

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа включает 114 страниц, 26 рисунков, 24 таблиц, 55 источников литературы.

Ключевые слова: *Xanthomonas Campestris*, *Bacillus Amyloliquefacience*, экзополисахарид, ксантан, микробиологический синтез, оптимальные условия.

Объект исследования: микробный экзополисахарид бактерий родов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*.

Цель работы: Получение экзополисахаридов на основе ксантана при совместном культивировании бактерий родов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*.

В ходе исследовательской работы проводился подбор оптимальных условий микробиологического синтеза экзополисахаридов бактериями *Xanthomonas Campestris*, *Bacillus Amyloliquefacience* и при их совместном культивировании.

В результате исследования впервые синтезированы экзополисахариды при совместном культивировании бактерий *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*. Полученные полисахариды охарактеризованы методами: эксклюзионной хроматографии, ИК- и УФ-спектроскопией.

Мономерный состав показал, что все образцы являются однородными. Установлено, что все полученные экзополисахариды содержат глюкозу.

ИК-спектры синтезированных ЭПС имеют фрагменты стандартного ксантана.

Область применения: косметология, пищевая промышленность, медицина.

Бакалаврская работа выполнена на кафедре ФАХ, ИПР.

Руководитель: к.х.н., доцент А.П. Асташкина.

Выполнил: студент группы 2Д2Г Л.И. Худякова.

REVIEW

The graduate qualification work includes 114 pages, 26 pictures, 24 tables, 55 references.

Key words: *Xanthomonas Campestris*, *Bacillus Amyloliquefacience*, Xanthan gum, microbiological synthesis, optimal conditions.

Subject of research: microbial exopolysaccharide of bacteria *Xanthomonas Campestris* and *Bacillus Amyloliquefacience*.

Purpose of the work: microbiological synthesis of exopolysaccharides using bacteria *Xanthomonas Campestris* and *Bacillus Amyloliquefacience* co-culture.

During the research work carried out selection of optimal conditions for microbial synthesis of exopolysaccharides using bacteria *Xanthomonas Campestris*, *Bacillus Amyloliquefacience*.

Results of the research: first synthesized exopolysaccharides using bacteria *Xanthomonas Campestris* and *Bacillus Amyloliquefacience* co-culture. Weight is determined by gravimetric method. These exopolysaccharides identified by IR spectroscopy. Defined physicochemical properties: glucose, monomer composition and molecular weight.

Areas of use: cosmetology, food industry, medicine.

The graduate qualification work performed at the Department of Physical and Analytical chemistry, Institute of Natural Resources.

Supervisor: PhD, associate professor A.P. Astashkina

Author: student L.I. Khudyakova, group 2D2G

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	15
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Экзополисахариды. Классификация экзополисахаридов	18
1.2 Экзополисахарид ксантан	20
1.2.1 Применение ксантана в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности	22
1.3 Методы получения экзополисахаридов	24
1.4 Характеристика бактерий рода <i>Xanthomonas Campestris</i>	25
1.4.1 Биохимические свойства штамма <i>Xanthomonas Campestris</i>	26
1.5 Характеристика бактерий рода <i>Bacillus Amyloliquefacience</i>	27
1.5.1 Биохимические свойства бактерий <i>Bacillus Amyloliquefacience</i>	28
1.6 Факторы, влияющие на выход при микробиологическом синтезе экзополисахаридов	28
1.7 Методы установления структуры экзополисахаридов	30
Глава 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	32
2.1. Объекты и методы исследования	33
2.2 Приготовление питательных сред	34
2.2.1 Мясо-пептонный агар (МПА)	34
2.2.2 Накопительная среда для культивирования <i>Xanthomonas Campestris</i> (Среда №1)	34
2.2.3 Питательная среда Мозера – Рогоза - Шарпа (МРС)	34
2.3 Методики проведения эксперимента	35
2.3.1 Методика микробиологического синтеза экзополисахаридов с использованием в качестве продуцентов бактерии <i>Bacillus Amyloliquefacience</i>	35
2.3.2 Методика микробиологического синтеза экзополисахаридов с использованием в качестве продуцента бактерии рода <i>Xanthomonas Campestris</i>	36

2.3.3 Методика микробиологического синтеза экзополисахаридов с использованием в качестве продуцентов бактерии рода <i>Xanthomonas Campestris</i> и <i>Bacillus Amyloliquefacience</i>	37
2.4 Методика выделения экзополисахаридов	38
2.5 Методика исследования полисахаридов методом ИК – спектроскопии	41
2.6 Методика определения мономерного состава во фракциях кислых полисахаридов	42
2.7 Методика определения глюкозы в исследуемых образцах	43
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	45
3.1 Подбор оптимальных условий биосинтеза экзополисахаридов	45
3.1.1. Биосинтез экзополисахаридов бактериями <i>Xanthomonas Campestris</i>	46
3.1.2 Биосинтез экзополисахаридов бактериями <i>Bacillus Amyloliquefacience</i>	47
3.1.3 Биосинтез экзополисахаридов бактериями <i>Bacillus Amyloliquefacience</i> и <i>Xanthomonas Campestris</i>	49
3.2 Исследование бактерицидной активности <i>Bacillus Amyloliquefacience</i>	51
3.3 Исследование физико-химических свойств экзополисахаридов	52
3.3.1 Установление структуры экзополисахаридов методом ИК – спектроскопии	52
3.3.2 Определение глюкозы в исследуемых образцах	63
3.3.3 Определение мономерного состава и молекулярной массы в полученных образцах экзополисахаридов	64
Глава 4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ	70
4.1 Введение	70

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	71
4.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	71
4.3 SWOT-анализ	72
4.4 Планирование научно-исследовательских работ	75
4.4.1 Структура работ в рамках научного исследования	75
4.5 Определение трудоемкости выполнения работ	77
4.6 Разработка графика проведения научного исследования	80
4.6.1 Контрольные события проекта	80
4.7 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)	82
4.7.1 Затраты на сырье и материалы	82
4.7.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ	83
4.7.3 Расчет основной заработной платы	84
4.8 Оценка сравнительной эффективности исследования	87
4.8.1 Интегральный показатель эффективности разработки и аналога	89
Глава 5 СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ	90
5.1 Оценка условий производственной среды	93
5.1.1 Защита от опасных и вредных факторов	93
5.1.2 Уровень шума и вибрации	96
5.1.3 Защита от заражения биологическими агентами	96
5.1.4 Защита от воздействия электромагнитного излучения и электростатических полей	98
5.1.5 Защита от воздействия ультрафиолетового излучения	99
5.1.6 Освещенность рабочих мест	99
5.1.7 Электробезопасность	101
5.1.8 Пожарная безопасность	102
5.2 Требования к рабочим помещениям	103
5.2.1 Требования к микроклимату рабочих помещений	105
5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	105

ВЫВОДЫ	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	111

ВВЕДЕНИЕ

Полисахариды являются значимыми компонентами клеток микроорганизмов. Большинство физиологических, биохимических и иммунохимических особенностей полисахаридов определяются их распределением в клетке: наружная и цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, выделение в виде внеклеточных слизей в окружающую среду (экзополисахариды) [1,2]. Экзополисахариды (ЭПС) выполняют ряд важных биологических функций: резервную, защитную и др. Сегодня экзополисахариды широко применяются в косметологии, медицине, пищевой промышленности и др., благодаря своим уникальным свойствам – эмульгирования, студнеобразования, загущения, влагоудержания и стабилизации [3]. В России наиболее часто применяются полисахариды растительного происхождения – агар, крахмал, пектин. Индустриальные потребности в биополимерах данного класса значительно возрастают. Полисахариды микробного происхождения имеют ряд преимуществ (простота, климатическая независимость, экономичность производства и регулирование свойств) и занимают лидирующие позиции. В связи с этим, во многих индустриально развитых странах производству полисахаридов микробного происхождения, а среди них и бактериальным, уделяют очень большое внимание. При получении экзополисахаридов используют разные способы, как традиционные, так и принципиально новые. Сфера применения полисахаридов определяется с учетом их свойств, как функциональных – создавать высоковязкие растворы, способность растворяться в воде, гели, студни, так и биологических. На сегодняшний день получение и применение бактериальных полисахаридов широко развито за рубежом, выпускаются такие полисахариды как ксантан, курдлан, геллан и другие.

В нашей стране различные отрасли индустрии нуждаются в полисахаридах и их в большом количестве закупают в таких странах, как Великобритания, Франция, Китай и США. Таким образом, изучение

экзополисахаридов бактериального происхождения и разработка их получения безусловно имеет важное научное и практическое значение.

Для получения ЭПС используют бактерии родов *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Xanthomonas* и др. [4-6]. В литературе наиболее подробно исследованы бактерии рода *Xanthomonas* для синтеза ЭПС [4]. Однако исследования по синтезу ЭПС при совместном культивировании бактерий рода *Xanthomonas Campestris* с другими бактериями отсутствуют и являются актуальными.

Целью работы являлось получение и выделение экзополисахаридов при совместном культивировании бактерий родов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*. Для достижения цели необходимо было решить поставленные задачи:

1. Выбрать оптимальные условия для микробиологического синтеза экзополисахаридов (питательная среда, источник углерода, pH).
2. Провести микробиологический синтез экзополисахаридов с использованием в качестве продуцентов бактерии *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*.
3. Исследовать физико-химические свойства полученных экзополисахаридов.

Научная новизна:

Выбраны оптимальные условия для микробиологического синтеза экзополисахаридов при совместном культивировании бактерий родов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*.

Практическая значимость:

Экзополисахариды применяются в медицине (пероральные препараты и препараты местного действия), пищевой промышленности (в качестве наполнителей, загустителей, приготовления диетических продуктов), косметологии (солнцезащитные крема, лосьоны, гели, шампуни), сельском хозяйстве (удобрения, взвешенные кормовые добавки), нефтедобывающей промышленности (приготовления буровых растворов и повышение

нефтеотдачи пластов) и др. Необходимо отметить, что такие широкие перспективы использования внеклеточных микробных полисахаридов определяются не только большим разнообразием их физико-химических свойств, но и многообразием возможных форм их применения: порошок, волокно, пленка, гранулы, высоковязкие растворы. Полученный полисахарид по своим физико-химическим свойствам может найти применение в медицине и фармацевтической промышленности, при изготовлении мягких лекарственных форм.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Экзополисахариды. Классификация экзополисахаридов

Под термином полисахариды понимают высокомолекулярные продукты поликонденсации моносахаридов, связанных друг с другом гликозидными связями и образующих линейные или разветвленные цепи, построенные не менее чем из 11 моносахаридов [5].

Полисахариды классифицируют по разным критериям:

1. По функциональному назначению.

Их подразделяют на две основные группы. Полисахариды первой группы несут главным образом структурную функцию (например, целлюлоза). Полисахариды второй группы выполняют функции, связанные с питанием (например, гликоген), их молекулы выполняют роль депо и в процессе обмена легко превращаются в моносахариды [7].

2. По общему принципу строения.

Полисахариды делятся на две группы: гомополисахариды и гетерополисахариды. Для первой группы характерно наличие в составе молекулы только одного вида моносахарида, при этом типы связей не обязательно должны быть одинаковыми между отдельными звеньями (например, резервный полисахарид крахмал, так как он состоит только из остатков D- глюкозы). Для второй группы характерно наличие двух и более типов мономерных остатков (например, гиалуроновая кислота, состоящая из остатков аминсахаров и гексуроновых кислот, которая содержится во всех видах соединительной ткани) [8].

3. По происхождению.

Полисахариды различают растительного, животного и микробного происхождения [9].

Полисахариды растительного происхождения обладают свойствами загустителей и гелеобразователей, подразделяются в зависимости от источника получения из высших растений (суши) и морских водорослей. К

первым относятся: целлюлоза и продукты модификации целлюлозы, крахмал, производные крахмала, пектин, камеди. Ко вторым относятся агар, альгинаты и др. [10].

Полисахариды морских растений представляют собой биополимеры, получаемые из экстрактов красных и бурых водорослей. К наиболее известным относятся агар, агароиды, фуцеллеран, каррагинаны и др.

Полисахариды животного происхождения выполняют две основные функции: резервные и структурные [11].

В настоящее время хорошо изучены такие экзополисахариды, как гликоген и хитин. Гликоген представляет собой разветвленный резервный полисахарид, широко распространенный в тканях животных, а также бактерий и дрожжей. Хитин – структурный гомополисахарид, по своим свойствам сходен с целлюлозой [12].

Экзополисахариды микробного происхождения в отличие от вышеизложенных обладают рядом перспектив: их можно получать в необходимом количестве вне зависимости от времени года, их производство и качество не зависят от природных условий. Это позволяет считать, что производство микробных полисахаридов более перспективно и экономично выгодно по сравнению с получением растительных и синтетических гидроколлоидов.

Полисахариды, полученные микробным синтезом, согласно M. Stacey, S.A. Barker, делятся на три топологические группы: внеклеточные, внутриклеточные, полисахариды клеточной стенки. По Н.К. Кочеткову их подразделяют в зависимости от функций на следующие группы: резервные (участвующие в активном транспорте), опорные (участвующие во взаимодействии между клетками), защитные. Среди микроскопических грибов продуцентами полисахаридов являются: *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformas*, *Candida viswannahii*, *Penicillium citrinum*, *Aureobasidium pullulans*.

Полисахариды микроскопических грибов нашли применение в косметической, фармацевтической, пищевой и других отраслях промышленности.

Так, крилан – высоковязкий гетерогликан, образованный *Cryptococcus laurentii*, является перспективным стабилизатором дисперсных систем. Полисахарид содержит глюкозу, маннозу, ксилозу, глюкуроновую кислоту и галактозу с преобладанием маннозы и ксилозы.

Аубазидан является основой для создания мягких лекарственных форм ранозаживляющих и местным контрацептивом. Лиофильно высушенный препарат полисахарида представляет собой волокнисто-пористый материал.

Среди внеклеточных бактериальных полисахаридов наиболее широкое практическое применение получил ксантан. Продуцентами ксантана являются следующие бактерии *X. Phaseoli*, *X. Campestris*, *X. Malvacearum*.

1.2 Экзополисахарид ксантан

Впервые ксантан был получен в конце 1950-х годов в Северной Региональной научно-исследовательской лаборатории (NRRL) Министерства сельского хозяйства США группой исследователей во главе с Розалиндой Джинсе, которая вместе с другими исследователями, внесла заметный вклад в исследование структуры этого полисахарида.

Экзополисахариды фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* являются гетерополисахаридами. Моносахаридный состав их сходен. В большинстве случаев они содержат D-глюкозу, D-маннозу, D-глюкуроновую кислоту. При сходном качественном составе, существуют значительные отличия в молярном соотношении даже у штаммов *Xanthomonas* одного вида – у некоторых преобладает глюкоза, у других соотношение глюкозы и маннозы одинаково или сдвинуто в сторону маннозы. Углеводный состав ксантана сложно изучить из-за высокой устойчивости целлюлозной основы к гидролизу.

Общепринятой структурной стала модель, предложенная Jansson [13] представленная на рисунке 1.

