста дрожжей *Hansenula polymorpha*, существуют несколько режимов культивирования. Углеродными компонентами среды являлись метанол и глюкоза, в качестве азота использовали соли аммония. Первый режим, среда с соотношением С: N 12 привела к углеродно-ограниченному росту (высокое содержание клеточного белка, низкое содержание углеводов) и в этих условиях использовались глюкоза и метанол одновременно. Среда с коэффициентом С: N >31 привела к азотно-ограниченному росту (низкому содержанию белка, но высокое содержание углевода в клетках) и клетки усваивали только глюкозу. Переходный режим роста наблюдался во время роста на средах с промежуточными соотношения С : N ($12 < \text{C:N} < 31$).

В этом переходном режиме роста, выявлены изменения углеродного обмена, клеточного и ферментативного состава клеток. С увеличением соотношения С: N в питательной среде происходит постепенное подавление синтеза, обнаружены метанол-ассимилирующие и разнородные ферменты [12].

На процессы роста соотношение С: N влияют как на структуру, так и на функцию пищевых сетей, и в конечном итоге оказывает влияние на широкомасштабные процессы, такие как глобальные углеродные циклы, вариация стехиометрии еще не полностью изучена. Эмпирические данные

показывают, что специфический темп роста отнесен к концентрации рибонуклеиновой кислоты и между и внутри таксонов как у одноклеточных, так и у многоклеточных организмов. Поскольку РНК богата фосфором и составляет значительную часть общего фосфора. В организмах, высокая скорость роста также связана с высоким содержанием фосфора. Согласно модели (предложенной Тобиасом Вреди и его соавторами) процент N и особенно процент P в сухой массе возрастает с увеличением удельной скорости роста [31].

В литературе описаны влияния различных соотношения C:N в процессе культивирования. Для роста культуры *Bacillus megaterium* исходя из графиков, максимальный рост бактерий был при соотношении углерода к азоту 25-26 (соотношение посчитано по граммам). Соотношение ПЗГБ на 20 часу культивирования было более 75%. Результаты мелкомасштабных экспериментов, проведенных в колбах показали, что *Bacillus megaterium* способен производить крупные количества ПЗГБ, достигая накопления полимера около 70% без ограничения азота. При минимизации субстрата хороший рост и накопление ПГА был виден при соотношении около 8 [7].

При работе с культурой бактерий *Pseudomonas putida* GPO1 максимальный рост и накопление полимера было при соотношении C:N – 18,3 [16].

Так же были сделаны работы при непрямом культивировании микроорганизмов способные продуцировать ПГА, а при их использовании при переработке сточных вод, причем выход полимера был 0,111 г/г биомассы где соотношение углерода к азоту было 96:1 [6]. Такое «двойное» использование микроорганизмов существенно снижает стоимость ПГА, но скорее всего данный полимер будет пригоден для бытового применения.

2 Материалы и методы

2.1 Расчет кинетических параметров культуры

Критериями оценки процесса биосинтеза ПГА служат концентрация биомассы клеток в культуре, выход полимера, затраты основного ростового субстрата, длительность и продуктивность процесса. Для этого находили кинетические и продукционные параметры культуры [38].

Для анализа брались следующие данные культивирования: записывается час культивирования, время отбора пробы, количество поданной глюкозы (в мл), количество поданной мочевины (в мл), значение ПГА, концентрация биомассы (сухие веса).

Для определения соотношения углерода к азоту по граммам нужно перевести значения данные в миллилитрах субстрата определенной концентрации основного вещества.

В ходе культивирования в качестве азотного субстрата бралась мочевины 60г/л концентрацией. В ходе культивирования азот подается и зафиксирован компьютером в миллилитрах. Чтобы определить сколько в граммах именно азота нужно добавить надо воспользоваться следующей формулой:

$$N = ((\text{мочевина в мл} * \text{концентрация мочевины} / 1000) * (28/60)) \quad (1);$$

где: 28- молярная масса азота в молекуле мочевины, 60- молярная масса мочевины.

