

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа содержит 88 страниц, 8 рис., 23 табл., 28 источников.

**Ключевые слова:** лимонная кислота, микробиологический синтез, продуцент *Aspergillus niger*, ультрафиолетовое облучение, микроволновое облучение.

**Объекты исследования:** культура гриба *Aspergillus niger*

**Цель работы** – получить лимонную кислоту микробиологическим синтезом с помощью продуцента *Aspergillus niger* при воздействии микроволнового и ультрафиолетового облучений.

В данной работе проведены исследования по влиянию питательной среды на биосинтез лимонной кислоты из сахарозы при культивировании гриба *Aspergillus niger* под действием ультрафиолетового и микроволнового облучения.

В результате был получен сверхпродуцента *Aspergillus niger* лимонной кислоты путём воздействия УФ и МВ облучения. Установлено, что выход лимонной кислоты при использовании сверхпродуцента в оптимальных условиях культивирования увеличился в 3 раза.

Степень внедрения: данная работа находится на стадии научного исследования.

Выпускная квалификационная работа выполнена на кафедре ФАХ.

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

Выполнил: студент группы 2Д2Г Новиков С.А

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**ЦТК** - цикл трикарбоновых кислот

**НАДН** - никотинамиддинуклеотид

**АТФ** - аденозинтрифосфат

**УФ** - ультрафиолет

**МВО** – микроволновое облучение

Содержание	
Введение.....	6
Глава 1 Обзор литературы.....	7
1.1 Основные сведения о лимонной кислоте.....	7
1.2 Продуценты для микробиологического синтеза лимонной кислоты.....	8
1.3 Биохимическая схема получения лимонной кислоты продуцентом <i>A.niger</i> .....	12
1.3.1 Технологическая схема.....	17
1.3.2 Технология выделения целевого продукта при микробиологическом синтезе.....	19
1.4 Высокопродуктивный штамм гриба <i>A.niger</i> при поверхностном и глубинном способах ферментации.....	20
1.5 Методы определения лимонной кислоты.....	26
Глава 2 Экспериментальная часть.....	28
2.1 Объекты и методы исследования .....	28
2.2 Приготовление питательной среды.....	29
2.2.1 Приготовление различных питательных сред (среда №1) .....	29
2.2.2 Приготовление питательной среды для образования лимонной кислот грибом <i>Aspergillus niger</i> .....	30
2.3 Методики проведения эксперимента.....	30
2.3.1 Микробиологический синтез лимонной кислоты для изучения влияния свойства питательной среды при культивировании гриба <i>Aspergillus niger</i> .....	31
2.3.2 Микробиологический синтез для подбора оптимальных условий синтеза лимонной кислоты с использованием в качестве продуцента <i>Aspergillus niger</i> .....	31
2.3.3 Микробиологический синтез для получения сверхпродуцента лимонной кислоты путем воздействия микроволнового (МВО) и	

ультрафиолетового облучения (УФ).....	32
Глава 3 Обсуждение результатов.....	33
3.1 Подбор состава питательной среды для роста гриба.....	33
3.2 Подбор оптимальных условий биохимического синтеза лимонной кислоты.....	34
3.3 Получение сверхпродуцента лимонной кислоты путем воздействия микроволнового и ультрафиолетового облучения.....	34
Глава 4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение.....	35
4.1. Анализ конкурентных технических решений.....	35
4.2. SWOT анализ.....	36
4.3. Планирование научно-исследовательских работ.....	40
4.3.1 Структура работ в рамках научного исследования.....	40
4.3.2 Определение возможных альтернатив проведения научных исследований .....	42
4.3.3. Определение трудоемкости выполнения работ .....	42
4.3.4. Разработка графика проведения научного исследования....	45
4.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ).....	48
4.4.1. Расчет материальных затрат НТИ .....	48
4.4.2. Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ.....	49
4.4.3. Основная заработная плата исполнителей темы.....	50
4.4.4. Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления) .....	52
4.4.5 Накладные расходы .....	54
4.4.6. Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта.....	54
4.5. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой,	

бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	55
Глава 5 Социальная ответственность.....	60
5.1 Производственная безопасность.....	61
5.2 Экологическая безопасность.....	70
5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	71
5.4 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности.....	73
Выводы	
Заключение	
Список литературы	

## Введение

В настоящее время во всем мире наблюдается интерес к биотехнологии, что приводит к разработке методов, позволяющих синтезировать ценные органические соединения. Классический химический синтез органических соединений имеет ряд недостатков: многостадийность, длительность термической обработки, высокие энергозатраты, дороговизна реагентов, поэтому необходимо разрабатывать альтернативные методы получения важных органических соединений, как в материальном плане, так и в экологическом. Наиболее перспективным является синтез с использованием микроорганизмов, который нашел широкое применение в области медицины, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. Путем микробиологического синтеза осуществляют получение антибиотиков, ферментов, витаминов, алкалоидов и т.п. Однако данные по применению микробиологического синтеза для получения органических соединений химической промышленности отсутствуют. Таким образом, целью нашей работы было получение лимонной кислоты микробиологическим синтезом продуцентом *Aspergillus niger* под влиянием микроволнового облучения и ультрафиолетовых лучей.

Для достижения поставленной цели был сформулирован следующий ряд задач:

1. Изучить влияние состава питательной среды на биосинтез лимонной кислоты при культивировании гриба *Aspergillus niger*.
2. Подобрать оптимальные условия для синтеза лимонной кислоты с использованием в качестве продуцента *Aspergillus niger*.
3. Получить сверхпродуцент лимонной кислоты путем воздействия микроволнового (МВО) и ультрафиолетового облучения (УФ).

### **Научная новизна**

Впервые исследовано влияние ультрафиолетового и микроволнового облучения культуры *Aspergillus niger* на выход лимонной кислоты.

### **Практическая значимость**

Лимонная кислота может найти широкое применение в пищевой, химической, фармацевтической промышленности и других областях.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Основные сведения о лимонной кислоте

Лимонная кислота (2-гидрокси-1,2,3-пропантрикарбоновая кислота, 3-гидрокси-3-карбокспентандиовая) ( $C_6H_8O_7$ ) — кристаллическое вещество белого цвета, температура плавления  $153\text{ }^{\circ}C$ , хорошо растворима в воде, этиловом спирте, малорастворима в диэтиловом эфире. Слабая трёхосновная кислота. Соли и эфиры лимонной кислоты называются цитратами. Структурная формула представлена на рис.1

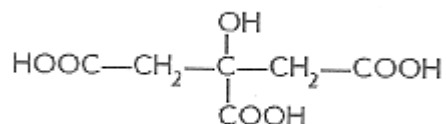


Рисунок 1. Структурная формула лимонной кислоты

Впервые лимонная кислота была выделена в 1783 году из сока лимонов аптекарем Карлом Шееле и до 30-х годов 20 века получалась из цитрусовых плодов. В 1934 году в Чехословакии, а в 1935 году в Советском Союзе впервые создано производство лимонной кислоты методом биохимического синтеза с участием плесневых грибов *Aspergillus niger* из сахара. В настоящее время для получения лимонной кислоты сырьём является меласса свекловичная.

Основным потребителем лимонной кислоты является пищевая промышленность. используется как вкусовая добавка, регулятор кислотности и консервант в пищевой промышленности (пищевые добавки E330—E333), для производства напитков, сухих шипучих напитков. В кондитерской промышленности для подкисления карамели, пастилы, вафель, так как она хорошо подчеркивает фруктовый вкус. Данную



органическую кислоту в целях подкисления добавляют в мороженое, пищевые концентраты, маргарин, некоторые сорта колбас и сыра. В алкогольные и прохладительные газированные и негазированные напитки лимонная кислота добавляется для придания им ощущения свежести. Кроме того, она является синергистом, т.е. веществом, усиливающим действие антиоксидантов, таких, например, как аскорбиновая кислота. В консервной промышленности лимонная кислота используется как консервант вместо уксуса, который признан канцерогеном и применение которого в пищевой промышленности ограничено в некоторых странах. В масложировой промышленности предохраняет сырье от разлагающего действия находящихся в них тяжелых металлов, за счет образования с ними комплексных соединений. Таким образом, снижается вероятность прогоркания жиров, маргаринов и животного масла.

В косметической промышленности лимонная кислота является частью многих косметических препаратов: эликсиров, кремов, шампуней, лосьонов, фиксаторов волос и т.д. В основном, используется, как регулятор pH.

При малом употреблении лимонная кислота стимулирует деятельность поджелудочной железы, способствует аппетиту и усвоению пищи.

## **1.2 Продуценты для микробиологического синтеза лимонной кислоты**

После первых публикаций о способностях микромицетов синтезировать органические кислоты, в том числе и лимонную, микробиологи стали тщательно изучать физиологию грибов и их биосинтетические способности. Многие проверки показали, что явно выраженный потенциал биосинтеза лимонной кислоты у целого ряда микромицетов, дрожжевых грибов и бактерий. В зависимости от химической природы окисляемого субстрата (свекловичная, тростниковая, цитрусовая или финиковая меласса, сок сахарного тростника, гидрол, гидролизаты крахмала, сахароза, багасса, глюкоза, парафины и много других субстратов) используют в качестве продуцентов лимонной кислоты в более или менее

широких масштабах микромицеты рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Botrytis*, дрожжевые грибы родов *Candida*, *Delaromyces* и *Torulopsis*, а также бактерии родов *Arthrobacterium*, *Pseudomonas* и *Micrococcus*.

Довольно хорошо исследованы представители аспергиллов, особенно *Aspergillus awamori*, *A.aureus*, *A.clavatus*, *A.glaucus*, *A.niger*.

Распространенным продуцентом лимонной кислоты считается микромицет *Aspergillus niger*, механизм биосинтеза и физиология которого хорошо изучены.

При биосинтезе лимонной кислоты в качестве основного сырья обычно используют мелассу — это отходы сахароперерабатывающей промышленности. В зависимости от исходного материала различают свекловичную, цитрусовую, тростниковую и другие виды сахаросодержащей мелассы. На международном рынке продается около 30—35 млн. т этого сырья в год. В России объем производства мелассы составляет 3 млн. т в год. В основном меласса используется для кормовых целей, но ее широко применяют и в микробиологической промышленности.

Свекловичная меласса характеризуется высоким содержанием Сахаров (46—55%), из которых преобладает сахароза. Она имеет сложный и непостоянный химический состав. Меласса содержит органические кислоты, коллоиды, витамины, белки и свободные аминокислоты, сложный спектр минеральных веществ. Из нелетучих органических кислот в мелассе могут присутствовать, %: лимонная — 0,01—0,5; глюконовая — 0,5—1,0; яблочная — 0,1—0,5; янтарная — 0,1—0,7.

Хорошо сбраживаемая меласса содержит не более 1% инвертного сахара и не более 1% СаО и 0,06,% сернистого газа (добавляемого в мелассу в качестве консервирующего агента) при общем содержании сухих веществ не менее 75% и Сахаров не менее 46,% при невысоком содержании живых микроорганизмов.

В золе свекловичной мелассы мало фосфора, но много магния, калия и железа.

Химический состав мелассы зависит от климатических и почвенных условий выращивания сахарной свеклы, применяемых минеральных удобрений, времени уборки урожая (поздние сроки уборки отрицательно влияют на качество мелассы), технологических нюансов переработки сахарной свеклы, условий транспортировки и хранения мелассы.

Производство мелассы связано с сезонными доставками сырья. В производстве лимонной кислоты наилучшие результаты дает зрелая, выдержанная меласса. Важное значение имеют длительность хранения мелассы и наличие герметически закрытых емкостей — мелассохранилищ с пневматическим перемешиванием (для предотвращения расслоения), насосами, устройствами для подачи и забора мелассы из разных горизонтальных хранилищ. В последнее десятилетие качество мелассы ухудшается под влиянием ряда дополнительных факторов, связанных с техническим прогрессом.

