

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа новых производственных технологий
 Направление подготовки 19.04.01 «Биотехнология», профиль «Биотехнология»
 Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Оптимизация выхода продигиозина при биосинтезе

УДК: 579.222.3-048.34

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Сапарханов Арнур Нурлабекулы		29.05.19

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Чубик Марианна Валериановна	К.М.Н., доцент		29.05.19

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницына Зоя Васильевна	К.Т.Н., доцент		17.05.2019

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Романова Светлана Владимировна	-		03.06.2019

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

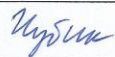
Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Руководитель ООП 19.04.01 Биотехнология	Чубик М.В.	К.М.Н., доцент		3.06.2019

Томск – 2019 г.

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов <i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i>	- Обзор литературы - Объект и методы исследования - Экспериментальная часть - Результаты исследования - Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение - Социальная ответственность - Заключение
Перечень графического материала <i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i>	
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы <i>(с указанием разделов)</i>	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Криницына З.В., доцент ОСТН, к.т.н.
Социальная ответственность	Романова С. В., профессор ОКД, Д. б. н.
Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:	
Обзор литературы	

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	28.01.2019 г.
--	---------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент НОЦ Н.М. Кижнера	Чубик М. В.	К.М.Н.		29.01.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Сапарханов А. Н.		29.01.19

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»



Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки 19.04.01 «Биотехнология», профиль «Биотехнология»
Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера

УТВЕРЖДАЮ:

Руководитель

ООП

«Биотехнология»

Чубик М.В.
(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ71	Сапарханову Арнуру Нурлабекулы

Тема работы:

Оптимизация выхода продигиозина при биосинтезе	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	№ 147/с от 25.02.2019 г.

Срок сдачи студентом выполненной работы:	01.06.2019 г.
--	---------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе

(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).

Объектом исследования являются красный пигмент, синтезируемый бактерией *S. marcescens* – «продигиозин». Получение продигиозина выгодно, т.к. не требует больших затрат.

Планируемые результаты обучения
по ООП 19.04.01 «Биотехнология» (магистр)
профиль «Биотехнология»

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
<i>Профессиональные компетенции</i>	
P1	Профессионально эксплуатировать современные биотехнологические производства, обеспечивая их высокую эффективность и безопасность
P2	Разрабатывать и внедрять новые биотехнологические процессы и оборудование в рамках проектирования новых и усовершенствования действующих производств
P3	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в различных областях прикладной биотехнологии
<i>Универсальные компетенции</i>	
P4	Ставить и решать задачи инженерного анализа для создания инновационных биотехнологических процессов и продуктов
P5	Эффективно организовывать и участвовать в работе коллективов, в том числе международных, демонстрировать ответственность за результаты инженерной деятельности
P6	Демонстрировать глубокие знания социальных, этических и правовых аспектов инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах устойчивого развития
P7	Постоянно повышать интеллектуальный и общекультурный уровень и профессиональную квалификацию, способствовать обучению персонала

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ71	Сапарханов Арнур Нурлабекулы

Школа	ИШНПТ	Отделение школы (НОЦ)	НОЦ Н.М.Кижнера
Уровень образования	Магистр	Направление/специальность	19.04.01 Биотехнология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Стоимость сырья, материалов, комплектующих изделий и покупных полуфабрикатов, спецоборудования, затраты по статьям.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	Расчетные величины материалов и сырья научно-технического проекта.
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования	Упрощенная система налогообложения, транспортно-заготовительные расходы, транспортно-монтажные расходы, премиальный коэффициент, коэффициент доплат и надбавок, районный коэффициент, заработная плата по тарифной ставке.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	Доступность исходных продуктов, простота методики, экологичность, скорость и время бисинтеза прототипа, эффективность продукта.
2. Разработка устава научно-технического проекта	Выбор организационной структуры научного проекта, проектная структура проекта.
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	- Планирование управления научно-техническим проектом (Иерархическая и организационная структура работ проекта, план проекта) - Формирование бюджета научного исследования - Оценка рисков проекта
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	Удобство эксплуатации, материалоемкость, надежность, энергосбережение.

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. Диаграмма Исикавы
2. Иерархическая структура работ проекта
3. Проектная структура проекта

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику 15.02.2019

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницына Зоя Васильевна	к.т.н., доцент		15.02.2019

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Сапарханов Арнур Нурлабекулы		15.02.2019

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ71	Сапарханов Арнур Нурлабекулы

Школа	ИШНПТ	Отделение школы (НОЦ)	НОЦ Н.М.Кижнера
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Биотехнология

Тема ВКР: «Оптимизация выхода продигиозина при биосинтезе»

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	<i>Объектом исследования является красный пигмент бактерии <i>Serratia Marcescens</i> «продигиозин».</i> <i>Область применения – медицина, нефтеперерабатывающая промышленность.</i>
--	--

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия	<i>Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. От 01.04.2019)</i> <i>ГОСТ 12.2.033-78 ССБТ – Рабочее место при выполнении работы стоя. Общие эргономические требования.</i>
2. Производственная безопасность: 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов и обоснование мероприятий по снижению воздействия	- Отклонение показателей микроклимата в помещении; - недостаточная освещенность рабочей зоны; - превышение уровней шума; - электробезопасность; - химические вещества, условно-патогенные микроорганизмы
3. Экологическая безопасность:	<i>Возможны следующие воздействия на окружающую природную среду в процессе выполнения работы и направления утилизации отходов:</i>

	- Контаминация воздушной среды микроорганизмами. Необходимо работать в ламинарном шкафу при включенной вентиляции и бактерицидной лампе, утилизация отработанного материала непосредственно после опыта; - Биологическое загрязнение водотоков в результате попадания в хозяйственно бытовую канализацию спор микроорганизмов. В связи с этим проводится стерилизация микроорганизмов и их спор.
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	К чрезвычайным ситуациям относится возникновение пожара на рабочем месте в результате разлива ЛВЖ, облив химикатами, ожог кислотами, электротравма, взрыв оборудования, работающее под давлением (автоклав паровой), термический ожог.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	13.02.2019
---	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Романова Светлана Владимировна	-		13.02.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Сапарханов Арнур Нурлабекулы		13.02.19

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа – 112 с., 18 рис., 35 табл., 50 источник, 3 приложения.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, бактерии, ГРМ №9, ГРМ-агар, продигиозинподобный пигмент, продигиозин.

Объектом исследования является бактерия *Serratia marcescens*, красный внутриклеточный пигмент *Serratia marcescens* – «продигиозин».

Цель работы – Оптимизация выхода продигиозина при биосинтезе

В процессе исследования проводилось культивирование биомассы бактерии на разных питательных средах, получение продуцента *Serratia marcescens*. Получили продигиозинподобный пигмент, определили растворимость в этаноле. Провели экстракцию из клеток-продуцентов и сделали химический анализ.

В результате исследования были получена чистая культура продуцента *Serratia marcescens*, из неё экстрагирован продигиозинподобный пигмент, определена его структура. Подобрана оптимальная среда для культивирования продуцента продигиозинподобного пигмента. Проведена оценка реурсоэффективности проекта. Определены опасные вещества и факторы, встречающиеся при получении продигиозинподобного пигмента

Область применения: биосинтез БАВ и медицина.

По результатам проведенного исследования планируется оптимизировать биосинтез продигиозина и (или) продигиозинподобного пигмента в части изменения физических параметров синтеза. Также планируется детальное изучение химической структуры полученных соединений путём проведения ЯМР-спектроскопии и СН-анализа.

Список сокращений

ГОСТ – государственный стандарт

ЛВЖ - легко воспламеняющиеся жидкости

ГН – государственный норматив

СанПиН – санитарные правила и нормы

ПДК – предельно-допустимая концентрация

СНиП – строительные нормы и правила

ЧС - чрезвычайная ситуация

ТСХ – тонкослойная хроматография

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	12
1 Обзор литературы	14
2 Объект и методы исследования	27
2.1 Описание бактерий рода <i>Serratia</i>	27
2.2 Питательные среды	39
2.3 Реактивы	30
2.4 Выделение «дикого» штамма <i>S. marcescens</i>	31
2.5 Получение пигмента и его экстракционная отчистка	34
3 Экспериментальная часть	36
3.1 Процесс получения «дикого» штамма <i>S. marcescens</i> из воздуха рабочих помещений	36
3.2 Определение штамма и культивирование методом Дригальского	36
3.3 Культивирование продуцента продигиозина	37
3.4 Изучение влияния температуры и света на рост продуцента	38
3.5 Выделение пигмента из клтеек продуцента	39
3.6 Отчистка пигмента	40
3.7 Определение структуры пигмента	41
4 Результаты исследования	42
5 Финансовый менеджмент ресурсоэффективность и ресурсосбережение	46
5.1 Предпроектный анализ	46
5.2 Инициация проекта	49
5.3 Планирование управления научно-техническим проектом	52

5.4	Оценка сравнительной эффективности исследования	67
6	Социальная ответственность	72
6.1	Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	73
6.2	Производственная безопасность	75
6.3	Экологическая безопасность	86
6.4	Безопасность в чрезвычайных ситуациях	87
	Выводы	93
	Список использованных источников	94
	Приложение А	99
	Приложение Б	111
	Приложение В	112

Введение

Ярко-красный пигмент продигиозин, синтезируемый энтеробактериями *Serratia marcescens*, представляет собой линейный тетрапиррол (пиррол, 3-метоксипиррол, 2-метил-3-амилпиррол), является вторичным метаболитом. В промышленности продигиозин используют в качестве красителя для полимеров и пластмасс, поскольку он обладает рядом преимуществ по сравнению с органическими и неорганическими пигментами. Изучен способ использования продигиозина в качестве маркера для нефтепродуктов. Пигмент хорошо растворим в различных марках топлива и легко обнаруживается по характерному спектру поглощения. Продигиозин и продигиозинподобные пигменты, рассматриваются как новое семейство противоопухолевых лекарственных препаратов. Показано, что продигиозин действует, как иммунодепрессант, селективно блокируя пролиферацию Т-клеток киллеров, избирательно индуцирует апоптоз различных типов злокачественных клеток, ингибирует образование метастаз.