В качестве углеродного сырья использовалась глюкоза. Для определения количества углеродного компонента глюкозы в граммах выведена следующая формула:

$$C = ((\text{глюкоза в мл} * \text{концентрация глюкозы} / 1000) * (72 * 180)) \quad (2);$$

где: 72- молярная масса углерода в молекуле глюкозы, 180- молярная масса молекулы глюкозы.

В ходе первичного анализа предыдущих культивирований результаты усредняются для получения достоверных значений. Производится отбор данных с учетом доверительных интервалов для значений культивирования.

Затем произведен расчет удельной скорости роста по усредненной концентрации биомассы, чтобы проследить как изменится скорость роста в процессе культивирования. Удельная скорость роста это функция описывающая рост популяции микроорганизмов.

На основе установленной зависимости удельной скорости роста от концентрации субстрата в питательной среде, обратившись к проблеме непрерывного культивирования, Моно обосновал принцип хемостата, послуживший теоретической основой различных приемов и способов культивирования широкого круга микроорганизмов.

Уравнение Моно:

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_s + S} * x \quad (3);$$

где: x – концентрация клеток в культиваторе, г/л;

μ – удельная скорость роста, функция, описывающая размножение популяции;

S – концентрация субстрата;

K_s - константа Моно по субстрату S , численно равная концентрации субстрата, при которой удельная скорость роста равна половине максимальной;

μ_{max} – максимальная удельная скорость роста.

Общее уравнение концентрации клеток в культуре:

$$dx/dt = x\mu \quad (4);$$

где: x – концентрация клеток в культиваторе;

μ – удельная скорость роста, функция, описывающая размножение популяции.

При $\mu = \text{const}$, интегрируя уравнение (4) получаем:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu * t, \quad (5);$$

после преобразования:

$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{X_n}{X_0} \right)}{t_n - t_0} \quad (6);$$

где: X_n , X_0 – концентрация клеток в культиваторе соответственно в момент времени t_n и t_0 , г/л; μ – удельная скорость роста, функция, описывающая размножение популяции, ч⁻¹ [36].

Затем, исходя из анализа данных, проводили собственное культивирование.

2.2 Сырье и материалы для культивирования

Для культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646 используют в качестве основного субстрата глюкозу, минеральное сырье и материалы (таблица 1). Применяемые материалы и комплектующие изделия должны соответствовать требованиям нормативной и технической документации. Соответствие материалов предъявляемым требованиям должно подтверждаться документами предприятий – поставщиков и входным контролем по ГОСТ 24297-2013 [40].

Таблица 1 – Сведения о сырье и материалах

Наименование материала	Нормативная документация
Глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆)	ГОСТ 97-58
Карбамид ((NH ₂) ₂ CO)	ГОСТ 6691-77
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O)	ГОСТ 4172-76
Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH ₂ PO ₄)	ГОСТ 4198-75

Наименование материала	Нормативная документация
Магний сернокислый ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	ГОСТ 4523-77
Железо лимоннокислое ($C_6H_5O_7 \times H_2O$)	ТУ6-09-01719-87
Купорос медный ($CuSO_4 \times 5H_2O$)	ГОСТ 19347-99
Марганец хлористый ($MnCl_2 \times 4H_2O$)	ГОСТ 612-75
Никель хлористый ($NiCl_2$)	ГОСТ 4038-79
Купорос цинковый ($ZnSO_4 \times 7H_2O$)	ГОСТ 8723-75
Кобальт хлористый ($CoCl_2 \times 6H_2O$)	ГОСТ 4525-77
Кислота борная (H_3BO_3)	ГОСТ 9656
Спирт этиловый технический (C_2H_5OH)	ГОСТ 18300-87
Реактив Нesslera	ТУ 6-09-2089-77
Калия гидроокись (KOH)	ГОСТ 24363-80
Кислота соляная (HCl)	ГОСТ 3118-77
Кальций хлористый ($CaCl_2$)	ГОСТ 450-77
Пробирка	ГОСТ 1770-74
Цилиндр 1-250 или 3-250, 1-10 или 23-100, 1-1000 или 3-1000	ГОСТ 20292-74
Стаканчик СН 45/13, 60/14	ГОСТ 25336-82
Колба КН-2-250-34 ТХС	ГОСТ 25336-82
Колба КН-1-250; 1-500; 1-1000; 1-2000	ГОСТ 25336-82
Воронка ВФ-1-32 пор ТХС или любого типа с таким же фильтром	ГОСТ 25336-82
Колба мерная 25; 50; 100; 250; 500; 1000; 2000 мл	ГОСТ 1770-74
Колба круглодонная	ГОСТ 25336-82
Палочка стеклянная	
Пипетка стеклянная 1; 2; 10; 25 мл	ГОСТ 29169-91
Спиртовка	ГОСТ 25336-82
Стаканы центрифужные, 2л	

