



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

Школа Инженерная школа природных ресурсов

Направление подготовки 18.03.01 «Химическая технология»

ООП/ОПОП Аналитический контроль в химической промышленности

Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

Тема работы
Определение чистоты коммерческого белка тауматина

УДК 543.611:664.162.8

Обучающийся

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д93	Новикова Александра Александровна		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Чернова Анна Пав- ловна	К.Х.Н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН, ШБИП	Меньшикова Екате- рина Валентиновна	к.ф.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподава- тель ООД, ШБИП	Гуляев Милий Все- володович	-		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП/ОПОП, должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Михеева Елена Ва- лентиновна	К.Х.Н		

ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОСВОЕНИЯ ООП/ОПОП
«Аналитический контроль в химической промышленности»

Код компетенции	Наименование компетенции
Универсальные компетенции	
УК(У)-1	Способен осуществлять поиск, критический анализ и синтез информации, применять системный подход для решения поставленных задач
УК(У)-2	Способен определять круг задач в рамках поставленной цели и выбирать оптимальные способы их решения, исходя из действующих правовых норм, имеющихся ресурсов и ограничений
УК(У)-3	Способен осуществлять социальное взаимодействие и реализовывать свою роль в команде
УК(У)-4	Способен осуществлять деловую коммуникацию в устной и письменной формах на государственном языке Российской Федерации и иностранном(-ых) языке(-ах)
УК(У)-5	Способен воспринимать межкультурное разнообразие общества в социально-историческом, этическом и философском контекстах
УК(У)-6	Способен управлять своим временем, выстраивать и реализовывать траекторию саморазвития на основе принципов образования в течение всей жизни
УК(У)-7	Способен поддерживать должный уровень физической подготовленности для обеспечения полноценной социальной и профессиональной деятельности
УК(У)-8	Способен создавать и поддерживать безопасные условия жизнедеятельности, в том числе при возникновении чрезвычайных ситуаций
УК(У)-9	Способен проявлять предприимчивость в практической деятельности, в т.ч. в рамках разработки коммерчески перспективного продукта на основе научно-технической идеи
Общепрофессиональные компетенции	
ОПК(У)-1	Способность и готовность использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности
ОПК(У)-2	Готовность использовать знания о современной физической картине мира, пространственно-временных закономерностях, строении вещества для понимания окружающего мира и явлений природы
ОПК(У)-3	Готовность использовать знания о строении вещества, природе химической связи в различных классах химических соединений для понимания свойств материалов и механизма химических процессов, протекающих в окружающем мире
ОПК(У)-4	Владение пониманием сущности и значения информации в развитии современного информационного общества, осознания опасности и угрозы, возникающих в этом процессе, способностью соблюдать основные требования информационной безопасности, в том числе защиты государственной тайны
ОПК(У)-5	Владение основными методами, способами и средствами получения, хранения, переработки информации, навыками работы с компьютером как средством управления информацией
ОПК(У)-6	Владение основными методами защиты производственного персонала и населения от возможных последствий аварий, катастроф, стихийных бедствий
Профессиональные компетенции	
ПК(У)-1	Способность и готовность осуществлять технологический процесс в соответствии с регламентом и использовать технические средства для измере-

	ния основных параметров технологического процесса, свойств сырья и продукции
ПК(У)-2	Готовность применять аналитические и численные методы решения поставленных задач, использовать современные информационные технологии, проводить обработку информации с использованием прикладных программных средств сферы профессиональной деятельности, использовать сетевые компьютерные технологии и базы данных в своей профессиональной области, пакеты прикладных программ для расчета технологических параметров оборудования
ПК(У)-3	Готовность использовать нормативные документы по качеству, стандартизации и сертификации продуктов и изделий, элементы экономического анализа в практической деятельности
ПК(У)-4	Способность принимать конкретные технические решения при разработке технологических процессов, выбирать технические средства и технологии с учетом экологических последствий их применения
ПК(У)-5	Способность использовать правила техники безопасности, производственной санитарии, пожарной безопасности и нормы охраны труда, измерять и оценивать параметры производственного микроклимата, уровня запыленности и загазованности, шума, и вибрации, освещенности рабочих мест
ПК(У)-6	Способность налаживать, настраивать и осуществлять проверку оборудования и программных средств
ПК(У)-7	Способность проверять техническое состояние, организовывать профилактические осмотры и текущий ремонт оборудования, готовить оборудование к ремонту и принимать оборудование из ремонта
ПК(У)-8	Готовность к освоению и эксплуатации вновь вводимого оборудования
ПК(У)-9	Способность анализировать техническую документацию, подбирать оборудование, готовить заявки на приобретение и ремонт оборудования
ПК(У)-10	Способность проводить анализ сырья, материалов и готовой продукции, осуществлять оценку результатов анализа
ПК(У)-11	Способность выявлять и устранять отклонения от режимов работы технологического оборудования и параметров технологического процесса
ДПК(У)-1	Способность планировать и проводить химические эксперименты, проводить обработку результатов эксперимента, оценивать погрешности, применять методы математического моделирования и анализа при исследовании химико-технологических процессов
ДПК(У)-2	Готовность изучать научно-техническую информацию, отечественный и зарубежный опыт по тематике исследования