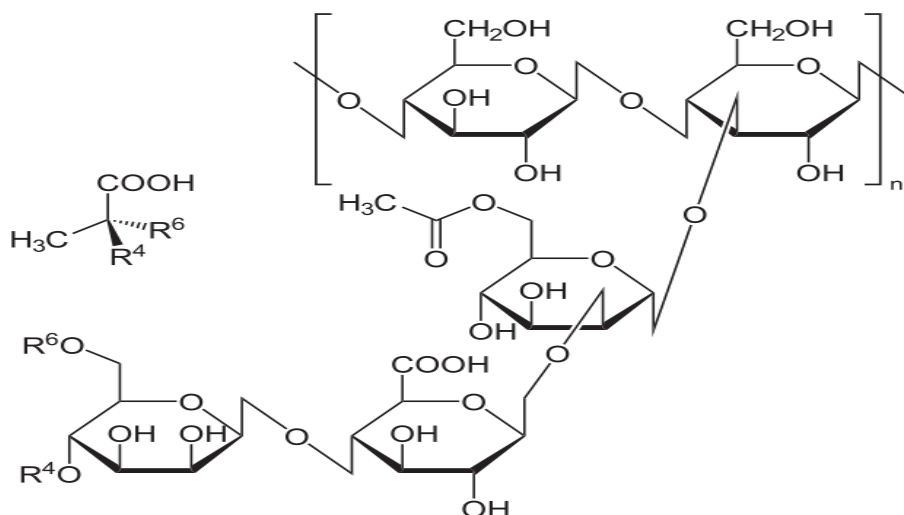


Рисунок 1 – Структурная формула ксантана

Согласно данной структуре основная цепь ксантана состоит из (1→4) - глюкопиранозы. Каждый второй остаток глюкопиранозы имеет трисахаридную боковую цепь, которая прикрепляется к остатку глюкопиранозы основной цепи в положении C₃. Боковая цепь содержит два остатка маннозы и остаток глюкуроновой кислоты. Одна молекула маннопиранозы соединена с остатком глюкопиранозы основной цепи связью (1→3), а с глюкуроновой кислотой - β - 1→2 связью. Конечный β - маннопиранозный остаток связан с остатком β-глюкуроновой кислоты связью 1→4, которая в свою очередь, (1→2) связью прикреплена к неконечному остатку α-маннопиранозы. Одна молекула α-маннопиранозы ацелирована в положении О – 6, маннопираноза, находящаяся в конце боковой цепи включает пировиноградную кислоты. Химический состав ксантана может варьироваться в зависимости от способа получения биополимера.

Химическое строение молекул ксантана обеспечивает ему многообразие функционально-технологических свойств: высокую растворимость в холодной и горячей воде; стабильность в растворах при низких и высоких

температурах и широком диапазоне pH от 1 до 13, к действию ферментов; к предотвращению синерезиса (отделение влаги) в продукте и др.

1.2.1 Применение ксантана в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности

В пищевой промышленности ксантан используют при производстве молочных пудингов, сметаны, йогуртов, мороженого, майонеза и других пищевых продуктов [14-16]. В косметической промышленности ксантан применяют при изготовлении солнцезащитных лосьонов и кремов, в том числе для автозагара; очищающих средства и кремов для лица, тела; краски для волос; шампуней и гелей для душа; зубных паст. В фармацевтической индустрии ксантан находит применение при производстве пероральных лекарственных препаратов (капсулы, порошки) и препаратов местного действия (мази, гели, линименты). При использовании 5% этого вещества изменяются реологические свойства коллоидной системы, что положительно влияет на структуру производимых продуктов. Последние годы получило развитие производство микробных экзополисахаридов в сравнении с получением полисахаридов из высших организмов. К числу таких веществ принадлежат полисахариды, используемые в медицинской и пищевой отраслях промышленности [17-19]. Это связано с тем, что микробные полисахариды имеют более разнообразные функциональные свойства, легко воспроизводимы и безопасны, получаются независимо от времени года с наименьшими затратами [20].

Ряд авторов отмечают, что ксантан является иммуностимулятором [21-24] и проявляет лечебно-профилактические свойства при язвенной болезни, гипертонии, атеросклерозе, онкологических заболеваниях [21].

Основными физическими свойствами полисахаридов являются способность к набуханию и растворению в холодной или горячей воде с образованием гелей. На эти свойства в зависимости от вида полисахарида

вливают следующие факторы: температура, активная рН среды, структура и его состав, происхождение, а также степень очистки [25]. Применение полисахарида в пищевой промышленности в качестве структурообразователей определяется их технологическими свойствами [26].

В последние годы, в связи с увеличивающимся объемом производства кисломолочных продуктов с длительным сроком хранения, повысился интерес к закваскам, образующим вязкие сгустки, которые обладают влагоудерживающей способностью [27]. Было установлено, что такие закваски при сквашивании молока продуцируют экзополисахариды, которые являются естественными загустителями, заменяющими стабилизаторы растительного и животного происхождения.

Особенно важным является использование штаммов продуцирующих ксантан для улучшения реологических свойств и функциональных характеристик кисломолочных продуктов в странах, где запрещено использование стабилизаторов. Эта особенность, на сегодняшний день, находится в центре внимания среди производителей продуктов питания.

На основании всего вышеизложенного, можно выделить основные функции ксантана, которые имеют важное значение в пищевой, косметологической и фармацевтической промышленности.

Основные функции ксантана:

- стабилизирует эмульсии и суспензии в широком диапазоне температур;
- при механическом воздействии (при перемешивании, перекачке и наполнении тары) вязкость продукта, стабилизированного ксантаном, понижается с последующим восстановлением;
- способствует пенообразованию и стабилизирует пену;
- образует прозрачный раствор, пригодный для загущения прозрачных продуктов;
- легко диспергируется.

Ксантановая камедь (E415) представляет собой комплекс полисахаридов, образующихся как вторичные метаболиты при аэробной ферментации

сахаров (например, кукурузного сиропа) бактериями *Xanthomonas Campestris*. Ксантановая камедь также может быть использована в качестве загустителя при изготовлении пищевого продукта и для связывания влаги [28-29].

1.3 Методы получения экзополисахаридов

Экзополисахариды получают из растительного сырья и путем микробного синтеза. Главные недостатки получения экзополисахаридов из растительного сырья связаны с использованием исходного сырья и экстрагентов в большом количестве. Преимущество микробного синтеза связано с быстрым получением продукта из дешевого сырья. Экзополисахариды микробного происхождения представляют собой катионные, анионные или нейтральные полимеры в зависимости от наличия в боковой цепи таких групп, как ацетатные, липидные, пируватсукцинатные, содержащие неорганические ионы или органический азот. В большей степени боковые группы определяют реологические свойства экзополисахарида. В силу этого, микробные экзополисахариды различают по физико-химическим свойствам и строению, поэтому области применения полисахаридов микробного происхождения могут быть различными.

Для получения ЭПС используют бактерии родов *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Xanthomonas* и др. [2-4]. В литературе наиболее подробно исследованы бактерии рода *Xanthomonas* для синтеза ЭПС [3]. Однако исследования по синтезу ЭПС при совместном культивировании бактерий рода *Xanthomonas Campestris* с другими бактериями отсутствуют и являются актуальными. В свою очередь бактерии рода *Bacillus Amyloliquefacience* нашли применение в медицине, их используют в мягких лекарственных формах, так как они обладают бактерицидной, фунгицидной и вирулицидной активностью.

На основании этого, в качестве объектов исследования были выбраны бактерии родов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*.

1.4 Характеристика бактерий рода *Xanthomonas Campestris*

Род *Xanthomonas* объединяет в себе фитопатогенные микроорганизмы и относится к семейству *Pseudomonaceae*.

По культурально – морфологическим свойствам штаммы относятся к Грам-отрицательным прямым палочкам с поперечными размерами $0,4 - 0,7 \times 0,7 - 1,8$ мкм, зачастую одиночные с наличием полярного жгутика (рисунок 2).

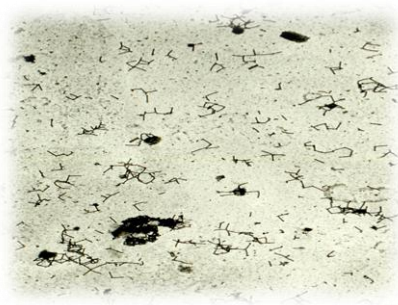


Рисунок 2 – Клетки *Xanthomonas Campestris*

В лаборатории Р. Джинес было описано три типа штаммов ксантомонад : L (large), Sm (small), Vs (very small) [30].

L (large) - крупные ярко-желтого цвета колонии, с диаметром 4 – 5 мм, обеспечивающие большую продукцию ксантана с высоким содержанием пировиноградной кислоты. Колонии Sm (small) имеют зеленовато-коричневый цвет и диаметр 2 – 3 мм, которые продуцируют меньшее количество ксантана. Vs (very small) – колонии белого цвета, 1 мм в диаметре, микроорганизмы из которых не производят ксантан. Колонии видов Sm и Vs, как правило, происходят из колоний L – типа в результате деградации культуры.

Клетки подвижны в узком диапазоне времени фазы развития популяции при благоприятных условиях культивирования. Для клеток нехарактерно наличие капсулы. Подвижность клеток прогрессивно снижается по мере обволакивания их синтезируемым ЭПС. Способны

образовывать очень специфические пигменты: «ксантомонадины», или бромзамещенные арильные полиены. В качестве единственных источников углерода используют разнообразные углеводы и соли органических кислот. Относятся к хемоорганотрофам со строго аэробным типом дыхания [31]. Для массового размножения бактерий и синтеза ксантана используют среду 1 (вода, агар, глюкоза/сахароза, кальций углекислый, дрожжевой экстракт) на которой образуют колонии желтого цвета, гладкие, клейкие, или маслянистые. Оптимальная температура роста бактерий *Xanthomonas Campestris* 25–30°C. Для длительного хранения штаммов бактерий используют ампулы с лиофильно высушивают в щадящем режиме и хранят при температуре 2 °C.

1.4.1 Биохимические свойства штамма *Xanthomonas Campestris*

Бактерии *Xanthomonas Campestris* окисляют глюкозу по пути Энтнера-Дудорова, также способны и к окислению глюкозы по пентозофосфатному циклу. В молочке с бромкрезоловым пурпурным или лакмусовом молочке кислоту не образуют, растут в среде с лактатом кальция, но не глутамином. Аспаргин в качестве единственного источника углерода и азота не используют. Трифенилтеразолийхлорид в концентрации 0,1 % (обычно уже 0,02%) ингибирует рост. Как правило, нуждаются в факторах роста, в том числе метионине, глутаминовой кислоте и никотиновой кислоте или их сочетании.

1.5 Характеристика бактерий рода *Bacillus Amyloliquefacience*

Бактерии *Bacillus Amyloliquefacience* аэробные бациллы, или спорообразующие бактерии объединяются в отдельный род *Bacillus* семейства *Bacillacea*.

По культурально–морфологическим свойствам штаммы относятся к грамположительным факультативно аэробным палочковидным бактериям длиной 4 – 4,5х0,6 – 0,8 мкм, со сниженной подвижностью и способностью к спорообразованию (эффективность споруляции $0,1 \times 10^{-7}$ спор/мл) (рисунок 3).

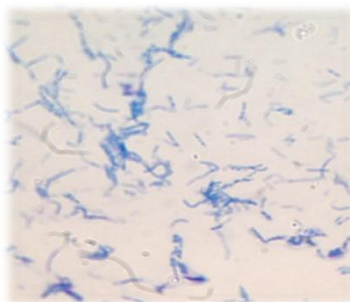


Рисунок 3 – Клетки *Bacillus Amyloliquefacience*

Штамм поддерживают на полноценных агаризованных средах (мясопептонный агар) в течение 7 – 10 суток. При росте на мясопептонном агаре штамм образует шероховатые колонии белого или кремового цвета с изрезанным краем, врастающие в поверхность питательной среды. Для массового размножения бактерий используют мясопептонный бульон. Культивирование проводят при температуре 34 – 37°C. Клетки палочковидные, эндоспоры овальные, расположены центрально или парацентрально, не раздувают клетку при спорообразовании. Длина клетки – (2-3) мкм, ширина – (0,7-0,8) мкм. Капсулу не образуют. По Граму окрашиваются положительно. Штаммы являются олигофильными, размножаются при 25-45°C, оптимальный рост наблюдается при температуре 33-37°C. Через 48 часов роста при 37°C на мясопептонном агаре культура имеет непрозрачные колонии однородной мучнистой консистенции, с

ровным краем. рН среды: минимальная 5,7; максимальная 8,0; оптимальная 7,0-7,2. Для длительного хранения штаммов бактерий споровую массу лиофильно высушивают.

1.5.1 Биохимические свойства бактерий *Bacillus Amyloliquefacience*

Бактерии *Bacillus Amyloliquefacience* не растут в анаэробных условиях, не образуют ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогес - Проскауэра, ферментируют с образованием кислоты глюкозу, маннозу, фруктозу, рибозу, ликсозу, целлобиозу, трегалозу, мальтозу, туранозу. Гидролизуют крахмал, мочевины и эскулин. Обладают лецитиназной, каталазной активностью. Толерантны к концентрациям хлорида натрия в питательной среде в диапазоне 1-9%. Штаммы не являются зоопатогенными и фитопатогенными.

1.6 Факторы, влияющие на выход при микробиологическом синтезе экзополисахаридов

На микробиологический синтез экзополисахаридов оказывают существенное влияние различные физические и химические факторы [32]. В литературных источниках [32-33] описано влияние микроволнового облучения, природы источника углерода и азота, аэрация, рН питательной среды, температура, время культивирования, скорость перемешивания, и т.д. Рассмотрим влияние каждого фактора на микробный синтез экзогликанов.

Микроволновое облучение (МВО), сверхвысокочастотное излучение (СВЧ-излучение). Является электромагнитным излучением, включающее в себя дециметровый, сантиметровый и миллиметровый диапазоны радиоволн (длина волны от 1 м — частота 300 МГц до 1 мм — 300 ГГц). Низкоинтенсивное миллиметровое излучение влияет на биохимические процессы.

МВО миллиметрового диапазона очень сильно поглощается молекулами воды [34], которые в свою очередь входят в состав любого живого организма и любой питательной среды, поэтому оно оказывает влияние на: морфологию клеток, процесс клеточного деления, ряд биологических свойств бактерий, скорость роста (выход биомассы), выход ферментов в среду.

Углерод. Микробный биосинтез экзогликанов существенно зависит от вида источника углерода. Продуценты экзополисахаридов используют в качестве источника углерода: аминокислоты, углеводы, углеводороды, спирты, карбоновые кислоты [35]. Продуцируемые микроорганизмами экзополисахариды являются конечными продуктами трансформации источника углерода. Когда рост культуры начинает тормозиться, но клетки жизнеспособны и до сих пор перерабатывают углеродный субстрат, экзополисахариды начинают выделяться. Недостаток витаминов и минеральных компонентов может быть ограничивающим фактором роста культуры.