2.3 Приготовление питательных сред

В отделении средоподготовки реализуются следующие стадии технологического цикла:

- стадия приготовления маточных растворов;
- стадия стерилизации.

Вся посуда (колбы, пробирки) предварительно должна быть простерилизована в автоклаве насыщенным водяным паром при давлении 0,1013 МПа. Для приготовления маточных растворов берут соответствующие навески сухих солей и растворяют дистиллированной водой при комнатной температуре. В качестве минеральной среды используется смесь из четырёх маточных растворов: А, Б, В, Г. Растворы готовятся из расчёта на производственную программу.

Раствор А – расчётное количество фосфата калия и фосфата натрия растворяют в дистиллированной воде при перемешивании.

Раствор Б – навеску сульфата магния растворяют в дистиллированной воде.

Раствор В - навеску железа лимоннокислого вносят в ёмкость, дистиллированной водой и кипятят до полного растворения. Затем раствор доводят водой до метки.

Раствор Г – в ёмкость вносят поочередно навески солей, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают до полного растворения.

Растворы: А; Б; В; Г; стерилизуются при температуре плюс 120°С, давлении 0,11 МПа в течение 45 минут.

Раствор глюкозы готовят с концентрацией 500 г/л. Полученный раствор насосом перекачивают в ёмкость через предфильтр и стерилизующий фильтр.

Раствор карбамида готовят с концентрацией 60 г/л. Полученную смесь насосом перекачивают в ёмкость через стерилизующий фильтр. Для

получения воды для приготовления питательных сред и получения инокулята используют аквадистиллятор электрический производительностью 25 л/ч.

В качестве пеногасителя в процессе культивирования используется подсолнечное масло. Для приготовления стерильного пеногасителя необходимо подсолнечное масло (примерно 50 мл) залить в колбу мерную на 100 мл, закрыть ватно-марлевой пробкой и обернуть бумагой, бумагу подвязать верёвкой. Стерилизовать в автоклаве при 1 атм., 121°C, 30 мин [39].

2.4 Приготовление инокулята

Бактерии выращивали в условиях, разработанных для синтеза ПГА [Волова с соавт.,1992]. Инокулят получали в стерильных условиях в периодическом режиме с использованием шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США,) в стеклянных колбах объемом от 0,5 до 2,0 л с коэффициентом заполнения 0,5 при 30 °C 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 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; KH_2PO_4 – 1.5; $\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025 (г/л) и сбалансированная кислотнo-солевая среда (Волова, 2004). Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который вводят из расчета 5 мл/л. Микроэлементы вводили по прописи Хоагланда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 литр среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_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; NiCl_2 – 0.008 (г/л). В качестве источника азота использовали хлористый аммоний и мочеви́ну.

Культивирование бактерий проводили на опытном производстве Сибирского Федерального Университета, с использованием ферментёра фирмы Bioengineering NLF 22 с объемом аппарата 30 л (рисунок 4), рабочий объем от 5 до 20 л, при температуре 30 °С.



Рисунок 5. - Ферментёр Bioengineering NLF 22 (Швейцария), 30 л.

2.5 Анализ проб

2.5.1 Измерение концентрации клеток в ходе культивирования

Изменение биомассы клеток в процессе роста культуры регистрировали оптическими показателями культуры. Для измерения оптической плотности каждый час отбирали пробы культуры и фотоколориметре КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм) мерили оптическую плотность.

2.5.2 Определение сухой биомассы клеток

Концентрацию клеток X , г/л, регистрировали весовым способом. Для этого брали аликвоты бактериальной суспензии, объемом 25-35 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.

2.5.3 Определение 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 и оставляют в холодильнике.