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

Школа Инженерная школа природных ресурсов

Направление подготовки (ООП/ОПОП) 18.03.01 «Химическая технология»

Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии

УТВЕРЖДАЮ:
Руководитель ООП/ОПОП

(Подпись) (Дата) (ФИО)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

Обучающийся:

Группа	ФИО
2Д93	Новикова Александра Александровна

Тема работы:

Определение чистоты коммерческого белка тауматина	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	

Срок сдачи обучающимся выполненной работы:

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 функционированию (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.)	Объект исследования: коммерческий белок тауматин, производства Китай, с заявленной чистотой 99,15 (масс.%) Провести оценку чистоты коммерческого белка тауматина физико-химическими методами и подобрать условия его очистки
Перечень разделов пояснительной записки подлежащих исследованию, проектированию и разработке (аналитический обзор литературных источников 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)	1.Проведение литературного обзора по теме выпускной квалификационной работы; 2.Описание материалов и методов исследования; 3.Анализ, обобщение и оценка полученных экспериментальных данных выполненной работы; 4.Оценка финансовой части проекта, его ресурсоэффективности и ресурсосбережения; 5.Рассмотрение рисков и опасностей проведения проекта, составление перечня нормативных требований для их регулирования; 6.Формулировка выводов и заключения по работе;
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант

«Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	Доцент ОСГН, ШБИП, к.ф.н. Меньшикова Екатерина Валентиновна
«Социальная ответственность»	Старший преподаватель ООД, ШБИП, Гуляев Милий Всеволодович

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

Задание выдал руководитель / консультант (при наличии):

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Чернова Анна Павловна	к.х.н.		

Задание принял к исполнению обучающийся:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д93	Новикова Александра Александровна		

**ЗАДАНИЕ К РАЗДЕЛУ
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСООБЪЕДИНЕНИЕ
И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Обучающемуся:

Группа	ФИО
2Д93	Новикова Александра Александровна

Школа	Инженерная школа природных ресурсов	Отделение школы (НОЦ)	Отделение химической инженерии
Уровень образования	Бакалавриат	Направление/ООП/ОПОП	18.03.01 Химическая технология

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

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Стоимость выполняемых работ, материальных ресурсов в соответствии с применяемой техникой, технологиями и рыночными ценами; оклады в соответствии с окладами сотрудников организации.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	Районный коэффициент равен 1,3; коэффициент доплат – 0,5; накладных расходов – 16 %
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования	Ставка по отчислениям во внебюджетные фонды составляет 30,2 %

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований	Провести предпроектный анализ.
2. Планирование научно-исследовательских работ	Составить план проведения НИРС
3. Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования	Провести оценку эффективности проекта.

Перечень графического материала:

1. Оценочная карта сравнения конкурентных разработок.
2. Матрица SWOT
3. Календарный план-график проведения НИОКР;
4. Расчет бюджета затрат НИ

Дата выдачи задания к разделу в соответствии с календарным учебным графиком	
---	--

Задание выдал консультант по разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН, ШБИП	Меньшикова Екатерина Валентиновна	к.ф.н.		

Задание принял к исполнению обучающийся:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д93	Новикова Александра Александровна		

ЗАДАНИЕ К РАЗДЕЛУ «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Обучающемуся:

Группа	ФИО
2Д93	Новикова Александра Александровна

Школа	Инженерная школа природных ресурсов	Отделение (НОЦ)	Отделение химической инженерии
Уровень образования	Бакалавриат	Направление/ООП/ОПОП	18.03.01 «Химическая технология»

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

Введение

- Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика) и области его применения.
- Описание рабочей зоны (рабочего места) при разработке проектного решения/при эксплуатации.

Объект исследования: определение чистоты коммерческого белка тауматина.

Область применения: биотехнологическая, фармацевтическая, пищевая промышленность.