В связи с большой практической значимостью продигиозина возникает необходимость в выработке больших количеств пигмента и снижении его стоимости.

Цель работы: Увеличение выхода продигиозина при биосинтезе.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- 1) Получить чистую культуру *S. marcescens*.
- 2) Выделить продигиозин или продигиозинподобный пигмент из чистой культуры *S. marcescens*.
- 3) Подобрать оптимальную среду для большего выхода пигмента.
- 4) Определить структуру пигмента.
- 5) Провести расчет экономической эффективности и социальной безопасности проекта.

Объектом исследования является красный пигмент, синтезируемый бактерией *S.marcescens* – «продигиозин».

Научная новизна – впервые был получен продигиозинподобный пигмент из чистой культуры *S. marcescens* выделенной из воздуха рабочих помещений.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика бактерии *S. marcescens*

Бактерия *Serratia marcescens* является представителем типового вида, рода *Serratia* являющегося представителем семейства Enterobacteriaceae. *S. marcescens* прямые палочки (0,9-2,0×0,5-0,8 мкм), грамтрицательные, подвижны (перитрихи). Имеют О-, Н-антигены, устойчивы ко многим антибиотикам и являются факультативными анаэробами [1]. Бактерии рода *Serratia* популяризированы в окружающей среде, их получают из почвы, воздуха, из растений, пищевых продуктов, также они распространены в воде, экскриментах насекомых и грызунов [2]. Причиной большой распространенности бактерии является способность размножаться при комнатной температуре, а также на влажных поверхностях и в физиологических растворах. За последние десятилетия было обнаружено большое количество научных данных о патогенном воздействии на человека и животных [3,4,5].

S. marcescens продуцирующая красный пигмент продигиозин, зачастую вызывает у насекомых септицемию.

Известно, что продигиозин обладает фунгицидным действием по отношению к различным возбудителям заболеваний растений. Обычно оно проявляется в ингибировании роста гиф и образовании склеротий у патогенных грибов.

Также продигиозин опасен своей токсичностью и для растений, что может затруднить его использование при работе с растениями [6].

Когда-то считавшийся безвредным сапрофитом, *Serratia marcescens* признана важным оппортунистическим патогеном, склонным вызывать проблемы со здоровьем у человека, также продигиозин устойчив к противомикробным препаратам. В настоящее время найдено 14 видов *Serratia*, восемь из которых опасны для человека [7]. Из восьми видов, инфицирующих людей наиболее известны *S. marcescens*, *S. liquefaciens* и *S. odorifera* [8].

В последние два десятилетия, *Enterobacteriaceae* продемонстрировали исключительную способность приобретать, передавать и модифицировать экспрессию множества генов устойчивости к противомикробным препаратам. Являясь типичным членом семейства *Enterobacteriaceae* и дополняющим его способность к выживанию, *S. marcescens* характерно демонстрирует склонность к выражению устойчивости к противомикробным препаратам. *S. marcescens* одинаково устойчивы к широкому спектру антибиотиков, включая пенициллины узкого спектра действия и цефалоспорины, цефуроксим, цефамицины, макролиды, тетрациклин, нитрофурантоин и колистин [9].

Были проведены исследования с применением L-форм *S. marcescens*, было отмечено, что оболочка клетки бактерии *S. marcescens* принимает участие в синтезе красного пигмента и представляет собой местом его постоянной или первичной локализации [10].

Винас с соавторами установил, что пигмент связан с липопротеидным компонентом, находящемся на внутренней мембране клетки бактерии. Проведенный анализ спектра поглощения внешней мембраны и внутренней мембраны, в том числе спектр поглощения совокупности цитоплазмы и периплазмы, позволяющий полагать, что пигмент соединен с внутренней мембраной клетки. Ученые предположили, что пигмент находится на наружной части цитоплазматической мембраны клетки и возможно периплазме. В ходе исследования были получены результаты, которые подтвердили предположение, что местом локализации пигмента является клеточная стенка бактерии [11].

1.2 Пигмент продигиозин

Продигиозин – красный внутриклеточный пигмент, образуемый грамотрицательными неспорообразующими энтеробактериями рода *Serratia* [12]. Красный пигмент продигиозин обладает необычными свойствами, которые давно задокументированы. Красные пигментированные продигиозины - это биологически активные вторичные метаболиты, продуцируемые как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями. Продигиозины

характеризуются общим пирролил-пиррометеновым скелетом, и биологическая роль этих пигментов в организмах-продуцентах остается неясной. Бактериальные продигиозины и их синтетические производные являются эффективными проапоптотическими агентами против различных линий раковых клеток, с множественными клеточными мишенями, включая клетки со множественной лекарственной устойчивостью, практически не токсичные по отношению к нормальным клеточным линиям [13].

Бактерия очень изменчива по признаку пигментообразования. Колонии, не имеющие пигмента, могут быть получены при посеве штаммов, имеющих пигмент, частота потери бактерией пигментообразования отличается у разных штаммов. Возможно штаммы, могут синтезировать лишь монопиррольную часть молекулы продигиозина, а способность синтезировать дипиррольные предшественники потеряна.

Известно, что штаммы *Serratia marcescens* не имеющие пигмент отличаются от пигментных своими индивидуальными биохимическими свойствами. Штаммы бактерии, имеющие пигмент чувствительны ко многим антибиотикам, отличие беспигментных штаммов в том, что они имеют устойчивость к антибиотикам, вследствие наличия плазмид. Штаммы бактерии, не имеющие пигмента, лучше принимают плазмиды, чем пигментированные [14].

Имеются штаммы *S. marcescens*, синтезирующие пигмент желтого цвета. Причина желтой пигментации является утрата способности бактерии расти на средах, имеющих ароматические альфа-аминокислоты: тирозин, фенилаланин. Желтый пигмент - «муконовая кислота» синтезируется в основную стадию метаболизма. Пигмент образуется в раннюю стационарную, позднюю экспоненциальную фазу роста [15].

Вреде и Хеттче первыми подробно изучили продигиозин [16]. Для получения продигиозина из клеток *S. marcescens*, они применили метод щелочного разрушения. Экстрагировали продигиозин с помощью спирта и

нефтяного эфиrom (петролейный эфир). В результате анализа экстракта, была установлена эмпирическая формула $C_{20}H_{25}N_3O$ (Mr 323,4).

Окончательную формулу продигиозина в виде пиррилдипиррилметена установили Рапопорт и Холден [17] (рис. 1.1).

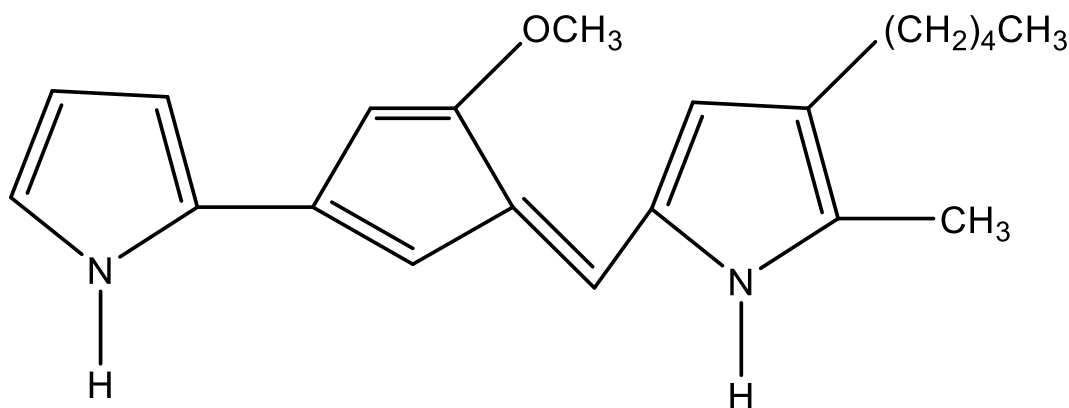


Рисунок 1.1 – структурная формула продигиозина

Продигиозин является легко окисляемым веществом и на воздухе образует сerratин $C_{40}H_{60}N_4O_6HClO_4$. Пигмент способен находится в двух вариантах, при наличии в растворе разных концентрации ионов водорода, в кислых и нейтральных питательных средах пигмент окрашивается в красный цвет, с спектральным максимум при 535-540 нм. В среде со щелочью у пигмента имеется оранжево-желтый цвет, в этом случае пигмент имеет спектральный максимум при 470 нм.

У бактерии в клеточной оболочке пигмент может находиться в виде нескольких форм, каждая из форм имеет пиррилдипиррилметеновую структуру, но имеет отличия в боковых цепях и агрегацией молекул пигмента.

Проведенный спектральный анализ пигмента в УФ-областях показал наличие максимумов при 370 - 135 - 120 - 75 - 66 нм. Для пиррольного кольца было характерно, поглощение при 100 - 150 и 300 - 310 нм, а для метиленовых и метальных групп, был характерен спектр поглощения 270 – 290 нм, поглощение при 310 нм. было выявлено для метеновой группы [6].

В результате представленных данных [6] можно сделать вывод, что пигментный препарат, выделенный из *S. marcescens*, является комплексом, состоящим из 6 различных фракций, имеющих разные спектры поглощения, но приблизительно одинаковые характеристики с нативным пигментом.