Два миллилитра культуральной жидкости центрифугируют в течение двух минут при 6000 оборотах. В три пробирки добавляют 2 мл ферментно-хромогенной смеси. В первую пробирку наливаю 0,02 мл фугата, , во вторую пробирку 0,02 мл калибратора, в третья пробирка (холостая проба) 0,02 мл дистиллированной воды. 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:

$$C=(E_0/E_K)\cdot 9,8 \quad (7)$$

где:

C – концентрация глюкозы, г/л;

E_0 – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

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

2.5.4 Измерение азота

Для измерения 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.

2.5.5 Определение содержания полимера

Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца на хромато-масс-спектрометрической системе «Agilent 7820» (рисунок 5). Метанолиз проб проводили следующим образом: к навеске полимера (4 мг) добавляли один миллилитр внутреннего стандарта (бензойной кислоты), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты, кипятили с помощью обратного холодильника 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 слой использовался для анализа. Его получали путем отбора с помощью пипетки.

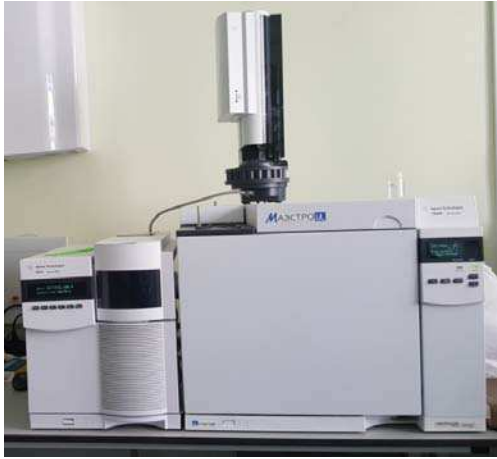


Рисунок 6 - Хроматограф аналитический газовый Маэстро GX 7820 Interlab (Россия)

ВЫВОДЫ

1. Исследовано влияние соотношения C:N на ростовые характеристики культуры *Cupriavidus eutrophus* B10646. Установлено, что для обеспечения высокого роста культуры, соотношение C:N необходимо поддерживать в пределах от 4 до 8. В проведенных исследованиях соотношение C:N равное 6 обеспечило максимальную достигнутую удельную скорость роста $\mu = 0,21 \text{ ч}^{-1}$. При соотношении C:N более 10, μ не превышает $0,05 \text{ ч}^{-1}$.

2. Исследовано влияние соотношения C:N на накопление ПГА в биомассе. Установлено, что с увеличением C:N содержание ПГА в клетках также увеличивается.

3. Исследовано влияние содержания ПГА в клетках на удельную скорость роста культуры. Установлено, что с увеличением содержания ПГА в клетке ростовые характеристики культуры снижаются. Для обеспечения максимальной скорости роста культуры необходимо, чтобы содержание ПГА в клетках составляло не более 30 %.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bhubalan K. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors / K. Bhubalan, W.H Lee, C.Y Loo, T. Yamamoto, T. Tsuge, Y. Doi, K. Sudesh. // *Polym. Degrad. Stabil.*, – 2008. – P. 17-23.
2. Borovkova Natalia V. Study of Biocompatible Films and Nonwoven Membranes Made of Copolymer of 3-hydroxybutyric Acid and 4-hydroxybutyric Acid in vitro / Natalia V. Borovkova, Anatoly K. Evseev, Maksim S. Makarov, Irina V. Goroncharovskaya, Olga N. Vinogradova, Elena D. Nikolaeva, Dmitry B. Goncharov, N.V. Sklifosovsky // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 1. – 2016. – P. 43-52.
3. Brigham Christopher J. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry / Christopher J. Brigham., Anthony J. Sinskey // *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. – 2012. – № 1, – P. 53-60.
4. Bugnicourt E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging/ E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez // *eXPRESS Polymer Letters*. – Vol.8, – №.11. – 2014. – P. 791-808.
5. Chee Jiun-Yee Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics / Jiun-Yee Chee, Sugama-Salim Yoga, Nyok-Sean Lau, Siew-Chen Ling, Raeid M. M. Abed, Kumar Sudesh // – 2010.
6. Chua C. K. Ma. Optimal Production of Polyhydroxyalkanoates in Activated Sludge Biomass / C. K. Ma, H. Chua, P. H. F. Yu, K. Hong // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2000. – P. 84 – 86.
7. D'ébora Jung Luvizetto Faccin Optimization of C :N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by