Рабочая зона: учебная лаборатория №223 2 корпуса ТПУ, Проспект Ленина, 43а.

Размеры помещения (климатическая зона*): площадь 30,5 м², кабинет.

Количество и наименование оборудования рабочей зоны: аналитические весы (1), спектрофотометр (1), термостат (1), хроматограф жидкостной (1), микроцентрифуга (1), прибор для определения точки плавления (1), рН метр (1), камера для горизонтального и вертикального электрофореза с прилагающим источником питания (1), УФ-камера с длиной волны 312 нм (1).

Рабочие процессы, связанные с объектом исследования, осуществляющиеся в рабочей зоне: анализ коммерческого белка тауматина на физико-химические свойства и очистка его от примесей.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности при разработке проектного решения/при эксплуатации:

- специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;
- организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.

- Федеральный закон № 426 от 28.12.2013 «О специальной оценке условий труда» (ред. от 30.12.2020);
- ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности;
- ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования;
- ГОСТ 12.2.033-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования;

	– ПНД Ф 12.13.1-03 от 04.09.2003 «Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения)»; – РД 34.03.277-93. Типовая инструкция по охране труда для лаборанта химического анализа.
2. Производственная безопасность при разработке проектного решения/при эксплуатации: – Анализ потенциально вредных и опасных производственных факторов – Обоснование мероприятий по снижению воздействия потенциально вредных и опасных производственных факторов	Потенциально вредные производственные факторы: – производственные факторы, связанные с аномальными микроклиматическими параметрами воздушной среды; – отсутствие или недостаток необходимого искусственного освещения; – повышенный уровень шума; Потенциально опасные производственные факторы: – производственные факторы, связанные с электрическим током; – производственные факторы, обладающие свойствами химического воздействия на организм работающего; – пожарная опасность; Требуемые средства коллективной и индивидуальной защиты от выявленных факторов: <u>лабораторный халат, перчатки, очки защитные, вентиляция, знаки и символы опасности.</u>
3. Экологическая безопасность при разработке при эксплуатации	Воздействие на селитебную зону: <u>отсутствует.</u> Воздействие на литосферу: <u>жидкие отходы (сливы), содержащие вредные и ядовитые вещества.</u> Воздействие на гидросферу: <u>жидкие отходы органической природы.</u> Воздействие на атмосферу: <u>отсутствует.</u>
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях при эксплуатации	Возможные ЧС: <u>возгорания, пожары, взрывы при работе с электрооборудованием и взрывоопасными веществами; проливы опасных химических веществ, аварии систем электроэнергетики, а также ЧС природного и биолого-социального характера.</u> Наиболее типичная ЧС: <u>проливы опасных химических веществ.</u>

Дата выдачи задания к разделу в соответствии с календарным учебным графиком	
---	--

Задание выдал консультант по разделу «Социальная ответственность»:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД, ШБИП	Гуляев Милий Всеволодович	-		

Задание принял к исполнению обучающийся:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д93	Новикова Александра Александровна		

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа содержит 101 страница, 15 рисунков, 33 таблицы, 55 источников и 1 приложение.

Ключевые слова: контроль качества, сладкий белок, тауматин, физико-химические методы, хроматографические методы.

Объектом исследования является коммерческий белок тауматин производства Китай с заявленной чистотой 99,15 %.

Цель работы – провести оценку чистоты коммерческого белка тауматина физико-химическими методами и подобрать условия его очистки.

В ходе работы были изучены основные методы контроля качества сладкого белка тауматина, исследованы его физико-химические, электрокинетические и хроматографические свойства. Подобраны оптимальные условия очистки белка.

В результате выполнения выпускной квалификационной работы определены основные параметры, характеризующие анализируемый белок, выявлено наличие загрязняющих веществ, конкретно мономера, подобран наиболее эффективный сорбент для очистки белка от примесей.

Область применения: данная разработка может быть использована для микробиологического синтез очищенного тауматина с участием бактерий, а также возможно применение очищенного белка данным методом в фармацевтической и пищевой промышленности.