1.3 Перспективное применение продигиозина

Продигиозин является алкалоидным и натуральным красным пигментом, вырабатываемым *Serratia marcescens*. Продигиозин обладает антимикробными, противомаларийными и противоопухолевыми свойствами и индуцирует апоптоз в Т- и В- лимфоцитах. Эти свойства вызвали интерес исследователей в области медицины, фармацевтики и различных отраслей промышленности [18]. Целью исследования [18] было оценить антимикробную активность продигиозина в отношении патогенных микроорганизмов. Красные пигменты, продуцируемые *S. marcescens*, проявляли поглощение при 534 нм, Rf 0,59 и молекулярную массу 323. Антимикробная активность была протестирована на устойчивость к оксациллину *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter sp.* и устойчивый к оксациллину *S. aureus*. Стандартными антибиотиками были ампициллин, хлорамфеникол, гентамицин и оксациллин. Дисковые диффузионные тесты показали значительные зоны ингибирования для *S. aureus* ($35 \pm 0,6$), *E. Faecalis* ($22 \pm 1,0$) и *S. pyogenes* ($14 \pm 0,6$). Однако продигиозин проявлял устойчивость к кишечной палочке, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter*, где не наблюдалось значительного образования ингибирующих ореолов. Также были определены минимальные ингибирующие и бактерицидные концентрации для 20 штаммов устойчивых к оксациллину *S. aureus*. Образцом был антибиотик оксациллин. Наблюдаемые минимальные ингибирующие концентрации составляли 1, 2 и 4,0 мкг/мл, соответственно, в то время как минимальные бактерицидные концентрации составляли 2, 4, 8 и 16 мкг/мл. Продигиозин *S. marcescens* показал бактерицидное и бактериостатическое действие, также антимикробную активность [18].

Продигиозин – перспективный противоопухолевый препарат. В западном мире рак ободочной и прямой кишки представляет собой одну из самых частых злокачественных опухолей и одну из чаще всего встречающихся причин смерти от рака. Его лечение является сложным процессом, и задача онкологов состоит в том, чтобы найти новые химические вещества с меньшей токсичностью и большей эффективностью, чем те, которые используются в современной химиотерапии. Охарактеризовано апоптотическое действие продигиозина в клетках рака толстой кишки. Клетки аденокарциномы толстой кишки человека DLD-1 и SW-620, незлокачественные клетки NRK и Swiss-3T3 анализировали с помощью анализа МТТ, картины фрагментации ДНК, окрашивания Hoechst 33342 и исследования расщепления PARP вестерн-блоттингом для характеристики продигиозина [19].

Продигиозин был очищен, и его структура была подтверждена. Метастатические клетки SW-620 были более чувствительны к продигиозину (IC_{50} : 275 нМ), чем DLD-1. Мы не наблюдали значительного снижения жизнеспособности клеток NRK. Было подтверждено, что продигиозин индуцирует апоптоз в обеих линиях раковых клеток с помощью характерного паттерна лестничной ДНК и конденсированных ядер или апоптотических тел, идентифицированных с помощью флуоресцентной микроскопии. Эти результаты показывают, что продигиозин вызывает апоптоз в клетках рака толстой кишки [19].

1.4 Источники пигментов

Природные пигменты могут быть получены из двух основных источников: растений [20] и микроорганизмов [21]. Природные пигменты растений имеют несколько недостатков, таких как нестабильность к свету, нагревание или неблагоприятный уровень pH, низкая растворимость в воде и часто они не бывают доступны в течение года. Но микробные пигменты представляют большой интерес благодаря стабильности полученных пигментов и простоте культивирования [22]. Микроорганизмы легко и быстро растут в

дешевой культуральной среде и производят пигменты различных цветовых оттенков. Следовательно, производство микробных пигментов в настоящее время является одной из новых областей исследований. Пигменты являются либо органическими / неорганическими, либо натуральными / синтетическими. Структурное сходство, и естественная встречаемость биологических пигментов была использована в качестве основы классификации биологических пигментов [13].

1.5 Факторы, влияющие на выработку продигиозина

Продигиозин, вторичный метаболит, в ходе роста бактерии пигмент появляется только на более поздних стадиях развития [23]. На производство продигиозина влияют несколько факторов окружающей среды, наличие неорганического фосфата, состав среды, температура и pH [24]. Ряд дифференциальных и селективных сред был использован для выделения и производства пигмента из *Serratia, spp.* Наиболее оптимальными жидкими питательными средами, используемыми в настоящее время для биосинтеза продигиозина, являются питательный бульон [25], пептон-глицериновый бульон.

Сравнительное исследование интенсивности выделения продигиозина *S. marcescens* на разных питательных средах было проведено с использованием порошкообразных семян кунжута в воде, питательного бульона и пептон-глицеринового бульона. На семенах кунжута наблюдался лучший выход продигиозина. Далее легко доступны более дешевые источники: кунжутное масло, арахисовое масло и кокосовое масло. Они были оценены наряду с основными средами. В питательном бульоне максимальный выход продигиозина была получен при (28 и 30) °C. Однако при 37 °C, *S. marcescens* не продуцировала пигмент в питательном бульоне, образовавшиеся колонии были обычного цвета. При использовании арахисового бульона наблюдалось образование пигмента даже при 37 °C, которое количественно было равно количеству, производимому в питательном бульоне при 30 °C. Выработка пигмента, усиливалась в бульоне

из семян кунжута даже в отсутствие каких-либо сахаров. Глюкоза и мальтоза в порошкообразной среде из семян кунжута подавляли выработку продигиозина как при 28 °C, так и при 30 °C [26].

Максимальный синтез продигиозина был зафиксирован при температуре от 22 до 30 °C. PigC - концевой конденсирующий фермент в бифуркационном пути, зависящий от температуры, и пониженный биосинтез пигмента хорошо задокументирован при более высоких температурах. Температура >30 °C денатурирует PigC и образование красного пигмента не происходит. При температуре <22 °C отсутствие образования пигмента обусловлено низкой активностью фермента PigC. Интересно, что производство пигмента восстанавливается при переходе от более высокой температуры (37 °C) к более низкой температуре (30 °C) скорее всего, это результат ренатурации PigC, которая восстанавливает его ферментативную активность [27].

1.6 Культивирование продуцента и определение продуктивности

Для получения продигиозина продуцент можно культивировать на плотных и жидких питательных средах, в том числе с использованием колбы Эйленмейера. Культуральную жидкость в колбах оставляют на шейкере, на 2-3 суток при комнатной температуре. При культивировании бактерий на твердых питательных средах, можно использовать одинаковый объем питательной среды и выращивать продуцента в одинаковых условиях. Для контроля роста *S. marcescens* используют анализ оптической плотности и вес сухой биомассы. Использование УФ-спектроскопии позволяет измерить оптическую плотность культуральной жидкости. Сухую биомассу получают при температуре 105 °C. После высушивания культуральной жидкости полученную биомассу бактерий заливают индием и гидроксидом натрия. После кипятят на водяной бане в течение 1 часа, далее экстрагируют пигмент 96%-ым этанолом, или подкисленным этанолом на шейкере в течение 3-х часов. Выход пигмента рассчитывают на 1л среды или к величине сухой биомассы [6].

1.7 Экстракция продигиозина из культуральной жидкости

Пигмент находится клеточной оболочке бактерий и нерастворим в воде. Для экстрагирования продигиозина из клеток продуцента были использованы различные методы.

В своих работах Вильяме [28] осаждал клетки *S.marcescens* центрифугированием, далее пигмент вымывали водой и экстрагировали ацетоном. Метод Хаббарда и Римингтона заключался в разрушении клеточной оболочки продуцента кипячением на водяной бане с добавлением гидроксида индия (III) в течение 1 часа, после проводили экстракцию этанолом. Для отделения пигмента от водорастворимых примесей и этанола, экстрагировали петролейным эфиром до перехода продигиозина из спирта в эфир, далее высушивали на водяной бане. Определение количества пигмента растворяли в подкисленном этаноле (10 мл этанола + 1 мл HCl), 1 мг продигиозина на 1 мл растворителя при длине волны 535 нм дало поглощение 51500 опт.ед.

Метод экстракции продигиозина предложенный Трутко и Акименко [29] заключался в использовании кислого метанола (1:9), взвесь клеток *S. marcsecsens* инкубируют с метанолом при комнатной температуре, в течение 10-15 минут на шейкере.

Монтанер с соавторами [30] предлагали проводить экстракцию пигмента кислым метанолом в соотношении метанола к HCl 24:1. Соле и Франсия [31] использовали до 96 мл метанола к 4 мл HCl .

Индийские исследователи [32] разработали свой метод экстракции. Клетки продуцента осаждают центрифугированием при 10 000 оборотах в течение 15 минут. Пигмент из надосадочной жидкости экстрагировали этилацетатом, а из клеток при помощи ацетона. Затем полученные фракции смешивают, в избытке добавляют сульфат натрия и далее экстракт высушивают. Оптический спектр снимают в диапазоне волн от 200 до 700 нм. Пигмент перегоняют, при помощи ТСХ в системе растворителей

дихлорметан:хлороформ:ацетон (2.5:2.5:0.5). Красную фракцию продигиозина идентифицируют при 535 нм.

Продигиозин из клеток продуцента можно получить экстракцией ацетоном, далее высушивают надосадочную жидкость в вакуумном шкафу, затем растворить в хлороформе, доведенным 1 М HCl до pH=3.

В работе Томсона пигмент экстрагировали из везикул клеток изопропиловым спиртом, без использования щелочи и растворителей [6].

1.8 Очистка продигиозина

Продигиозин экстрагировали из бактериальной биомассы с использованием подкисленного этанола до обесцвечивания биомассы клеток бактерии, далее упаривали при 45–50 °C, оставшиеся клетки заново растворяли в хлороформе.