Широко применяемые в сельском хозяйстве ядохимикаты и минеральные удобрения могут оставлять определенные отрицательные следы в сельскохозяйственной продукции, в частности в мелассе, где обнаружены инсектициды, например фосфорорганический инсектицид малатилон (до 90 мг в 1 кг мелассы), оказывающий ингибирующее влияние на биосинтез лимонной кислоты.

В мелассе установлено присутствие некоторых фунгицидов (трилон, мертрилан и др.). Данные о влиянии фунгицидов на биосинтез лимонной кислоты неоднозначны. Некоторые авторы утверждают, что ряд фунгицидов подавляет активность ферментов изоцитрат- и сукцинатдегидрогеназы и тем самым способствует биосинтезу лимонной кислоты, во всяком случае у дикорастущих культур *Aspergillus niger*. По данным других авторов [12], фунгициды отрицательно влияют на ацидогенез.

Обнаружено угнетение синтеза белка в клетках *Aspergillus niger* под действием ртутьорганического фунгицида мертрилана. В результате его воздействия на ферменты ЦТК (в частности на малат-, изоцитрат- и

сукцинатдегидрогеназы) резко понижаются интенсивность дыхания клеток и активность терминальных оксидо-редуктаз, особенно цитохромоксидазы.

Фунгицид трилан (4,5,6-трихлорбензоксазолон) также отрицательно влияет на метаболизм микромицета *Aspergillus niger*, по механизму его воздействия другой.

Все исследованные фунгициды подавляют интенсивность дыхания, тормозят синтез белка, нарушают проницаемость цитоплазматических мембран.

В мелассе нередко обнаруживается присутствие детергентов. Их влияние на микроорганизмы изучено слабо. Установлено изменение проницаемости клеточной мембраны *Aspergillus niger* и как следствие — повышенная гидроксилазная активность культуры.

### **1.3 Биохимическая схема получения лимонной кислоты продуцентом *A.niger***

Биосинтез лимонной кислоты осуществляется с помощью культуры *A. niger*, специально селекционированной для получения высоких выходов продукта. В качестве углеродсодержащего субстрата используют мелассу, которая кроме углеводов, содержит большой ряд органических кислот. Применение определенной питательной среды с сахарозой приводит к меньшему качественному разнообразию кислот (лимонная, щавелевая и глюконовая кислота).

Биохимический механизм образования лимонной кислоты основан на функционировании цикла трикарбоновых кислот согласно рис.2.

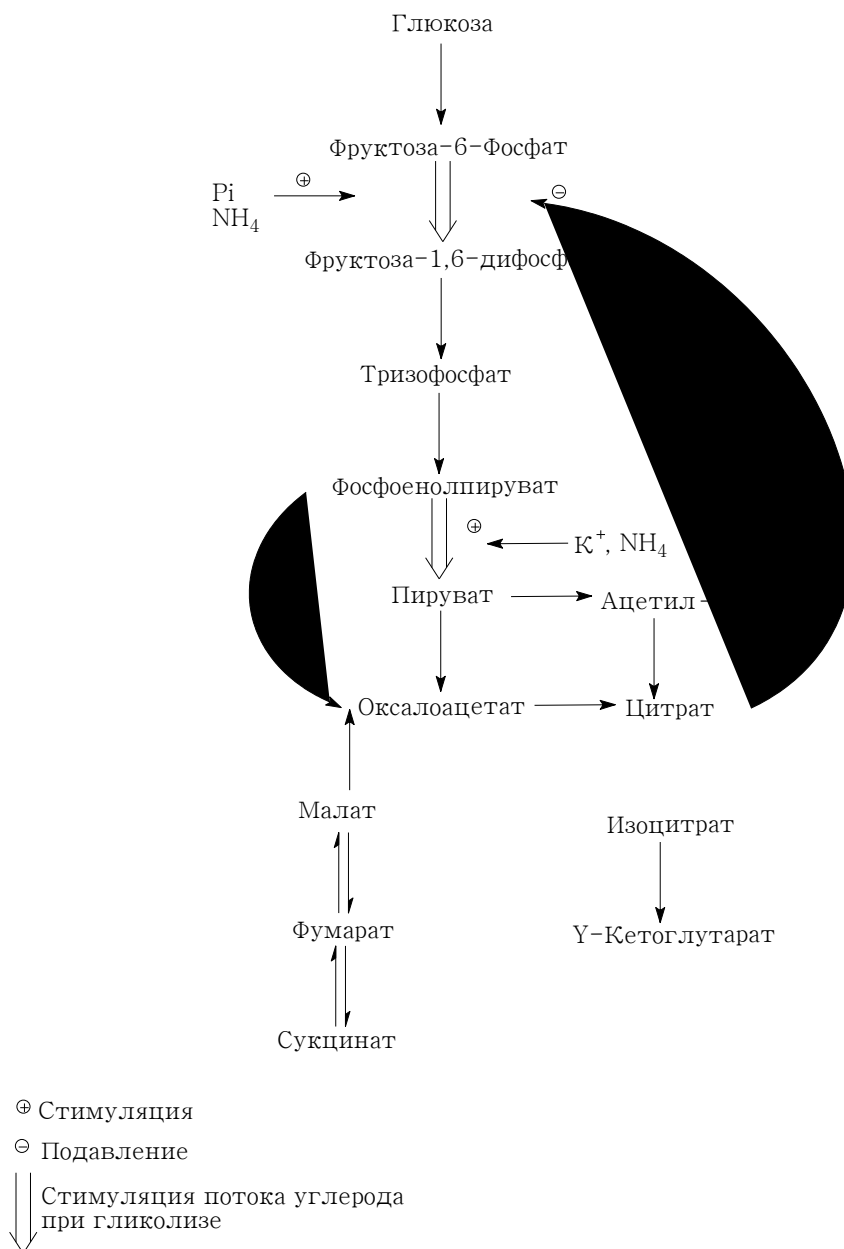


Рисунок 2. Биохимическая схема синтеза лимонной кислоты

Дегидрирование уксусной кислоты приводит к образованию двух молекул  $\text{CO}_2$  и четырех пар ионов водорода. В цикле происходит также образование НАДН и АТФ. Хотя большинство реакций цикла обратимы, основным направлением течения ферментативных реакций является образование щавелево-уксусной кислоты через  $\alpha$ -кетоглутаровую, янтарную и фумаровую кислоты.

Реакцией, лимитирующей скорость оборота цикла, является синтез лимонной кислоты, катализируемый аллостерическим ферментом цитратсинтетазой. Источником ацетил-КоА, который идет на синтез метаболитов цикла, является продукт цикла – лимонная кислота – легко переходящая в цитоплазму через мембрану. Как правило, из ЦТК на нужды биосинтеза уходит значительное количество метаболитов, и пополнения их фонда и функционирования полного цикла в клетках существуют дополнительные возмещающие ферментативные механизмы, например глиоксилатный шунт. В последнем, в отличие от ЦТК, уксусная кислота расходуется на синтез. Следовательно, первой реакцией ЦТК является конденсация ацетил-КоА со щавелево-уксусной кислотой, катализируемая цитратсинтетазой. Именно активность этого фермента является контролирующим параметром, определяющим скорость метаболического потока в цикле. Ингибирующий эффект на цитратсинтетазу оказывает НАДН и сукцинил-КоА. Но основное влияние на скорость синтеза лимонной кислоты оказывает поступление субстрата (щавелево-уксусной кислоты). Так как непрерывная «работа» ЦТК требует реокисления восстановленных эквивалентов (используются 4 пары дегидрогеназ), максимальная скорость цикла наблюдается в условиях достаточного доступа кислорода в клеточную систему (т.е. при хорошей аэрации).

Аэрация имеет критическое значение для глубинной ферментации. Пропускание чистого  $O_2$  увеличивает образование лимонной кислоты, но это дорого; газовая фаза может циркулировать, если при этом поглощается  $CO_2$ . Прерывание аэрации на короткое время может иметь губительное действие на продукцию лимонной кислоты, но если при этом повысить pH с 3,0 до 4,0, то ферментация может начаться снова.

У грибов различают трофофазу, которая характеризуется ростом мицелия и активным дыханием с выделением  $CO_2$ , и идиофазу (продукционную фазу), когда рост завершен, дыхание подавлено, а

оставшаяся глюкоза перерабатывается во вторичные метаболиты; в данном случае в лимонную или другие кислоты.

Образование лимонной кислоты может быть условно разделено на три процесса: 1 – разложение гексоз до пирувата и ацетил-КоА при гликолизе, 2 – анаэробное образование оксалоацетата из пирувата и  $\text{CO}_2$  и 3 – аккумуляция цитрата в ЦТК. *A. niger* разлагает глюкозу по гексозодифосфатному (80%) и гексозомонофосфатному пути.

При работе первого пути  $\text{CO}_2$ , образованная в результате декарбонирования пирувата, фиксируется при анаэробном образовании оксалоацетата. (При работе гексозомонофосфатного пути  $\text{CO}_2$  не фиксируется). Наряду с гликолизом у *A. niger* частично реализуется и другой путь окисления углеводов — пентозофосфатный, называемый также пентозным, гексозомонофосфатным, или фосфоглюконатным. Общим с гликолизом исходным продуктом является глюкозо-6-фосфат, но в дальнейшем их пути расходятся: фермент фосфофруктокиназа определяет дихотомический путь, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа — апотомический. Конечными продуктами процесса являются 3-фосфоглицериновый альдегид и рибозо-5-фосфат. Первый из них по реакциям гликолиза превращается в пировиноградную кислоту, поэтому пентозофосфатный цикл рассматривается как шунт гликолитического пути. Основное назначение цикла — снабжение клетки НАДН<sub>2</sub>, необходимой для восстановительных реакций синтеза липидов и стероидов, и пентозами, в основном рибозой, используемой в синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Гексозомонофосфатный путь и гликолиз имеют много общих ферментов. Таким образом, оба пути могут реализовываться в клетке одновременно. При превращении 6 молекул глюкозо-6-фосфата по гексозомонофосфатному пути суммарный эффект будет тот же, что и при окислении 1 молекулы гексозы в  $\text{CO}_2$  по пути гликолиза и ЦТК.

В процессе разложения глюкозы образуются промежуточные соединения: манит, арабит, эритрит, глицерин.

Образование лимонной кислоты тесно связано со скоростью фиксации  $\text{CO}_2$ . Фиксацию  $\text{CO}_2$  у *A. niger* осуществляет конститутивный фермент пируваткарбоксилаза. Существуют почти стехиометрическое отношение между фиксацией  $\text{CO}_2$  и продукцией цитрата.

Фермент аконитаза, участвующий в расщеплении цитрата в ЦТК, снижает его продукцию. Считали, что при дефиците Fe или при добавлении Cu происходит ингибирование аконитазы и соответственно увеличение выхода цитрата. Однако аконитаза катализирует реакцию, сильно сдвинутую в сторону образования цитрата, и необходимости в ее ингибировании нет. Другой фермент – НАДФН-зависимая изоцитратдегидрогеназа, которая теоретически должна способствовать снижению аккумуляции лимонной кислоты, ингибируется цитратом. Правда, у *A. niger* имеется еще один аллостерически НАД-связанный фермент – изоцитратдегидрогеназа, которая активируется цитратом.

Выход лимонной кислоты зависит от активности  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы. Образование сукцинил-КоА из  $\alpha$ -кетоглутарата под действием  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы называют узким местом ЦТК. Фермент ингибируется физиологической концентрацией щавелево-уксусной кислоты и НАДН. Увеличение клеточного оксалоацетата снижает катаболизм цитрата на уровне  $\alpha$ -кетоглутарата и одновременно усиливает скорость его синтеза при участии цитратсинтазы. Аккумуляция  $\alpha$ -кетоглутарата и НАДН снижает активность НАД(НАДФ)-изоцитратдегидрогеназы, что способствует увеличению накопления цитрата до уровня, при котором сам ингибирует вышеуказанный фермент. Цитрат сильно ингибирует транспорт глюкозы в клетке путем подавления активности фосфофруктокиназы. Последнему противодействует увеличение концентрации  $\text{NH}_4^+$ , а накоплению  $\text{NH}_4^+$  способствует дефицит Mn в среде. Полагают, что при дефиците Mn усиливается разложение белков и внутриклеточное содержание  $\text{NH}_4^+$  возрастает. Повышение концентрации аммонийных ионов внутри клеток смягчает ингибирующее влияние цитрата на фосфофруктокиназу.