Азот. Внутриклеточная концентрация ионов аммония определяет принцип усвоения связанного неорганического азота у разных бактерий. Биохимическое объяснение значительному влиянию разнообразных по природе источников азота заключается в возникновении метаболического блока на уровне включения соединений азота в клетку [35]. При добавлении аминокислот в питательные среды микроорганизмы не расходуют собственную энергию на гидролиз белков и пептонов питательной среды, а сразу используют их для синтеза ферментных систем и клеточных компонентов, отвечающих за метаболическую активность клетки.

Аэрация. Зачастую в литературных источниках встречаются данные о стимуляции синтеза ЭПС кислородом, растворенным в питательных средах. От уровня снабжения продуцентов кислородом зависит количество образующихся экзополисахаридов и их химическое строение.

pH питательной среды. Образование ЭПС значительно зависит от значения pH в питательной среде. В определенном диапазоне pH работают ферменты той или иной группы. В силу этого, в зависимости от pH среды равновесие реакций анаболизма и катаболизма может смещаться. Оптимум для роста *Xanthomonas Campestris* находится в нейтральной области. Наибольший выход ксантана достигается при pH культуральной жидкости 7,2. Помимо того, что в самой молекуле ксантана присутствуют кислые группы, в процессе синтеза происходит образование органических кислот, за счет чего происходит снижение pH культуральной жидкости до 5,0. Для управления pH в процессе синтеза полисахарида рекомендуется использовать щелочные растворы.

Температура. Наиболее оптимальная температура для роста *Xanthomonas Campestris* – 25°C, а для образования ксантана – 30°C. При увеличении температуры снижается содержание пирувата, но выход ксантана увеличивается [36]. Помимо этого, при 30°C образуется ксантан с большей молекулярной массой, чем при 35 °C.

Время культивирования и скорость перемешивания оказывают влияние на химический состав экзополисахарида, его молекулярную массу, а также соотношение полисахаридов, что, в свою очередь, влияет на реологические свойства ЭПС [37].

1.7 Методы установления структуры экзополисахаридов

В настоящее время для установления структурных особенностей экзополисахаридов используют классические методы химии углеводов, комбинирование методов структурной химии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (спектроскопии ЯМР), методы химической и ферментативной модификации, хроматографические методы (газо-жидкостная хроматография (ГЖХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), гельпроникающая хроматография), а также методы

световой микроскопии и электрофорез [38-43]. В последние годы для установления тонкой структуры полисахаридов стали использовать различные виды масс-спектрометрии [44-45].

Инфракрасная спектроскопия (ИК – спектроскопия). Метод основан на взаимодействии инфракрасного излучения с веществом. Поглощение происходит не во всём спектре падающего излучения, а лишь при тех длинах волн, энергия которых соответствует энергиям возбуждения колебаний в изучаемых молекулах. Следовательно, длины волн (или частоты), при которых наблюдается максимальное поглощение ИК-излучения, могут свидетельствовать о наличии в молекулах образца тех, или иных функциональных групп и других фрагментов.

Фенол – сернокислый метод. В силу того, что главным признаком экзополисахаридов является наличие в них сахаров, было важно определить наличие глюкозы в полученных образцах. В основу количественного определения глюкозы в исследуемом образце положена реакция взаимодействия оксиметилфурфурола с фенолом в среде кислоты серной концентрированной. Сначала под воздействием кислоты серной концентрированной глюкоза дегидратируется с образованием оксиметилфурфурола. А далее при действии фенола на оксиметилфурфурол образуется ауриновый краситель, имеющий в видимой области спектра максимум поглощения $\lambda_{\max} = 483-485$ нм.

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В данной главе представлена информация об объекте исследования, пробоподготовке, методах и методиках проведения эксперимента.

Исследования по данной тематике связаны с использованием микроорганизмов и требуют строгого соблюдения правил работы в микробиологической лаборатории. Для поддержания чистоты исследуемой культуры и проведения микробиологического анализа лаборатория оснащена следующим оборудованием:

1. Ламинарный шкаф SC2-4A1 Streamline Esco
2. Суховоздушный шкаф-стерилизатор Binder
3. Цифровой автоклав (паровой стерилизатор) WiseCube
4. Биореактор BIOSTAT Cplus, 20л Sartorius
5. Ферментер BIOSTAT Aplus, 5л Sartorius
6. Шкаф термостатируемый WiseCube
7. Инкубатор WiseCube WIS-20 горизонтальный с орбитальным шейкером
8. Бинокулярный микроскоп MC-100
9. Весы лабораторные аналитические ACCULAB ALC 210
10. pH-метр лабораторного типа pH-150 МИ
11. Дистиллятор 3,5 л/ч.

Для выделения и идентификации исследуемых экзополисахаридов использовалось следующее оборудование:

1. Центрифуга Centrifuge 5702 R.
2. УФ-ВИД спектрофотометр ScanDrop 200
3. УФ-Спектрофотометр Cary60
4. ИК – Спектрометр Agilent 660
5. Инкубатор WiseCube WIS-20 горизонтальный с орбитальным шейкером.

2.1. Объекты и методы исследования

Для микробиологического синтеза экзополисахаридов использовали культуры бактерий родов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*.

Штамм *Xanthomonas Campestris* B-2228 был получен из лаборатории ГосНИИГенетика, г. Москва и хранился в лиофилизированной форме и на скошенном агаре при температуре хранения 4-8 °С. Для поддержания культуры в состоянии жизнеспособности, производили пересев культуры через 2 недели на скошенный агар.

Штамм *Bacillus Amyloliquefacience* ВКПМ B-10642, который обладает вирулицидной, фунгицидной, бактерицидной активностью, был выделен из мягкой лекарственной формы «Афала» (г.Челябинск) и препарата «Ноздрин» (г.Новосибирск) микробиологами ПЦНИЛ СибГМУ (г. Томск). Культура *Bacillus Amyloliquefacience* хранилась на скошенном агаре при температуре 4-8 °С.

Культуры бактерий перед посевом на питательные среды для биосинтеза ЭПС предварительно доставали из комнаты хранения (4-8 °С) и выдерживали при комнатной температуре 22 °С в течение 1 часа. Подготовленные таким образом культуры, переносили в асептических условиях со скошенного агара с помощью микробиологической петли в колбу с жидкой питательной средой. В случае использования лиофилизированного препарата, образец культуры предварительно разбавляли стерильной дистиллированной водой, доводили до концентрации 10^5 по стандарту мутности и вносили суспензию в количестве 1 см³ на жидкую питательную среду.

Все работы с культурами микроорганизмов проводили в асептических условиях в ламинарном шкафу с соблюдением всех правил техники безопасности в микробиологической лаборатории.

2.2 Приготовление питательных сред

Питательные среды являются основой микробиологических работ, и их качество нередко определяет результаты всего исследования.

2.2.1 Мясо – пептонный агар (МПА)

Навеску сухого мясопептонного бульона (пептон сухой ферментативный на основе мяса, ГОСТ 13805-76), массой 20 г, и агара микробиологического (ГОСТ 17206-96), массой 15 г, растворяли в 1 дм³ дистиллированной воды. Среду кипятили 2 минуты, после чего фильтровали через ватно-марлевый фильтр и разливали по колбам.

Приготовленную питательную среду разливали по колбам Эрленмейера объемом 250 см³, закрывали ватно-марлевыми пробками, пергаментной бумагой и стерилизовали в автоклаве при 121 °С (1 атм) в течение 20 мин.

2.2.2 Накопительная среда для культивирования *Xanthomonas Campestris* (Среда №1)

Для культивирования *Xanthomonas Campestris* использовали питательную среду №1, следующего состава, г/л: сахара – 10, агар – 20, дрожжевой экстракт – 2, кальций углекислый – 3, вода дистиллированная – 1000 см³.

Приготовленную питательную среду разливали по колбам Эрленмейера объемом 250 см³, закрывали ватно-марлевыми пробками, пергаментной бумагой и стерилизовали в автоклаве при 121 °С (1 атм) в течение 20 мин.

2.2.3 Питательная среда Мозера – Рогоза - Шарпа (МРС)

Коммерческую питательную среду МРС следующего состава: мясной экстракт – 8,0 г, дрожжевой экстракт – 4,0 г, пептон сухой ферментативный –

10,0 г, глюкоза – 20,0 г, твин-80 – 1,0 см³, калий фосфорнокислый двузамещенный – 2,0 г, марганец сернокислый – 0,05 г, аммония цитрат – 2,0 г, натрия ацетат 3-водный – 5,0 г, магний сернокислый – 0,2 г, вода дистиллированная 1 л; разливали по колбам Эрленмейера объемом 250 см³, которые закрывали ватно-марлевыми пробками и пергаментной бумагой. Среду стерилизовали в автоклаве при 121 °С (1 атм) 20 мин.

2.3 Методики проведения эксперимента

2.3.1 Методика микробиологического синтеза экзополисахаридов с использованием в качестве продуцентов бактерии *Bacillus Amyloliquefacience*

Биосинтез экзополисахаридов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см³ на жидкой питательной среде МРС при pH 6,0; 6,5 с добавлением дополнительного источника углерода лактозы и на среде №1 с добавлением различных источников углерода (сахароза, лактоза, глюкоза) при температуре 37 °С и скорости перемешивания 120 и 180 об/мин, соответственно. В асептических условиях в колбу с питательной средой №1, объемом 150 см³, с помощью микробиологической петли переносили культуру *Bacillus Amyloliquefacience* со скошенного агара. Выделение продукта проводили через 24, 48 и 72 ч. Схема проведения микробиологического синтеза ЭПС представлена на рисунке 4.

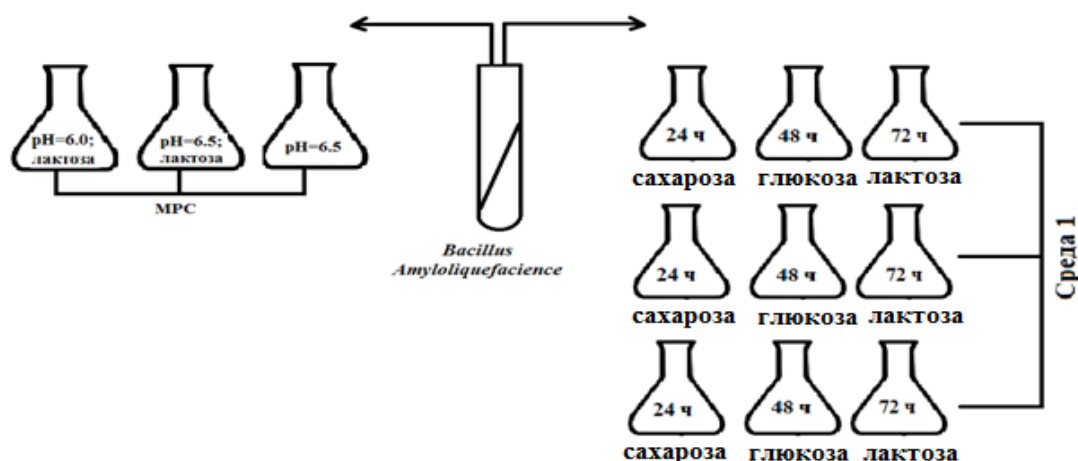


Рисунок 4 – Схема микробиологического синтеза ЭПС бактериями *Bacillus Amyloliquefacience*

2.3.2 Методика микробиологического синтеза экзополисахаридов с использованием в качестве продуцента бактерии рода *Xanthomonas Campestris*

Для проведения микробиологического синтеза экзополисахаридов бактериями *Xanthomonas Campestris* использовали 72-часовую культуру (экспоненциальная фаза роста). Биосинтез проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см³ на жидкой обогащенной питательной среде №1 с добавлением сахарозы в качестве источника углерода и энергии при температуре 27 °С со скоростью перемешивания 200 об/мин. В асептических условиях в колбу с питательной средой №1, объемом 150 см³, с помощью дозатора 1000μл вносили суспензию культуры *Xanthomonas Campestris*. Выделение продукта проводили через 72 ч. Схема проведения микробиологического синтеза ЭПС представлена на рисунке 5.

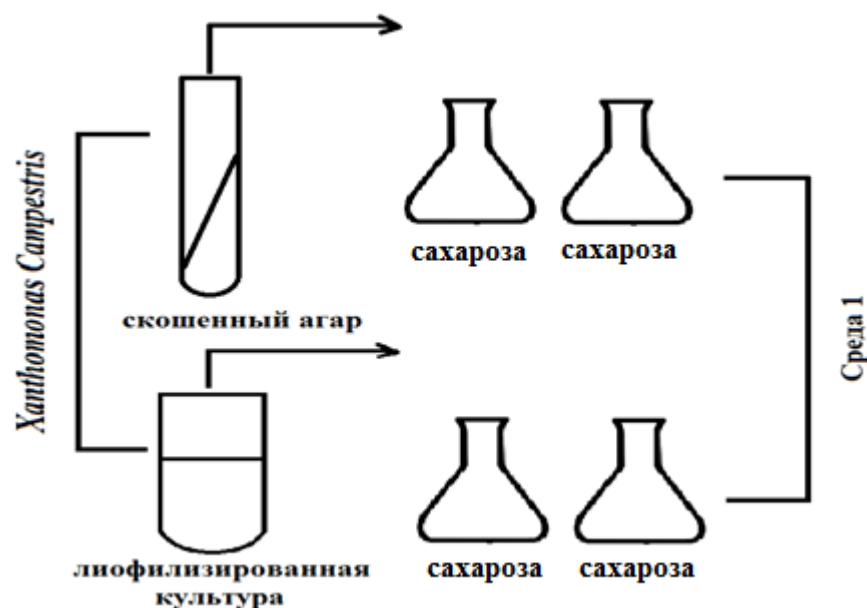


Рисунок 5 – Схема микробиологического синтеза ЭПС бактериями

Xanthomonas Campestris

2.3.3 Методика микробиологического синтеза экзополисахаридов с использованием в качестве продуцентов бактерии рода *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*

Для проведения микробиологического синтеза экзополисахаридов бактериями *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience* использовали 48-часовую и 72-часовую культуры, соответственно. Биосинтез ЭПС проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см³ на жидкой питательной среде № 1 с добавлением дополнительного источника энергии сахарозы при температуре 27 °С, со скоростью перемешивания 180 об/мин. В асептических условиях в колбу с питательной средой №1, объемом 150 см³, с помощью микробиологической петли переносили культуру *Bacillus Amyloliquefacience* со скошенного агара. Далее в колбу с питательной средой вносили с помощью дозатора 1000μл суспензию культуры *Xanthomonas Campestris*. Выделение продукта проводили через 72 ч. Схема проведения микробиологического синтеза ЭПС представлена на рисунке 6.