В раствор добавляли смесь вода:этанол (4:1), после этого один час перемешивали на магнитной мешалке, при комнатной температуре. Растворенные в воде побочные продукты отделяли с помощью делительной воронки, после сушили в вакуумной сушилке и заново заливали этанолом. Жидкостную хроматографию проводили для отделения веществ, в стеклянной колонке заполненную силикагелем. Пигмент из раствора наносили на поверхность сорбента и элюировали из колонки последовательно гексаном-ацетоном 3:1, затем ацетоном. Продигиозин дополнительно очищали с помощью ПТСХ на стеклянных силикагелях 60 F254, использовали гексан:этиловый эфир:уксусную кислоту (70:30:1). Одиночные пигментные полосы снимали с пластин, далее промывали силикагель используя последовательно растворители в порядке: 96%-ый этанол, хлороформ, ацетон [33].

1.9 Характеристика красного пигмента

Изучение характеристик выделенной красной фракции проводили с использованием спектрофотометрии (УФ), спектрофотометра, с поглощением, определенным в диапазоне 200–700 нм. Молекулярную массу образца определяли с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ/МС),

масс-спектрофотометра. Масс-спектрометрию типа следует использовать, когда известен масс-спектр соединения в случае продигиозина и его производных, согласно литературным данным. Полученные данные сравнивали со значениями массы, зарегистрированными в компьютерной библиотеке значений [18].

1.10 Пигментообразование бактерии и анализ спектров поглощения

Состав питательной среды влияет на пигментообразование бактерии. Культивирование микроорганизмов на среде с использованием ацетата и культивирование на глицерин-пептонной среде, показало наличие у продуцента красной и желтой окраски. Также рН среда влияет на образование пигмента. Пигмент полученный на глицерин-пептонной среде имел красный и желтый цвета с максимальными областями поглощения при 535 и 460–470 нм. Спектр поглощения пигмента в естественном виде отличался от спектра, растворенного в этаноле, и был представлен как схожий спектр в присутствии дополнительного максимума поглощения при 500 нм. Чувствительность пигмента к низкоинтенсивному видимому свету зависела от растворимости белка. Чувствительность пигмента с нативным белком идентична с фоточувствительностью продигиозина в составе нетронутой бактериальной клетки. Экстракция пигмента при помощи денатурации показывало меньшую чувствительность к освещению. Красный и желтый пигмент в растворе флуоресцировала при 560–565 нм; флуоресцирование красной фракции *in vivo* была ярко выраженной [34].

1.11 Аналоги продигиозина

В исследованиях было выявлено [6], что также другие микроорганизмы при оптимальных условиях способны синтезировать продигиозинподобные пигменты. Продигозин является представителем группы полипиррольных пигментов, которые образуются отдельными группами бактерий, некоторые штаммы *Streptomyces* и *Serratia*. Пигменты характеризуются одинаковым пиррилдипиррилметеновым скелетом. Из мицелия бактерии *Streptomyces coelicolor* был получен пигмент, напоминающий по своей структуре

продигиозин. Формула пигмента ($C_{25}H_{35}N_3O$), отличалась на пять CH_2 -групп от продигиозина. Из актиномицета *Streptomyces rubriraeticuli* был получен пигмент, схожий с продигиозином. Результаты естественного анализа пигмента были схожи с ранее предложенной формулой $C_{25}H_{35}N_3O$, однако, спектры поглощения пигмента отличались от спектров пигмента, описанных в литературе.

Был получен аналог продигиозина из *Act. longisporus ruber* — «продигиозин С - 25». Строение этого пигмента также соответствует пиррилдипиррилметену, который несет в себе метокси-группу. Однако, имеется отличие в фрагменте С где нет метильного радикала. В молекуле аналога продигиозина установлена алифатическая боковая цепь $C_{11}H_{23}$. Также аналог отличается по своим физическим свойствам, от описанных выше гомологов продигиозина. Было изучено строение аналога продигиозина от японских ученых, который содержал на пять CH_2 групп больше, чем обычный продигиозин. Васерман установил для этого пигмента формулу (рис.1.2). Соединение было названо ундецилпродигиозином.

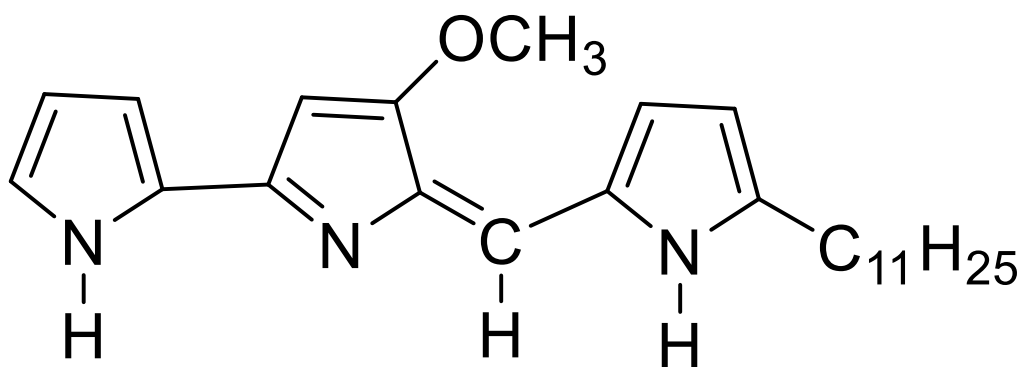


Рисунок 1.2 - структурная формула ундецилпродигиозина

Из штамма *A. longisporus ruber* был выделен второй продигиозинподобный пигмент - метациклопродигиозин, имеющий необычную структуру не характерную для природных продуцентов (рис.1.3).

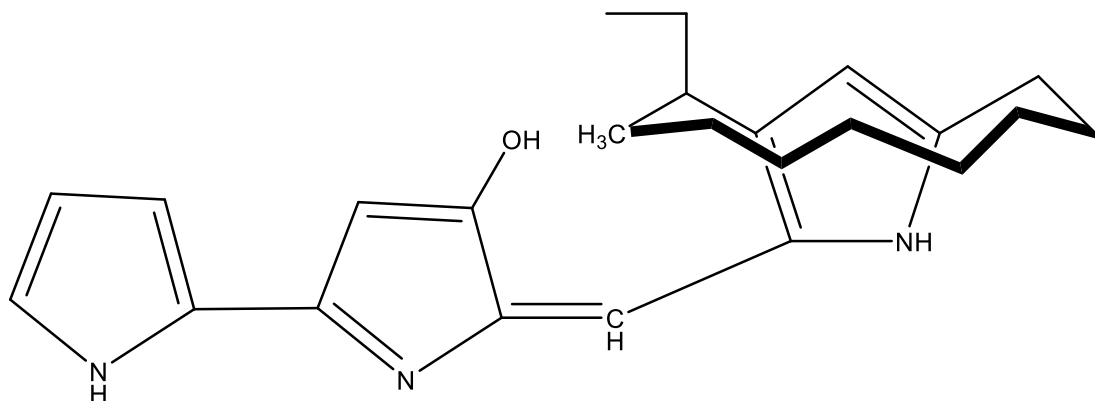


Рисунок 1.3—структурная формула метациклопиррола

Также наличие продигиозинподобных пигментов было обнаружено у *A. aureoverticillatus* и *A. longissimus rameus*.

Таким образом, продигиозин – краситель микробного происхождения, доступный в природе. Он имеет большой спектр областей применения, включая медицину и тяжелую промышленность. Усовершенствование продуцентов продигиозина, способов его выделения и очистки является весьма перспективным направлением в биотехнологии.

2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования является красный внутриклеточный пигмент, продуцируемый бактерией *S. marcescens* – продигиозин. Продигиозин, красный линейный трипиррольный пигмент, секретируется *Serratia marcescens* в качестве вторичного метаболита.

2.1 Описание бактерии рода *Serratia*

Прямые палочки (0,5-0,8 x 0,9-2,0 мкм), грамотрицательны, подвижны (перитрихи). Имеют О-, Н-антигены. Являются факультативные анаэробами, Способны получать энергию в результате аэробного дыхания и путем анаэробного окисления органических субстратов. Хорошо растут при 30 – 37°C. Катаболизируют D – глюкозу и другие углеводы с образованием кислоты и газа. Большинство штаммов положительные по лизиндекарбоксилазе, отрицательные по аргининдигидролазе и положительные по орнитиндекарбоксилазе. В таблицах 2.1, 2.2, 2.3 приведены дифференциальные признаки рода *Serratia* [35].

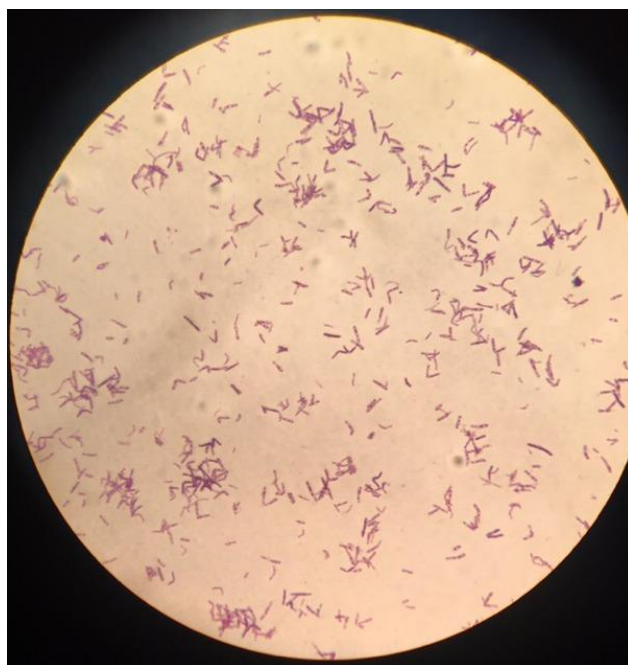


Рисунок 2.1 – Препарат автора, окраска по методу Грама. Иммерсионная микроскопия, ув. $\times 1000$.