- Bacillus megaterium* / D'ebora Jung Luvizetto Faccin, Ivana Martins, Nilo S'ergio Medeiros Cardozo, Rosane Rech, Marco Ant ^ onio Z'achia Ayub, Tito L'ivio Moitinho Alves, Rossano Gambetta, Argimiro Resende Secchi // Wiley Interscience. – 2009. – P. 22-40.
8. Dawes E.A. Novel biodegradable microbial polymers / E.A. Dawes // Kluwer Academic, Dordrecht. – Netherlands. – 1990. – P. 287.
 9. Dawes E.A. Novel biodegradable microbial polymers / E.A. Dawes // Kluwer Academic, Dordrecht. – Netherlands. – 1990. – P. 287.
 10. Doi, Y Nuclear magnetic resonance studies on poly(̂-hydroxybutyrate) and a copolyester of ̂-hydroxybutyrate and ̂-hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 / Y Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, K. Soga // *Macromolecules*. – 1986. – P. 2860-2864.
 11. Du G. C. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha* / G. C. Du, J. Chen, J. Yu, S. Y. Lun // *Biochem. Eng. J.* – 2001. – P. 103-110.
 12. Egli Th. Influence of the Carbon:Nitrogen Ratio of the Growth Medium on the Cellular Composition and the Ability of the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* to Utilize Mixed Carbon Sources / Th. Egli J . R. Quayle // Swiss Federal Institute for Water Resources and Water Pollution Control, Swiss Federal Institutes of Technology / Diibendorfl Switzerland the university. – 1999. – P. 1779- 1788.
 13. Egli Thomas Microbial growth and physiology: a call for better craftsmanship / Thomas Egli // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – P. 1-12.
 14. F. Dr.Simon Application of PHAs in Medicine and Pharmacy / F. Dr.Simon, F. Dr. David. 2005. 5-27 p.
 15. Fonseca G. G. Polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Escherichia coli* harboring the structural genes of the polyhydroxyalkanoate synthases of *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas aeruginosa* using low

- cost substrate / G. G. Fonseca, R. V. Antonio // Journal of Applied Sciences. – 2006. – P. 1745-1750.
16. Hartmann Rene Tailored Biosynthesis of Olefinic Medium-Chain-Length Poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas putida* GPo1 with Improved Thermal Properties / Rene´ Hartmann, Roland Hany, Thomas Geiger, Thomas Egli, Bernard Witholt, Manfred Zinn // Macromolecules. – 2004. – P. 6780-6785.
 17. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // Proc. Biochem. – 2004. – P. 607 – 619.
 18. Kunasundari B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh // eXPRESS Polymer Letters. – Vol.5, – №7. – 2011. – P. 620–634.
 19. Lee E. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by newly isolated Agrobacterium sp. SH-1 and GW-04 from structurally unrelated single carbon substrates / E. Y. Lee, S. H. Kang, C. Y. Choi // Biosynthesis J. Ferment. Bioeng. – 1995. – P. 328-334.
 20. Luzier WD. Materials derived from biomass biodegradable materials / W. D. Luzier // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1992. – P. 839-842.
 21. Noisshiki Y. Medical materials for soft tissue use/ Y. Noisshiki, S. Komatsuzaki // Japanese Patent Application. – № JP 7275344 A2. – 1995.
 22. Raven John A. Global aspects of C/N interactions determining plant - environment interactions / John A. Raven, Linda L. Handley, Mitchell Andrews // Journal of Experimental Botany. – Vol. 55, – № 394. – 2004. – P. 11-25.
 23. Rehm B.H. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles / B.H. Rehm // Curr Issues Mol Biol. – 2007. – P.41-62.
 24. Shang L. Optimization of propionic acid feeding for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in fed-batch of *Ralstonia eutropha* /