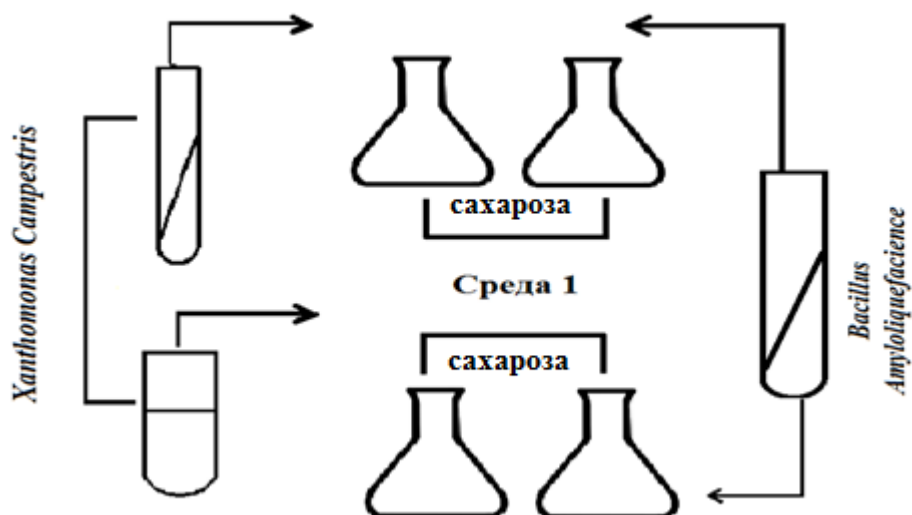


Рисунок 6 – Схема микробиологического синтеза ЭПС бактериями *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*

2.4 Методика выделения экзополисахаридов

Нижепредставленные методики для выделения полученных экзополисахаридов, были разработаны путем модифицирования методики выделения микробных полисахаридов [6].

Для выделения экзополисахаридов, синтезированных бактериями рода *Bacillus Amyloliquefacience* использовали модифицированную методику представленную на рисунке 7.

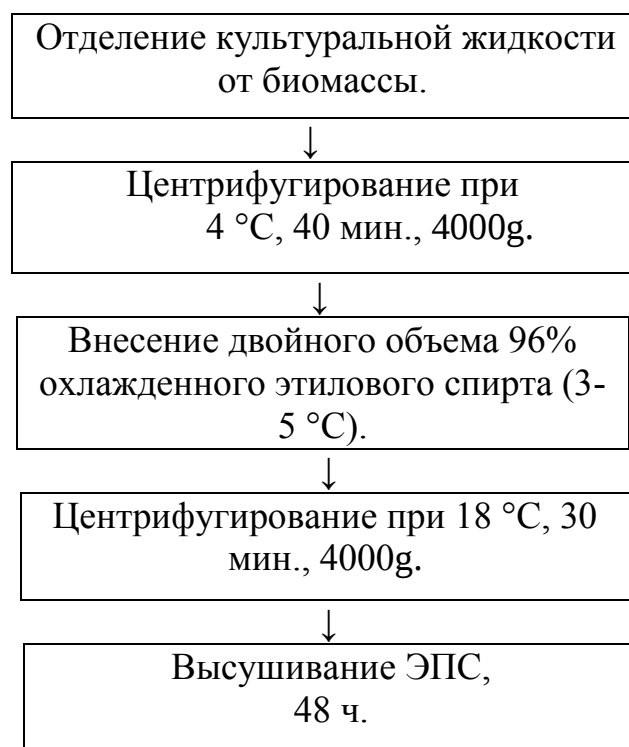


Рисунок 7 – Схема выделения экзополисахаридов синтезируемых бактериями рода *Bacillus Amyloliquefacience*

Выделение экзополисахаридов, синтезированных бактериями рода *Bacillus Amyloliquefacience*, начинали с отделения культуральной жидкости от биомассы. Для этого, культуральную жидкость фильтровали через ватно – марлевый фильтр с последующим центрифугированием в течение 40 минут при 4 °C, 4000 g. Для осаждения экзополисахаридов добавляли двойной объем 96% охлажденного этилового спирта и выдерживали в холодильнике в течение 24 ч. Осажденные полисахариды отделяли от этилового спирта центрифугированием в течение 30 минут при 18 °C, 4000 g. Полученные образцы экзополисахаридов высушивали в сухожаровом шкафу при температуре 4 °C в течение 48 ч.

Для выделения экзополисахаридов, синтезированных штаммами микроорганизмов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience* использовали модифицированную методику [6] (рисунок 8).

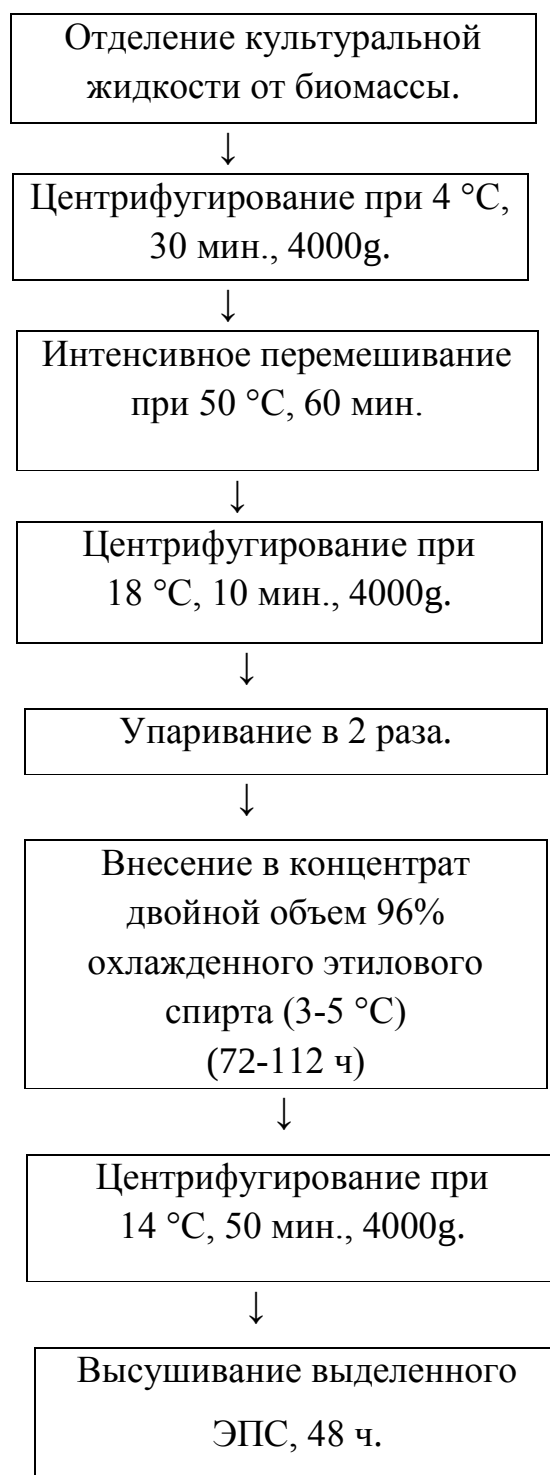


Рисунок 8 – Схема выделения ЭПС, синтезируемых бактериями рода *Xanthomonas Campestris* и при совместном культивировании

Выделение экзополисахаридов, синтезированных штаммами микроорганизмов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience* начинали с отделения культуральной жидкости от биомассы. Для этого,

культуральную жидкость фильтровали через ватно – марлевый фильтр с последующим центрифугированием в течение 30 минут при 4 °С, 4000 g. Далее проводили интенсивное перемешивание на магнитной мешалке при 50 °С в течение 60 минут и центрифугирование при 18 °С, 4000g в течение 10 минут. После этого проводили концентрирование раствора в 2 раза путем упаривания на песочной бане. Для осаждения экзополисахаридов добавляли двойной объем 96% охлажденного этилового спирта и выдерживали в холодильнике в течение 72 – 112 ч. Осажденные полисахариды отделяли от этилового спирта центрифугированием в течение 50 минут при 14 °С, 4000 g. Полученные образцы экзополисахаридов высушивали в сухожаровом шкафу при температуре 45 °С в течение 48 ч.

Разработанные методики выделения экзополисахаридов из культуральной жидкости позволили сократить временные и материальные затраты. Выделенные экзополисахариды представляли собой белые, светло-бежевые образцы, вязкие по консистенции.

2.5 Методика исследования полисахаридов методом ИК – спектроскопии

Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия, ИКС) – раздел спектроскопии, основанный на взаимодействии инфракрасного излучения с веществами. Химические вещества поглощают инфракрасное излучение параллельно с возбуждением колебаний молекул. ИК – излучение представляет электромагнитную волну, которая характеризуется длиной волны, волновым числом и частотой.

Анализируемый образец растирали в агатовой ступке до мелкодисперсного состояния ручным способом до состояния «пудры» (при растирании между пальцами не ощущается «жесткости» порошка). Образец равномерно распределяли в приставке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) ИК – спектрометра.

Регистрация спектров.

Включение, настройку и прибора проводят строго по инструкции к прибору. Регистрация спектров на ИК-спектрометре с однолучевой схемой предварительно снимают фоновый спектр, затем регистрируют ИК-спектр анализируемого образца. Спектрограмму записывают в интервале частот 4000–400 см⁻¹.

Обрабатывают полученные спектрограммы, рассчитывая точное положение максимумов поглощения. Интерпретацию спектров проводят, используя литературу [46].

2.6 Методика определения мономерного состава во фракциях кислых полисахаридов

Пробоподготовка образцов:

К 200 мкл образца добавляли 800 мкл воды для хроматографии, перемешивали при 3000 мин⁻¹ на вибро-шейкере в течение 5 минут. После чего центрифугировали при 15 000 об/мин в течение 10 минут. Аликвоту супернатанта помещали в вialу автосемплера.

Анализ:

Хроматографическая система: Ultimate 3000 (Dionex, USA), включающая насос LPG-3400SD со встроенным дегазатором, автосемплер WPS-3000SL; термостат колонок TCC-3000SD, детектор RI-101

Неподвижная фаза: колонка PROGEL TSK GMPWXL 300 x 7,6mm, 13 µm

Подвижная фаза: вода деионизированная

Условия анализа: скорость потока 1 мл/мин, объем пробы 20 мкл, температура колоночного отделения – 30 °С, температура ячейки рефрактометрического детектора – 40 °С.

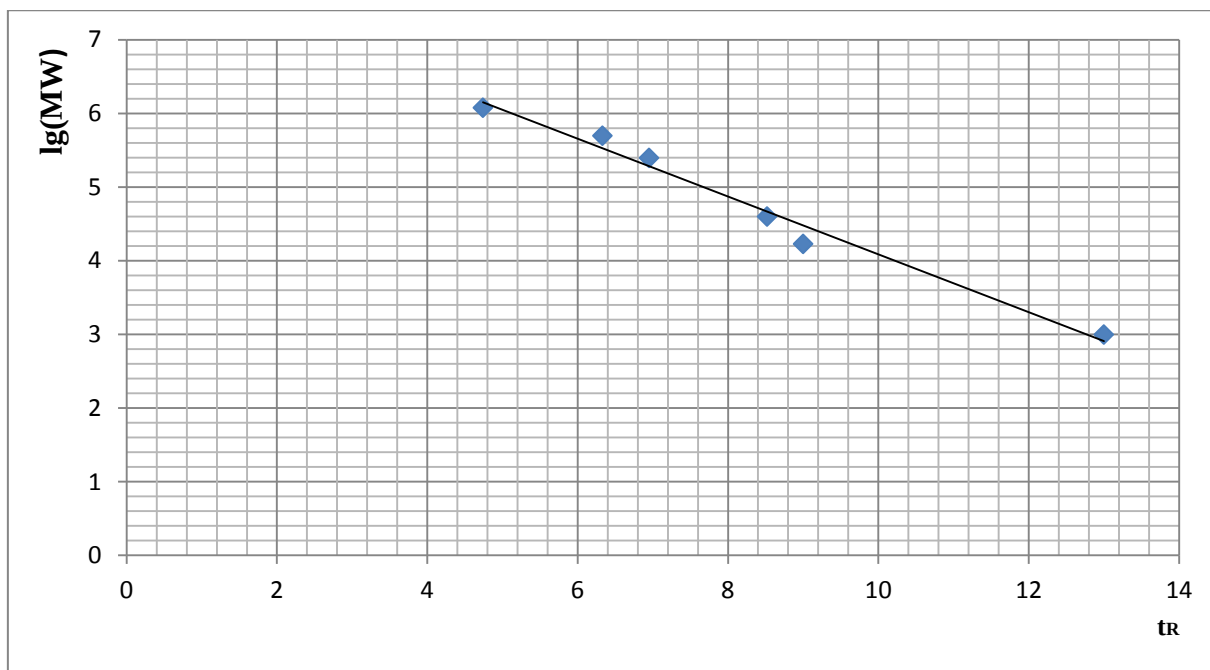


Рисунок 9 – Калибровочная зависимость колонки

2.7 Методика определения глюкозы в исследуемых образцах

Одной из характеристик экзополисахаридов является наличие в них сахаров, поэтому в полученных образцах ЭПС определяли глюкозу.

В исследуемых образцах определяли глюкозу по фенол-серному методу. В основу количественного определения глюкозы в исследуемом образце положена реакция взаимодействия оксиметилфурфурола с фенолом в среде кислоты серной концентрированной. Сначала под воздействием кислоты серной концентрированной глюкоза дегидратируется с образованием оксиметилфурфурола. А далее при действии фенола на оксиметилфурфурол образуется ауриновый краситель, имеющий в видимой области спектра максимум поглощения $\lambda_{\max} = 483-485$ нм.

Для определения глюкозы в исследуемых образцах предварительно проводили разбавление дистиллированной водой. Общий объем образца составлял $0,5 \text{ см}^3$. Далее согласно методике фенол – сернокислого метода вносили концентрированную серную кислоту и фенол, выдерживали 1 ч. Подготовленные таким образом образцы экзополисахаридов анализировали

на наличие глюкозы с использованием спектроскопического анализа в диапазоне от 200 до 600 нм.

Содержание глюкозы в образцах ЭПС проводили методом сравнения со стандартным раствором глюкозы, согласно формуле:

$$C_x = \frac{A_x \cdot C_{cm}}{A_{cm}},$$

где C_x – концентрация глюкозы в исследуемом образце, г/мл; A_x - оптическая плотность образца; C_{cm} - концентрация глюкозы в стандартном образце; A_{cm} - оптическая плотность в стандартном образце.

На основании полученных данных мы рассчитали выход глюкозы в образцах, по формуле:

$$W = \frac{m_{gl}}{m_{ep}} \cdot 100\%,$$

где W - выход глюкозы в образцах, %; m_{gl} - масса глюкозы в образце, г; m_{ep} - масса гравиметрическая.

ГЛАВА 4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

4.1 Введение

Полисахариды представляют собой высокомолекулярные продукты поликонденсации моносахаридов, связанных друг с другом гликозидными связями и образующих линейные или разветвленные цепи, построенные не менее чем из 11 моносахаридов. Экзополисахариды (ЭПС) являются значимыми компонентами клеток микроорганизмов, которые выполняют ряд важных биологических функций: резервную, защитную и др. Сегодня экзополисахариды широко применяются в косметологии, медицине, пищевой промышленности и др., благодаря своим уникальным свойствам – эмульгирования, студнеобразования, загущения, влагоудержания и стабилизации [3]. Полисахариды микробного происхождения имеют ряд преимуществ (простота, климатическая независимость, экономичность производства и регулирование свойств) и занимают лидирующие позиции. На сегодняшний день получение и применение бактериальных полисахаридов широко развито за рубежом, выпускаются такие полисахариды как ксантан, курдлан, геллан и другие.