Экономическая эффективность/значимость работы: поскольку на сегодняшний день исследований, связанные с изучением тауматина, достаточно мало, данные, полученные в данной работе, представляют собой практический интерес. Кроме того подобранная методика очистки белка является наиболее экономически эффективна.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

E. coli - кишечная палочка (escherichia coli);

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГГ – горючие газы;

ГЖ – горючие жидкости;

ЛВЖ – легковоспламеняющиеся вещества;

НВ – низкомолекулярные вещества;

ПФ – подвижная фаза;

СД – сахарный диабет;

СИЗ – средства индивидуальной защиты;

СОУТ – специальная оценка условий труда;

ТФУ – трифторуксусная кислота;

ЧС – чрезвычайная ситуация;

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	15
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	17
1.1 Значение сладких белков в медицине и пищевой промышленности..	17
1.2 Основные характеристики тауматина	20
1.3 Методы получения тауматина	23
1.4 Методы очистки нативного и рекомбинантного тауматина.....	26
2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 Материалы, оборудование, химическая посуда.....	28
2.1.1 Используемые реактивы и стандартные вещества.....	28
2.1.2 Оборудование, используемое для выполнения ВКР.....	29
2.1.3 Лабораторная химическая посуда, используемая для выпол- нения ВКР.....	30
2.2 Основные характеристики объекта исследования.....	30
2.3 Методика контроля качества тауматина колориметрическими ме- тодами.....	31
2.3.1 Метод Лоури.....	31
2.3.2 Биуретовый метод.....	32
2.4 Оценка температуры плавления тауматина.....	33
2.5 Определение изоэлектрической точки.....	33
2.6 Определение стабильности белка методом горизонтального элек- трофореза.....	34
2.7 Очистка белка хроматографическими методами.....	35
2.7.1 Методика очистки тауматина методом колоночной хромато- графии.....	35
2.7.2 Методика очистки тауматина методом ультрафильтрации.....	36
2.8 Анализ белка методом ВЭЖХ.....	36
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	38
3.1 Общая количественная оценка тауматина в пробе.....	39

3.1.1	Определение содержания кислых фракций белка методом Лоури.....	39
3.1.2	Определение содержания основных фракций белка тауматина биуретовым методом.....	40
3.2	Анализ термической устойчивости белка	42
3.3	Определение изоэлектрической точки белка.....	43
3.4	Определение стабильности тауматина.....	45
3.5	Результаты очистки белка различными сорбентами.....	45
3.5.1	Очистка тауматина с использованием азоэпоксисорбента Sephadex LH-20.....	46
3.5.2	Очистка тауматина с использованием сорбента SP Sepharose Fast Flow.....	48
3.5.3	Очистка тауматина с использованием картриджа Bio-Scale Mini UNOsphere S.....	49
3.5.4	Очистка тауматина с использованием системы ультрафильтрации Sartorius Vivaflow 200.....	50
3.5.5	Оценка содержание тауматина до и после очистки методом ВЭЖХ.....	51
4	ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ.....	55
4.1	Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований.....	55
4.1.1	Потенциальные потребителя результатов исследования.....	55
4.1.2	Анализ конкурентных технических решений.....	57
4.1.3	SWOT-анализ.....	58
4.2	Планирование научно-исследовательских работ.....	61
4.2.1	Структура работ в рамках научного исследования.....	61
4.2.2	Определение трудоемкости выполнения работ.....	62
4.2.3	Разработка графика проведения научного исследования.....	63
4.2.4	Бюджет научно-технического исследования.....	64

4.3 Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	72
5 СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	75
5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности..	76
5.1.1 Специальные правовые нормы трудового законодательства....	76
5.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны	77
5.2 Производственная безопасность.....	79
5.2.1 Производственные факторы, связанные с аномальными микроклиматическими параметрами воздушной среды.....	81
5.2.2 Отсутствие или недостаток необходимого искусственного освещения.....	82
5.2.3 Повышенный уровень шума.....	83
5.2.4 Производственные факторы, связанные с электрическим током.....	84
5.2.5 Производственные факторы, обладающие свойствами химического воздействия на организм работающего.....	85
5.2.6 Пожарная опасность.....	87
5.3 Экологическая безопасность.....	88
5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СТУДЕНТА.....	94
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	95
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	100

ВВЕДЕНИЕ

Сахар естественным образом присутствует во всех продуктах, содержащих углеводы: злаках, молочных продуктах, фруктах и овощах. Человеческий организм перерабатывает эти продукты медленно, а сахар обеспечивает стабильный источник энергии для клеток.

Однако в настоящее время сахар в больших количествах используется в производстве продуктов питания. В результате современные люди привыкли потреблять в десять раз больше сахара, чем обычно. Эта привычка привела к росту заболеваемости сахарным диабетом, ожирением и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Необнаруженный и вовремя не взятый под контроль диабет может привести к слепоте, почечной недостаточности, сердечным заболеваниям, инсульту, гангрене и ампутации конечностей.