- L. Shang, J. H. Do, D. D. Fan, M. Jiang, H. N. Chang, J. Chin. // Chem. Eng. – 2003. – P. 220-223.
25. Shishatskaya Ekaterina I. Biodegradation of PHA in vivo / Ekaterina I. Shishatskaya // Journal of Siberian Federal University. Biology 1. – 2016. – P. 21-32.
26. Shishatskaya Ekaterina I. Biomedical Studies of Polyhydroxyalkanoates / Ekaterina I. Shishatskaya, Tatiana G. Volova // Journal of Siberian Federal University. Biology 1. – 2016. – P. 6-20.
27. Sudesh K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh., H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci. – 2000. – P. 1503-1555.
28. Verlinden R.A.J. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates / R.A.J. Verlinden, D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams, I. Radecka // Review Article. – 2007.
29. Vinogradova Olga N. Biosynthesis and Properties of PHA Containing Monomers 3-Hydroxy-4-Methylvalerate / Olga N. Vinogradova, Tatiana G. Volova // Journal of Siberian Federal University. Biology 2. – 2016. – P. 145-152.
30. Volova Tatiana G. Fundamental basis of production and application of biodegradable polyhydroxyalkanoates / Tatiana G. Volova, Ekaterina I. Shishatskaya, Natalia O. Zhila, Eugeny G. Kiselev, Petr V. Mironov, Alexander D. Vasiliev, Ivan V. Petersone, Anthony J. Sinskey // Journal of Siberian Federal University. Biology 3. – 2012. – P. 280-299.
31. Vrede Tobias Fundamental connections among organism C:N:P stoichiometry, macromolecular composition, and growth / Tobis Vrede, Dean r. Dobberfuhl, S. A. L. M. Kooijman, James J. Elser // *Ecology*. Ecological Society of America. – Amsterdam, The Netherlands. – 2004. – P. 1217–1229.

32. Yim K. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli* / K. S. Yim, S. Y. Lee, H. N. Chang // *Biotechnol. Bioeng.* – 1996. – P. 495-503.
33. Zhila Natalia O. Characterization of *Cupriavidus eutrophus* B-10646 culture synthesizing polyhydroxyalkanoates grown on sugars and lipidic substrates / Natalia O. Zhila, Tatiana G. Volova, Galina S. Kalacheva // *Journal of Siberian Federal University. Biology 2.* – 2014. – P. 161-173.
34. Zhila Natalia O. Synthesis and Intracellular Degradation of P(3HB)/DEG Copolymers by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 / Natalia O. Zhila // *Journal of Siberian Federal University. Biology 2.* – 2016. – P. 136-144.
35. Вайнберг Р. Ш. Теплофизические проблемы и практические результаты повышения энергоэффективности извлечения и термообработки высокомолекулярных биополимеров // *Промышленная теплотехника.* – 2007.
36. Варфоломеев, С. Д. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов : учеб. пособие для биол. и хим. спец. вузов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный // – М. : Высшая школа. – 1990.
37. 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. Sinskey // *Высокомолекулярные соединения. – Серия А.* – 2013. – Т. 55, № 7. – С. 775–786.
38. 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. Sinskey // *Высокомолекулярные соединения, Серия А,* 2013, том 55, № 7, С. 775–786.
39. Киселев Е.Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства / Е.Г.

Киселев, С.В. Барановский, А.В. Демиденко, Т. Г. Волова // Журнал СФУ, Биология – 2014. – С. 134-147.

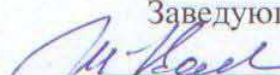
40. Культивирование микроорганизмов в ферментере BioFlo115(7,5л.) / методические указания к лабораторному практикуму [Электронный ресурс] // сост. С.В. Барановский, А.В. Демиденко, Е.Г. Киселев. – Электрон. дан. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2016. – С. 42.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 18 » июня 20 18 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Влияние соотношения C:N в среде на синтез ПГА в культуре бактерий
Cupriavidus eutrophus B10646

Руководитель



подпись, дата

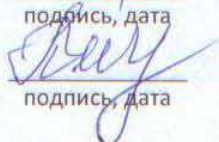
доцент, канд. техн. наук

должность, учёная степень

С.В.Барановский

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

О.Д.Петровская

инициалы, фамилия

Красноярск 2018