В нашей стране различные отрасли индустрии нуждаются в полисахаридах и их в большом количестве закупают в таких странах, как Великобритания, Франция, Китай и США. Таким образом, изучение экзополисахаридов бактериального происхождения и разработка их получения безусловно имеет важное научное и практическое значение.

В результате данной НИР был получен экзополисахарид при совместном культивировании микроорганизмов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*, который может найти широкое применение в медицине, косметологии, пищевой и др. отраслях промышленности.

1.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Для анализа потребителей результатов исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование.

Целевой рынок – сегменты рынка, на котором будет использоваться в будущем разработка. Для данного проекта целевым рынком являются предприятия фармацевтической, пищевой, косметологической промышленности.

Продукт (результат НИР) – экзополисахариды на основе ксантана, синтезированные бактериями *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*.

Сегментирование – это разделение покупателей на однородные группы, для каждой из которых может потребоваться определенный товар (услуга). Можно применять географический, демографический, поведенческий и иные критерии сегментирования рынка потребителей, возможно применение их комбинаций с использованием таких характеристик, как возраст, пол, национальность, образование, любимые занятия, стиль жизни, социальная принадлежность, профессия, уровень дохода.

4.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет провести оценку сравнительной эффективности научной разработки и определить направления для ее будущего повышения.

В таблице 9 представлены основные критерии ресурсоэффективности и ресурсосбережений разрабатываемого метода и существующих подходов. В качестве конкурентов микробиологического метода рассмотрим термический (1) и химический (2) методы.

Таблица 9– Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б _ф	Б _{к1}	Б _{к2}	К _ф	К _{к1}	К _{к2}
1	2	3	4	5	6	8	10
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Повышение производительности труда пользователя	0,1	4	4	3	0,4	0,4	0,3
2. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,12	5	3	4	0,6	0,4	0,5
3. Энергоэкономичность	0,1	4	4	3	0,4	0,4	0,3
4. Надежность	0,11	5	3	4	0,5	0,3	0,4
5. Безопасность, экологичность	0,13	5	2	3	0,6	0,3	0,4
6. Простота эксплуатации	0,1	5	4	3	0,5	0,4	0,3
Экономические критерии оценки эффективности							
1. Стоимость эксплуатации оборудования	0,12	3	4	2	0,4	0,5	0,2
2. Уровень проникновения на рынок	0,1	4	2	4	0,4	0,2	0,4
3. Цена	0,12	5	3	4	0,6	0,4	0,5
Итого	1	40	29	30	4,4	3,3	3,3

где $B_{1,2}$ — баллы соответствующего конкурента, $K_{1,2}$ - конкурентоспособность соответствующего конкурента; $B_{ф}$ - баллы разрабатываемого метода (микробиологического), $K_{ф}$ - конкурентоспособность разрабатываемого метода.

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum B_i \cdot B_i, \quad (4)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

B_i – вес показателя (в долях единицы);

B_i – балл i -го показателя.

4.3 SWOT-анализ

SWOT – (Strengths – сильные стороны, Weaknesses – слабые стороны, Opportunities – возможности и Threats – угрозы) – это комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в табл. 10.

Таблица 10 – Первый этап SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1 Экологичность технологии С2. Более низкая стоимость производства по сравнению с другими технологиями С3. Квалифицированный персонал	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца Сл2. Отсутствие достаточного финансирования проектов Сл3. Недостаток литературных данных по данному проекту
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Появление спроса на продукт		
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства У2. Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции У3. Ограничения на экспорт технологии У4. Несвоевременное		

финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства		
---	--	--

Таблица 11 – Итоговая матрица SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1 Экологичность технологии С2. Более низкая стоимость производства по сравнению с другими технологиями С3. Квалифицированный персонал	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца Сл2. Отсутствие достаточного финансирования проектов Сл3. Недостаток литературных данных по данному проекту
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Появление спроса на продукт	Синтез нового экзополисахарида бактериями <i>Xanthomonas Campestris</i> и <i>Bacillus Amyloliquefacience</i> . Появится большой спрос за счет быстрой скорости синтеза продукта.	Не до конца изучен данный метод синтеза.
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые технологии производства У2. Введения дополнительных государственных требований к сертификации	Синтез данным методом ускорит получение продукта, тем самым увеличив спрос на внутреннем рынке. Снижение зависимости от внешних рынков. Прибыль на внутреннем	Отсутствие рекламы на данный продукт. Сертификация продукции. Недостаточная прибыль. Повышение себестоимости.

продукции У3. Ограничения на экспорт технологии У4. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства	рынке.	
---	--------	--

4.4 Планирование научно-исследовательских работ

4.4.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научных исследований формируется рабочая группа, в чей состав входят: бакалавр, научный руководитель, консультант по части социальной ответственности (СО) и консультант по экономической части (ЭЧ) выпускной квалификационной работы. Составим перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования и проведем распределение исполнителей по видам работ (табл. 12)

Таблица 12 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№раб	Содержание работ	Должность исполнителя
1	2	3	4
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР, Рыжакина Т.Г. к.э.н., доцент каф. менеджмента ИСГТ, Ахмеджанов Р.Р., профессор каф. ЭБЖ ИНК, Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
Выбор направления исследований	2	Выбор направления исследований	Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР, Худякова Л.И.,

			кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
	3	Подбор и изучение материалов по теме	Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР, Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
	4	Патентный обзор литературы	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
	5	Календарное планирование работ по теме	Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР, Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
Теоретические и экспериментальные исследования	6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
	7	Проведение экспериментов	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
	8	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР, Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
Обобщение и оценка результатов	9	Оценка эффективности полученных результатов	Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР, Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
	10	Определение целесообразности проведения ВКР	Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР, Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
Проведение ВКР			
Разработка технической документации и проектирование	11	Разработка методики биосинтеза экзополисахаридов бактериями <i>Xanthomonas Campestris</i> и <i>Bacillus Amyloliquefacience</i>	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр
	13	Оценка эффективности производства и применения разработки	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр, Рыжакина Т.Г. к.э.н., доцент

			каф. менеджмента ИСГТ
	14	Разработка социальной ответственности по теме	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр, Ахмеджанов Р.Р., профессор каф. ЭБЖ ИНК
Изготовление и испытание опытного образца	15	Получение опытного образца	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр, Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР
	16	Лабораторные испытания опытного образца	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр, Асташкина А.П., к.х.н., доцент каф. ФАХ ИПР
Оформление комплекта документации по ВКР	15	Составление пояснительной записки	Худякова Л.И., кафедра ФАХ ИПР, бакалавр

4.5 Определение трудоемкости выполнения работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества трудно учитываемых факторов. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости $t_{ожi}$ используется формула (4):

$$t_{ожi} = \frac{3t_{\min i} + 2t_{\max i}}{5}, \quad (4)$$

где $t_{ожi}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения i – ой работы, чел. – дн.;

$t_{\min i}$ – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной i – ой работы, чел. – дн.;

$t_{\max i}$ – максимально возможная трудоемкость выполнения заданной i – ой работы (пессимистическая оценка: в предположении наиболее

неблагоприятного стечения обстоятельств), чел. – дн.

Исходя из ожидаемой трудоемкости работ, определяется продолжительность каждой работы в рабочих днях T_p , учитывающая параллельность выполнения работ несколькими исполнителями:

$$T_{pi} = \frac{t_{ож\ i}}{Ч_i}, \quad (5)$$

где T_{pi} – продолжительность одной работы, раб. дн.;

$t_{ож\ i}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел. – дн;

$Ч_i$ – численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

Результаты расчетов занесены в табл. 13

Таблица 13 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Название работ	Трудоемкость работ									Исполнители	Т _р , раб. дн.			Т _р , кал. дн.		
		t _{min} , чел-дн.			t _{max} , чел-дн.			t _{ож} , чел-дн.				Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3
		Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3							
1	Составление технического задания	0,2	0,2	0,2	1	1	1	0,5	0,5	0,5	Р	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,2	0,2	0,2	1	1	1	0,5	0,5	0,5	Б	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,2	0,2	0,2	1	1	1	0,5	0,5	0,5	К ¹	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		0,2	0,2	0,2	1	1	1	0,5	0,5	0,5	К ²	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2	Выбор направления исследований	0,5	0,5	0,5	2	2	2	1	1	1	Р	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
		0,5	0,5	0,5	2	2	2	1	1	1	Б	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
3	Подбор и изучение материалов	5	5	5	10	10	10	7	7	7	Р	3,5	3,5	3,5	4,2	4,2	4,2
		5	5	5	10	10	10	7	7	7	Б	3,5	3,5	3,5	4,2	4,2	4,2
4	Патентный обзор литературы	7	7	7	10	10	10	8,2	8,2	8,2	Б	8,2	8,2	8,2	9,8	9,8	9,8
5	Календарное планирование работ по теме	1	1	1	2	2	2	1,4	1,4	1,4	Р	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8
		1	1	1	2	2	2	1,4	1,4	1,4	Б	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8
6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	3	3	3	5	5	5	3,8	3,8	3,8	Б	1,9	1,9	1,9	2,3	2,3	2,3
7	Проведение экспериментов	5	5	5	8	8	8	6,2	6,2	6,2	Б	3,1	3,1	3,1	3,7	3,7	3,7

8	Сопоставление результатов с теоретическими исследованиями	2	2	2	3	3	3	2,4	2,4	2,4	Р	1,2	1,2	1,2	1,4	1,4	1,4
		3	3	3	5	5	5	3,8	3,8	3,8	Б	1,9	1,9	1,9	2,3	2,3	2,3
9	Оценка эффективности результатов	3	3	3	4	4	4	3,4	3,4	3,4	Р	1,7	1,7	1,7	2	2	2
		5	5	5	6	6	6	5,4	5,4	5,4	Б	2,7	2,7	2,7	3,2	3,2	3,2
10	Определение целесообразности проведения ВКР	5	5	5	7	7	7	5,8	5,8	5,8	Р	2,9	2,9	2,9	3,5	3,5	3,5
		5	5	5	7	7	7	5,8	5,8	5,8	Б	2,9	2,9	2,9	3,5	3,5	3,5
11	Разработка методики био-синтеза экзополисахарида в бактериями <i>Xanthomonas Campestris</i> и <i>Bacillus Amyloliquefacience</i>	2	2	2	3	3	3	2,4	2,4	2,4	Б	2,4	2,4	2,4	2,9	2,9	2,9
12	Оценка эффективности производства	5	5	5	10	10	10	7	7	7	Б	3,5	3,5	3,5	4,2	4,2	4,2
		5	5	5	10	10	10	7	7	7	К ¹	3,5	3,5	3,5	4,2	4,2	4,2
13	Получение экзополисахарида в (биосинтез)	7	7	7	10	10	10	8,2	8,2	8,2	Б	4,1	4,1	4,1	4,9	4,9	4,9
		7	7	7	10	10	10	8,2	8,2	8,2	К ²	4,1	4,1	4,1	4,9	4,9	4,9
14	Выделение синтезированного образца ЭПС	3	3	3	4	4	4	3,4	3,4	3,4	Р	1,7	1,7	1,7	2	2	2
		14	14	14	28	28	28	19,6	19,6	19,6	Б	9,8	9,8	9,8	12	12	12
15	Испытания полученного образца	3	3	3	4	4	4	3,4	3,4	3,4	Р	1,7	1,7	1,7	2	2	2
		5	5	5	7	7	7	5,8	5,8	5,8	Б	2,9	2,9	2,9	3,5	3,5	3,5
16	Составление пояснительной записки	13	13	13	16	16	16	14,2	14,2	14,2	Б	14	14	14	17	17	17

Р – руководитель

Б – бакалавр

К¹ – консультант по экономической части

К² – консультант по социальной ответственности

4.6 Разработка графика проведения научного исследования

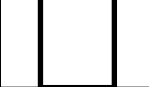
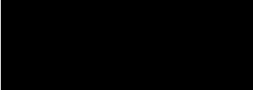
4.6.1 Контрольные события проекта

Таблица 14— Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	Получение задания и составление плана работ	08.01.2016	
2	Литературный обзор по получению экзополисахаридов	09.01.2016	Обзор литературы (ВКР)
3	Постановка цели и задач	19.01.2016	Раздел цели и задачи в (ВКР)
4	Разработка плана экспериментальных работ	20.01.2016	План экспериментальных работ
5	Проведение эксперимента	25.01.2016	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
6	Обработка экспериментальных данных, обсуждение результатов	30.03.2016	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
7	Оформление графической части (таблицы, графики).	15.04.2016	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
8	Разработка презентации и раздаточного материала	19.05.2016	

Календарный план-график выполнения научно-исследовательской работы по теме: «Микробиологический синтез экзополисахаридов бактериями родов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*» представлен в календарном плане- проекте (таблица 15).

Таблица 15 - Календарный план-график проведения НИОКР по теме

Код работы (из ИСР)	Вид работ	Исполнители	Т _к , кал, дн.	Продолжительность выполнения работ													
				январь		февраль			март			апрель			май		
				2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	
1	Составление технического задания. Постановка цели и задач	Руководитель, консультант ЭЧ, консультант СО	5														
2	Обзор литературы	Бакалавр	20														
3	Выполнение эксперимента	Бакалавр	62														
4	Результаты и обсуждения	Руководитель, бакалавр, консультант ЭЧ, консультант СО	9														
																	
5	Оформление диплома, обработка полученных данных.	Руководитель, бакалавр	34														
																	



– руководитель



– бакалавр



– консультант ЭЧ,
консультант СО

4.7 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

Бюджет затрат на выполнение научно-исследовательской работы рассчитывается по статьям калькуляции, которые включают две группы затрат: прямые затраты и накладные затраты.

Прямые затраты - это затраты на сырье, амортизацию оборудования, энергию.

Накладные затраты включают лабораторные затраты, связанные с освещением, отоплением, содержанием персонала.

Основными статьями калькуляции являются:

1. Затраты на сырье и материалы, покупные изделия.
2. Фонд заработной платы исполнителей.
3. Амортизация оборудования.
4. Накладные расходы, включающие затраты на содержание на административно-управленческого аппарата, по охране труда и т.п.
5. Прочие затраты.