Главная проблема заключается в том, пристрастие людей к сладкой пище является врожденным. Поэтому для сохранения здоровья людей необходимо предлагать такую альтернативу сахару, которая не будет травмировать организм. Ими могут стать сахарозаменители и различные подсластители, например, «сладкие» белки.

Таким образом, возникает необходимость изучения свойств различных сладких белков, их качества и степени чистоты, от которой во многом зависит безопасность и здоровья людей, а также возможность увеличения производительности производства белка. В настоящее время изучаются биотехнологические альтернативы для устранения неопределенностей и изменчивости, связанных с сельскохозяйственным производством, и снижения затрат, а также ведутся разработки в области очистки тауматина.

Цель выпускной бакалаврской работы: провести оценку чистоты коммерческого белка тауматина физико-химическими методами и подобрать условия его очистки.

Для достижения поставленной цели был сформулирован следующий

ряд задач:

- 1) Определить концентрацию тауматина биуретовым методом и методом Лоури.
- 2) Провести идентификацию белка методом термического анализа;
- 3) Исследовать электрокинетические свойства белка и его стабильность;
- 4) Подобрать рабочие условия для очистки белка хроматографическими методами;
- 5) Провести контроль очистки белка от примесей методом ВЭЖХ

Научная новизна работы: проведено исследование по подбору сорбента для наиболее эффективной очистки коммерческого белка тауматина.

Практическая значимость: в ходе работы исследованы основные характеристики тауматина и подобраны наиболее эффективные условия очистки белка. На сегодняшний день исследований, связанных с таким сладким белком, как тауматин, достаточно мало. Поэтому данные, полученные в настоящем исследовании, представляют собой практический интерес.

Результаты исследования могут быть использованы в следующих направлениях:

- 1) Микробиологический синтез очищенного тауматина с участием бактерий;
- 2) Применение очищенного белка данным методом в фармацевтической и пищевой промышленности.

Результаты исследования докладывались и обсуждались на следующих конференциях:

- 1) Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Химия. Экология. Урбанистика», г. Пермь, 19 – 21 апреля 2023 г.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Значение сладких белков в медицине и пищевой промышленности

«Сладкие» белки – органические вещества, содержащиеся в тропических фруктах. Эти белки имеют ряд преимуществ над сахаром и другими сахарозаменителями [1]:

- 1) нулевой гликемический индекс;
- 2) не наносят вреда для зубов;
- 3) подходят для диабетического влияния;
- 4) являются натуральным продуктом;
- 5) не оказывают негативного влияния на пищеварительную систему.

Основное преимущество белковых подсластителей перед углеводными подсластителями заключается в том, что они обладают чрезвычайно высокой интенсивностью сладости, что требует незначительного количества калорий по сравнению с сахарозой [2]. Кроме того, сладкие белки не оказывают такого негативного влияния на наш организм, как сахар.

В таблице 1.1 приведена статистика заболеваемости сахарным диабетом населения различных стран по данным Всемирной организацией здравоохранения совместно с Международной Диабетической организацией.

Таблица 1.1 – Статистика заболеваемости СД по странам [3]

Страна	млн. людей с диабетом
Индия	50,8
Китай	43,2
США	26,8
Россия	9,6
Бразилия	7,6
Пакистан	7,1
Мексика	6,8

По оценкам Минздрава России, в нашей стране зарегистрировано 5,2 млн случаев диабета. Росстат подсчитал, что в год появляется 300-400 тыс. новых пациентов (Рисунок 1.1). Эксперты предполагают, что реальное число заболевших гораздо выше 5 млн — примерно 10,5 млн человек [4].

Распространение сахарного диабета в России



Рисунок 1.1 – Распространение СД в России по данным РОССТАТ [4]

В настоящее время известно восемь сладких белков размером от 54 остатков до 207 остатков, сравнительная характеристика которых представлена в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Сравнение белковых подсластителей [5]

Белок	Молекулярная масса, кДа	Аминокислоты	Сладость относительно сахарозы	Природные источники
Браззейн	6,5	54	500-2000	Плоды растения <i>Pentadiplandra brazzeana</i>
Тауматин	22,0	207	3000	Растение <i>Thaumatococcus daniellii</i> из Африки

Продолжение таблицы 1.2

Монеллин	10,7	45 (А цепь) 50 (Б цепь)	3000	Тропическое растение <i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>
Куркумин	24,9	114	500	Плоды малайзийского растения <i>Curculigo latifolia</i>
Мабинлин	12,4	33 (А цепь) 72 (Б цепь)	100	Растение из Китая <i>Capparis masaikai</i>
Миракулин	98,4	191	-	Плоды растения <i>Richadella dulcifica</i>
Пентадин	12,0	-	500	Цветковое растение <i>Richadella dulcifica</i>
Лизоцим	14,6	129	-	Белки куриных яиц