Большинство исследователей склоняется к мнению, что основную роль играет ингибирование ферментов — аконитатгидратазы и изоцитратдегидрогеназы. Ингибирование аконитатгидратазы объясняют действием самой лимонной кислоты или избытка гексацианоферроата калия, применяемого для обработки мелассных сред перед ферментацией.

При интенсивном кислотообразовании активность цитратсинтетазы возрастает приблизительно в десять раз. Однако по имеющимся данным еще нельзя решить вопрос, что является причиной накопления лимонной кислоты — ингибирование указанных двух ферментов или активирование цитратсинтетазы.

Известно, что ко вторым суткам ферментации в среде, уже покрытой тонкой мицелиальной пленкой, в ощутимых количествах содержатся янтарная и яблочная кислоты, а также не относящиеся к ЦТК кислоты: глюконовая, сахарная и малоновая. Первые две кислоты образуются непосредственным окислением глюкозы, малоновая как промежуточный продукт на пути синтеза насыщенных жирных кислот. Содержание этих кислот возрастает до третьих—пятых суток ферментации. Таким образом, ингибирование аконитатгидратазы и изоцитратдегидрогеназы начинают вызывать перечисленные выше кислоты, что вызывает постепенное накопление лимонной кислоты, которая в свою очередь еще больше ингибирует данные ферменты, и усиливает их синтез.

Следует обратить внимание еще на одного возможного участника в этом механизме — малоновую кислоту, являющуюся специфическим ингибитором сукцинатдегидрогеназы. Малоновая кислота образуется больше других кислот и содержание ее в среде возрастает до четвертых-пятых суток — времени начала наиболее интенсивного продуцирования лимонной кислоты.

В период интенсивного накопления лимонной кислоты в ЦТК преобладает анаэробный путь метаболизма, т.е. сначала происходит карбоксилирование пировиноградной кислоты с образованием щавелево-

уксусной, а затем конденсация ее с ацетил-КоА. Интенсивность образования лимонной кислоты в этот период может быть понятна также из того, что в данном случае резко ограничиваются возможности конструктивного и энергетического обмена веществ клетки и *A.niger* для поддержания жизнеспособности вынужден перерабатывать значительно большее количество субстрата.

Фактором, стимулирующим аккумуляцию лимонной кислоты, служит аэрация.  $O_2$  необходим и для реокисления гликолитического НАДН в процессе лимоннокислой ферментации.

### **1.3.1 Технологическая схема**

Процесс производства лимонной кислоты включает все основные стадии микробиологической технологии (рис. 3):

В промышленном производстве лимонной кислоты применяется несколько вариантов процесса.

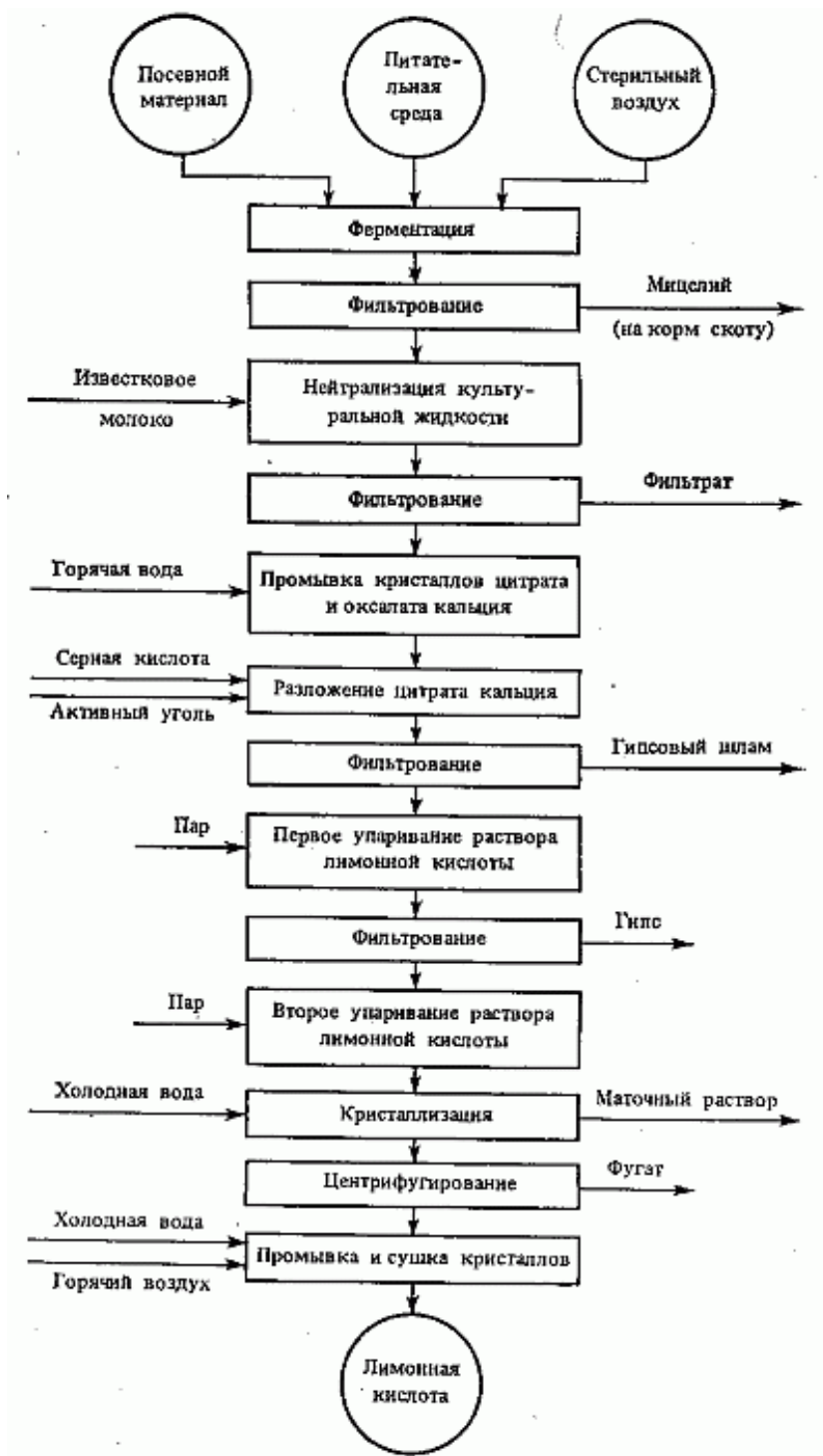


Рисунок 3. Технологическая схема производства лимонной кислоты:

- получение посевного материала;
- подготовка сырья-мелассы к ферментации;
- подготовка и стерилизация воздуха;
- ферментация;
- отделение биомассы продуцента — мицелия;

- выделение из культурной жидкости лимонной кислоты и получение ее в кристаллическом виде.

### **1.3.2 Технология выделения целевого продукта при микробиологическом синтезе.**

Лимонную кислоту выделяют из культуральной жидкости в виде плохо растворимой соли (Рис.3) – цитрата кальция, которая образуется при добавлении мела. Перевод лимонной кислоты в свободное состояние достигается при добавлении строго определенного количества серной кислоты:



Гипс удаляют фильтрованием. Раствор лимонной кислоты осветляют активным углем, упаривают, сливают в кристаллизаторы, в которых постепенно снижают температуру. Выделившиеся кристаллы центрифугируют, промывают водой, сушат, фасуют.

## **1.4 Высокопродуктивный штамм гриба *A.niger* при поверхностном и глубинном способах ферментации**

### *Поверхностный способ ферментации*

Приготовление питательной среды при поверхностном способе культивирования осуществляют в варочном котле. Мелассу разбавляют кипящей водой в соотношении 1:1 и, добавляя серную кислоту, доводят рН раствора до значения 6,7 – 7,2. Для осаждения солей железа и тяжелых металлов вводят при кипячении определенное количество раствора желтой кровяной соли. В раствор мелассы при температуре 60 – 70 С последовательно добавляют источники азота, фосфора, макро- и микроэлементов. Содержание сахаров в среде должно составлять 12 – 16%.

Основная ферментация осуществляется в специальных камерах, представляющих собой закрытые помещения, в которых на стеллажах расположены кюветы. Кюветы прямоугольной формы изготавливают из алюминия или нержавеющей стали. Заполнение кювет питательной средой и слив из них культуральной жидкости осуществляется через штуцеры в дне кювет. Камеры оборудованы системой для подачи нагретого стерильного воздуха.

Перед началом нового цикла ферментации камеры и кюветы тщательно моют и стерилизуют параформалиновой смесью с последующей дегазацией пароаммиачной смесью. После стерилизации и охлаждения камер в кюветы наливают питательную среду слоем от 12 до 18 см. с помощью специального устройства для распыления в питательную среду вносят посевной материал – конидии гриба *A.niger*.

Через сутки после засева образуется тонкая серовато-белая пленка мицелия, которая по истечении трех суток сильно утолщается и приобретает складчатую структуру. Температуру в период активного роста мицелия гриба поддерживают в пределах 34 – 36 С при умеренной аэрации. В период

активного кислотообразования температуру снижают до 32 – 34 С, а подачу воздуха увеличивают в 3 – 4 раза. По мере снижения интенсивности кислотообразования и уменьшения количества выделяемой теплоты подачу воздуха в камеру постепенно уменьшают. Процесс ферментации прекращают, когда в растворе остается 1 – 2% сахаров, а содержание кислот в культуральной жидкости достигает 12 – 20%.

Культуральную жидкость сливают из кювет в сборник, откуда ее подают в химический цех для выделения лимонной кислоты. Содержание лимонной кислоты в культуральной жидкости составляет 12 – 20%.

Мицелий отмывают от кислоты горячей водой и используют как корм для скота.

Способ называется бесменным. По сменному способу после сливания культуральной жидкости под пленку *A.niger* вводят немного воды температурой 30 – 32 °С, выдерживают 0,5 часов, промывную жидкость сливают, вводят свежую мелассную среду и ферментируют. По доливному способу ферментации на 4-5 сутки под пленку *A.niger* доливают свежую питательную среду в количестве, компенсирующем уменьшения объема вследствие испарения влаги. При работе этими способами экономится расход конидий, реже перезаряжаются камеры и появляется возможность ферментировать низкокачественные мелассы, не пригодные для выращивания грибной пленки.

Периодические способы имеют ряд недостатков: ферментация происходит с небольшой скоростью; мицелий по окончании цикла выбрасывают, хотя он еще активен, а получение нового мицелия связано с затратой конидий, мелассы и времени на его выращивание; во всех кюветах трудно поддерживать заданную температуру, поэтому ферментация происходит неравномерно.

Предложенные непрерывные способы предусматривают протекание мелассной среды по каскаду кювет под предварительно выращенной пленкой

мицелия *A.niger* или под секциями его, движущимися на транспортере в одном направлении со средой в плоском ферментаторе туннельного типа.

Наряду с поверхностным способом ферментации на жидких средах за рубежом известны способы ферментации на твердых средах. Твердофазная ферментация предусматривает использование импрегнированного средой пористого твердого материала, как багасса, картофель, пульпа сахарной свеклы др. в определенных пропорциях. Материал стерилизуют и инокулируют суспензией спор. Инкубируют в лотках при 25 – 30 °С в течение 6 – 7 дней. После инкубирования содержимое экстрагируют водой, концентрируют, цитрат осаждают и очищают.