4.7.1 Затраты на сырье и материалы

Таблица 16 - Расчет затрат на сырье

№ п/п	Наименование затрат	Единица измерений	Расход	Цена за ед., руб.	Сумма, руб.
1	Пептон сухой ферментативный на основе мяса фас, 0,25 кг	кг	0,5	2340	1170
2	Агар микробиологический фас. 0,25 кг	кг	0,3	3713	530,4
3	Серная кислота	кг	1	289	289
4	Ф.Соляная кислота 0,1 н	упак	1	197	197
5	Ф.Натрий гидроокись 0,1 н	упак	1	193,5	193,5
6	Вата хирург н/с 1 кг	кг	1	157,3	157,3
7	Марля медицинская отбеленная пл.29г/м ²	м	50	9,09	454,5
8	Пергамент М 74-Ф	кг	1	177,1	177,1

9	Глюкоза	кг	0,5	400	200
10	Сахароза	кг	0,5	400	200
11	Лактоза	кг	0,5	700	350
12	Шприц, 5 см ³ , одн. прим.	шт	100	1,82	182
13	Шприц, 5 см ³ , одн. прим.	шт	100	2,73	273
14	Пробка А5 (для пенициллиновых флаконов)	шт	10	0,64	6,4
15	Пенициллиновые флаконы АБ 10 мл	шт	10	1,6	16
16	Перекись водорода, 37 %	кг	0,5	497	248,5
17	Спирт этиловый, 96%	шт.	2	900	1800
18	Спиртовка СЛ 2 с метал, оправой	шт	2	110	220
19	Фильтровальная бумага	упак	1	300	300
20	Маска 3-слойная медицинская на резинке 100 шт н/стерил.	шт	1	13,6	136
21	Шапочка нетканая «Берет» 100 шт	шт	1	14,5	145
22	Бахилы одноразовые 14 микрон уп. 25 пар	шт	2	3,5	145,5
23	Латексный перчатки	шт.	30	7	210
ИТО ГО					7601,2

4.7.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ

Расчет сводится к определению амортизационных отчислений, так как оборудование было приобретено до начала выполнения данной работы и эксплуатировалось ранее, поэтому при расчете затрат на оборудовании учитываем только рабочие дни по данной теме. Амортизация оборудования рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{C_n \cdot H_a \cdot n}{100 \cdot k} \quad (6)$$

где C_n - первоначальная стоимость оборудования;

H_a - норма амортизации, %;

n -число проработанных месяцев; k - количество месяцев в году.

Таблица 17 - Амортизация используемых приборов

№ п/п	Наименование прибора	Стоимость * С, руб.	Количество п,шт	Норма аморт., Na,%	Амортизация А, руб.
1	Суховоздушный шкаф-стерилизатор Binder	723000,00	1	10	48500
2	Ламинарный шкаф SC2-4A1 Streamline Esco	750000,00	1	15	50000
3	Цифровой автоклав (паровой стерилизатор) WiseCube	477400,00	1	10	47740
4	Шкаф термостатируемый WiseCube	107669,49	1	10	10767
5	Инкубатор WiseCube WIS- 20 горизонтальный с орбитальным шейкером	383822,03	1	10	38382
6	Дистиллятор 3,5 л/ч	34500	1	1	34500
7	Весы лабораторные аналитические ACCULAB	57277	1	10	5727
8	Биноккулярный микроскоп MC-100	123000	1	10	12300
9	Одноканальный дозатор «БЮИТ» 100-1000 мкл	4000	1	1	4000
10	Одноканальный дозатор «БЮИТ» 10 -100 мкл	4202	1	1	4202
ИТОГО:		12314170			255818

* Стоимость оборудование указана с учетом НДС.

4.7.3 Расчет основной заработной платы

Основная заработная плата ($Z_{\text{осн}}$) находится по формуле:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}}, \quad (8)$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата одного работника;

$T_{\text{р}}$ – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{\text{дн}}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата в свою очередь рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}}, \quad (9)$$

где $Z_{\text{м}}$ – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 24 раб. дня $M = 11,2$ месяца, 5-дневная неделя;

$F_{\text{д}}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. Дн

Таблица 18- Баланс рабочего времени за 2016 год.

Показатели рабочего времени	Руководитель	Бакалавр
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	118	118
- праздничные дни		
Потери рабочего времени		
- отпуск	24	-
- невыходы по болезни		
Действительный годовой фонд рабочего времени	223	247

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_{\text{м}} = Z_{\text{б}} \cdot k_{\text{р}}, \quad (10)$$

где $Z_{\text{б}}$ – базовый оклад, руб.;

$k_{\text{р}}$ – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Основная заработная плата руководителя (от ТПУ) рассчитывается на основании отраслевой оплаты труда. Отраслевая система оплаты труда в ТПУ предполагает следующий состав заработной платы:

1) оклад – определяется предприятием. В ТПУ оклады распределены в соответствии с занимаемыми должностями. Базовый оклад $Z_{\text{б}}$ определяется исходя из размеров окладов, определенных штатным расписанием предприятия.

2) стимулирующие выплаты – устанавливаются руководителем подразделений за эффективный труд, выполнение дополнительных обязанностей и т.д.

3) иные выплаты; районный коэффициент.

Найдем основную заработную плату за период с января по май 2015 года для руководителя:

$$З_{5\text{мес}} = 23264,86 * 5 = 116320,86\text{руб.}$$

$$З_{\text{осн}} = 116320,86 * 1,3 = 151218,59\text{руб.}$$

Аналогично для бакалавра:

$$З_{\text{м}} = 3200\text{руб.}$$

$$З_{\text{осн}} = 3200 * 5 = 16000\text{руб.}$$

Таблица 19 - Расчёт основной заработной платы с января по май

Исполнители	З _б , руб.	к _р	З _{5мес} , руб	З _{осн} , руб.
Руководитель	23264,86	1,3	116320,86	151218,59
Бакалавр			3200 _{стип.}	16,000
Консультант ЭЧ	14874,45	1,3	19336,79	96684
Консультант СО	14874,45	1,3	19336,79	96684

Отчисления на социальные нужды составляет 30 % от суммы заработной платы всех сотрудников. Отчисления на социальные нужды составляет: отчисления в пенсионный фонд 22 %, отчисление на социальное страхование 2,9%, отчисление на медицинское страхование 5,1 %, 0,5% страхование жизни, от несчастного случая.

Рассчитываем затраты на отчисление на социальные нужды по формуле:

$$З_{\text{о.с.н.}} = 0,305 \cdot (З_{\text{осн.рук.}} + З_{\text{осн.асс.}} + З_{\text{осн.магис.}}) \quad (10)$$

где $З_{\text{о.с.н.}}$ - затраты на отчисления на социальные нужды, руб.

$$З_{\text{о.с.н.}} = 0,305 \cdot (151218,59 + 96684 + 12500) = 79422,79$$

Таблица 20 - Смета затрат на выполнение НИР

Наименование затрат	Единицы измерения	Цена, руб.	Затраты на услугу, руб.
Материалы:			
Сырье			7601,2
Заработная плата			
Руководитель	руб.		151218,59
Ассистент ЭЧ	руб.		96684
Ассистент СО	руб.		96684
Бакалавр	руб.		16000
Отчисления на социальные нужды	руб.		79422,79
Содержание и эксплуатация оборудования:			
Амортизация	руб.		255818
Суммарные затраты	Руб.		703428,58

Как видно из таблицы 20 основные затраты НИР приходятся на основную заработную плату исполнителей темы.

4.8 Оценка сравнительной эффективности исследования

Биотехнологический метод «in vitro», основанный на использовании различных групп микроорганизмов, является экономически выгодным в плане эксплуатации оборудования, наиболее ресурсоэффективным, экологически безопасным и надежным. Основные экономические затраты аналогов представлены в таблице 21.

Таблица 21 - Группировка затрат по статьям аналогов разработки

Вариант исполнения аналога	Сырье, материалы (за вычетом возвратных отходов), покупные изделия и полуфабрикаты	Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	Основная заработная плата	Отчисления на социальные нужды	Итого плановая себестоимость
in situ	30000	700000	60000	18300	838300
ex situ	5000	1500000	89500	27297,5	1695487,5

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} \quad (11)$$

где I_{ϕ}^p - интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i-го варианта исполнения;

Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Найдем значения интегрального финансового показателя для всех вариантов исполнения научного исследования:

$$I_1^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{838300}{1695487,5} = 0,5$$

$$I_2^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{1695487,5}{1695487,5} = 1$$

$$I_{исс}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}} = \frac{639806,11}{1695487,5} = 0,38$$

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное удешевление стоимости затрат разработки в разы, то есть наша разработка обладает наименьшей стоимостью по сравнению с аналогами.

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования определяют следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (12)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов;
 a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

b_i^a, b_i^p – бальная оценка i -го параметра для аналога и разработки,
устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности рекомендуется проводить в форме таблицы.

Таблица 22 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии	ПО			
	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Аналог 1	Аналог 2
1. Способствует росту производительности труда пользователя	0,2	5	5	4
2.Наличия оборудования	0,2	5	3	1
3.Экспресность выполнения анализа	0,2	5	3	2
4. Энергосбережение	0,2	4	2	2
5 Материалоемкость	0,2	4	3	2
ИТОГО	1	4,6	3,2	2,2

4.8.1 Интегральный показатель эффективности разработки и аналога

Интегральный показатель эффективности разработки ($I_{финр}^p$) и аналога ($I_{финр}^a$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_{\phi}^p}, \quad I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_{\phi}^a} \quad \dots \quad (13)$$

$$I_{\text{иссл.}}^p = \frac{I_m^p}{I_{\phi}^p} = \frac{4,6}{0,38} = 12,1$$

$$I_1^a = \frac{I_m^a}{I_{\phi}^a} = \frac{3,2}{0,5} = 6,4$$

$$I_2^a = \frac{I_m^a}{I_{\phi}^a} = \frac{2,2}{1} = 2,2$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта.

Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{\text{финр}}^p}{I_{\text{финр}}^a} \quad (14)$$

$$\mathcal{E}_{cp1} = \frac{I_{\text{финр}}^p}{I_{\text{финр}}^a} = \frac{12,1}{3,2} = 3,7$$

$$\mathcal{E}_{cp2} = \frac{I_{\text{финр}}^p}{I_{\text{финр}}^a} = \frac{12,1}{2,2} = 5,5$$

где $\mathcal{E}_{cp}$ – сравнительная эффективность проекта; $I_{\text{финр}}^p$ – интегральный показатель разработки; $I_{\text{финр}}^a$ – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Таблица 23 Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Аналог 1	Разработка	Аналог 2
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,5	0,38	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	3,2	4,6	2,2
3	Интегральный показатель эффективности	6,4	12,1	2,2

4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	3,7	5,5
---	---	-----	-----

Вывод: Сравнение значений интегральных показателей эффективности показывают, что наша разработка представляет собой более эффективный вариант решения поставленной в бакалаврском дипломе технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности.

ГЛАВА 5. СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

В данной бакалаврской работе рассматривается безопасность и экологичность нахождения сотрудников в лаборатории. Безопасность включает в себя влияние опасных и вредных факторов, их анализ и меры их профилактики.

В настоящем разделе рассматриваются вопросы охраны труда, связанные с работой в лаборатории, а так же разрабатываются мероприятия по предотвращению воздействия на здоровье опасных и вредных факторов для работников лаборатории и создание безопасных условий труда для обслуживающего персонала.

Согласно [51] говорится, что необходимо выявить все вредные и опасные факторы для оценки их влияния на работника. Выполнение научно-исследовательской работы по данной тематике требует четкого соблюдения правил по технике безопасности и охраны труда работников: при работе с биологическими агентами; химическими реактивами; едкими и ядовитыми веществами, при работе с электрооборудованием (автоклав, ламинарный шкаф, сухожаровой шкаф и т.п.).

В микробиологической и химической лаборатории исследователь может подвергаться следующим факторам воздействия: биологическая опасность, УФ — излучение, электромагнитные поля, параметры микроклимата (шум, вибрация, температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха, инфракрасное излучение), параметры световой среды рабочей поверхности.

Одной из основных задач является внедрение на всех предприятиях и рабочих местах совершенных средств техники безопасности и безвредных условий труда, обеспечения санитарно-гигиенических условий, устраняющих производственный травматизм и профессиональные заболевания [52].

5.1 Оценка условий производственной среды

В соответствии с [52] каждый человек имеет право на труд в условиях, отвечающих требованиям безопасности и гигиены, и право на охрану здоровья. В соответствии с п. 5 (Условия и охрана труда, промышленная и экологическая безопасность) Генерального соглашения между общероссийскими объединениями профсоюзов, общероссийскими объединениями работодателей и Правительством Российской Федерации на 2014 - 2016 годы [53], обеспечение безопасности жизни и здоровья работников в процессе трудовой деятельности является одним из национальных приоритетов в целях сохранения человеческого капитала и рассматриваются в неразрывной связи с решением задач по улучшению условий и охраны труда, промышленной и экологической безопасности.

5.1.1 Защита от опасных и вредных факторов

Согласно [54] все вредные опасные факторы, воздействующие при эксплуатации оборудования, можно классифицировать следующим образом по группам, физические, биологические, химические, психофизиологические. В рамках данной работы следует выделить основные группы: химические и биологические.

В ходе выполнения научно-исследовательской работы исполнитель может подвергаться воздействию опасных и вредных производственных факторов:

а) санитарно-гигиенические: заражение биологическими агентами (микроорганизмами, бактериями и т.п.); нерациональное освещение, содержание вредных и отравляющих веществ в воздухе;

б) поражение электрическим током при прикосновении к открытым токоведущим частям электрооборудования или при нарушении изоляции проводов;

в) организационно - технические: неправильная организация труда и рабочего места (загроможденность помещения, присутствие ненужных и отсутствие необходимых для работы приборов и приспособлений), недостаточное обучение работников правилам техники безопасности.

Важной организационной мерой является установление научно обоснованных норм по гигиене труда. В соответствии с законодательством Российской Федерации, рабочие и служащие, связанные по роду своей деятельности с вредными и опасными условиями труда, должны в обязательном порядке проходить медицинский осмотр. В производственных помещениях следует иметь аптечки, укомплектованные медикаментами, для оказания первой доврачебной помощи. Работа с вредными и опасными химическими реактивами проводится в специальных помещениях, оборудованных вытяжными шкафами.

Технические и организационные меры по предотвращению пожара или взрыва и противопожарной защите осуществляются в соответствии с [53].

Согласно п. 1.1.2 [54] вещества, используемые в технологических процессах, проводимых в данной работе, могут быть классифицированы как химически опасные и вредные.

Таблица 24 Характеристика химических веществ

Вещество	Величина ПДКр.з., мг/м ³	Характеристика	Класс опасности	Особенности воздействия на организм
Серная кислота [ГОСТ 4204- 77 Реактивы. Серная кислота. Техническ ие условия]	1	Бесцветная, прозрачная, маслянистая жидкость, без запаха	2[ГОСТ 12.1.005]	Серная кислота и ее пары обладают сильным прижигающим и раздражающим слизистые оболочки действием. При попадании на кожу и слизистые

				оболочки серная кислота вызывает тяжелые ожоги.
Соляная кислота [ГОСТ 3118- 77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия]	5	Представляет собой бесцветную жидкость с резким запахом, дымящуюся на воздухе; смешивается с водой, бензолом и с эфиром.	3[ГОСТ12.1.007-76]	При воздействии высоких концентраций — ожоги кожи; при воздействии паров кислоты - раздражение слизистых, в особенности носа; конъюнктивит; помутнение роговицы, охриплость.
Перекись водорода [ГОСТ 10929-76 Перекись водорода Технические условия]	0,3	Негорючая, Пожаровзрывоопасная жидкость, является сильным окислителем, способна самопроизвольно	2 [ГОСТ 12.1.007]	Растворы перекиси водорода могут вызывать ожоги кожи и глаз, пары перекиси водорода - раздражение слизистых оболочек.