Из этих сладких белков тауматин является наиболее продвинутым с точки зрения разработки продукта и нормативного статуса. Международная ассоциация подсластителей отмечает, что тауматин часто используется из-за его изменяющих вкус свойств, а не в качестве подсластителя. Он был одобрен Объединенным комитетом экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам в 1985 году, является разрешенным подсластителем в ЕС и одобрен для использования в качестве усилителя вкуса и подсластителя примерно в 30 странах, включая Швейцарию, США, Канаду, Израиль, Мексику, Японию, Гонконг, Южную Корею, Сингапур, Австралию, Новую Зеландию и Южную Африку [6]. В мире он зарегистрирован как пищевая добавка E957 – подсластитель, который относится к категории натуральных.

В соответствии с СанПин 2.3.2.1293-03, п.2.22 тауматин разрешен в качестве подсластителя для низкокалорийных продуктов, не содержащих сахарозу. В этот список входят кондитерские сахаристые изделия на основе какао

и сухофруктов, мороженое растительного происхождения или фруктовый лед, жевательная резинка [7].

В качестве усилителя вкуса и аромата добавка E957 разрешена в безалкогольных напитках (не более 0,5 мг/л) и кондитерских десертах (5 мг/кг) [6].

На практике использование малоизученного тауматина в России очень ограничено. Обычно он встречается в БАДах для снижения веса и некоторых видах жевательной резинки.

В фармацевтике же добавку E957 используют в качестве подсластителя в лекарственных сиропах, жевательных таблетках и пастилках, а также в витаминах.

Что касается производителей тауматина, на сегодняшний день пищевую добавку E957 поставляют три мировых производителя [8]: «Tate and Lyle» (Великобритания), «Naturex» (Франция), «Xian Tonking Biotech Co., Ltd.» (Китай).

1.2 Основные характеристики тауматина

Тауматин представляет собой смесь сладких белков, первоначально выделенных из плодов западноафриканского растения катемфе (*Thaumatococcus danielli* Benth.). Существует, по меньшей мере, пять тауматинов, которые получают экстракцией водой, концентрированием и ультрафильтрацией.

Тауматин состоит из одной цепи из 207 нормальных аминокислотных остатков с восемью дисульфидными связями и имеет молекулярную массу около 22 кДа [9]. Он хорошо растворим в воде (600 г/л) и стабилен при pH 2,7 ÷ 8,0 и в условиях пастеризации. При более высоких значениях pH белок становится более чувствительным к изменению температуры, несмотря на его стабильность при значениях pH до 8 в условиях окружающей среды. Стабильность солюбилизированного тауматина требует тщательного контроля pH, времени, температуры и других параметров обработки. Кроме того, за-

щита белка от дрожжей и плесени в растворах также имеет решающее значение для стабильности. Тауматин может связываться с отрицательно заряженными соединениями, такими как синтетические красители и кислые смолы, ксантан, пектин, каррагинан, альгинат и карбоксиметилцеллюлоза, что приводит к потере сладости. Связь с синтетическими красителями также может привести к потере цвета [10].

Сладость тауматина отличается от сладости сахарозы. Во-первых, восприятие сладкого вкуса, вызванного тауматином, задерживается на 10-15 секунд по сравнению с восприятием, вызванным сахарозой. Во-вторых, восприятие сладости тауматина развивается постепенно, пока не достигнет максимума, с очевидной фазой роста восприятия. В-третьих, сладкий вкус сохраняется в течение длительного времени, во многих случаях в течение нескольких минут. Кроме того, тауматин обладает длительным и характерным послевкусием с оттенком лакрицы[11].

Детальный механизм восприятия сладости тауматина отличается от механизма восприятия сахарозы. Причина в том, что тауматин и сахароза имеют разную структуру. Сахароза - это маленькая молекула, которая связывается с участком рецептора сладости на языке подобно тому, как ключ вставляется в замок. Тауматин, структура которого, показана на рисунке ниже, примерно в пять раз больше (по радиусу) сахарозы [12].