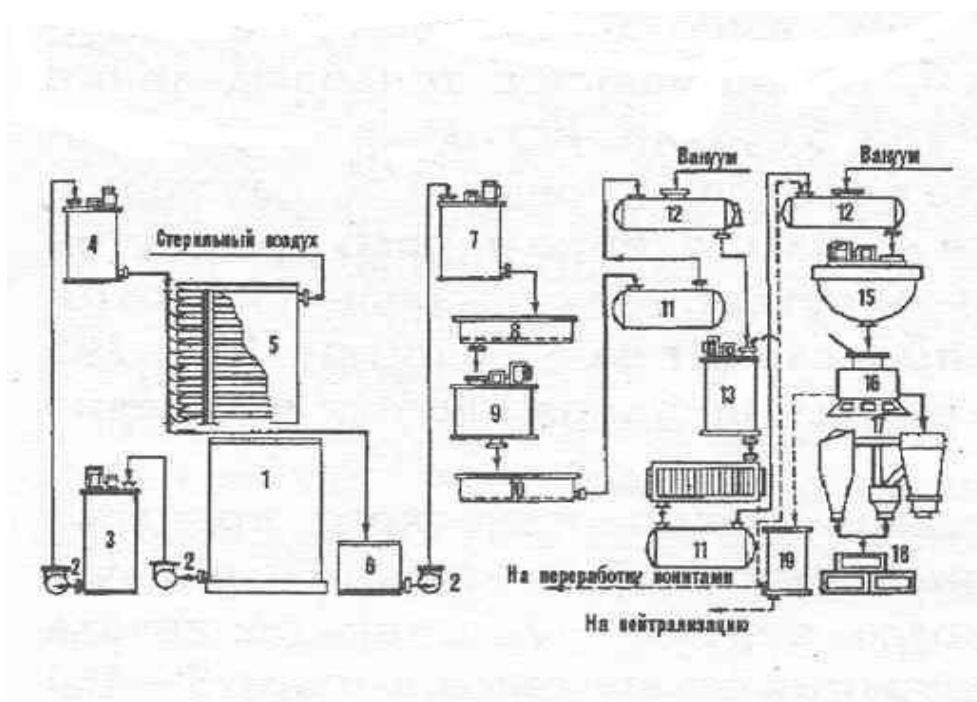


Рисунок 4. Технологическая схема получения лимонной кислоты из мелассы поверхностным способом (жидкофазная ферментация)

1 - цистерна для мелассы, 2 - центробежные насосы, 3 - реактор для разбавления мелассы, 4 - стерилизатор, 5 - бродильная камера, 6 - сборник сбраживаемых растворов, 7 - нейтрализатор, 8, 10 - нутч-фильтры, 9 - расщепитель, 11 - сборник-монтежу, 12 - вакуум-аппарат, 13-дисольвер, 14 -

фильтр-пресс, 15 - кристаллизатор, 16 - приемник, 17 - сушилка, 18 - готовая продукция, 19 - сборник фильтрата.

### *Глубинный способ ферментации*

На современных заводах принято глубинное культивирование гриба, характеризующее более высокой продуктивностью, чем первый процесс. При этом инокулированная среда наливается хорошо аэрируемые ферментеры с перемешиванием и контролем аэрации. Глубинная ферментация возможна в разных вариантах: периодическом с подпиткой и непрерывном.

Процесс получения лимонной кислоты при глубинном культивировании гриба *A.niger* проводят в ферментаторах объемом 100 м<sup>3</sup>. В качестве посевного материала используют подросший мицелий, полученный в посевных аппаратах объемом 10 м<sup>3</sup>.

Раствор мелассы и для посевного, и для производственного ферментаторов готовят также, как и при поверхностном культивировании, только исходный раствор мелассы для глубиной ферментации должен содержать не более 4% сахаров. По ходу ферментации, когда концентрация сахара резко снижается, проводят дробное добавление стерильного мелассного раствора, содержащего 25 – 28% сахаров. Добавляют этот раствор в таком количестве, чтобы концентрация сахаров в ферментаторе составляла 12 – 15%.

В посевной аппарат, заполненный питательной средой, засевают суспензию конидий, которую предварительно выдерживают 5 – 6 часов в термостате при 32 С. Культуру выращивают при 34 – 35 С при постоянном перемешивании и аэрации. В процессе культивирования строго контролируют режим подачи воздуха в ферментатор, расход которого увеличивают к концу ферментации почти в 10 раз. О<sub>2</sub> должен находиться как минимум в концентрации 20 – 25% от насыщения. В период интенсивного



вспенивания среды небольшими порциями вводят химический пеногаситель (олеиновую кислоту). Процесс подращивания мицелия заканчивают через 30—36 ч, когда содержание кислот в культуральной жидкости достигает 1—2%. Подросший мицелий передают для засева питательной среды в производственный ферментатор.

Процесс кислотообразования в ферментаторе продолжается 5—7 сут при непрерывной аэрации и температуре 31—32 °С. Расход воздуха постепенно увеличивают с 400 м<sup>3</sup>/ч в начале процесса до 2200 м<sup>3</sup>/ч к концу ферментации. Дробную добавку подливного раствора проводят 2—3 раза, поддерживая концентрацию Сахаров, в растворе в пределах 12—15%. Конец процесса определяют по общей кислотности и концентрации сахаров.

После окончания процесса ферментации культуральную жидкость нагревают острым паром до 60—65 °С и сливают в сборник, а оттуда подают на вакуум-фильтр для отделения и промывки биомассы мицелия. Промытый мицелий используется как корм для скота. Основной раствор лимонной кислоты вместе с промывными водами передается в химический цех для выделения лимонной кислоты.

Отъемно-долевой способ ферментации заключается в том, что при активно протекающем процессе продолжают подливать мелассную среду с соответствующими предварительными отъемами жидкости. В начале ферментацию ведут по режиму, обычно для периодического способа, затем в 3 – 4 приема или непрерывно подливают дополнительное количество среды. Подлив прекращают за 36 часов до конца процесса ферментации, продолжающийся 12 суток. Суммарное количество сахара за цикл составляет около 30% в пересчете на исходный объем (при начальной 3%-ной концентрации). В период дополнительных подливов поддерживают 1,2 – 1,5%-ную концентрацию сахара. Перед каждым подливом добавляют столько воды, сколько ее увлечено отработавшим сжатым воздухом, и небольшого количества азота.

При ферментации отъемно-долевым способом увеличивается среднесуточный сьем лимонной кислоты с 1 м<sup>3</sup> ферментатора за счет уменьшения частоты его зарядок при том же выходе кислоты по массе сахара.

В процессе непрерывной ферментации *A.niger* изменяет морфологию и проявляет большую кислотообразующую способность, чем в периодическом. Недостатком непрерывной ферментации в одном аппарате является прокок неферментированного сахара и невозможность осуществления профилактической стерилизации без прерывания процесса. Проведение ферментации в нескольких последовательно соединенных аппаратах не имеет этих недостатков и более перспективно, о чем свидетельствует опыт непрерывного спиртового брожения.

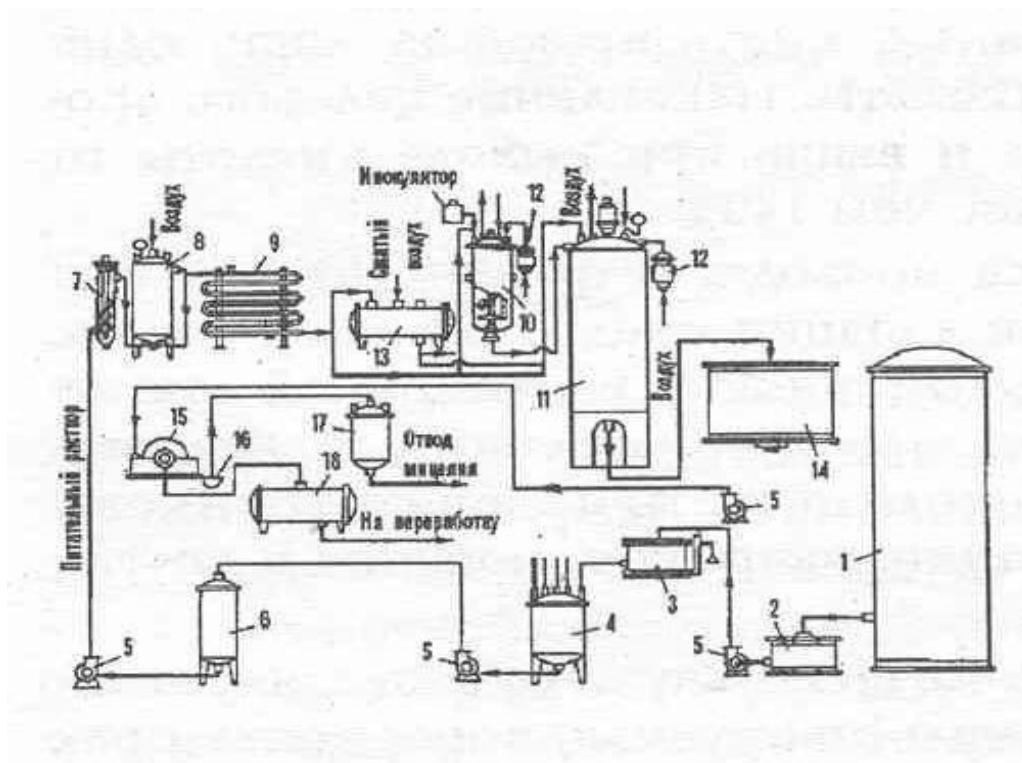


Рисунок 5. Технологическая схема получения лимонной кислоты при глубинной ферментации продуцента

## 1.5 Методы определения лимонной кислоты

Лимонная кислота широко используется в пищевой, косметической, медицинской и других видах промышленности. В зависимости от области использования применения лимонной кислоты существует разработанная нормативная документация.

1. Для идентификации лимонной кислоты согласно госту ГОСТ 908-2004

Сначала определяют наличие ионов водорода:

Взвешивают 1 г испытуемой пробы (результат записывают до первого десятичного знака) и растворяют в 100 см воды. К 10 см раствора добавляют две-три капли раствора лакмуса.

Изменение цвета раствора из бесцветного в красный свидетельствует о наличии ионов водорода (кислая среда).

Далее определяют присутствие цитратов иона:

К 5 см раствора (приготовленного по тесту ионов водорода) добавляют 0,5 см уксусного

ангидрида и нагревают. Появление через  $(30 \pm 10)$  мин красного окрашивания свидетельствует о присутствии в растворе цитрат-ионов.

2. Общие методы определения структуры и идентификация.

Лимонную кислоту можно идентифицировать с использованием методов ИК-спектromетрии, УФ-спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и температуры плавления.

## **Глава 2 Экспериментальная часть**

В данной главе представлена информация об объекте исследования, пробоподготовке, методах и методике 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.

### **2.1. Объекты и методы исследования**

В качестве объектов исследования была выбрана культура рода *Aspergillus niger*.

Штамм *Aspergillus niger* F-718 получен из лаборатории ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск). Для исследования данный штамм хранили на скошенном агаре при температуре хранения 4-8 °С.

Перед началом биосинтеза исследуемые культуры выдерживали при

комнатной температуре 22 °С. 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.

Культивирование микроскопических грибов *Aspergillus niger*, которые сбраживают сахара питательной среды, образуя лимонную кислоту. В качестве углеродсодержащего компонента питательной среды используют сахарозу. Кроме того, в состав питательной среды входят нитрат аммония, моно- или дифосфат калия, сульфат магния, цинка, железа.

### **2.2.1 Приготовление различной питательной среды (Среда №1)**

Готовят различные питательные среды для культивирования гриба *Aspergillus niger*.

Вариант 1- полная питательная среда без микроэлементов, %:  
сахароза-10,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -0,34;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -0,2;  $\text{MgSO}_4$ -0,05;  $\text{FeSO}_4$ - 0,01.

Вариант 2-среда без углерода: исключена сахароза.

Вариант 3- среда без азота: исключен  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Вариант 4- среда без фосфора:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  заменен эквивалентным количеством  $\text{KCl}$ .