Химическая лаборатория, в которой проводился анализ, снабжена приточно-вытяжной вентиляцией и вытяжным шкафом для защиты органов дыхания и слизистой оболочки глаз. Перед началом работы (за 30 минут) в лаборатории включалась вентиляция и включалась в конце рабочего дня. Для предотвращения ожогов слизистой оболочки глаз и кожи (перекись водорода) использовали индивидуальные средства защиты (резиновые

перчатки, спецодежда). Таким образом, при выполнении работы по теме: «Микробиологический синтез экзополисахаридов бактериями *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*» использовали индивидуальные средства защиты и соблюдали правила работы с горючими и легковоспламеняющимися жидкостями, поэтому уровень ПДК не превышал значений указанных в таблице 5.1.

5.1.2 Уровень шума и вибрации

Для разработки метода и проведения исследований в работе использовалось различного уровня оборудования: термостат, ламинарный шкаф, сухожаровой шкаф, автоклав и т.д. которые являются источником шума и вибрации. Шум и вибрация ухудшают условия труда, оказывая вредное воздействие на организм человека. При длительном воздействии шума на организм человека происходят не желательные явления: снижение остроты зрения, слуха; повышение кровяного давления; снижение внимания. Согласно нормативным документам [53] уровень звука в помещении не должен превышать 50 дБА. Для предотвращения негативного воздействия шумовых характеристик оборудования на здоровье человека приборы установлены на фундаменты и амортизирующие прокладки, описанные в нормативных документах. По уровню шума, локальной и общей вибрации научно-исследовательская лаборатория с вышеперечисленным оборудованием относится к допустимому классу, ПДУ <25 дБА, что соответствует требованиям безопасного нахождения в лаборатории.

1.1.3 Защита от заражения биологическими агентами

Бактерии *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience* являются непатогенными, но несмотря на это, в лаборатории соблюдали определенные правила.

В ходе выполнения научно-исследовательской работы в микробиологической лаборатории каждый сотрудник строго соблюдал следующие требования безопасности:

1. Работники должны быть в специальной спецодежде (класс В по GMP), которые необходимо одевать при входе и оставлять при выходе из помещения.
2. При работе с биологическими агентами необходимо надевать перчатки, маску.
3. Перенос БА и использованной посуды для обеззараживания осуществлять в закрывающихся емкостях, исключающих инфицирование во время транспортировки.
4. Во всех помещениях, где проводится работа с заразным материалом, не реже одного раза в 2 неделю должна проводиться влажная уборка с дезинфицирующим средством (5 % раствор хлорамин или 3% раствор перекиси водорода) стен, пола, боксов и предбоксов. Мебель и оборудование обрабатывают 2 - 3%-ный раствором соды (бикарбоната натрия), 0,5 - 3%-ный водным раствором хлорамина. Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для протирания поверхности стола можно использовать растворы: 70%-ный изопропилового или этиловый спирт, лизол, хлорамин.
5. Воздух во всех рабочих помещениях обеззараживается ежедневно при помощи бактерицидных ламп в течение 30-40 минут.
6. Обеззараживание рабочего места в ламинарном боксе также производится от 30-60 минут. Стерилизующая способность ламинарных боксов должна постоянно (не реже 6 месяцев) проверяться при помощи бактериологических питательных сред и фиксироваться также в журнале. Запрещается находиться в помещениях при включенной бактерицидной лампе.

7. Перед посевом следует разборчиво сделать надпись на пробирке (колбе или чашке Петри): название культуры и дату посева. Надпись делают маркером на стекле или на наклеенной этикетке.

5.1.4 Защита от воздействия электромагнитного излучения и электростатических полей

Требования защиты от воздействия электромагнитных полей (ЭСП) должны удовлетворять следующим [8,9.]. Допустимые уровни воздействия электростатических полей (ЭСП) регламентируются требованиями [10] и санитарно- гигиеническими нормами. Согласно данным нормативным документам предельное значение напряжённости электрического поля составляет 5 кВ/м, предельно допустимый уровень напряженности (общее) — 8кА/м.

Оценка и нормирование электростатических полей осуществляется по уровню электрического поля дифференцированно в зависимости от времени его воздействия на работника за смену для условия общего (на все тело) и локального (кисти рук, предплечье) воздействия.

Работа по разработке метода контроля проводилась ежедневно, и исследователь подвергался воздействию электростатического поля.

Предельно допустимый уровень напряженности электростатического поля (Епду) при воздействии более 1 часа за смену Епду рассчитывали по формуле [12]:

$$ЕПДУ = \frac{60}{\sqrt{t}},$$

где t - время, ч

Установили, что при выполнении работы Епду составил 18 кВ/м, следовательно, пребывание ЭСП не регламентируется и не требует применения специальных средств защиты.

5.1.5 Защита от воздействия ультрафиолетового излучения

Работа по разработке метода контроля биоразложения нефтепродуктов включает в себя проведение микробиологического определения численности микроорганизмов (количество образующихся колоний, КОЕ). Так как работа ведется с биологическими агентами, то для предотвращения зараженности и контаминации помещений необходимо ежедневно в течение 30 мин (2 раза в день) проводить УФ-стерилизацию помещения (обеззараживание). Для обеззараживания помещения используются бактерицидные лампы с длинноволновой областью 400-315 нм (УФА) и частотой 10-13 Гц. Согласно [10] допустимая интенсивность облучения работающих при наличии незащищенных участков поверхности кожи не более 0,2 м и периода облучения до 5 мин, длительности пауз между ними не менее 30 мин и общей продолжительности воздействия за смену до 60 мин - не должна превышать 50,0 Вт/м². Для предотвращения попадания УФ лучей (на прямых, не отраженных) на слизистую оболочку глаз и кожного покрова все работники лаборатории оставляли свое рабочее место. С целью защиты органов дыхания и слизистой оболочки глаз работу в помещении начинали через 30 минут после стерилизации. Так как, бактерицидные лампы имеют ограниченный срок годности, то время работы лампы постоянно фиксируется исследователем (дата, время работы, ответственное лицо). Так как работа выполнялась строго с соблюдением техники безопасности и охраны труда (использовались индивидуальные средства защиты), то значение допустимой интенсивности облучения не превысило 50 Вт/м .

5.1.6 Освещенность рабочих мест

Согласно [55] в зависимости от назначения помещений существуют требования к искусственному освещению. Применение на рабочих местах, на которых проводятся работы с высоким зрительным напряжением, одного

местного освещения не допускается. При выполнении измерений в микробиологической лаборатории (работа со световым микроскопом, подсчет клеток, описание колоний) освещенность рабочего места должна быть согласно СНиП 23-05-95 в пределах 400 лк. Обеспечить это требование естественным освещением практически невозможно, поэтому должно применяться комбинированное освещение. При совмещенном освещении общественных зданий нормируемые значения КЕО должны составлять от нормированных значений КЕО при естественном освещении не менее 60% для научно-исследовательских помещений.

При выполнении измерений в микробиологической лаборатории (работа со световым микроскопом, подсчет клеток, описание колоний) для освещения применяются люминесцентные лампы низкого давления с исправленной цветностью ЛДЦ и дневного света ЛД со светильниками рассеянного типа ОД. Необходимо ограничивать прямую блесткость от источников освещения, при этом яркость светящихся поверхностей в поле зрения не должна превышать 200 кд/м².

Показатель ослепленности для источников общего искусственного освещения в производственных помещениях не превышает 20, показатель дискомфорта в общественных помещениях не превышает 40.

Для операторов персональных компьютеров и видеодисплейных терминалов ограничивают неравномерность распределения яркости в поле зрения, при этом соотношение яркости между рабочими поверхностями не должно превышать 3:1 - 5:1, между рабочими поверхностями и поверхностями стен и оборудования 10:1.

Для осветительных установок общего освещения коэффициент запаса составляет 1,8 — 2,0. Коэффициент пульсации не превышает 5%.

Для обеспечения нормируемых значений освещенности в рабочих помещениях проводится чистка стекол оконных рам и светильников два раза в год и своевременная замена перегоревших ламп.

5.1.7 Электробезопасность

Основными причинами воздействия тока на человека являются: появление напряжения на металлических частях оборудования в результате повреждения изоляции. Наибольшую опасность при эксплуатации электрических устройств и проведении ремонтно-профилактических работ представляет поражение электрическим током вследствие присоединения к токоведущим частям аппаратуры и к частям прибора, находящимся под напряжением. Наиболее опасным для человека является переменный ток с частотой 20 - 100 Гц. Опасной величиной тока является ток, равный 0,001 А, а смертельный 0,1 А.

Помещение лаборатории согласно ГОСТ Р12.1.019-2009 относится к 1-ой категории по условиям опасности поражения электрическим током, без опасности поражения электрическим током, в которых отсутствуют условия, создающие повышенную или особую опасность. Для предотвращения воздействия тока на человека в лаборатории выполнялись следующие условия:

1. Соблюдение соответствующих расстояний до токоведущих частей или путем закрытия (заземление электрооборудования) [12];
2. Ограждения токоведущих частей;
3. Применение блокировки аппаратов и ограждающих устройств для предотвращения ошибочных операций и доступа к токоведущим частям;
4. Применение предупреждающей сигнализации, надписей;
5. Целостность электрооборудования.

Кроме того, для адекватной работы приборов в помещении поддерживались следующие условия:

1. Температура окружающей среды от 10°C до 35 °C;
2. Относительная влажность 30 - 80% при 25°C;

3. Окружающая среда — невзрывоопасна, не содержащая значительного количества токопроводящей пыли, агрессивных газов.

Безопасность работы обеспечена в конструкции электрооборудования: термостат, ламинарный шкаф, сухожаровой шкаф. Металлический корпус приборов исключает возможность прикосновения к токоведущим частям (ТЧ), имеется зануление (класс защиты 1). В электрической схеме оборудования предусмотрен выключатель со световой сигнализацией для включения прибора, кроме того, оборудование снабжено аварийной звуковой сигнализацией, в случае нештатных и чрезвычайных ситуаций (издается звуковой сигнал и оборудование отключается автоматически).

5.1.8 Пожарная безопасность

В соответствии с ФЗ N123-03 ст. 26 [13, 14] лабораторное помещение (аудитория 221/222) относится к категории А - повышенная пожаро— взрывоопасность.

С целью предупреждения и локализации пожаров и взрывов выполняются следующие требования/условия [14]:

1. разработан план эвакуации (рисунок), с которым ознакомлены сотрудники лаборатории.
2. для обнаружения пожара, оповещения и эвакуации людей установлена система пожарной сигнализации;
3. проводится систематический осмотр оборудования и электрических цепей;
4. в лаборатории находится необходимый набор первичных средств пожаротушения: ящик с сухим песком, асбестовое одеяло, ручной углекислотный огнетушитель типа ОП - 4, вода.



Рисунок 26 - План эвакуации при возникновении пожара в лаборатории 221/222 и размещения основного пожарного оборудования

5.2 Требования к рабочим помещениям

Производственные помещения корпуса № 2 ТПУ спроектированы в соответствии с требованиями [15] и [16]. Данные санитарные правила являются нормативно правовым документом, определяющим гигиенические требования по предотвращению воздействия на работающих вредных производственных факторов и охрану окружающей среды с целью улучшения условий труда и состояния здоровья работающих. Помещения оборудованы системами отопления, кондиционирования воздуха или эффективной приточно-вытяжной вентиляцией. Расчет воздухообмена проводится по теплоотдаче от машин, людей, солнечной радиации и искусственного освещения. Системы вентиляции и отопления в лабораторном помещении обеспечивают параметры микроклимата.

Для проведения микробиологических исследований научно-исследовательская лаборатория 222-2 дополнительно снабжена приточновытяжной вентиляцией, смонтирована проводка для электробезопасности (напряжение 380В для автоклава). При организации работы в микробиологической лаборатории предусмотрены мероприятия по охране труда: улавливание и очистка технологических и вентиляционных выбросов; очистка и обезвреживание промышленных стоков; своевременное удаление, обезвреживание и утилизация отходов производства.

Для безопасной работы лаборатория разделена на зоны: "заразную" зону, где осуществляют манипуляции с биологическими агентами (БА) и их хранение; "чистую" зону, где не проводят работы с БА.

В "чистой" зоне лабораторий располагают:

- гардероб для верхней одежды;
- помещения для проведения подготовительных работ (препараторская, моечная, приготовление и разлив питательных сред и др.);
- помещение для стерилизации питательных сред и лабораторной посуды (стерилизационная);
- помещение с холодильной камерой или холодильниками для хранения питательных сред и диагностических препаратов;
- комнаты для работы с документами и литературой;
- подсобные помещения.

В "заразной" зоне располагают:

- боксированные помещения для проведения микробиологических работ с биологическими агентами.
- помещение «заразной зоны» должны быть оборудованы бактерицидными облучателями для обеззараживания воздуха и поверхностей. В "заразной" зоне в помещениях, где проводят непосредственную работу с БА, персонал работает в защитной одежде (халате, маске, перчатках, шапочке).

5.2.1 Требования к микроклимату рабочих помещений

Согласно [17,18] показателями, характеризующими микроклимат, являются: температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха, интенсивность теплового излучения. Перечисленные параметры оказывают огромное влияние на функциональную деятельность человека, его самочувствие, здоровье, надежность работы.

Для комфортной работы в лаборатории соблюдались следующие показатели средней тяжести работ Пб, что согласуется с нормативной документацией [19]

1. Температура окружающей среды от 18°C (холодный период года) и в теплый период до 25 °C;
2. Относительная влажность 50 - 70% при 25°C;
3. Скорость движения: не более 0,4 (холодный период года) и 0,3 теплый период.
4. Интенсивность теплового облучения не превышало 70 Вт/м² при величине облучаемой поверхности от 25-50% (работа ведется над пламенем горелки или факелами).

При соблюдении данных показателей перепад температуры воздуха по высоте рабочей зоны не превышал более 3 °C, по горизонтали - не более 5 °C. Для создания благоприятного микроклимата лаборатория снабжена системой отопления от охлаждения, а в теплый период года - жалюзи, от попадания прямых солнечных лучей.

5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Мероприятия, проводимые во время чрезвычайных ситуаций (аварий, стихийных бедствии, военных конфликтов), представляют собой проведение спасательных работ и неотложных аварийно-восстановительных работ в очаге поражения. Данные мероприятия должны проводиться на основании

положения комплекса государственных стандартов по предупреждению и ликвидации чрезвычайной ситуации [20].

Для предотвращения различных чрезвычайных ситуаций сотрудники лаборатории в ходе выполнения работ должны соблюдать инструктаж по техники безопасности в химической и микробиологической лаборатории, разработанных в структурных подразделениях (Техника безопасности и охраны труда работы в аналитической лаборатории» №5-23).

Для предотвращения аварийных ситуаций в микробиологической лаборатории выполнялись следующие требования:

1. вход в биотехнологический блок посторонних лиц должен быть строго ограничен. Все сотрудники производят запись в журнале - начало и конец своей работы. При необходимости нахождения посторонних, они должны сопровождаться сотрудниками блока, их присутствие обязательно фиксироваться записью в журнале.
2. использовать материалы и средства личной гигиены, раздражающие кожу;
3. пипетировать ртом, переливать жидкий материал через край сосуда (пробирки, колбы с посевами);
4. хранить верхнюю одежду, личные вещи, а также продукты питания в «заразной зоне»;
5. употреблять пищу, курить;
6. сливать жидкие отходы в канализацию без предварительного обеззараживания;
7. оставлять после окончания работы на рабочих местах нефиксированные мазки или посуду с БА;
8. оставлять без надзора рабочее место во время выполнения любого вида работ с БА.

Во время военных конфликтов приводятся в боевую готовность формирования гражданской обороны. При угрозе нападения по радиотрансляционной сети передают сигналы «Воздушная тревога», «Отбой

воздушной тревоги», «Радиационная опасность» и «Химическая тревога», «Биологическая опасность».

Для исключения возможности несчастных случаев должны проводиться обучение и проверка знаний работников требований безопасности труда в соответствии с [53,54].

ВЫВОДЫ

1. Выбраны оптимальные условия для микробиологического синтеза экзополисахаридов бактериями *Xanthomonas Campestris*. Оптимальные условия микробиологического синтеза: среда с содержанием сахарозы, температура 27 °С, время культивирования 72 ч, 180 об/мин. Выход ЭПС составил 4,8 г.

2. Выбраны оптимальные условия для микробиологического синтеза экзополисахаридов бактериями *Bacillus Amyloliquefacience*. Оптимальные условия микробиологического синтеза: среда с содержанием глюкозы , температура 27 °С, время культивирования 24 ч, 180 об/мин. Выход ЭПС составил 0,33 г.

3. Выбраны оптимальные условия для микробиологического синтеза экзополисахаридов при совместном культивировании бактерий *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*. Оптимальные условия микробиологического синтеза: среда с содержанием сахарозы, температура 27 °С, время культивирования 48 ч, 180 об/мин. Выход ЭПС составил 0,57 г.

4. Разработаны методики выделения ЭПС из культуральной жидкости *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience* в ходе микробиологического синтеза.

5. Установлено, что все полученные образцы экзополисахаридов содержат глюкозу. Наибольшее количество глюкозы находится в ксантане, более 50%. В образцах ЭПС, полученных бактериями *Bacillus Amyloliquefacience* количество глюкозы не более 15%. В образцах при совместном культивировании глюкозы содержится от 1 до 10%.

5. Метод гель - хроматографии установлено, что все полученные образцы экзополисахаридов являются однородными по мономерному составу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время получение и применение бактериальных полисахаридов очень развито за рубежом, выпускаются такие полисахариды как ксантан, геллан, курдлан и другие. Ксантан широко зарекомендовал себя, как загуститель и стабилизатор на рынке фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. В ходе литературного обзора, было обнаружено, что изучение ксанта́на с каждым годом становится более актуальным. Основными поставщиками ксанта́на в РФ являются Китай и США. В силу этого, получение и изучение экзополисахаридов имеет важное научное и практическое значение для нашей страны. В литературе подробно описаны экзополисахариды на основе ксанта́на с использованием бактерий *Xanthomonas Campestris*. Однако, постоянно ведутся исследования по биосинтезу ЭПС бактериями *Xanthomonas Campestris* с другими бактериями для получения новых экзополисахаридов.

В ходе выполнения научно – исследовательской работы был впервые получен и выделен экзополисахарид на основе ксанта́на при совместном культивировании *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*, который может найти применение в ветеринарии, медицине, косметологии, пищевой промышленности и др.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. L.I. Khudyakova, A.P. Astashkina, Y.V. Kolbysheva. The basic components in the seawater composition. Proceedings of XIV International Scientific Conference of students and young scientists “Chemistry and Chemical Engineering in XXI century” dedicated to Professor L.P. Kulyov. – Tomsk, 2013. Part. 2 – P. 204-206.
2. L.I. Khudyakova, A.P. Astashkina, Y.V. Kolbysheva. Bacteria as a kind of living organism. Proceedings of XV International Scientific Conference of students and young scientists “Chemistry and Chemical Engineering in XXI century” dedicated to Professor L.P. Kulyov. – Tomsk, 2014. Part. 2 – P. 208-210.
3. L.I. Khudyakova, A.P. Astashkina, Y.V. Kolbysheva. Microbiological quality control of probiotic products. Procedia chemistry – 2014. – V.10. p. 74-79.
4. Худякова Л.И., Асташкина А.П., Ютрина О.И. Получение экзополисахаридов совместным культивированием бактерий родов *Xanthomonas Campestris* и *Bacillus Amyloliquefacience*. Сборник материалов XVI Всероссийской научно-практической конференции им. Проф. Л.П. Кулева студентов и молодых ученых с международным участием «Химия и химическая технология в XXI веке». – Томск, 2015. Том. 1 – С. 312-313.
5. Худякова Л.И., Асташкина А.П. Микробиологический синтез экзополисахаридов на основе ксантана для пищевой промышленности. Труды Международной научно-практической конференции «Интеграция науки, образованию и производства – основа реализации Плана Нации» (Сагиновские чтения №7), посвященной 100-летию со дня рождения академика А.С. Сагинова: в 5 т., Караганда, 10-11 декабря 2015. – Караганда: издательство КарГУ, 2015 – Т. 5 – С. 338-341.
6. Худякова Л.И., Асташкина А.П. Влияние УФ и МВ – облучения на микробиологический синтез ксантана. Сборник материалов XVII Всероссийской научно-практической конференции им. проф. Л.П. Кулева

студентов и молодых ученых с международным участием "Химия и химическая технология в XXI веке". – Томск, 2016. Том. 1 – С. 303-305.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Дубцова, Г.Н. Липид – белковое взаимодействие в технологии хлебопечения / Г.Н. Дубцова, И.В. Нечаев, У.Т. Жуманова // Агробιология.- 1986. Сер.27, №6. – С.20.
2. Микробиологические исследования карбонатного коллектора Ромашкинского нефтяного месторождения в связи с испытанием биотехнологии повышения нефтеотдачи / Т.Н. Назина и др. // Микробиология. – 1998. – Т.67, № 5. С. 701-709.
3. Елинов Н.П. Химия микробных полисахаридов / Н.П. Елинов. – М.: Высшая школа, 1984. – 156 с.
4. Матора А.В. Получение и исследование промышленно – важных штаммов – продуцентов ЭПС: дис. ... канд. био. наук / Матора А.В. – Саратов, 1993. – 172 с.
5. Гвоздяк Р.И. Микроный полисахарид ксантан / Р.И. Гвоздяк, М.С. Матышевская. – Киев: Наукова думка, 1989. – 195 с.
6. Полукаров Е.В. Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их функциональная значимость в организме животных: дис. ... канд. био. наук. Самара. 2009. 148 с.
7. Любешкина, Е. Упаковка с дополнительными функциями / Е. Любешкина // Пакет. – М.: Изд-во «Курсив». – 2000. – Вып.4 (5).
8. Heinze, T. Esterification of polysaccharides / T. Heinze, T. Liebert, A. Korschella. –Berlin: Springer-Verlag, 2006. 232 p.
9. Смоляр, В.И. Рациональное питание / В.И. Смоляр. Киев: Наукова думка, 1991.-368с.
10. Milas, M. Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan / M. Milas, M. Rinaudo // Carbohydr. Res. 1979. – N.76. – P.189.

11. Mironescu, M. Microbial polisaharides production, characterization and properties / M. Mironescu // *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 2003. –V. VII, N. 2 – P. 26-38.
12. Вудсайд, Е. Полисахариды микроорганизмов / Е. Вудсайд, Е. Квапинский // *Молекулярная биология*. М.: Мир, 1977. – С. 145-200.
13. Jansson, P.E., Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas Campestris* Текст. / Jansson P.E., Kenne L., Lindberg B. // *Carbohydr. Res.* – 1975. – 45.-N4.P.275-282.
14. Горощенко, Г. Российский рынок йогурта / Г. Горощенко // *Молочная промышленность*. 2003.-№10. –С. 5-7.
15. Губанова, Т.С. Йогурт: потребители и предпочтения / Т.С. Губанова // *Молочная промышленность*. 2001.-№10. – С. 8-9.
16. Липатов, Н.Н. Молочная промышленность в XXI веке / Н.Н. Липатов // *Пищевая и перерабатывающая промышленность*. 1987. -№10. – С.4.
17. Забодалова, П.А. Биотехнология комбинированных молочных продуктов с использованием компонентов сои: автореф. дис..доктора технических наук / П.А. Забодалова. Кемерово, 2000. – 36 с.
18. Шацкая, Н.Г. Технологические аспекты производства молочных продуктов с низкими аллергическими свойствами и гипоаллергенных продуктов / Н.Г. Шацкая, П.Ф. Крашенинин, Г.Ю., Сажин, В.И. // *Вопросы питания*. 1994 - №1/2.
19. Wassels, S. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation / S. Wessels, L. Axelsson, E.B. Hansen // *Trends in Food Science and Technology*. 2004. -№15.-P. 498-505.
20. Гвоздяк, Р.И. Микробный полисахарид ксантан / Р.И. Гвоздяк, М.С. Матышевская. Киев: Наукова думка, 1989. – 212 с.
21. Мартынов, А.В. Потенциал молочной продукции пониженной жирности / А.В. Мартынов // *Молочная промышленность*. 1999. -№8. – С. 1112.

22. Рогов, И.А. Современные технологии пищевых продуктов с полисахаридами: Обзорная информация / И.А. Рогов, Н.В. Нефедова. М.: АгроНИИТЭИПП, 1996. – 32 с.
23. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том I: Микрофлора человека и животных и ее функции. М.: ГРАНТЬ, 1998.-288 с.
24. Zeimer, C.J. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept perspectives and future strategies / C.J. Zeimer, G.R. Gibson // *Inter. Dairy J.* 1998. - №5/6. – P.437 -479.
25. Банникова, П.А. Использование мутантов с целью интенсификации производства кисломолочных продуктов / П.А. Банникова, И.Н. Пятницына // Цельномолочная промышленность: Экспресс-информация-М.:ЦНИИТЭИмясомолпром. 1975. - №8. – С. 1 – 4.
- 26.Sandine, W.E. Lactis acid bacteria-in food and health/ W.E. Sandine, K.S. Muralidhara, P.R. Elliker // *J. Milk food technol.* 1972. – Vol.35. - № 12. – P. 670-691.
27. Ruas-Madiedo, P. An overview of the functional of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria / P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz, P. Zoon // *International Dairy Journal.*2002. – Vol. 12. – P. 163-171.
28. Химия углеводов/ Н.К. Кочетков и др //М.: Химия. 1967. 672с
29. Гюнтер, Е.А. Культуры клеток растений как продуценты полисахаридов / Е.А. Гюнтер // Материалы Второго съезда Общества биотехнологов России, 13-15 октября 2004.-М.: МАКС Пресс, 2004. С. 61-62.
30. Garcia-Ochoa, F. Nutritional study of *Xanthomonas Campestris* in xanthan gum production by factorial design of experemements. Текст. / Garcia-Ochoa F, Santos VE, Fritsch AP. // *Enzyme Microbiol. Technol.* 1992. - 14. - P.991 – 996.
31. De Vuyst, L. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas Campestris* NRRL B-1459 Текст. / De Vuyst L, Van L. J, Vandamme E.J. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1987. - 39. - P.263 - 273.

32. Кочетков Н.К. Синтез полисахаридов / Н.К. Кочетков. – М.: Наука, 1994. – 219 с.
33. Химия углеводов/ Н.К. Кочетков и др //М.: Химия. 1967. 672с
34. Reeslev M., Jorgensen B. Exopolysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* grown in continuons cultivation with waring cemmonium glucose ratio in the growth medium // J. Biotechnol.- 1996.- №2.- P.131-135.
35. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А. Роль аминокислот в интенсификации биосинтеза экзополисахаридов *Bacillus Subtilis* в глубинных условиях роста // Микробиология.- 1995.- Т.64, №1.-С.44-50.
36. . Souw P. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas Campestris* NRR L B1459 / P. Souw, A. Demain // Appl . Environ. Microbiol.– 1979. – N 6. – P. 1186-1192.
37. Ананьева Е. П. Влияние условий биосинтеза на физико-химические свойства экзополисахаридов / Е. П. Ананьева, Ж. В. Быстрова, Г. А. Витовская // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – С. 417- 421.
38. Ai-Nong Ren, Ying Lu, Yi-Fang Zou. Separation, purification and preliminary structure analysis of acidic polysaccharides from safflower // Eur Food Res Technol (2013) 237, pp. 449–455
39. Kaur S., Kaler R.S.S. Quantitative estimation of polysaccharides in molasses using Near Infra Red spectroscopy// Sugar Tech., 10(3), pp. 265-268 (2008).
40. Monsoor M. A., Kalapathy U., Proctor A., Improved method for determination of pecticin degree of ecterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy// Journal Agricultural and Food Chemistry. (2001)
41. E. Tojo and J.Prado, Carbohydr. Res., 338, 1309-1312 (2003)
95. Gidley M.J., Bociek S. M., Molecular organization in starches: A ¹³C-CP/MAS NMR study// J. Am. Chem. Soc. 107, pp. 7040-7044 (1985)
42. И. Дехант и др. Инфракрасная спектроскопия полимеров. - М.: Химия 1976. - 471 с.

43. Крос А. Введение в практическую инфракрасную спектроскопию, М.: ИЛ, 1961. – 110 с.
44. Mathlouthiet and et. Chem. And Ind. (London), 330 (1957)
45. Dang F., Zhang L., Jabasini M., Baba Y. Characterization of electrophoretic behavior of sugar isomers by microchip electrophoresis coupled with videomicroscopy// Analytical Chemistry, 75(10), pp. 2433 (2003)
46. Крос А. Введение в практическую инфракрасную спектроскопию, М.: ИЛ, 1961. – 110 с., Л. Беллами Инфракрасные спектры сложных молекул /Под ред. А.Ю. Пентина. _М.: Изд-во иностр. лит-ры. –1963. – 590с.
48. Chang H. N. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in continuous fermentation / P. K. Lee, H. N. Chang, B. H. Kim // Biotechnol. –1989. –№ 8.– P. 573-578.
49. Нейшлос А.Л. Исследование спектральными методами в твердой фазе строения химически модифицированных микробных полисахаридов: Дисс. . канд. хим. наук. СПб, 2004. 227 с.
50. Milner Y., Avigad G. The Milner-Avigad method for the quantitative determination of endouronidase activities// Carbohydr. Res. 4, pp. 359-361 (1967)
51. Технический регламент «О безопасности средств индивидуальной защиты» №1213-ФЗ от 24.12.2009; Технический регламент «О требованиях пожарной безопасности» №123-ФЗ от 22 июля 2008 года
52. ГОСТ 120003-74 «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация»
53. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общесанитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
54. ГОСТ Р 22.0.01-94. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Основные положения [Текст]. - введ. 01.01.1995. - М.: Издательство стандартов, 1994. - 11 с.
55. ГОСТ 12.1.010-76. Взрывобезопасность. Общие требования [Текст].-введ. 01.01.1978.- М.: ИПК Издательство стандартов, 2003. - 7 с