Таблица 2.1 – Дифференциальные признаки рода *Serratia*

Признак	Наличие+ / Отсутствие -
Реакция Фогеса - Проскауэра	+
Гидролиз мочевины	-
Гидролиз желатины	+
Использование малоната	-
Дезоксирибонуклеаза	+
Липаза (кукурузное масло)	+
D-глюкоза, образование кислоты в присутствии иодацетата, 0,001 М	+

Таблица 2.2 – Дифференциальные признаки рода *Serratia* от биохимически сходных таксонов

Признак	Наличие+ / Отсутствие -
Источники углерода	+
4-аминобутират	
5-аминовалерат	-
аргинин	-
капринат, капроат и каприлат	+
D-дульцитол	-
L-фукоза	+
тагатоза	-
тирозин	+
Гидролиз трибутирина	+
Глюконат, образование восстанавливающих соединений	+
Гидролиз пектата	-

Таблица 2.3 – Дифференциальные признаки *S. marcescens* по отношению к роду *Serratia*

Признак	Наличие+ / Отсутствие -
Реакция Фогеса – Проскауэра	+
Лизиндекарбоксилаза	+
Аргининдигидролаза	-
Орнитиндекарбоксилаза	+
Гидролиз желатины	+
Использование малоната	-
Образование кислоты из	
L-арабинозы	-
целлобиозы	-
дульцитола	-
лактозы	-
мелибиозы	-
рафинозы	-
L-рамнозы	-
D-сорбитола	+
сахарозы	+
D-ксилозы	-
α – Метил – D - глюкозид	-
Дезоксирибонуклеаза	+
Липаза	+
Пигмент (красный, розовый, оранжевый)	+

2.2 Питательные среды

Для получения «дикого» штамма *S. marcescens* использовалась коммерческая среда ГРМ-агар следующего состава: панкреатический гидролизат рыбной муки - 12,0 г/л, Пептон сухой ферментативный - 12,0 г/л, Натрия хлорид - 6,0 г/л, Агар микробиологический - 10,0±2,0 г/л.

«ГРМ-агар» - используют для получения различных бактерий. Среда предназначена для получения бактерий семейства энтеробактерий, синегнойной палочки, стафилококков. Питательная среда представляет собой порошок светло-желтого цвета.

Для культивирования продуцента использовалась коммерческая среда ГРМ № 9 следующего состава: панкреатический гидролизат рыбной муки - 20,0 г/л, калий сернокислый – 10,0 г/л, магний хлористый 1,4 г/л, экстракт пекарных дрожжей 2,0 г/л, агар – 10,0±3,0 г/л. Представляет собой мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-желтого цвета.

2.3 Реактивы

Этанол (этиловый спирт) – представляет собой бесцветную прозрачную жидкость, формула этанола C_2H_5OH . При естественных условиях летучая, горючая жидкость. Молекулярная масса 46,069 а.е.м., температура плавления - 114,15 °С. Этанол является дезинфицирующим средством. Температура кипения 78,39 °С.

Изопропиловый спирт (пропанол-2, изопропанол, диметилкарбинол) – бесцветное жидкое вещество, имеет резким запах. Температура плавления - 89,5 °С, температура кипения 82,4 °С, плотность 0,7851 г/см³ (при 20 °С). Растворим в ацетоне и бензоле. В концентрации с водой 75 % используется как дезинфицирующее средство. Раздражает кожу и слизистые оболочки.

Ацетон – представитель кетонной группы. Органическое соединение, формула $CH_3-C(O)-CH_3$. Бесцветная летучая жидкость с резким запахом. Молярная масса 58,08 г/моль, температура плавления -95°С, температура кипения 56,1 °С. Является хорошим растворителем.

Гексан - насыщенный углеводород C_6H_{14} . Бесцветная жидкость, оказывает наркотическое действие. Молярная масса 86,18 г/моль, температура плавления -95 °С, температура кипения 68 °С.

Этиловый эфир - по химическим свойствам типичный алифатический простой эфир. Бесцветная, прозрачная, очень подвижная, летучая жидкость со своеобразным запахом и жгучим вкусом. Широко используется в качестве растворителя. Химическая формула: $C_4H_{10}O$, молекулярная масса: 74,12 г/моль, температура плавления – 116 °С, температура кипения 34,65 °С.

Уксусная кислота (этановая кислота) CH_3COOH — органическое соединение, слабая, предельная одноосновная карбоновая кислота. Химическая формула: $C_2H_4O_2$, молекулярная масса: 60,05 г/моль, температура плавления – 16,75 °С, температура кипения 118,1 °С. Уксусная кислота представляет собой бесцветную жидкость с характерным резким запахом и кислым вкусом.

2.4 Выделение «дикого» штамма *S. marcescens*

«Дикий» штамм *S. marcescens* получали из воздуха рабочих помещений в учебно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры Биотехнологии и органической химии. Для получения культур клеток производили посев воздуха на чашки Петри, со заранее приготовленной питательной средой ГРМ-агар (рис.2.2). Рост колоний бактерий отмечали на 2-3 сутки после посева воздуха (рис. 2.3), при комнатной температуре.

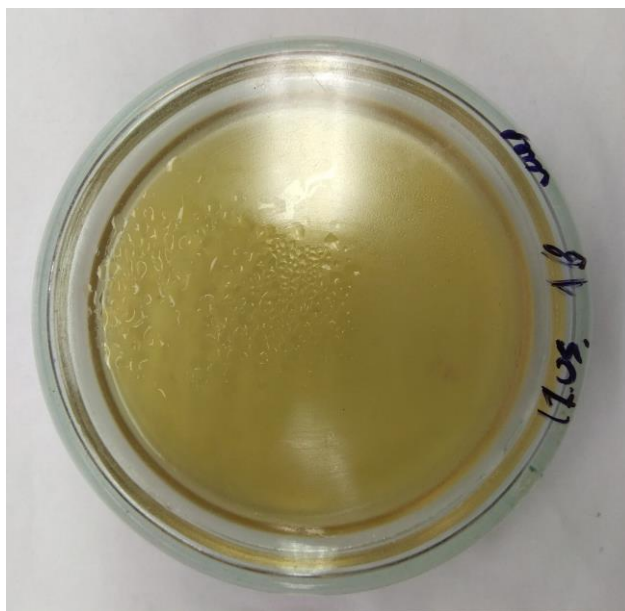


Рисунок 2.2 – посев воздуха на среду ГРМ-агар



Рисунок 2.3 – рост колоний бактерий на 2 сутки после посева воздуха

2.4.1 Идентификация *S. marcescens*

Для идентификации бактерии сделали окраску по Граму (рис. 2.1) [36].

Приготовление мазка:

Приготовление состоит из нескольких последовательных операций: подготовка мазка, высушивание, фиксация и окраска. Исследуемый материал наносят на чистое обезжиренное предметное стекло. Для взятия бактериальной культуры:

- 1) нагревают до покраснения бактериальную петлю в пламени горелки;
- 2) берут чашку Петри с исследуемой культурой в левую руку так, чтобы видеть поверхность среды;
- 3) приоткрывают чашку возле пламени огня горелки осторожно вводят петлю и берут исследуемый материал;
- 4) вынимают петлю;
- 5) на предметное стекло предварительно наносят каплю стерильного физиологического раствора
- 6) взятый материал осторожно распределяют по предметному стеклу тонким слоем, после чего бактериальную петлю стерилизуют в пламени спиртовки;
- 7) мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в токе теплого воздуха, держа предметное стекло высоко над пламенем горелки. Нельзя допускать закипания материала, т.к. при этом может нарушиться структура микроорганизмов.
- 8) фиксация препарата: высушенные мазки подвергают термической (предметное стекло (мазком вверх) проводят несколько раз через пламя горелки) или химической (фиксирующие растворы: формалин, спирты, глутаральдегид, жидкость Карнау, ацетон, пары осмиевой кислоты) обработке, в результате которой бактерии погибают и плотно прикрепляются к поверхности стекла.

Метод окраски по Граму:

1. На фиксированный мазок накладывают небольшие кусочки фильтровальной бумаги и наливают основной краситель - генцианвиолет или метиленовый синий.
2. Спустя 3-5 минут снимают окрашенную фильтровальную бумагу и заливают мазок раствором Люголя на 1 минуту. При этом препарат темнеет.
3. Сливают раствор Люголя и обрабатывают мазок чистым этиловым спиртом: капают несколько капель на препарат, спустя 20 секунд сливают. Процедуру повторяют 2-3 раза.
4. Промывают стекло с исследуемым препаратом дистиллированной водой.
5. Производят дополнительное окрашивание - докрашивают препарат фуксином. Спустя 1-2 минуты краситель смывают.
6. После высыхания воды изучают мазок под микроскопом. Грамположительные бактерии будут иметь сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные - розовый или красный.

Полученная культура соответствовала морфологическим [35] и тинкториальным характеристикам *S. marcescens*.

2.4.2 Культивирование продуцента

Для получения изолированной культуры клеток *S. marcescens* использовали метод Дригальского. Способ Дригальского довольно широко используется в исследовании биологического материала путем разведения культур в пробирке с бульоном либо с физиологическим раствором.

Следующий этап: одну каплю полученного раствора при помощи стерильного шпателя из стекла распределяют равномерно по поверхности среды питания в 1-ой чашке. Потом, не прожигая шпатель на огне, делают им же посев на 2-ой и 3-ей чаше. Суть метода Дригальского заключается в том, что с каждым последующим посевом культур концентрация бактерий (аэробов) все меньше. На 3-ей чашке они распределяются довольно обособленно, каждая

бактериальная клетка при этом дает клональные клетки (в виде изолированной колонии). Их пересевают на скошенный агар для накопления возбудителей [37].

Рост культуры клеток, выделенных по методу Дригальского наблюдался на 2-3 сутки. Колонии имели округлую форму, гладкую поверхность, профиль – каплевидный, цвет колонии – желто-оранжевый, консистенция – хрупкая. Культуральные признаки соответствовали справочным данным [35].