Вариант 5- среда без калия:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  заменен эквивалентным количеством  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Вариант 6- среда без серы:  $\text{MgSO}_4$  и  $\text{FeCl}_3$  заменены эквивалентными количествами  $\text{MgCl}_2$   $\text{FeCl}_3$

Вариант 7- среда без магния:  $\text{MgSO}_4$  заменены эквивалентным количеством  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Вариант 8: среда без железа:  $\text{FeSO}_4$  заменен эквивалентным количеством  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Вариант 9: полная питательная среда с добавлением цинка:  $\text{ZnSO}_4$ -0,01%.

Вариант 10- полная питательная среда с добавлением цинка:  $\text{ZnSO}_4$ -0,01%.

Вариант 11- полная питательная среда с добавлением бора:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -0,01%.

В колбы вносят дистиллированной воды до метки 30 мл. Закрывают ватно-марлевыми пробками и пергаментной бумагой.

### **2.2.2 Приготовление питательной среды для образования лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* (Среда №2)**

Готовят 200 мл полной питательной среды без микроэлементов %:  
сахароза — 10,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,2;  $\text{MgSO}_4$  — 0,05;  $\text{FeSO}_4$  — 0,01.

Питательную среду разливают по 50 мл в четыре конические колбочки, каждая емкостью 150 мл. Закрывают ватно-марлевыми пробками и пергаментной бумагой.

### **2.3 Методики проведения эксперимента**

Культуры исследуемых бактерий перед посевом на жидкую питательную среду для биосинтеза лимонной кислоты предварительно доставали из комнаты хранения (4-8 °С). Культуры выдерживали при комнатной температуре 22 °С в течение 2 часов. Подготовленные таким образом культуры, переносили в асептических условиях со скошенного агара с помощью микробиологической петли в колбу с жидкой питательной

средой. Образец культуры предварительно разбавляли стерильной дистиллированной водой, доводили до концентрации  $10^5$  по стандарту мутности и вносили суспензию в количестве  $1 \text{ см}^3$  на жидкую питательную среду.

## Глава 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

### 4.1. Анализ конкурентных технических решений

При ведении собственного производства необходим систематический анализ конкурирующих разработок во избежание потери занимаемой ниши рынка. Периодический анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности позволяет оценить эффективность научной разработки по сравнению с конкурирующими предприятиями. Из наиболее влияющих предприятий-конкурентов в области производства лимонной кислоты можно отнести: «Белгородский завод», «Смелянский сахарный завод».

В табл. 4 приведена оценочная карта, включающая конкурентные технические разработки в области производства лимонной кислоты.

Таблица 4– Оценочная карта для сравнения конкурентных технических разработок

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б <sub>ф</sub>	Б <sub>к1</sub>	Б <sub>к2</sub>	К <sub>ф</sub>	К <sub>к1</sub>	К <sub>к2</sub>
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Технические критерии обогащаемого материала</b>							
1. Выход продукта	0,3	3	5	5	1,2	1,5	1,2
2. Энергоемкость процессов	0,3	4	3	3	1,5	0,9	0,9
<b>Экономические критерии оценки эффективности</b>							



3. Цена	0,2	5	3	4	1,0	0,8	0,9
4. Конкурентоспособность продукта	0,1	3	5	4	0,4	0,5	0,5
5. Финансирование научной разработки	0,1	3	5	5	0,3	0,5	0,5
<b>Итого:</b>	<b>1</b>				<b>4,4</b>	<b>4,2</b>	<b>3,7</b>

Б<sub>ф</sub> – продукт проведенной исследовательской работы;

Б<sub>к1</sub> – Белгородский завод

Б<sub>к2</sub> – Смелянский сахарный завод.

#### 4.2.SWOT-анализ

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

Он проводится в несколько этапов.

Первый этап заключается в описании сильных и слабых сторон проекта, в выявлении возможностей и угроз для реализации проекта, которые проявились или могут появиться в его внешней среде.

Таблица 5 - Матрица SWOT

	<b>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</b>	<b>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</b>
--	---	--

	<p>C1. Заявленная экономичность технологии.</p> <p>C2. Экологичность технологии.</p> <p>C3. Более низкая стоимость исследований по сравнению с другими.</p> <p>C4. Наличие бюджетного финансирования.</p> <p>C5. Удобство эксплуатации.</p>	<p>Сл1. Отсутствие у потенциальных потребителей квалифицированных кадров по работе с научной разработкой</p> <p>Сл2. Большой срок поставок материалов и комплектующих, используемые при проведении научного исследования</p> <p>Сл3. Низкий уровень проникновения на рынок</p>
<p><b>Возможности:</b></p> <p>V1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ</p> <p>V2. Появление дополнительного спроса на новый продукт</p> <p>V3. Повышение стоимости конкурентных</p>	<p>Инфраструктура ТПУ позволяет проводить исследования в новых лабораториях, обеспечивая финансирование. Появление дополнительного спроса, использование разработки в промышленных масштабах и повышение стоимости конкурентных разработок влияет на все сильные стороны..</p>	<p>Инфраструктура ТПУ обеспечивает исследования квалифицированными кадрами, позволяет снизить срок поставок, продолжительность стадий и повысить уровень проникновения на рынок.</p>

разработок		
<p><b>Угрозы:</b></p> <p>У1. Развитая конкуренция технологий производства</p> <p>У2. Ограничения на экспорт технологии</p> <p>У3. Введения дополнительных государственных требований сертификации продукции</p> <p>У4. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства</p>	<p>Развитая конкуренция может не дать продукту удержаться на рынке. Ограничение на экспорт может способствовать уменьшению бюджетному финансированию. Введение дополнительных требований к сертификации продукта и несвоевременное финансовое обеспечение влияет на экономичность продукта.</p>	<p>Развитая конкуренция и ограничения на экспорт приведут к низкому уровню проникновения на рынок. Введение дополнительных требований к сертификации и отсутствие квалифицированных кадров усложняет вывод продукции на рынок.</p>

Таблица 6- Интерактивная матрица проекта

Сильные стороны проекта						
Возможност и проекта		C1	C2	C3	C4	C5
	B1	+	+	+	+	+
	B2	+	+	+	+	+
	B3	-	+	+	0	-
	B4	0	-	+	-	-

Таблица 7 - Интерактивная матрица проекта

Возможности проекта		Сл1	Сл2	Сл3
	B1	+	-	-
	B2	+	+	-
	B3	+	+	+
	B4	+	+	-

Таблица 8- Интерактивная матрица проекта

Угрозы проекта		C1	C2	C3	C4	C5
	У1	-	-	-	+	+
	У2	+	0	+	+	+

	У3	-	-	-	+	-
	У4	+	-	+	+	+

Таблица 9 - Интерактивная матрица проекта

Угрозы проекта		Сл1	Сл2	Сл3
	У1	-	-	+
	У2	-	+	+
	У3	-	-	+
	У4	+	0	+

### 4.3. Планирование научно-исследовательских работ

#### 4.3.1 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. 10)

Таблица 10– Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ра б	Содержание работ	Должность исполнителя
----------------	----------	------------------	--------------------------

1	2	3	4
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Научный руководитель, консультант ЭЧ, СО, бакалавр
Выбор направления исследований	2	Выбор направления исследований	Руководитель, бакалавр
	3	Подбор и изучение материалов по теме	Руководитель, бакалавр,
	4	Патентный обзор литературы	Бакалавр
	5	Календарное планирование работ по теме	Руководитель, бакалавр
Теоретические и экспериментальные исследования	6	Проведение теоретических расчетов	Бакалавр
	7	Проведение экспериментов	Бакалавр
	8	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	Руководитель, бакалавр
Проведение ВКР			
Разработка технической документации и проектирование	7	Оценка эффективности производства и применения разработки	Бакалавр, консультант по ЭЧ
	8	Разработка социальной ответственности по теме	Бакалавр, консультант СО

Оформление комплекта документации по ВКР	9	Составление пояснительной записки	Бакалавр
--	---	-----------------------------------	----------

#### 4.3.2 Определение возможных альтернатив проведения

#### научных исследований

Таблица 11

*Морфологическая матрица для методов получения лимонной кислоты*

	1	2	3
А. штамм гриба	F-817	F-501	F-696
Б. поставщик мелассы	Россия	Китай	Казахстан

#### 4.3.3. 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  $t_{ожі}$  используется формула (4):

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

где  $t_{ож i}$  – 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. 24

Таблица 12 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Название работ	Трудоемкость работ									Исполнители	Т <sub>р</sub> , раб. дн.			Т <sub>р</sub> , кал. дн.		
		t <sub>min</sub> , чел-дн.			t <sub>max</sub> , чел-дн.			t <sub>ож</sub> , чел-дн.				Исп.	Исп.	Исп.	Исп.	Исп.	Исп.
		Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3							
1	Составление технического задания	0	0	0	1	1	1	0	0	0	Р	0,	0,	0,	0,	0,	0,
		,2	,2	,2				,5	,5	,5		1	1	1	1	1	1
		0	0	0	1	1	1	0	0	0		Б	0,	0,	0,	0,	0,
,2	,2	,2				,5	,5	,5	1	1	1		1	1	1		
0	0	0	1	1	1	0	0	0	К <sup>1</sup>	0,	0,		0,	0,	0,	0,	
,2	,2	,2				,5	,5	,5		1	1	1	1	1	1		



		0,2	0,2	0,2	1	1	1	0,5	0,5	0,5	K <sup>2</sup>	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	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
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
10 13	Определение целесообразности проведения ВКР Разработка СО	5	5	5	10	10	10	7	7	7	K <sup>1</sup>	3,5	3,5	3,5	4,2	4,2	4,2
		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
16	Составление пояснительной записки	13	13	13	16	16	16	14,2	14,2	14,2	Б	14	14	14	17	17	17

#### 4.3.4. Разработка графика проведения научного исследования

Для иллюстрации календарного плана проекта приведена диаграмма Ганта, на которой работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. Для удобства отображения каждый месяц разделен на декады (таблица 13)



Продолжение -Таблица 13

Вид работы	Исполнители	$T_{ki}$ , дней	Продолжительность выполнения работ												
			февраль		март			апрель			май				
			2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
Проведение экспериментов	Руководитель, бакалавр	3,5													
Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	Руководитель, бакалавр	1,4 2,3													
Оценка эффективности производства и применения разработки	Бакалавр, консультант ЭЧ	4,2													
Разработка социальной ответственности	Бакалавр, консультант СО	4,9													
Составление пояснительной записки	Бакалавр	21													

Руководитель	Бакалавр	Консультант ЭЧ	Консультант СО

## 4.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

### 4.4.1. Расчет материальных затрат НТИ

При планировании бюджета научного исследования должно быть обеспечено полное и достоверное отражение всех видов планируемых расходов, необходимых для его выполнения. Многие из материалов уже находились в лаборатории, поэтому в статьях отражены малые расходы. Расчет стоимости материальных затрат производится по действующим прейскурантам или договорным ценам. Результаты расчета приведены в таблице 26.

Расчет материальных затрат осуществляется по следующей формуле:

$$Z_m = (1 + k_T) \cdot \sum_{i=1}^m C_i \cdot N_{расхи} ,$$

где  $m$  – количество видов материальных ресурсов, потребляемых при выполнении научного исследования;

$N_{расхи}$  – количество материальных ресурсов  $i$ -го вида, планируемых к использованию при выполнении научного исследования (шт., кг, м, м<sup>2</sup> и т.д.);

$C_i$  – цена приобретения единицы  $i$ -го вида потребляемых материальных ресурсов (руб./шт., руб./кг, руб./м, руб./м<sup>2</sup> и т.д.);

$k_T$  – коэффициент, учитывающий транспортно-заготовительные расходы.