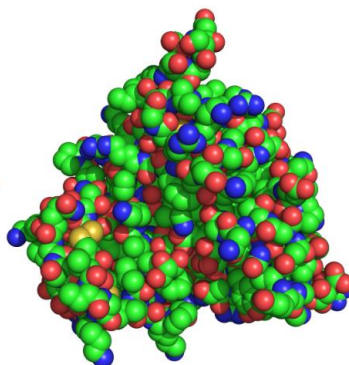


Рисунок 1.2 - Заполняющая пространство модель тауматина. Сферы имеют цветовую маркировку по элементам: зеленый (углерод), синий (азот), красный (кислород) и желтый (сера). Эта структура была получена с использованием тауматина Natex и в настоящее время является структурой белка с самым высоким разрешением (0,94 ангстрема) [12].

Так же тауматин маскирует металлический или горький привкус. Чтобы добиться вкуса, более близкого к вкусу сахарозы, тауматин необходимо смешивать с другими интенсивными подсластителями или сахарами. Например, сочетание тауматина с аланином и органическими кислотами приводит к удвоению сладости, уменьшению послевкуся и задержке сладости [13].

Тауматин может метаболизироваться до составляющих его аминокислот, принося те же калории, что и белок. Однако из-за своей высокой сладости, он имеет низкую калорийность на единицу сладости, менее 0,002 ккал [14].

Общее название тауматин относится к смеси гомологов I и II, которые являются наиболее распространенными соединениями в семенах. Рассмотрим подробнее их аминокислотные последовательности, представленные на рисунке 1.3.

```

TI 1 ATFEIVNRCS YTVWAAASKG DAALDAGGRQ LNSGESWTIN VEPGTNGGKI
TII 1 ATFEIVNRCS YTVWAAASKG DAALDAGGRQ LNSGESWTIN VEPGTKGGKI

TI 51 WARTDCYFDD SGSGICKTGD CGLLRCKRF GRPPTTLAEF SLNQYGKDYI
TII 51 WARTDCYFDD SGRGICRTGD CGLLQCKRF GRPPTTLAEF SLNQYGKDYI

TI 101 DISNIKGFNV PMNFSPTTRG CRGVRCAADI VGQCPAKLKA PGGGCNDACT
TII 101 DISNIKGFNV PMDFSPTTRG CRGVRCAADI VGQCPAKLKA PGGGCNDACT

TI 151 VFQTSEYCCT TGKCGPTEYS RFFKRLCPDA FSYVLDKPTT VTCPGSSNYR
TII 151 VFQTSEYCCT TGKCGPTEYS RFFKRLCPDA FSYVLDKPTT VTCPGSSNYR

TI 201 VTFCPTA
TII 201 VTFCPTA

```

Рисунок 1.3 - Аминокислотные последовательности подслащивающих белков тауматин I (TI) и тауматин II (TII) [15]

Таумины I и II, состоящие из цепочки из 207 аминокислот, очень похожи и различаются только по пяти аминокислотам: в положении 46 (N вместо K), 63 (S вместо R), 67 (K вместо R), 76 (R вместо Q) и 113 (N вместо D).

Таким образом, основные физико-химические свойства тауматина

можно представить в виде таблицы 1.3.

Таблица 1.3 – Основные характеристики тауматина [2]

Показатель	Стандартные значения
Цвет	Кремовый
Внешний вид	Мелкий порошок
Запах	Без запаха
Содержание основного вещества	Белка не менее 94%, азота не менее 16%
Растворимость	Хорошо растворим в воде, не растворим в жирах
Калорийность	4 ккал/г
Термостойкость	Термически устойчив в условиях пастеризации
Кристаллизация	Кристаллизуется быстро и легко в присутствии тартрат-ионов
Изоэлектрическая точка	11,5

Поскольку производство тауматина не ограничивается выделением его из соответствующего растения, рассмотрим основные способы получения данного сладкого белка.

1.3 Методы получения тауматина

Тауматин имеет несколько способов получения. Основным и самым очевидным является его получение из растения. Однако помимо него выделяют синтез белка тауматина с участием генетически-модифицированных микроорганизмов и трансгенных растений.

В настоящее время в основном тауматин получают из плодов западно-африканского растения катемфе (*Thaumatococcus daniellii* Бент) [16]. Тауматин присутствует в ариле, окружающей семена катемфе. Растения Катемфе произрастают в дождевых лесах Западной Африки, они предпочитают богатые хорошо дренированные почвы в районах, где годовое количество осад-

ков составляет около 1500-2000 мм. Катемфе плодоносит только в районах своей естественной среды обитания. Будучи выращенным в других регионах или в теплицах, он не дает плодов, несмотря на обильное цветение. Количество тауматина в зернах зрелых плодов составляют 30-55 мг/г свежего веса (около 50 % общего растворимого белка), варьируя в широких пределах в зависимости от степени зрелости плодов и происхождения [17].