Посев «дикого» штамма на среду ГРМ №9 объемом 500 мл производили микробиологической петлей при соблюдении условий стерильности, посевным материалом служила изолированная двух суточная культура клеток со среды ГРМ-агар. Культивирование проводили при одинаковых условиях с учетом размеров чашек Петри и объема сред в них. Культивировали микроорганизмы в течение 2-3 суток при комнатной температуре, в отсутствии света. Полученные после двух-, трех- дневного культивирования, колонии продуцента пигмента анализировали и проводили экстракцию.

2.5 Получение пигмента и его экстракционная очистка

Пигмент получали из 2-х суточной культуры клеток *S. marcescens*. Для этого биомассу деликатно удаляли с поверхности чашки Петри, далее пигмент экстрагировали, в качестве растворителя использовали этанол. Экстракт помещали на шейкер до полного обесцвечивания биомассы, после центрифугировали и повторно заливали этанолом для выделения оставшихся пигментов. При помощи УФ-спектроскопии определили максимальную область поглощения вещества.

Для получения пигмента этанольный экстракт выпаривали с помощью вакуумно-роторного испарителя, для полного высушивания пигмента использовали вакуумно-сушильный шкаф.

Высушенный пигмент растворяли в метаноле и подвергали тонкослойной хроматографии, используя силикагель (ПТСХ-АФ-В-УФ) в качестве адсорбента. Элюирование проводили с использованием системы

гексан — этиловый эфир - уксусная кислота в соотношении 70:30:1 (об/об/об).

Далее измеряли величины R_f полученных полос.

5 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

5.1 Предпроектный анализ

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Ярко-красный пигмент продигиозин, синтезируемый энтеробактериями *Serratia marcescens*, представляет собой линейный тетрапиррол, является вторичным метаболитом. В промышленности продигиозин рекомендуется в качестве красителя для полимеров, поскольку он обладает рядом преимуществ по сравнению с применяемыми в настоящее время органическими и неорганическими пигментами. Известен способ использования продигиозина для маркирования нефтепродуктов. Пигмент хорошо растворим в различных марках топлива и легко обнаруживается по характерному спектру поглощения. Продигиозин и продигиозинподобные пигменты в медицине, рассматриваются как новое семейство противоопухолевых лекарственных препаратов. Показано, что продигиозин действует, как иммунодепрессант, селективно блокируя пролиферацию Т-клеток киллеров, избирательно индуцирует апоптоз различных типов злокачественных клеток, ингибирует образование метастаз.

В связи с большой практической значимостью продигиозина возникает необходимость в выработке больших количеств пигмента и снижении его стоимости.

5.1.2 Диаграмма Исикавы

Если на предприятии имеется проблема, необходимо выявить и проанализировать причины ее возникновения, а также пути устранения. Существует графический метод анализа причин проблемы и последующего графического представления - диаграмма Исикавы (рис.5.1.2.1).

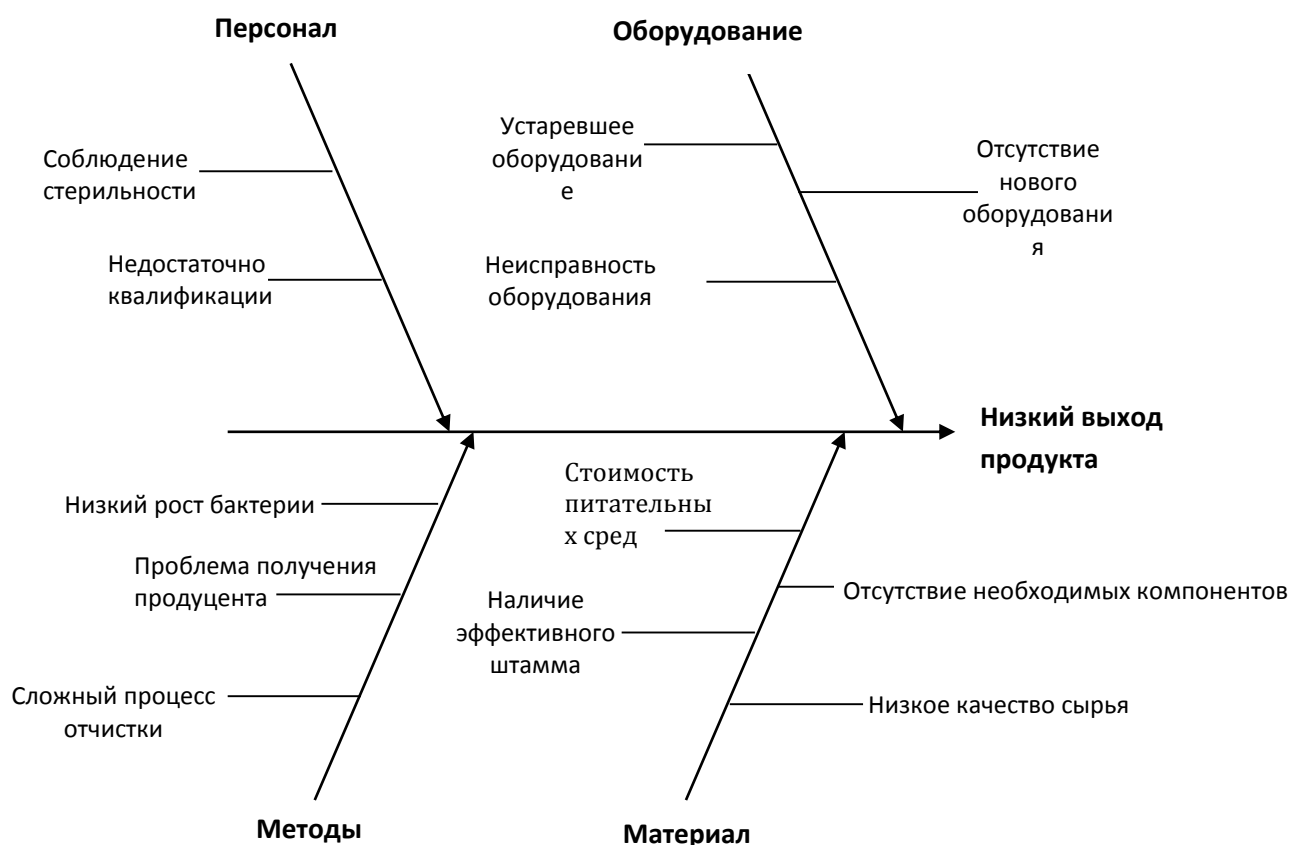


Рисунок 5.1.2.1 – Диаграмма Исикавы

5.1.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации

На какой бы стадии жизненного цикла не находилась научная разработка полезно оценить степень ее готовности к коммерциализации и выяснить уровень собственных знаний для ее проведения (или завершения). Для этого необходимо заполнить специальную форму, содержащую Показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенциям разработчика научного проекта представлены в таблице – 5.1.3.1.

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i, \quad (1.1)$$

где $B_{\text{сум}}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению;
 B_i – балл по i -му показателю.

Таблица 5.1.3.1 - Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

№ п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1.	Определен имеющийся научно-технический задел	4	4
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического раздела	5	5
3.	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	4
4.	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	5	4
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	3	3
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	3
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	2	2
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	0	0
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	4	3
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	1	1
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	3	3
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	3	3
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	3	3
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	1	1
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	1	1
	ИТОГО БАЛЛОВ	43	40

Критерии для сравнения и оценки ресурсоэффективности и ресурсосбережения, подбираются, исходя из выбранных объектов сравнения с учетом их технических и экономических особенностей разработки, создания и эксплуатации. Позиция разработки и конкурентов оценивается по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая

позиция, а 5 – наиболее сильная. Веса показателей, определяемые экспертным путем, в сумме должны составлять 1.

По результатам оценки готовности научного проекта к коммерциализации можно сделать вывод о том, что перспективность разработки на среднем уровне.

5.1.4 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

В качестве способа коммерциализации результатов научно-технического исследования выбран метод передачи интеллектуальной собственности в уставной капитал предприятия. Такой метод наиболее выгоден, так как объектом коммерциализации являются технология получения красного внутриклеточного пигмента - продигиозина.

5.2. Инициация проекта

В данном разделе документируются бизнес-потребности, текущее понимание потребностей заказчика проекта, а также результаты исследования, которые планируется создать, и использовать для разработки препарата.

5.2.1 Цели и результат проекта

Поставленные цели проекта и планируемые результаты по созданию продигиозина представлены в таблице – 5.2.1.1.

Таблица 5.2.1.1 - Цели и результат проекта

Цели проекта:	Получение красного внутриклеточного пигмента бактерии <i>S. marcescens</i> . Получение штамма продуцента, идентификация, культивирование и очистка культуральной жидкости.
Ожидаемые результаты проекта:	Получение красного пигмента продигиозина, его идентификация. Определение наиболее оптимальной питательной среды для культивирования бактерии.
Критерии приемки результата проекта:	Предоставление методики выполнения исследований, достоверность и объективность данных, анализ результатов проекта.
Требования к результату проекта:	Получение красного внутриклеточного пигмента продигиозина, установление структуры пигмента.
	Наличие данных о оптимальной среде для культивирования <i>S. marcescens</i> .
	Определение наиболее оптимальных методов очистки пигмента из культуральной жидкости.
	Воспроизводимость результатов исследования.

Для реализации проекта необходимо оценить спрос на разработку и ожидания потребителей (Таблица 5.2.1.2).

Таблица 5.2.1.2 - Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Научно-исследовательские центры и клиники	Новые экспериментальные данные о синтезе продигиозина
Магистр	Исследование полученного пигмента
Научный руководитель	Руководство над проектом
Пациенты (в медицине)	Является противораковым препаратом
Нефтяные компании	Пигмент является маркером для нефтепродуктов

5.2.2 Организационная структура проекта

Информация о членах рабочей группы данного проекта и роль каждого участника и его функции представлены в таблице – 5.2.2.1.

Таблица 5.2.2.1 - Рабочая группа проекта

№ п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, час.
1	Сапарханов А.Н.	магистрант	Биосинтез продигиозина	290
2	Чубик М.В.	Руководитель проекта	отвечает за реализацию проекта в пределах заданных ограничений по ресурсам	100
3	Криницына З.В., НИ ТПУ Отделение социально- гуманитарных наук, Доцент	Консультант по финансовому менеджменту, ресурсосбережению и ресурсоэффективности	отвечает за написание главы финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	2
4	Романова Светлана Владимировна, НИ ТПУ, старший преподаватель	Консультант по социальной ответственности	отвечает за написание главы социальная ответственность	2
ИТОГО:				394

5.2.3 Ограничения и допущения проекта

Ограничения проекта – это все факторы, которые могут послужить ограничением степени свободы участников команды проекта, а также «границы проекта» - параметры проекта или его продукта, которые не будут реализованных в рамках данного проекта (Таблица 5.2.3.1).

Таблица 5.2.3.1 - Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/ допущения
3.1. Бюджет проекта	
3.1.1. Источник финансирования	НИ ТПУ
3.2. Сроки проекта:	Сентябрь 2017 - Июнь 2019 года
3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом	Сентябрь 2017
3.2.2. Дата завершения проекта	Июнь 2019 года
3.3. Прочие ограничения и допущения*	ограничения по времени работы участников проекта

5.3 Планирование управления научно-техническим проектом

5.3.1. Иерархическая структура работ проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. На рисунке 5.3.1.1 представлена иерархическая структура работ по данному проекту.



Рисунок 5.3.3.1 - Иерархическая структура работ по проекту

5.3.2. Контрольные события проекта

В данном разделе представлена информация о ключевых событиях, включая их даты и результаты, которые должны быть получены по состоянию на эти даты, как показано в таблице - 5.3.2.1.

Таблица 5.3.2.1 – Контрольные события проекта

п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1.	Защита научно-исследовательской работы студента	24.12.2018	Получение отметки в зачетной книжке
2.	Защита преддипломной практики	31.05.2019	Получение отметки в зачетной книжке
3.	Предзащита ВКР	6.06.2019	-
4.	Защита ВКР	14.06.2019	Получение диплома

5.3.3. План проекта

Процесс планирования данного научного проекта включает определение видов работы, исполнителей и требуемое время для достижения запланированного результата проекта. При планировании проекта необходимо построить календарный график и диаграмму Ганта в качестве способа визуализации календарного плана. Линейный график представляется в виде таблицы (Таблица 5.3.3.1).

Таблица 5.3.3.1 - Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО)
1.1	Определение направления работы исследования	5	3.09.18	8.09.18	Сапарханов А.Н.
1.2	Определение целей и задач исследования	5	8.09.18	13.09.18	Сапарханов А.Н.
1.3	Составление календарных планов	1	13.09.18	14.09.18	Сапарханов А.Н.
2.1	Изучение литературных данных по теме исследования	7	15.09.18	22.09.18	Сапарханов А.Н.
2.2	Составление плана и методик эксперимента	14	22.09.18	6.10.18	Сапарханов А.Н.
2.3	Проведение культивирования микроорганизмов	90	6.10.18	4.01.19	Сапарханов А.Н.
2.4	Выделение и очистка пигмента	50	4.01.19	23.02.19	Сапарханов А.Н.
3.1	Обработка и анализ полученных экспериментальных данных	30	23.02.19	25.03.19	Сапарханов А.Н.
3.2	Визуализация данных эксперимента и составление выводов по данным эксперимента	10	25.03.19	4.04.19	Сапарханов А.Н.
3.3	Написание диссертации	57	4.04.19	31.05.19	Сапарханов А.Н.
Итого:		269	3.09.18	31.05.19	

В таблице – 5.3.3.2 строится календарный план-график на основе информации, представленной в таблице – 5.3.3.1. График строится для максимального по длительности исполнения работ в рамках научно-исследовательского проекта с разбивкой по месяцам и декадам (10 дней) за период времени дипломирования. При этом работы на графике следует выделить разной заливкой в зависимости от исполнителей, ответственных за ту или иную

работу. С помощью графика можно проследить выполнение работ, отклонение от сроков и определить исполнителей.

Таблица 5.3.3.2 - Календарный план-график проведения проекта по теме «Оптимизация выхода продигиозина при биосинтезе»

Вид работ	испольнители	Т _к , дн и	Продолжительность выполнения работ									
			сен	окт	но я	дек	ян в	фе в	ма р	ап р	ма й	
Определение направления работы исследования	Руководитель, магистрант	5										
Определение целей и задач исследования	Руководитель, магистрант	5										
Составление календарных планов	Руководитель, магистрант	1										
Изучение литературных данных по теме исследования	Магистрант	7										
Составление плана и методик эксперимента	Руководитель, магистрант	14										
Проведение культивирования микроорганизмов	Магистрант	90										
Выделение и очистка пигмента	Магистрант	50										
Обработка и анализ полученных экспериментальн ых данных	Магистрант, руководитель	30										
Визуализация данных эксперимента и составление выводов по данным эксперимента	Магистрант,руководитель	10										
Написание диссертации	Магистрант	57										

 - руководитель  - магистрант

5.3.4 Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования должно быть обеспечено полное и достоверное отражение всех видов планируемых расходов, необходимых для его выполнения. В процессе формирования бюджета, планируемые затраты группируются по статьям, представленным в таблице – 5.3.4.1.

Таблица 5.3.4.1 - Сырье, материалы, комплектующие изделия и покупные полуфабрикаты

Наименование	Марка, размер	Кол-во, Грамм	Цена за единицу, руб. за грамм	Сумма, руб.
Питательная среда	ГРМ-агар 9	250	11,9	2 989
Колба круглодонная	К-3-250-34	10	103.75	1030
Чашка Петри	150*15 мм	5	18	90
Перчатки медицинские стерильные	270-280 мм	40 пар в коробке	15	600
Цилиндр стеклянный	100 мм	3	15	45
Стакан стеклянный	1 литр	5	70	350
Стакан стеклянный	20 мл	5	50	250
Бумажные фильтры	10 см	1	50	50
Всего за материалы				5404
Транспортно-заготовительные расходы (3-5%)				270,2
Итого по статье C_m				5674,2

Таблица 5.3.4.2 - Специальное оборудование для научных работ

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудова- ния	Цена единицы оборудова- ния, тыс.руб.	Срок службы оборудова- ния, год	Общая стоимость оборудован- ия с учетом доставки и монтажа	Сумма амортизацио- нных отчислений за 1 год, руб.
1.	Шкаф вытяжной	1	52070	20	59880	433,74
2.	Шкаф ГП-40- ОХ ПЗ Сушильный	1	22944	15	26385	191,12
3.	Шкаф холодильный- морозильный MPR414F	1	145371	15	167176	1210,9
4.	Автоклав- полуавтоматич- ескийTuT-2340 МК 19л	1	104500	8	120175	870,5
5.	Весы аналитические AS/310/C/2	1	57260	5	65849	476,9
6.	Дистиллятор Д- 4	1	18230	8	20964	151,8
7.	Термостат ТС1- 20	1	16500	10	18975	137,44
8.	Спектрофлюор- иметр Флюорат-02- Панорама	1	413 472,00	10	475492,8	3444,22
9.	Холодильник лабораторный LiebherrLKv 3910	1	56 779,66	15	6529,85	472,9
	Итого	-	887126	-	1026263,9	7389,52

Нами была рассчитана амортизация с использованием линейного метода. Линейный метод расчета амортизации соответствует равномерному переносу стоимости основных фондов на стоимость готовой продукции, сумма амортизационных отчислений зависит от первоначальной стоимости приобретения основных средств. При этом методе рассчитывается ежемесячная

норма амортизации в зависимости от срока использования объекта основных фондов до полного списания его стоимости.

При применении линейного метода сумма начисленной амортизации за один месяц определяется по формуле:

$$A = C \cdot K, \quad (3.1)$$

$$K = \frac{1}{n} \cdot 100\% \quad (3.2)$$

A – сумма амортизационных отчислений за месяц;
 C – первоначальная стоимость оборудования;

K - норма амортизации в процентах к первоначальной стоимости оборудования;
 n - срок полезного использования объекта (в месяцах).

$$\text{Годовая норма амортизации } K = \frac{1}{10 \cdot 12} \cdot 100\% = 0,8333\%$$

$$\text{Ежемесячная сумма амортизации } A = \frac{887126 \cdot 0,833}{100} = 7389,7 \text{ рублей.}$$

$$\text{Ежегодная сумма амортизационных отчислений } 7389,7 \cdot 12 = 88676,4 \text{ рублей.}$$

Сумма ежемесячных амортизационных отчислений составит 7389,7 рублей
Таким образом, в целях исчисления налога на прибыль в состав расходов, связанных с производством и реализацией, будет включаться сумма амортизации по данному основному средству в размере 7389,52 рубля.

Основная заработная плата

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением проекта, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату.

$$C_{зп} = З_{осн} + З_{доп}, \quad (3.1)$$

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

$Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата.

Основная заработная плата ($Z_{\text{осн}}$) руководителя и инженера рассчитывается по следующей формуле (4.4.4):

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}}, \quad (3.2)$$

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

$T_{\text{р}}$ – продолжительность работ, раб. дн. (таблица 4.4.3);

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле (4.4.5):

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}}, \quad (3.3)$$

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; при отпуске в 48 раб. дней $M = 10,4$ месяца, 6-дневная неделя;

$F_{\text{д}}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дни (таблица 5.3.4.4).

Таблица 5.3.4.3 - Расчет основной заработной платы

№ п/п	Наименование этапов	Исполнители по категориям	Трудо-емкость, чел.-дн.	Заработная плата, приходящаяся на один чел.-дн., тыс.руб.	Всего заработная плата по тарифу (окладам), тыс. руб.
1.	Составление задания	Руководитель	4	592,36	2369,44
2.	Изучение литературы	Инженер	78	169,21	13198,38
3.	Выполнение экспериментальной части	Инженер	115	169,21	19459,15
4.	Обработка результатов	Инженер	30	169,21	5076,30
5.	Координация деятельности исполнителей работы	Руководитель	23	592,36	13624,28
Итого: 176346,07					

Таблица 5.3.4.4 - Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	44	48
- праздничные дни	14	14
Потери рабочего времени		
- отпуск	56	28
- невыходы по болезни	1	1
Действительный годовой фонд рабочего времени	250	274

Месячный должностной оклад работника:

$$З_{\text{м}} = З_{\text{б}} \cdot (k_{\text{пр}} + k_{\text{д}}) \cdot k_{\text{р}}, \quad (3.4)$$

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

$k_{\text{пр}}$ – премиальный коэффициент, (определяется Положением об оплате труда);

$k_{\text{д}}$ – коэффициент доплат и надбавок;

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

Таблица 5.3.4.5 - Расчёт основной заработной платы

Исполнители	З _б , руб.	k _р	З _м , руб	З _{дн} , руб.	Т _р , раб.дн.	З _{осн} , руб.
Руководитель	33664	1,3	43763,2	1820,54	53	96488,62
Инженер	26300	1,3	34190	1297,72	221	286796,12

Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:

$$З_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \cdot З_{\text{осн}} \quad (3.5)$$

где $З_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата, руб.;

$k_{\text{доп}}$ – (1,1)коэффициент дополнительной зарплат;

$З_{\text{осн}}$ – основная заработная плата, руб.

В таблице – 5.3.4.6 приведена форма расчёта основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 5.3.4.6 - Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	Руководитель	Инженер
Основная зарплата	96488,62	286796,12
Дополнительная зарплата	9648,86	-
Итого по статье $C_{\text{зп}}$	106137,48	286796,12

Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды:

$$C_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}}), \quad (3.6)$$

Где (0,271) $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

Таблица 5.3.4.7 - Отчисления во внебюджетные фонды

Заработная плата	Руководитель	Инженер
Основная зарплата	96488,62	286796,12
Дополнительная зарплата	9648,86	-
Отчисления во внебюджетные фонды	28763,25	-
Итого по статье $C_{внеб}$	134900,73	286796,12

Накладные расходы

Расчет накладных расходов ведется по следующей формуле (3.7):

$$C_{накл} = k_{накл} \cdot (З_{осн} + З_{доп}), \quad (3.7)$$

Где (0,7) $k_{накл}$ – коэффициент накладных расходов.

На основании полученных данных по отдельным статьям затрат составляется калькуляция плановой себестоимости НТИ "Оптимизация выхода продигиозина при биосинтезе" (Таблица 5.3.4.8).

Таблица 5.3.4.8 – Накладные расходы

Заработная плата	Руководитель	Инженер
Основная зарплата	96488,62	286796,12
Дополнительная зарплата	9648,86	-
Накладные расходы	74296,23	200757,28

Итоговые затраты на проект

Статьи затрат	Затраты, руб.
Материальные затраты на сырье, материалы	5674,2
Материальные затраты на оборудование	887126
Заработная плата	392933,6
Отчисления на социальные нужды	28763,25
Накладные расходы	275053,51
Итого	1589550,56

5.3.5 Организационная структура проекта

В практике используется несколько базовых вариантов организационных структур: функциональная, проектная, матричная. Поскольку степень

неопределённости условий реализации текущего проекта и его сложность являются высокими и в связи с новизной предлагаемой технологии данное исследование имеет проектную организационную структуру.



Рисунок 5.3.5.1 — Проектная структура проекта «Оптимизация выхода продигозина при биосинтезе»

5.3.6 Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности

Таблица 5.3.6.1 — Матрица ответственности

Этапы проекта	Руководитель	Магистрант	Эксперт по биоинформатике	Консультант «Финансовый менеджмент»	Консультант «Социальная ответственность»	Консультант «Английский язык»
Определение направления, целей и задач работы исследования	И,У	И	С			
Составление календарных планов	У	И,О				
Изучение литературных данных по теме исследования	У,С	И				
Составление плана и методик эксперимента	У,С	И				
Проведение культивирования микроорганизмов	У	И				
Выделение и очистка пигмента	У	И				
Обработка и анализ полученных экспериментальных данных	У	И	С			
Визуализация данных эксперимента и составление выводов по данным эксперимента	У	И	С			
Написание диссертации	У	И,О		У	У	У

Степень участия в проекте может характеризоваться следующим образом:

- Ответственный (О) – лицо, отвечающее за реализацию этапа проекта и контролирующее его ход.
- Исполнитель (И) – лицо (лица), выполняющие работы в рамках этапа проекта.
- Утверждающее лицо (У) – лицо, осуществляющее утверждение результатов этапа проекта (если этап предусматривает утверждение).
- Согласующее лицо (С) – лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов этапа требованиям.

5.3.7 План управления коммуникациями

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. Фрагмент плана приведён в таблице – 5.3.7.1.

Таблица 5.3.7.1 — План управления коммуникациями проекта «Оптимизация выхода продигозина при биосинтезе».

Какая информация передаётся	Кто передаёт информацию	Кому передаётся информация	Когда передаётся информацию
Дизайн исследования	Исполнитель магистрант	Руководителю	В течение месяца после начала проекта
Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель магистрант	Руководителю	Еженедельно (пятница)
Данные по анализу структуры полученного продукта	Внешний исполнитель — спектрометрия	Руководителю, исполнителю магистранту	В течение 3-х дней после выполнения задачи
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Исполнитель и магистрант	Консультант Финансовый менеджмент	Не позже двух недель до завершающей вехи по проекту

5.3.8 Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределённые события, которые могут возникнуть в проекте и привести к нежелательным последствиям.

Таблица 5.3.8.1 — Реестр возможных рисков проекта

Риск	Потенциальное воздействие	Вероятность наступления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска
Низкий выход целевого продукта	Удорожание проекта, повышение трудоёмкости	3	5	высокий	Оптимизация условий экспрессии целевого продукта
Загрязнение культуральной жидкости	Снижение эффективности диагностического препарата	3	5	средний	Подбор оптимальных условий очистки
Отсутствие финансовой поддержки следующего этапа работ	Невозможность выполнения отдельных работ	3	4	средний	Тщательное планирование бюджета исследования

5.4 Оценка сравнительной эффективности исследования

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:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}$$

(4.1)

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

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

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

Таблица 5.2.1 – 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
1	8000	200000	200500	95598	536000
2	1000	150000	200500	95598	325000

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

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}} = 435000/536000 = 0,8$$

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}} = 325000/536000 = 0,6$$

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}} = 536000/536000 = 1$$

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное удешевление стоимости разработки в

разы, то есть наша разработка обладает наименьшей стоимостью по сравнению с аналогами.

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования определяют следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (27)$$

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

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

n – число параметров сравнения.

Результат расчетов представим в виде таблицы:

Таблица 5.2.2 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Аналог 1	Аналог 2
1. Способствует росту производительности труда пользователя	0,1	5	4	3
2. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,15	4	3	4
3. Эффективность	0,15	5	4	3
4. Энергосбережение	0,20	5	4	2
5. Надежность	0,25	5	5	5
6. Материалоемкость	0,15	1	2	3
ИТОГО	1	25	22	20

$$I_m^a = 5 \cdot 0,1 + 4 \cdot 0,15 + 5 \cdot 0,15 + 5 \cdot 0,2 + 5 \cdot 0,25 + 1 \cdot 0,15 = 4,25$$

$$I_1^a = 4 \cdot 0,1 + 3 \cdot 0,15 + 4 \cdot 0,15 + 4 \cdot 0,2 + 5 \cdot 0,25 + 2 \cdot 0,15 = 3,8$$

$$I_2^a = 3 \cdot 0,1 + 4 \cdot 0,15 + 3 \cdot 0,15 + 2 \cdot 0,2 + 5 \cdot 0,25 + 3 \cdot 0,15 = 3,45$$

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

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_\phi^p}, \quad I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_\phi^a} \quad (28)$$

$$I_{финр}^a = 4,25 / 0,8 = 5,3$$

$$I_{финр}^{a1} = 4,25 / 0,8 = 6,3$$

$$I_{финр}^{a2} = 4,25 / 0,8 = 3,45$$

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

$$\mathcal{E}_{cp} = 5,3 / 6,3 = 0,8$$

$$\mathcal{E}_{cp} = 5,3 / 3,45 = 1,5$$

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

Таблица 5.2.3 - Сравнительная эффективность разработки с первым аналогом

№ п/п	Показатели	Аналог 1	Разработка	Аналог 2
1	Интегральный финансовый показатель разработки	1	0,72	0,8
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	3,8	4,25	3,45
3	Интегральный показатель эффективности	3,8	5,9	4,31
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1,55	1,37	

В результате написания раздела "Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение" была определена перспективность научно-исследовательского проекта, дана оценка готовности проекта к коммерциализации, проведено сегментирование рынка, а также рассчитана себестоимость реализации данной научно-исследовательской работы.

Пигмент «продигиозин» эффективен и экономически выгоден по сравнению с аналогами. Он имеет широкую область применения, который может быть использован в промышленности и медицине. В промышленности продигиозин рекомендуется в качестве красителя для пластмасс, маркера нефтепродуктов. В медицине продигиозин и продигиозинподобные пигменты рассматриваются как новое семейство противоопухолевых препаратов и иммунодепрессанты.