Таблица 14– Материальные затраты

Наименование	Единица измерения	Количество			Цена за гр руб.			Затраты на материалы, (Z <sub>м</sub> ), руб.		
		Исп .1	Исп .2	Исп .3	Исп .1	Исп .2	Исп .3	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3

гриб Aspergill usniger	гр	2	2	2	600	650	600	1200	1300	1200
сахароза	гр	150	150	150	5	8	6	750	1200	900
Итого								<b>1950</b>	<b>2500</b>	<b>2100</b>

#### 4.4.2. Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ

Все расчеты по приобретению спецоборудования и оборудования, имеющегося в организации, но используемого для каждого исполнения конкретной темы, сводятся в табл. 15.

Таблица 15- Расчет бюджета затрат на приобретение спецоборудования для научных работ

№ п/ п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудовани я	Цена единицы оборудовани я, руб.	Сумма амортизацион ных отчислений,,руб.
1.	колба	14	200	40
2.	Перемешивающее устройство ПЭ-6410	1	22000	1100
3.	Сухожаровой шкаф	1	80000	4000
4.	Автоклав	1	40000	2667
<b>Итого</b>				<b>7811</b>

#### 4.4.3. Основная заработная плата исполнителей темы

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ, (включая премии и доплаты) и дополнительную заработную плату. Также включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы в размере 20 – 30 % от тарифа или оклада:

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп} , \quad (13)$$

где  $Z_{осн}$  – основная заработная плата;

$Z_{доп}$  – дополнительная заработная плата (12 – 20 % от  $Z_{осн}$ ).

Основная заработная плата ( $Z_{осн}$ ) руководителя от предприятия рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_p , \quad (14)$$

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

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

$T_p$  – продолжительность работ, выполняемых научно – техническим работником, раб. дн. (табл.16).

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d} , \quad (15)$$

где  $Z_m$  – месячный должностной оклад работника, руб.;

$M$  – количество месяцев работы без отпуска в течение года;

$F_d$  – действительный годовой фонд рабочего времени научно – технического персонала, раб. дн.

В табл. 16 приведен баланс рабочего времени каждого работника НИИ

Таблица 16–Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Бакалавр	Консультант ЭЧ	Консультант СО
Календарное число дней	140	140	140	140
Количество нерабочих дней				
выходные дни:	16	16	16	16
праздничные дни:	6	6	6	6
Потери рабочего времени				
отпуск:	0	0	0	0
невыходы по болезни:	0	0	0	0
Действительный годовой фонд рабочего времени	118	118	118	118

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (16)$$

где  $Z_{тс}$  – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

$k_{пр}$  – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от  $Z_{тс}$ );

$k_d$  – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2 – 0,5;

$k_p$  – районный коэффициент, для Томска равный 1,3.

Расчет основной заработной платы приведен в табл. 17.

Таблица 17 – Расчет основной заработной платы

Категория	$Z_{тс}$	$k_d$	$k_p$	$Z_m$	$Z_{дн}$	$T_p$	$Z_{осн}$
-----------	----------	-------	-------	-------	----------	-------	-----------



	руб.			руб	руб.	раб. дн.	руб.
Руководитель							
	23264,9	0,35	1,3	39922,5	1487,6	14	20826,4
Бакалавр							
	14874,5	0,35	1,3	25524,6	945,4	62	58614,8
Консультант ЭЧ							
	20080,9	0,35	1,3	34458,8	1276,3	3,6	4594,7
Консультант СО							
	20080,9	0,35	1,3	34458,8	1276,3	3,6	4594,7

Общая заработная исполнителей работы представлена в табл. 18.

Таблица 18 – Общая заработная плата исполнителей

Исполнитель	$Z_{осн}$ , руб.	$Z_{дон}$ , руб.	$Z_{зн}$ , руб.
Руководитель	20826,4	1457,9	22284,3
Бакалавр	58614,8	4103,0	62717,8
Консультант ЭЧ	4594,7	321,6	4919,3
Консультант СО	4594,7	321,6	4919,3

#### 4.4.4. Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

В данной статье расходов отражаются обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам государственного социального страхования (ФСС), пенсионного фонда (ПФ) и медицинского страхования (ФФОМС) от затрат на оплату труда работников.

Величина этих отчислений определяется по формуле (17):

$$З_{внеб} = k_{внеб} \cdot (З_{осн} + З_{доп}), \quad (17)$$

где  $k_{внеб}$  – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды.

На 2014 г. в соответствии с Федеральным законом от 24.07.2009 № 212-ФЗ установлен размер страховых взносов равный 30%. Однако на основании пункта 1 ст.58 закона №212-ФЗ для учреждений осуществляющих образовательную и научную деятельность в 2014 году водится пониженная ставка – 30%.

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в табл. 19.

Таблица 19 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Руководитель проекта	20826,4	1457,9
Бакалавр	58614,8	4103,0
Консультант ЭЧ	4594,7	321,6
Консультант СО	4594,7	321,6
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,30	
<b>Итого:</b>	<b>28924,6</b>	

#### 4.4.5 Накладные расходы

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование графических материалов, оплата услуг связи, электроэнергии, транспортные расходы и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = k_{\text{нр}} \cdot (\text{сумма статей } 1 \div 4), \quad (18)$$

где  $k_{\text{нр}}$  – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов  $k_{\text{нр}}$  допускается взять в размере 16%. Таким образом, накладные расходы на данные НТИ составляют 27148 руб.

#### 4.4.6. Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта

Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы (темы) является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в качестве нижнего предела затрат на разработку научно-технической продукции.

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект по каждому варианту исполнения приведен в табл. 20.

Таблица 20

*Расчет бюджета затрат НТИ*

Наименование статьи	Сумма, руб.			Примечание
	Исп.1	Исп.2	Исп.3	
1. Материальные затраты НТИ	1950	2500	2100	Таблица 13

2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	7811	7811	7811	Таблица 14
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	88630,6	88630,6	88630,6	Таблица 15
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	6204,1	6204,1	6204,1	Таблица 16
5. Отчисления во внебюджетные фонды	28924,6	28924,6	28924,6	Таблица 17
6. Накладные расходы	21363,1	21451,2	21387,04	16 % от суммы ст. 1-5
7. Бюджет затрат НИИ	154882,1	155521,5	155057,27	Сумма ст. 1- 6

Как видно из табл. 20 основные затраты НИИ приходятся на затраты по основной заработной плате исполнителей темы.

#### **4.5. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования**

Эффективность научного ресурсосберегающего проекта включает в себя социальную эффективность, экономическую и бюджетную эффективность. Показатели общественной эффективности учитывают социально-экономические последствия осуществления инвестиционного проекта как для общества в целом, в том числе непосредственные результаты

и затраты проекта, так и затраты, и результаты в смежных секторах экономики, экологические, социальные и иные внеэкономические эффекты. Чтобы определить эффективность исследования, необходимо рассчитать интегральный показатель эффективности научного исследования. Для этого определяют две средневзвешенные величины: финансовую эффективность и ресурсоэффективность.

Интегральный показатель финансовой эффективности научного исследования получают в ходе оценки бюджета затрат трех (или более) вариантов исполнения научного исследования. Для этого наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчета (как знаменатель), с которым соотносятся финансовые значения по всем вариантам исполнения.

**Интегральный финансовый показатель** разработки определяется как:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{\Phi_{ri}}{\Phi_{\text{max}}},$$

где  $I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i}$  – интегральный финансовый показатель разработки;

$\Phi_{ri}$  – стоимость  $i$ -го варианта исполнения;

$\Phi_{\text{max}}$  – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

**Интегральный показатель ресурсоэффективности** вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i,$$

где  $I_{pi}$  – интегральный показатель ресурсоэффективности для  $i$ -го варианта исполнения разработки;

$a_i$  – весовой коэффициент  $i$ -го варианта исполнения разработки;

$b_i^a$ ,  $b_i^p$  – балльная оценка  $i$ -го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

$n$  – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности рекомендуется проводить в форме таблицы (табл. 21).

Таблица 21 -Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования Критерии	Весовой коэффициент параметра	Исп.1	Исп.2	Исп.3
1. Способствует росту производительности труда	0,1	3	5	4
2. Удобство в эксплуатации	0,15	5	4	4
3. Энергосбережение	0,15	4	4	5
4. Надежность	0,20	5	4	5
5. Воспроизводимость	0,25	5	5	4
6. Материалоемкость	0,15	5	5	4
<b>ИТОГО</b>	<b>1</b>	<b>4,65</b>	<b>4,5</b>	<b>4,35</b>

**Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки** ( $I_{исп.i}$ ) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{исп.1} = \frac{I_{p-исп1}}{I_{финр}^{исп.1}}, \quad I_{исп.2} = \frac{I_{p-исп2}}{I_{финр}^{исп.2}} \text{ и т.д.}$$

Сравнение интегрального показателя эффективности вариантов исполнения разработки позволит определить сравнительную эффективность проекта и выбрать наиболее целесообразный вариант из предложенных. Сравнительная эффективность проекта ( $\mathcal{E}_{cp}$ ):

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{исп.1}}{I_{исп.2}}$$

Таблица 22 - Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Исп.1	Исп.2	Исп.3
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,9986	0,9995	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,65	4,5	4,35
3	Интегральный показатель эффективности	4,657	4,502	4,35
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1	0,967	0,934

Вывод: Сравнительный анализ интегральных показателей эффективности показывает, оба метода производства лимонной кислоты предпочтительно, но при использовании гриба *Aspergillus niger* штамм F-817 и использование мелассы Российского производства обуславливает большую производительность труда.



## **Глава 5. Социальная ответственность.**

### **Характеристика объекта исследования и области его применения**

Лимонная кислота (2-гидрокси-1,2,3-пропантрикарбоновая кислота, 3-гидрокси-3-карбокспентандиовая) ( $C_6H_8O_7$ ) — кристаллическое вещество белого цвета, температура плавления 153 °С, хорошо растворима в воде, растворима в этиловом спирте, малорастворима в диэтиловом эфире. Слабая трёхосновная кислота. Соли и эфиры лимонной кислоты называются цитратами.

Вещество чрезвычайно распространено в природе: содержится в ягодах, плодах цитрусовых, хвое, стеблях махорки, особенно много её в китайском лимоннике и незрелых лимонах.

В кондитерской промышленности лимонная кислота используется как подкислитель и усилитель вкуса. В алкогольные и прохладительные газированные и негазированные напитки лимонная кислота добавляется для придания им ощущения свежести. Кроме того, она является синергистом, т.е. веществом, усиливающим действие антиоксидантов, таких, например, как аскорбиновая кислота. В консервной промышленности лимонная кислота используется как консервант вместо уксуса, который признан канцерогеном и применение которого в большинстве стран в пищевой промышленности резко ограничено. В масложировой промышленности лимонная кислота предохраняет продукцию от разлагающего действия находящихся в них следов тяжелых металлов, путем образования с ними комплексных соединений. Таким путем значительно снижается вероятность прогоркания жиров, маргаринов и животного масла.

В косметической промышленности лимонная кислота является частью многих косметических препаратов: эликсиров, лосьонов, кремов, шампуней, фиксаторов волос и т.д. Используется, в основном, как регулятор рН.

## 5.1 Производственная безопасность

Работа в аналитической лаборатории требует соблюдение техники безопасности, охраны труда работников, индивидуальной защиты. Условия труда должны быть максимально безвредными.

При нарушении санитарно-гигиенического режима в аналитической лаборатории на работников могут воздействовать неблагоприятные факторы производственной среды. Основными из них являются, прежде всего, контакт с токсичными химическими веществами, значительное напряжение зрения при выполнении анализов, работе с приборами и взвешивании на аналитических весах. Анализ вредных и опасных факторов при синтезе лимонной кислоты представлены в таблице 23.

Таблица 23

Опасные и вредные факторы при синтезе лимонной кислоты.