Мелкое сельское хозяйство широко распространено в районах естественной растительности катемфе. Объем производства не очень ясен, он зависит от года и погодных условий текущего сезона.

Не так давно были разработаны трансгенные растения, несущие ген тауматина II, для улучшения и изменения вкуса растений. К ним относятся огурец, груша, помидор и клубника. Выход тауматина в трансгенных плодах томатов составлял приблизительно 50 мкг/мг общего растворимого белка. В остальных изученных растениях содержание тауматина варьировало от $17,6 \pm 6,1$ до $41,3 \pm 12,3$ мкг/мг общего растворимого белка (13 %—4,1 %) [18]. Плоды трансгенных растений характеризовались выраженным сладким вкусом с характерным для тауматина длительным послевкусием. Трансгенные плоды томата с интенсивной экспрессией гена тауматина могут быть потенциально использованы как продуценты данного белка для нужд пищевой и фармацевтической промышленности.

Но, несмотря на то, что использование растительных систем показало определенные преимущества, с точки зрения масштабируемости, экономичности и безопасности, им все еще не хватает некоторых преимуществ, которых можно достичь с помощью микробных клеток-хозяев, таких как возможность контролирования условий роста и консистенции продукта во всех партиях. Кроме того, рассмотрение некоторых потенциальных проблем, связанных с использованием трансгенных растений, таких как аллергические реакции и неопределенность в регулировании, ограничивает широкое применение данного подхода.

Бактерии значительно быстро наращивают биомассу, дают высокий

выход продукта и достаточно просты в культивировании. Поэтому для экспрессии целевого белка часто используют метод, который включает передачу его гена другому хозяину, такому как бактерии.

При производстве рекомбинантных белков очень важно, чтобы используемые микроорганизмы, в которые вносятся чужеродные гены, отвечали следующим свойствам [19]:

- 1) Метаболизм микроорганизма должен быть хорошо изучен, поэтому в качестве продуцентов рекомбинантных белков используются *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*;
- 2) Микроорганизмы не должны вызывать болезни и вред;
- 3) Микроорганизмы должны хорошо и интенсивно размножаться в условиях ферментера;
- 4) Микроорганизм должен быть способен выделять секретируемый им чужеродный белок в среду;
- 5) Клетки микроорганизма должны иметь возможность стать компетентными для того, чтобы их клеточная стенка была проницаема для плазмид.

Производство тауматина было впервые предпринято с использованием *Escherichia coli* K-12 под контролем систем промотора/оператора *lac* и *trp* [20]. Был сконструирован синтетический ген, кодирующий аминокислотную последовательность тауматина II, и были предприняты попытки экспрессировать рекомбинантный тауматин в штаммах *E. coli* DH5 [21]. В итоге успешно было получено 40 мг/л рекомбинантного сладкого тауматина с использованием восстановленного/окисленного глутатиона.

Таким образом, каждый из приведенных способов имеет как достоинства, так и недостатки. Однако получение тауматина с помощью микроорганизмов дает возможность достижения высокой плотности культуры, относительно невысокую стоимость, а применение методов структурной биологии значительно облегчают создание эффективной экспрессионной системы и планирование процессов выделения и очистки рекомбинантного белка.

1.4 Методы очистки нативного и рекомбинантного белка

При определении строения веществ важным критерием является чистота исходного материала. Белки из-за большого молекулярного веса и наличия вторичных связей труднее выделить и очистить, чем многие другие органические соединения.

На сегодняшний день значительная часть исследований тауматина, особенно связанных с кристаллизацией белка, была проведена с использованием нечистого белка. В то время как нечистый белок все еще может быть кристаллизован, качество кристаллов низкое, что затрудняет использование этих кристаллов для определения структуры белка.

Рассмотрим основные способы очистки белка.

- 1) Колоночная хроматография. Способ препаративного разделения смесей жидких или твердых веществ, основанный на различном сродстве разделяемых веществ к неподвижной и подвижной фазам.
- 2) Гель-электрофорез. Метод основан на различных свойствах частиц, несущих неодинаковый заряд. Заряженные частицы движутся с различной скоростью к катоду или аноду и таким образом отделяются друг от друга. Особенно высокое разрешение наблюдается при использовании полиакриламидного геля.
- 3) Ультрафильтрация. Метод основан на различии молекул по размеру. Данный метод позволяет отделить в основном низкомолекулярные компоненты от белка.
- 4) ВЭЖХ. Один из эффективных методов разделения сложных смесей веществ, основой которого является участие компонентов смеси в системе Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий на границе раздела фаз.
- 5) Фракционирование растворителем. