

УДК 579.66

А.С. ФЕДОРОВ*, Т.Л. ГОРДЕЕВА, Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ, С.П. СИНЕОКИЙ

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»,
Москва, 117545

e-mail: alex.fedorov@genetika.ru

Биосинтез молочной кислоты с использованием рекомбинантного дрожжевого штамма *Schizosaccharomyces pombe* при низких значениях pH культуральной жидкости

Биосинтез молочной кислоты с использованием рекомбинантного дрожжевого штамма *Schizosaccharomyces pombe* осуществлялся без pH-статирования. Обнаружено, что активный биосинтез МК происходил в течение 24 ч после перехода культуры в стационарную фазу. Скорость поглощения глюкозы из среды понижалась с уменьшением степени аэрации при культивировании в пробирках. Концентрация МК в культуральной жидкости в ферментере достигала 63 г/л за 95 ч; при этом pH КЖ снижался до 2,36 к концу процесса. В этих условиях около 95% всей МК в КЖ находилось в недиссоциированной форме.

Ключевые слова: аэрация, дрожжи, культивирование, молочная кислота, низкие значения pH, ферментер, *Schizosaccharomyces pombe*.

Молочная кислота (2-гидроксипропионовая кислота) является востребованным продуктом для разных отраслей промышленности. Традиционные области ее применения — это пищевая, фармацевтическая, косметическая и кожевенная отрасли. Относительно новая и быстро развивающаяся область применения МК — использование ее для производства биodeградируемых полимеров и растворителей (полилактитов, этиллактата) [1]. Прогнозируется, что мировая потребность в МК составит до 150 тыс. т в год [2].

В микробиологической промышленности традиционными продуцентами лактата являются бактериальные штаммы, которые синтезируют его при нейтральных значениях pH среды. Однако

на этапах выделения и очистки соли МК необходимо переводить в форму свободной кислоты, которая является более предпочтительным, чем лактат, конечным продуктом. Поэтому привлекательным направлением в совершенствовании микробного процесса получения МК является биосинтез кислоты при низких значениях pH, при которых основная часть целевого продукта находится в недиссоциированном состоянии.

Дрожжи обладают устойчивостью к низким значениям pH, что дает им преимущество перед другими микроорганизмами при обеспечении стерильности процесса. Кроме того, дрожжи способны выживать при высоких концентрациях МК. Получены рекомбинантные штаммы *Saccharomyces*

Федоров Александр Сергеевич, Гордеева Татьяна Леонидовна, Борщевская Лариса Николаевна, Синеокий Сергей Павлович.

Список сокращений: а.с.б. — абсолютно сухая биомасса, КЖ — культуральная жидкость, МК — молочная кислота, ОП₅₉₀ — оптическая плотность, измеренная при длине волны 590 нм.

* Автор для переписки.

cerevisiae с клонированными генами лактатдегидрогеназы *ldh*, участвующими в биосинтезе МК, из грибов и бактерий, однако такие процессы осуществлялись при значениях pH 5,0 и 3,6, соответственно, которые поддерживались за счет добавления щелочных растворов [3, 4]. Как показал скрининг 13 родов дрожжей, наиболее перспективными из них продуцентами МК при низких значениях pH (ниже 4,0) могут служить представители вида *Schizosaccharomyces pombe* [5], обладающие наибольшей устойчивостью к высоким концентрациям МК в среде (выше 100 г/л).

Целью данной работы было исследование биосинтеза МК дрожжевым штаммом *S. pombe* с экспрессией гена лактатдегидрогеназы *Lactobacillus plantarum* при низких значениях pH в отсутствие pH-стабилизации.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Продуцент МК. В работе использовали рекомбинантный дрожжевой штамм *Schizosaccharomyces pombe* Y-4204 из коллекции Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (ВКПМ). Штамм Y-4204 был получен путем интеграции в состав его хромосомы гена *ldh*, кодирующего лактатдегидрогеназу *L. plantarum*, и инактивации гена *adh1*, кодирующего фермент алкогольдегидрогеназу, участвующий в синтезе этанола. Штамм *S. pombe* Y-4204 имеет генотип *adh1::ldh pla*.