Наименование	Нормативные документы	Величина ПДК <sub>3</sub> мг/м <sup>3</sup>	Класс опасности	Примечание
Конц. серная кислота	ГОСТ 14262-78	1	2	Серная кислота раздражает и обжигает слизистые оболочки верхних дыхательных путей, поражает легкие. При попадании на кожу вызывает тяжелые ожоги.
микробицет aspergillus niger				aspergillus niger является активным разрушающим агентом различных материалов, возбудителем тяжелых заболеваний и провоцирующим фактором токсических поражений организмов животных и людей. Он вызывает такие

				заболевания, как аспергиллезы. Аспергиллез развивается в большинстве случаев у людей, страдающих иммунодефицитом. Путь проникновения грибка – через верхние дыхательные пути.
--	--	--	--	---

### *Работа с кислотами и щелочами*

Работа с концентрированными кислотами проводится только в вытяжном шкафу и с использованием защитных средств (перчаток, очков).

Используемые для работы концентрированные азотная, серная, соляная кислоты должны храниться в вытяжном шкафу в стеклянной посуде емкостью не более 2 дм<sup>3</sup>. В местах хранения кислот недопустимо нахождение легковоспламеняющихся веществ.

Разбавленные растворы кислот (за исключением плавиковой) также хранят в стеклянной посуде, а щелочей - в полиэтиленовой таре.

Переносить бутылки с кислотами разрешается вдвоем и только в корзинах, промежутки в которых заполнены стружкой или соломой. Более мелкие емкости с концентрированными кислотами и щелочами следует переносить в таре, предохраняющей от ожогов (специальные ящики с ручкой).

Концентрированные кислоты, щелочи, и другие едкие жидкости следует переливать при помощи специальных сифонов с грушей или других нагнетательных средств.

Для приготовления растворов серной, азотной и других кислот их необходимо приливать в воду тонкой струей при непрерывном помешивании. Для этого используют термостойкую посуду, так как процесс растворения сопровождается сильным выделением тепла.

Приливать воду в кислоты запрещается!

В случае попадания кислоты на кожу пораженное место следует немедленно промыть в течение 10 - 15 минут струей воды, а затем нейтрализовать 2 - 5 % раствором карбоната натрия.

Пролитую кислоту следует засыпать песком. После уборки песка место, где была разлита кислота, посыпают известью или содой, а затем промывают водой.

Пролитые концентрированные растворы едкого натра, едкого калия и аммиака можно засыпать как песком, так и древесными опилками, а после их удаления обработать место слабым раствором уксусной кислоты.

Использованную химическую посуду и приборы, содержащие кислоты, щелочи и другие едкие вещества, перед тем как мыть ополаскивают проточной водой.

#### *Первая помощь при химической травме*

Химический ожог представляет собой повреждение тканей организма в результате воздействия различных химических агентов. Термические ожоги – поражение кожи при контакте с жидким, твердым или газообразным источником тепла.

Перед тем как оказывать первую медицинскую помощь (ПМП), необходимо знать, под влиянием какого химического агента была получена травма и какова степень ее тяжести. Повреждения могут быть вызваны:

- кислотами;
- солями тяжелых металлов;
- щелочами;
- другими химическими соединениями активного типа.

Понять, каким именно веществом был нанесен ожог, можно по внешнему виду поврежденной ткани. Так, при ожоге, полученном серной

кислотой, на поверхности поврежденного участка образуется струп (корка) белого цвета. Со временем он темнеет до черного или коричневого. Струп от соляной кислоты имеет желтый цвет, а от азотной – желтый с коричневым или зеленоватым оттенком. Под действием кислот пораженный участок становится “запавшим”. При нажатии он не собирается в складку и может быть со спаянными участками поврежденного кожного покрова.

Ожог, полученный щелочью, образует струп влажный или студнеобразный. В том случае, если в рану дополнительно проникла инфекция и в ней нет нагноения, он становится сухим и плотным через несколько дней. Под влиянием щелочей происходит омыление жиров и растворение белков, что и приводит к образованию такой раны. В свою очередь, кислоты коагулируют белки, что делает струп сухим. В связи с этими особенностями кислотный ожог от щелочного отличается еще и тем, что сухой струп образует «барьер», который становится препятствием для дальнейшего проникновения кислоты внутрь ткани. В этом случае повреждение тканей не так глубоко, как после щелочного ожога.

При химическом ожоге кислотой пораженное место сразу же промывают большим количеством проточной холодной воды 15-20 мин. Если кислота попала на кожу через одежду, то сначала надо смыть ее водой с одежды, после чего промыть кожу.

При попадании на тело человека серной кислоты в виде твердого вещества необходимо удалить ее сухой ватой или кусочком ткани, а затем пораженное место тщательно промыть водой. При химическом ожоге полностью смыть химические вещества водой не удастся. Поэтому после промывания пораженное место обрабатывают раствором пищевой соды (одна чайная ложка на стакан воды).

При попадании кислоты или щелочи в пищевод срочно вызвать врача скорой помощи. Нельзя промывать желудок водой. Хороший эффект дает

прием внутрь молока, яичного белка, растительного масла, растворенного крахмала.

Минимизировать возможный незначительный риск для здоровья в процессе выполнения работы и снизить содержание реактивов в воздухе рабочей зоны позволили следующие мероприятия:

1. Использование средства индивидуальной защиты (очки, щитки, маски, респираторы, резиновые перчатки, спецодежда).
2. Герметизация тары хранения и оборудования для проведения реакции.
3. Вытяжная система вентиляции (вытяжной шкаф).

Анализ выявленных опасных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения.

В аналитической лаборатории химик - аналитик подвергается физическим факторам: электромагнитные поля, параметры микроклимата (температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха, инфракрасное излучение), параметры световой среды (искусственное освещение (освещенность) рабочей поверхности).

#### *Производственное освещение*

Для нормальной зрительной работы без перенапряжения глаз в лаборатории используется, как общее естественное и искусственное, так и местное, то есть комбинированная система освещения. Освещение рабочего места является близким по спектральному составу к солнечному свету как наиболее гигиеничному; и соответствует нормативным документам; равномерным и устойчивым; без резких теней и блеклости в поле зрения; соответствующей цветности. Источники искусственного освещения не являются факторами дополнительных вредных и опасных воздействий (по избыткам тепла, шуму и т.д.).

#### *Микроклимат в аналитической лаборатории*

В процессе работы в лаборатории человек находится под влиянием микроклимата внутренней среды помещения. Основные показатели микроклимата воздуха в лаборатории составляют:

температура (t) – 19-21<sup>0</sup>С;

относительная влажность – 60 - 65%;

скорость движения воздуха (v) – 0,2 м/с.

Эти показатели относятся к оптимальным условиям.

Для того чтобы постоянно поддерживать нормальные параметры микроклимата в лаборатории была установлена система вентиляции, предназначенная для подачи чистого воздуха и удаления из рабочей зоны загрязненного воздуха. Кроме этого установлена локальная система в виде местной вентиляции – вытяжной, где загрязненный воздух удаляется от места его возникновения вентиляторами. Для этого применяют вытяжной шкаф, внутри которого проводят работу с химическими реактивами.

#### *Уровень шума и вибрации*

Для проведения исследований по теме проекта в работе использовалось различного уровня оборудования: термостат, сухожаровой шкаф, центрифуга и т.д. которые является источником шума и вибрации. Для предотвращения негативного влияния данных факторов при выполнении работы были предприняты меры в соответствии с нормативными документами. Используемые приборы установлены на амортизирующие прокладки, описанные в нормативных документах. По уровню шума, локальной и общей вибрации лаборатория с вышеперечисленным оборудованием относится к допустимому классу, ПДУ < 25 дБ, что позволяло безопасно выполнять работу.

#### *Электробезопасность*

При выполнении данной научно исследовательской работы использовались следующие электроприборы: весы аналитические лабораторные, сушильный шкаф, ИК- спектрометр, ламинарный шкаф, автоклав, термостат и т.д.

Все помещения лаборатории соответствуют требованиям электробезопасности при работе с электроустановками.

Все электрооборудование с напряжением свыше 36 В, а также оборудование и механизмы, которые могут оказаться под напряжением, заземлены.

Для предотвращения воздействия тока на человека в лаборатории выполнялись следующие условия:

1. соблюдение соответствующих расстояний до токоведущих частей или путем закрытия (заземление электрооборудования);
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 20 °С;
2. относительная влажность 40 - 50%;
3. окружающая среда — невзрывоопасна, не содержащая значительного количества токопроводящей пыли, агрессивных газов.

Безопасность работы обеспечена в конструкции электрооборудования. 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.

#### *Молниезащита производственных зданий и сооружений*

Молниезащита промышленных зданий разрабатывается исходя из типа опасного воздействия, возникающего при электрическом разряде молнии:



Прямой удар: опасен термическим и механическим разрушением здания.

Вторичное воздействие: характеризуется образованием электрических токов в замкнутых токопроводящих системах здания (электропроводке, трубопроводе и пр.). Возникающие при этом искры и нагрев металлоконструкций могут спровоцировать пожар или взрыв.

Занос высоких потенциалов: процесс переноса электрических потенциалов, возникших при ударе молнии, по внешним металлоконструкциям (трубопроводам) в защищаемое сооружение. Может привести к пожару, взрыву, выходу из строя электрооборудования.

Наибольшей опасности подвергаются высотные объекты, поэтому в первую очередь в защите нуждаются такие промышленные объекты, как мачты, трубы, опоры ЛЭП.

Молниезащита промышленных зданий осуществляется в соответствии с требованиями нормативных документов РФ. Все производственные объекты делятся на три категории. В зависимости от того, к какой категории относится сооружение, выбирается необходимый уровень защиты.

1 категория – объекты, на которых могут находиться взрывоопасные вещества классов В1 и В2, а также электростанции и подстанции. Промышленные здания данной категории нуждаются в защите:

- от заряда статического электричества (заземление всех металлических корпусов сооружения)
- от прямого удара (стержневые и тросовые молниеотводы)
- от вторичного действия и заноса высоких потенциалов (установка специальных перемычек, которые объединяют контуры в единую систему).

2 категория – сооружения, в которых также находятся взрывоопасные химические вещества, кроме веществ класса В1 и В2. Здесь необходима молниезащита промышленных зданий от прямого удара молнии. Выполняется в виде:

- тросовых или стержневых молниеотводов, расположенных на здании или стоящих отдельно;
- сетчатых молниеотводов с ячейкой не менее 6х6 м (по требованиям МЭК 5х5 м);
- заземления металлической кровли.

3 категория – все объекты, не вошедшие в первые две категории. Молниезащита зданий осуществляется так же, как и для объектов 2 категории.

#### *Правила пожарной безопасности в лаборатории*

При работе в лаборатории опасность пожаров и взрывов зависит от физико-химических свойств и количества имеющихся в лаборатории материалов, веществ, от конструктивных особенностей и режима работы оборудования, а также от наличия источников загорания и условий для быстрого распространения огня.

В Национальном Исследовательском Томском политехническом университете, где проводились исследования, предприняты все необходимые по нормативным документам меры для предотвращения возникновения пожаров. При возникновении пожара необходимо, принять все меры по его локализации и тушению. Для этого всегда обеспечен проход между лабораторными столами, выходы не загромождены. При возникновении загорания все сотрудники знают инструкции и план эвакуации, в соответствии с заранее разработанной программой.

Для тушения возможного загорания и пожаров лаборатория оснащена специальным оборудованием:

1. огнетушитель углекислотный газовый типа ОУ-2 для тушения всех видов горючих веществ и электроустановок, кроме веществ, горящих без доступа воздуха;
2. ручной пенный огнетушитель ОХП, применяемый для тушения установок, находящихся под напряжением.

3. порошковый огнетушитель ОПС-10, предназначен для тушения небольших очагов возгорания щелочных металлов.

4. асбестовое одеяло, которое используется при тушении обесточенных электропроводов, горячей одежды.

5. ящик с песком для тушения обесточенных горящих на горизонтальной поверхности проводов.

Для обнаружения пожара, оповещения и эвакуации людей установлена система пожарной сигнализации и разработан план эвакуации, с которым ознакомлены сотрудники лаборатории.

Таким образом, лаборатория, оснащена всеми противопожарными устройствами и соответствует требованиям пожарной безопасности.

## **5.2 Экологическая безопасность**

В настоящее время химические производства являются серьезными источниками загрязнения окружающей среды. Вредные вещества могут попадать в окружающую среду по сточным водам в виде пыли, дыма, газа, твердых отходов производства.

Во многих промышленно развитых странах действуют законодательные акты, обязывающие промышленные предприятия предусматривать все необходимые мероприятия, исключающие сброс вредных веществ в водоем, загрязнение почвы и воздушного бассейна.

При выполнении работы в качестве исследуемого объекта была использована лимонная кислота, которая не оказывает негативное влияние на окружающую среду.

Основными отходами в окружающую среду при выполнении работы были: сточные воды с низкой концентрацией серной кислоты и слив воды, которой мылась посуда после работы с реактивами. Далее реакционный слив, утилизируется в места определенного назначения.

Современное развитие и совершенствование индустрии направлено на создание безотходных технологий. Под понятием «безотходная технология» следует понимать комплекс мероприятий в технологических процессах от обработки сырья до использования готовой продукции, в результате чего сокращается до минимума количество вредных выбросов и уменьшается воздействие отходов на окружающую среду до приемлемого уровня. В этот комплекс мероприятий входят:

- 1) создание и внедрение новых процессов получения продукции с образованием наименьшего количества отходов;
- 2) разработка различных типов бессточных технологических систем и водооборотных циклов на базе способов очистки сточных вод;
- 3) разработка систем переработки отходов производства во вторичные материальные ресурсы;
- 4) создание территориально-промышленных комплексов, имеющих замкнутую структуру материальных потоков сырья и отходов внутри комплекса.

### **5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях**

Одним из важнейших факторов в безопасности жизнедеятельности людей является подготовленность к чрезвычайным ситуациям.

Чрезвычайная ситуация (ЧС) – это совокупность таких обстоятельств, которые сопровождаются разрушениями зданий, сооружений, материальных ценностей, поражению и гибелью людей.

Чрезвычайную ситуацию можно квалифицировать следующим образом:

1. ЧС, связанная с производственными авариями (пожары, взрывы, выброс вредных веществ в окружающую среду)

2. ЧС, связанная со стихийными бедствиями (землетрясения, наводнения, ураганы, смерчи, снежные бури, заносы, оползни, обвалы, эпидемии, лесные и торфяные пожары).

3. ЧС конфликтного характера (вооруженное нападение, волнения в отдельных районах, вызванные выступлениями экстремистских групп, применения оружия массового поражения).

При выполнении работы в аналитической лаборатории может возникнуть ЧС техногенного характера - пожар.

В случае выявления пожара (признаков горения) необходимо:

1. незамедлительно сообщить об этом по телефону 01 в пожарную охрану (при этом необходимо назвать адрес объекта, место возникновения пожара, а также сообщить свою фамилию), поставить в известность службу охраны и покинуть здание;

2. в случае сильного задымления и ограниченной видимости не следует паниковать, надо лечь на пол (для того, чтобы не задохнуться т.к. дым висит над полом примерно в 30-ти сантиметрах и в этой зоне можно дышать) и осмотреться, сориентироваться в помещении, определить направление движения к выходу и покинуть помещение;

3. принять по возможности меры по эвакуации людей и материальных ценностей в соответствии с планом эвакуации и реально создавшейся ситуацией;

4. по возможности отключить электроэнергию и приступить к тушению пожара первичными средствами пожаротушения, не подвергая свою жизнь опасности.

## **5.4 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности**

Виды компенсаций, предусмотренные российским законодательством работникам, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда:

1. Сокращенная продолжительность рабочего времени, устанавливаемая для работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

2. Ежегодные дополнительные отпуска, которые устанавливаются работникам, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда.

3. Оплата труда работников в повышенном размере, занятых на тяжелых работах, работах с вредными и (или) опасными и иными особыми условиями труда.

4. Молоко или другие равноценные пищевые продукты, выдаваемые работникам, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда бесплатно по установленным нормам.

5. Лечебно-профилактическое питание для работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда бесплатно по установленным нормам.

6. Досрочное назначение трудовой пенсии для работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, на работах в особых условиях труда .

Эргономическое проектирование рабочих пространств и рабочих мест производится для конкретных рабочих задач и видов деятельности с учетом антропометрических, биомеханических, психофизиологических и психических возможностей и особенностей работающих людей.

Оно должно создать наилучшие условия для:

- размещения работающего человека с учетом рабочих движений и перемещений в соответствии с требованиями технологического процесса;
- выполнение основных и вспомогательных операций в удобном рабочем положении, соответствующем специфике трудового процесса, и с применением наиболее эффективных приемов труда;
- расположение средств управления в пределах оптимальных границ пространства перемещений человека;
- сохранения оптимального обзора источников визуальной информации при смене рабочей позы и рабочего положения;
- свободного доступа к местам профилактических осмотров, ремонта и наладки, удобства их выполнения;
- рационального размещения оборудования, безопасности рабочих.

Правильное расположение и компоновка рабочего места, обеспечение удобной позы и свободы трудовых движений, использование оборудования, отвечающего требованиям эргономики и инженерной психологии, обеспечивают наиболее эффективный трудовой процесс, уменьшают и предотвращают опасность возникновения профессиональных заболеваний.

Оптимальная поза человека в процессе трудовой деятельности обеспечивает высокую работоспособность и производительность труда.

Неправильное положение тела на рабочем месте приводит к быстрому возникновению статической усталости, снижению качества и скорости выполняемой работы, а также снижению реакции на опасности.

## Выводы

В результате выполнения научной исследовательской работы по теме «Микробиологический синтез лимонной кислоты продуцентом *Aspergillus niger*» в рамках бакалаврской работы были сделаны следующие выводы:

1. Изучено влияние состава питательной среды на биосинтез лимонной кислоты при культивировании гриба *Aspergillus niger*.
2. Проведен подбор оптимальных условий для синтеза лимонной кислоты с использованием в качестве продуцента *Aspergillus niger*.
3. Получен сверхпродуцент лимонной кислоты путем воздействия микроволнового (МВО) и ультрафиолетового облучения (УФ).
4. Проведен анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения научно-исследовательской разработки.
5. Проанализирован характер воздействия научно-исследовательской разработки, с точки зрения социальной ответственности за моральные, общественные, экологические возможные негативные последствия и ущерб здоровью человека в результате их внедрения.



## **Заключение**

Лимонная кислота нашла широкое применение в различных отраслях промышленности. В России потребность в лимонной кислоте не удовлетворяется, поэтому приходится закупать из стран ЕС и дальнего зарубежья. Кроме того, современные требования экономики и экологии диктуют настоятельную необходимость создания новых высокоэффективных технологий для уменьшения доли импорта. Наибольший интерес в данной области представляют технологии, основанные на использовании микроорганизмов. Поэтому получение лимонной кислоты с использованием МВО и УФ облучения и является актуальным.

Таким образом, на основании полученных результатов, можно сделать вывод, что микробиологический синтез лимонной кислоты с продуцентом *Aspergillus niger* при воздействии микроволнового и ультрафиолетового облучений в дальнейшем может стать основой для импортозамещения продукта на внутреннем рынке РФ.

## Список литературы

1. Авчиева П.Б., Винаров А.Ю.. Биосинтез лимонной кислоты из н-парафинов мутантным штаммом *S.Нро1уйса* 917-1. - Биотехнология, 1992, №3, с.65-68.
2. Авчиева П.Б., Винаров А.Ю.. Получение мутантов дрожжей *S. 1ро1уй11са* - активных продуцентов лимонной кислоты. - Микробиология, 1993, т.62, в.2, .243-248.
3. Авчиева П.Б., Винаров А.Ю., Биосинтез лимонной кислоты при непрерывной ферментации. Экскреция лимонной кислоты. - Биотехнология. 1992, №1, с.46-49.
4. Авчиева П.Б., Винаров А.Ю.. Питательная среда для получения лимонной кислоты. Патент РФ. № 2007459, 1995г.
5. Авчиева П.Б.. Технология применения нового физиологически активного наполнителя при производстве лимонной кислоты. - МГЦНТИ, 1997, Ко1-97, с. 1-3.
6. Авчиева П.Б.. Подготовка питательной среды к ферментации в производстве лимонной кислоты. - МГЦНТИ, 1996, №2-96, с. 2-3.
7. Авчиева П.Б., Винаров А.Ю.. Способ получения посевного материала в производстве лимонной кислоты. - Заявка на патент № 94017790, 1994. Решение о выщаче 1995г..
8. Авчиева П.Б.. Штамм гриба *A.niger* P- 718 - продуцент лимонной кислоты. Заявка на патент № 116989, 1995. Решение о выдаче 1996г..

9. Авчиева П.Б., Винаров А.Ю.. Биосинтез лимонной кислоты при непрерывной ферментации гриба *A.niger*, - Прикладная биохимия и микробиология. 1992, в.4, т.29, с. 567-575.
10. Авчиева П.Б., Винаров А.Ю., Побочные продукты производства лимонной кислоты - компоненты комбикормов. - Комбикормовая промышленность, 1994, № 1, с. 33-34.
11. Авчиева П.Б., Винаров А.Ю.. Углеводно-минеральный концентрат. - Комбикормовая промышленность, 1994, № 1, с. 30-32.
12. Авторское свидетельство СССР № 488850, кл. C12 d 13/10, €12 К 3/00, 1976г..
13. Алиханян СИ.. Селекция промышленных микроорганизмов. Москва, "Наука", 1968, с. 151.
14. Буткевич В.С., Тимофеева А.Г.. Влияние отдельных минеральных элементов питательной среды на образование кислот грибом *A.niger*. - В кн.: Буткевич В.С. Избранные труды, Т.1, "Изд. АН СССР", 1957, с. 373.
15. Бережной Ю.Д., Новикова Л.А. и др.. Способ получения лимонной кислоты. АС СССР, № 51050 9, 1996г.
- 16.ГОСТ 12.1.005—88. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны [Текст]. - введ. 01.01.1989.- М.: Стандартиформ, 2008. – 49 с.
- 17.СанПиН 2.2.4.584-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений. Санитарные правила и нормы.
18. ГОСТ 12.1.007. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
19. ГОСТ 12.1.003-89. Шум. Общие требования безопасности.

20. ГОСТ 12.1.012-90. Вибрационная безопасность. Общие требования.

21. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий.

22. ГОСТ 12.1.002–84. Электрические поля промышленной частоты. Допустимые уровни и требования к проведению контроля на рабочем месте [Текст].-введ. 01.01.1986.- М.: Стандартиформ, 2009. – 7 с.

23. СанПиН 2.2.4.1191-03.Электромагнитные поля в производственных условиях зданий [Электронный ресурс]. - Режим доступа [www.URL: http://www.vrednost.ru/2241191-03.php](http://www.vrednost.ru/2241191-03.php)

24. ГОСТ Р 22.0.01-94. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Основные положения [Текст]. - введ. 01.01.1995.- М.: Издательство стандартов, 1994. – 11 с.

25. ГОСТ 12.0.004-90. Организация обучения безопасности труда [Текст]. - введ. 01.07.1991.- М.: Стандартиформ, 2010. – 16 с.

26. Конституция Российской Федерации [Электронный ресурс]. - Режим доступа [www. URL: http://www.consultant.ru/popular/cons](http://www.consultant.ru/popular/cons)

27. Генеральное соглашение между общероссийскими объединениями профсоюзов, общероссийскими объединениями работодателей и Правительством Российской Федерации на 2014 - 2016 годы от 25 декабря 2013 г. [Электронный ресурс]: - Режим доступа [www.URL: http://www.rg.ru/2013/12/30/a904631-dok.html](http://www.rg.ru/2013/12/30/a904631-dok.html)

28. Белов С.В., Ильницкая А.В., Козьяков А.Ф. Безопасность жизнедеятельности и др. 7-е изд., стер. — М.: Высшая школа, 2007. — 616 с.