Состав сред. Использовали среды следующего состава, г/л: **YPD:** дрожжевой экстракт (тип D, Springer, Франция) — 10, пептон дрожжевой (тип НУР-А, Springer) — 20, глюкоза моногидрат (фирма Roquette, Франция) — 22; для приготовления твердой среды добавляли агар (тип Vacto™, BD, Франция) — 18; **КЭ-1** (для культивирования в пробирках): кукурузный экстракт сухой (марка «SO-LULYS® 095E», Roquette) — 10, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (пищевой, ООО «ХИММЕД») — 5,7, KH_2PO_4 (ч.д.а., ООО «ЛабТех») — 3,4, глюкоза моногидрат — 165; **КЭ-2** (для культивирования в ферментере): кукурузный экстракт сухой — 10 и глюкоза моногидрат — 110. pH среды КЭ-2 довели до значения 4,5 или 6,8 титрованием 25%-ным водным аммиаком (о.с.ч., ООО «ЛабТех»).

Все среды стерилизовали без глюкозы автоклавированием при 1,0 атм в течение 40 мин. Глюкозу моногидрат автоклавировали отдельно при 0,5 атм в течение 20 мин в виде водного раствора с концентрацией 550 г/л. Этот раствор также использовали для подпитки культуральной среды в ферментерах. Раствор глюкозы вносили

в среды асептически до необходимых концентраций.

Подготовка посевной культуры для выращивания в пробирках. Клетки высевали на агаризованную среду YPD, и чашку Петри инкубировали 24 ч при 29° в термостате. Затем в пробирку П-20 (высота 20 см, диаметр 20 мм) с ватной пробкой, содержащую 5,0 мл среды YPD, вносили одну большую микробиологическую петлю биомассы с чашки. Суспензию инкубировали 24 ч при 250 об/мин и 29° на круговой термостатируемой качалке (модель с охлаждением, опытное производство ФГУБП ИБП РАН, Пушкино). Полученной культурой инокулировали 750-мл качалочную колбу с ватной пробкой, содержащую 50 мл среды YPD и инкубировали в тех же условиях, что и пробирку. Через 24 ч концентрация а.с.б. в посевной культуре составляла 3,0 г/л.

Проведение основного процесса биосинтеза МК в пробирках. В 120 мл среды КЭ-1 вносили 12 мл посевной культуры (10% по объему). Начальное значение pH культуры составляло 5,80, ОП₅₉₀ — 4, начальная концентрация МК — 2,0 г/л (была учтена при дальнейших расчетах для основного процесса биосинтеза). Исходную культуру помещали в пробирки П-20 с ватными пробками (три повторности). Варианты рабочих объемов КЖ в пробирках были следующие: с перемешиванием — 2,0 мл, 5,0, 10,0 и 15,0 мл; без перемешивания — 5,0 мл. После посева пробирки инкубировали либо на термостатируемой орбитальной качалке (угол наклона пробирок 45°) при 29° и 250 об/мин, либо в термостате без перемешивания под углом наклона 45° при 29°.

Подготовка посевной культуры для ферментеров. Выращивание посевной культуры проводили в 3-литровых ферментерах КФ-103/4 (ООО «Проинтех», Пушкино), оснащенных контроллером Merabit (КЕКЛАВ, Москва-Пушино), системой термостатирования, перистальтическими насосами для титрования и подпитки, а также pH- и pO_2 -датчиками. Культивирование осуществляли на среде КЭ-2 (без глюкозы) с pH 4,5, поддерживаемым добавлением 25%-ного водного раствора аммиака. Рабочий объем КЖ составлял 1,0 л; инокуляцию проводили, как и в случае культивирования в пробирках, из расчета 10% по объему. Температуру культивирования поддерживали на уровне 29°. Перемешивание осуществляли с частотой 300 об/мин. Аэрацию проводили стерильным воздухом из расчета 0,3 л/л/мин. Сразу после внесения инокулята начинали подпитку КЖ раствором моногидрата глюкозы с постоянной скоростью из расчета 250 г глюкозы за 48 ч. К этому вре-

мени ОП₅₉₀ достигало значения 16 и культура считалась готовой для посева в основной ферментер.

Проведение основного процесса биосинтеза МК в ферментере. Культивирование проводили в 3-литровых ферментерах КФ-103/4 с рабочим объемом КЖ 1,8 л. Доля посевной культуры составляла 10%. Аэрацию осуществляли стерильным воздухом из расчета 1,0 л/л/мин. Минимальная частота перемешивания составляла 250 об/мин. В культурах поддерживали концентрацию растворенного кислорода на уровне 20% от насыщения воздухом путем каскадной регулировки скорости мешалки. Процесс вели без титрования при температуре 29° на среде с КЭ-2 с соответствующим значением рН. На 22-м часе и 43-м часе добавляли 257 и 230 мл, соответственно, раствора моногидрата глюкозы.

Аналитические методы. Оптическую плотность клеточных суспензий измеряли при длине волны 590 нм с помощью концентрационного фотоэлектрического колориметра КФК-2МП (ЗОМЗ, Загорск). Для определения концентрации а.с.б. 2,0 мл клеточной суспензии разделяли на биомассу и надосадочную жидкость центрифугированием. Биомассу промывали два раза дистиллированной водой, ресуспендировали и осаждали центрифугированием. Затем промытую биомассу высушивали путем лиофилизации и взвешивали.

Концентрацию глюкозы и L-форму МК определяли с помощью системы измерения уровня глюкозы/лактата BIOSEN C-Line (модель Clinic/GP+, EKf-diagnostic GmbH, Германия), используя ферментные чип-сенсоры глюкозы и лактата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние аэрации на процесс биосинтеза МК при выращивании в пробирках

Для изучения влияния степени аэрации культуры рекомбинантного штамма — продуцента МК Y-4204 на биосинтез МК варьировали лишь один параметр процесса, а именно, начальный рабочий объем КЖ. Поскольку культивирование проводили в идентичных культуральных сосудах (пробирках), поверхность массообмена для переноса кислорода к культуре и, следовательно, количество кислорода, поступающего в каждую культуру, было одинаково (за исключением варианта без перемешивания). Однако интенсивность аэрации культуры снижалась с увеличением ее объема.

В таблице представлены параметры биосинтеза МК через 52 ч, 74 и 95 ч после начала культивирования.

Скорость поглощения глюкозы из среды понижалась с уменьшением степени аэрации. К 74-му часу в культуре с начальным объемом КЖ 2,0 мл глюкоза потреблялась полностью, тогда как в культуре с начальным объемом 5,0 мл почти полное потребление глюкозы наблюдалось лишь к 95-му часу. В вариантах с исходным объемом 10,0 и 15,0 мл, а также в варианте без перемешивания остаточная концентрация глюкозы в конце культивирования составляла 5,0—6,0 г/л.

Не только скорость поглощения субстрата, но и рост биомассы зависел от степени аэрации культуры. К 52-му часу культивирования с исходным объемом КЖ 2,0 мл ОП₅₉₀ выросла до 22, при большем рабочем объеме ОП₅₉₀ была ниже, а в варианте без перемешивания составляла всего 10 оптических ед. Похожая тенденция наблюдалась и к концу эксперимента.

Оптическая плотность культуры не всегда корректно отражает концентрацию биомассы, поскольку клеточная суспензия может менять свои оптические характеристики (светоотражение и светопропускание) за счет изменения как числа, так и формы и размера клеток, а также свойств окружающей среды. Концентрацию биомассы в культуре можно охарактеризовать и путем измерения концентрации а.с.б. Этот параметр напрямую зависел от степени аэрирования культуры (см. таблицу).

Концентрация МК в КЖ увеличивалась с увеличением степени аэрации культуры. Максимальная концентрация МК была в культуре с рабочим объемом 2,0 мл и составляла 58,3 г/л к концу культивирования. В вариантах с рабочим объемом 10,0 и 15,0 мл концентрация МК была одинакова, составляя около 52,5 г/л. В варианте без перемешивания была получена самая низкая концентрация МК в КЖ — 49,1 г/л.

Значение рН КЖ к 95-му часу культивирования во всех вариантах с перемешиванием было около 2,85. При отсутствии перемешивания конечное значение рН культуры было незначительно, на 0,1, выше. Исходя из значения константы кислотности МК $pK_a = 3,73$ [6], при данном значении рН 88% МК находилось в недиссоциированной форме, что облегчает задачу выделения и очистки целевого продукта и снижает количество отходов промышленного производства. Данный процесс биосинтеза не требует использования титрующего агента (щелочи), что также является его преимуществом перед процессами с использованием бактериальных продуцентов.

Важным показателем процесса биосинтеза является степень конверсии субстрата в продукт.

Влияние различной степени аэрации культуры *S. rombe* Y-4204 при выращивании в пробирках на процесс биосинтеза молочной кислоты

Начальный объем, мл	Параметры процесса и длительность культивирования												Конверсия, %		
	52 ч			74 ч			95 ч								
	ОП ₅₉₀	Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация МК, г/л	ОП ₅₉₀	Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация МК, г/л	Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация МК, г/л	Концентрация а.с.б., г/л	Концентрация глюкозы, г/л	Концентрация МК, г/л	Концентрация а.с.б., г/л			
2,0	22	18,4	46,0	24	0	57,9	27	2,85	0,0	58,3	1,54	10,4	45,0	8,0	29,93
5,0	18	34,0	36,6	18	18,8	52,3	19	2,84	0,2	56,2	4,48	7,5	50,4	6,7	33,61
10,0	15	40,5	32,3	15	28,1	46,0	15	2,86	5,3	52,4	9,40	6,0	49,3	5,6	33,97
15,0	13	41,1	31,5	14	31,7	44,5	14	2,84	5,6	52,6	14,35	5,5	50,3	5,3	34,79
5,0**	10	71,4	17,5	11	56,3	33,4	11	2,95	6,1	49,1	4,60	4,0	45,2	3,7	31,29

* Параметр был пересчитан с учетом испарения в процессе культивирования.

** Опыт проводили без перемешивания.

Для расчета конверсии потребленной глюкозы в МК в конце эксперимента был измерен рабочий объем всех вариантов культур. Обнаружено, что в абсолютном выражении испарение из пробирок было приблизительно на уровне $(0,53 \pm 0,13)$ мл за 95 ч. Однако доля снижения объема в каждом варианте была далеко не одинакова и составляла 23%, 10, 6 и 4% при начальном объеме КЖ 2,0 мл, 5,0, 10,0 и 15,0 мл, соответственно (для варианта без перемешивания при начальном объеме 5,0 мл доля испаренной влаги составила 8%) (см. таблицу). Исходя из полученных данных по объему, содержанию конечного продукта и исходной концентрации глюкозы были рассчитаны значения конверсии для каждого варианта. Видно, что при интенсивной аэрации (вариант с исходным объемом КЖ 2,0 мл), а также в отсутствие аэрации конверсия оказалась на 3—4% ниже по сравнению с вариантами с умеренной аэрацией. Для вариантов с рабочим объемом 5,0 мл, 10,0 и 15,0 мл конверсия составляла в среднем $(34,12 \pm 0,61)\%$ при наличии некоторой обратной зависимости от интенсивности аэрации культуры (см. таблицу).

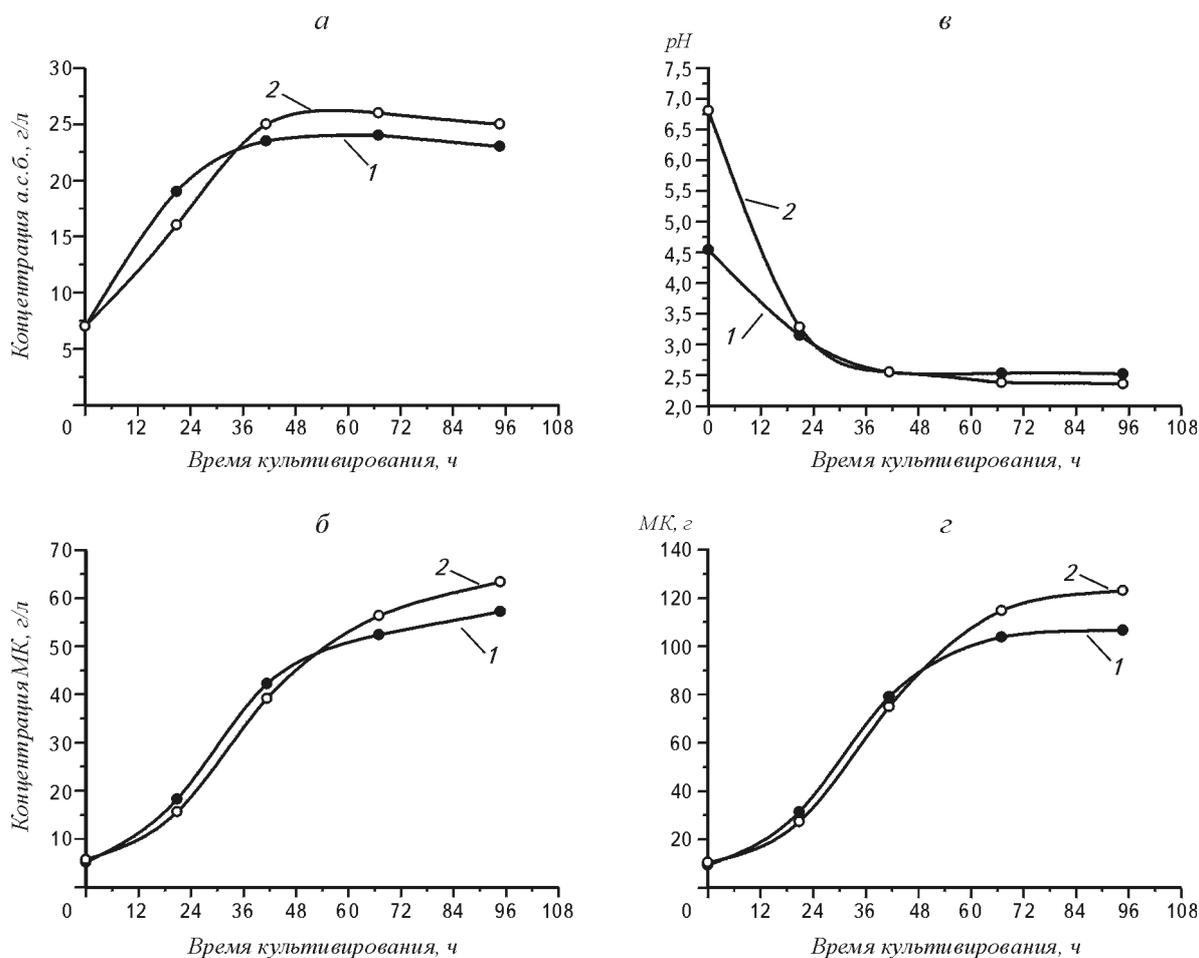
Интересно отметить, что конечная концентрация МК с учетом испарения к концу эксперимента оказалась примерно одинаковой для вариантов с умеренной аэрацией $(50,0 \pm 0,6)$ г/л. Для вариантов без аэрации и с относительно высокой аэрацией концентрация МК составила около 45,0 г/л. Вместе с тем, данные по а.с.б. с учетом испарения позволяют сделать вывод, что удельная активность биомассы возрастает с уменьшением степени аэрации.

Из представленных данных видно, что оптимальным для получения МК при низких значениях рН КЖ является режим аэрации при начальном рабочем объеме 5,0 мл. В этих условиях в КЖ практически отсутствует глюкоза, которая осложняет процесс дальнейшей очистки МК. КЖ содержит МК в высокой концентрации, и конверсия глюкозы в МК близка к максимальной.

Полученные данные могут быть использованы для дальнейшей оптимизации условий культивирования штамма — продуцента МК.

Динамика процесса биосинтеза МК при культивировании в ферментере

Изучение данного процесса сопровождалось регистрацией значения рН КЖ. Как уже говорилось выше, использовали простой периодический режим культивирования без рН-статирования. В зависимости от начального значения рН среды наблюдали различия в характере роста био-



Динамика процесса биосинтеза МК штаммом *S. pombe* Y-4204 в ферментере с рабочим объемом 1,8 л при начальном значении pH среды 4,5 (1) и 6,8 (2): а — а.с.б.; б — концентрация МК; в — pH КЖ; г — накопление МК во всем объеме КЖ

массы (рисунок, а). Замедление роста культуры на среде с pH 4,5 происходило быстрее и концентрация а.с.б. в стационарной фазе (к 30-му часу) была ниже, чем у культуры на среде с начальным pH 6,8. Стационарная фаза роста во втором случае наступала примерно на 12 ч позже.

Концентрация МК в обоих ферментерах непрерывно повышалась на протяжении всего процесса культивирования (см. рисунок, б). В случае, когда биосинтез начинался при нейтральном значении pH (6,8), концентрация МК в КЖ к 95-му часу культивирования была выше на 15% по сравнению с процессом, который начинался при более низком pH (4,5).

Несмотря на различия в исходной кислотности среды к 24-му часу культивирования pH обеих культур достигал одинакового значения — 3,0 (см. рисунок, в); при этом происходил активный биосинтез МК (см. рисунок, б, г). Примерно к 42-му часу pH обеих культур снижался до значения 2,50—2,60, после чего динамика этого показателя

для данных культур становилась различной: в КЖ варианта с начальным pH 4,5 дальнейшее уменьшение pH не происходило, тогда как в КЖ с исходным pH 6,8 этот показатель продолжал снижаться и достигал значения 2,36 к 95-му часу. Разница во времени установления стационарного значения pH также составляла 12 ч (см. рисунок, в).

Несмотря на то, что концентрация МК в ферментерах повышалась на протяжении всего процесса культивирования вплоть до 95-го часа (см. рисунок, б), рост количества целевого продукта (этот параметр дает непосредственную информацию о процессе биосинтеза) прекращался значительно раньше (см. рисунок, г). Так, установлено, что увеличение концентрации МК в КЖ в этот период было связано с испарением воды из ферментера из-за аэрации воздухом и перемешивания. В случае, когда культура росла на среде с исходным pH 4,5 биосинтез останавливался примерно к 54-му часу. Для варианта культуры на среде с pH 6,8 он продолжался примерно до 66 ч (см. рисунок, г).

Таким образом, активный биосинтез МК штаммом *S. pombe* Y-4204 в лабораторном ферментере происходил в течение 24 ч после наступления стационарной фазы роста. При этом значение рН КЖ было ниже 3,00 и продолжало снижаться. Вероятно, остановка биосинтеза связана с длительным нахождением культуры в стационарной фазе роста, а значение рН слабо сказывается непосредственно на синтезе МК клетками.

Конверсия глюкозы в МК составила 23,80 и 22,30% для культуры на среде с начальным рН 4,5 и 6,8, соответственно. Разница в 1,5% может быть объяснена тем, что на среде с рН 6,8 конечное значение а.с.б. было выше. Скорость синтеза МК обеими культурами была примерно одинакова и составила около 0,80 г/л/ч для активной фазы продукции. Невысокие значения конверсии связаны с тем, что штамм Y-4204 наряду с целевым продуктом синтезирует побочные: около 20 г/л глицерина и порядка 10 г/л этанола. Дальнейшие усилия необходимо направить на генетическую модификацию штамма для устранения путей синтеза побочных продуктов [7, 8], а также на оптимизацию условий культивирования.

Исходя из значения константы кислотности МК [6] при наблюдаемых значениях рН на конечных этапах культивирования дрожжей в ферментере 94—96% молочной кислоты находится в недиссоциированной форме, что делает данный штамм привлекательным объектом для дальнейшей работы по созданию промышленного продуцента МК.

Таким образом, в данной работе показана возможность получения МК микробиологическим способом без рН-стагирования с высоким содержанием продукта в КЖ в форме свободной кислоты (63 г/л за 95 ч).

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57914X0013) с использованием уникальной научной установки (УНУ) — Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (уникальный идентификатор проекта RFMEFI59214X0002).

Получено 25.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Jem, K.J., van der Pol, J.-F., Sicco de Vos. Microbial Lactic Acid, its Polymer Poly(lactic acid), and their Industrial Applications: Plastics from Bacteria — Natural functions and applications. [Ed. G.-Q. Chen]. — Berlin: Springer-Verlag, 2010. — P. 327—350.
2. Randhawa, M.A. Optimization of lactic acid production from cheap raw materials: sugarcane molasses / M.A. Randhawa,

A. Ahmed, K. Akram // J. Radiation Res. Appl. Sci. — 2014. — V.7. — P. 222—229.

3. Skory, C.D. Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2003. — V. 30. — N 1. — P. 22—27.
4. Colombie, S. Control of lactate production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a bacterial LDH gene / S. Colombie, S. Dequin, J.M. Sablayrolles // Enzym. Microbiol. Technol. — 2003. — V. 33. — P.38—46.
5. Вустин М.М. Скрининг микроорганизмов — реципиентов для клонирования гена лактатдегидрогеназы с целью получения продуцента молочной кислоты / М.М. Вустин, М.А. Великая, Н.Г. Токарева, С.П. Синеокий // Биотехнология. — 2013. — № 5. — С. 24—30.
6. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. — пер. с англ. В.Л. Друцы и О.Н. Королевой. — М.: Мир, 1991. — С. 47.
7. Drewke, C. Ethanol formation in *adh0* mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae* / C. Drewke, J. Thielen, M. Ciriacy // J. Bacteriol. — 1990. — V. 172. — P. 3909—3917.
8. Sakurai, M. A distinct type of alcohol dehydrogenase, *adh4+*, complements ethanol fermentation in an *adh1*-deficient strain of *Schizosaccharomyces pombe* / M. Sakurai, H. Tohda, H. Kumagai, Y. Giga-Hama // FEMS Yeast Res. — 2004. — V. 4. — P. 649—654.

A.S. FEDOROV*, T.L. GORDEEVA,
L.N. BORSHCHEVSKAYA, and S.P. SINEOKY

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545, Moscow Russia

e-mail: alex.fedorov@genetika.ru

Lactic acid biosynthesis by a recombinant yeast strain of *Schizosaccharomyces pombe* at low pH in the fermentation broth

Lactic acid (LA) biosynthesis by a *Schizosaccharomyces pombe* recombinant strain has been performed without pH control. The most productive period of biosynthesis occurred during 24 hours after the culture had passed to the stationary phase. The rate of glucose assimilation reduced with decreasing in the aeration degree during cultivation in test tubes. In a fermenter, the LA concentration reached 63 g/l by the 95th hour. The final pH of the fermentation broth was 2.36, and 95% of total LA contained in fermentation broth were in the form of free acid under those conditions.

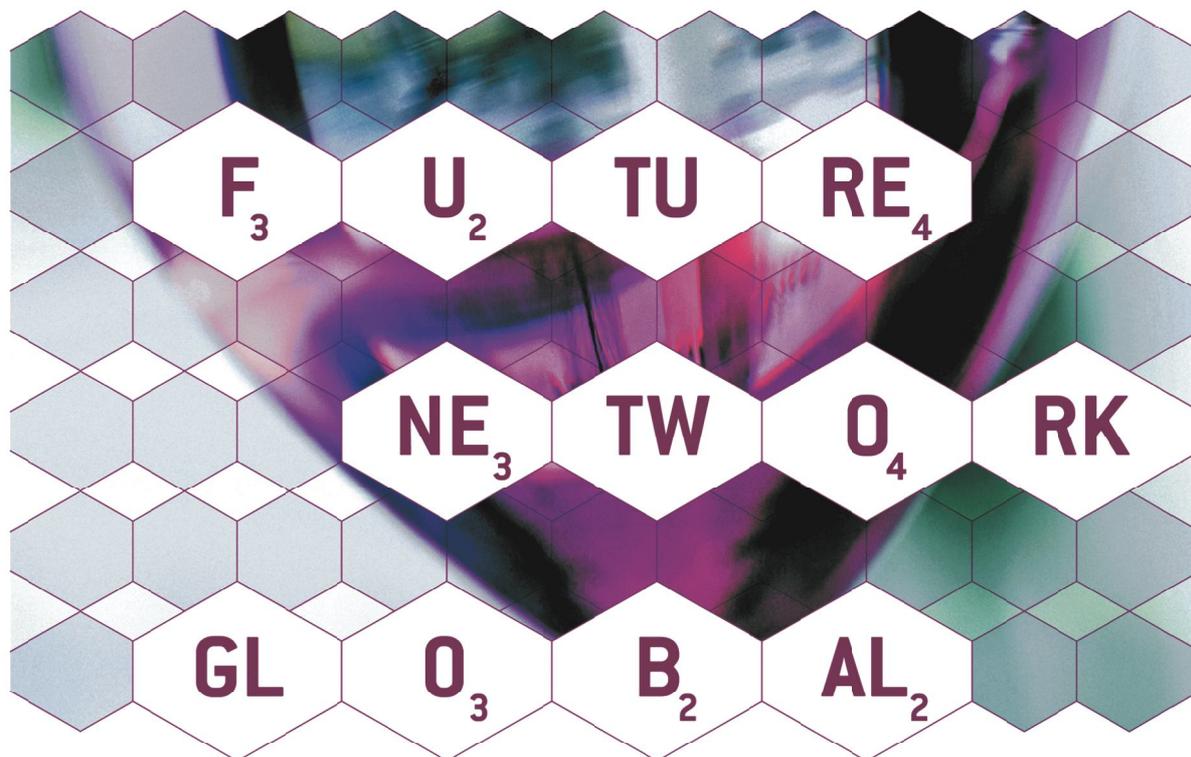
Key words: cultivation, fermenter, lactic acid, low pH, *Schizosaccharomyces pombe*, yeast.

* Author for correspondence.



Messe München

Connecting Global Competence



Elementary to your success.

Крупнейшая в мире сеть специализированных выставок лабораторных технологий, инструментального анализа и биотехнологий представляет полный ассортимент продуктов и услуг для Вашей лаборатории, как научной, так и производственной. *analytica conference* – яркое научное событие, на котором международная элита обсуждает последние открытия в биохимии и лабораторной медицине.

Контакты в России: ООО «Мессе Мюнхен Консалтинг»,
тел. +7 495 697 16 70
info@messe-muenchen.ru

May 10–13, 2016

Messe München

25th International Trade Fair for Laboratory Technology,
Analysis, Biotechnology and *analytica conference*
www.analytica.de

Everything
related to
biotechnology
in one hall



analytica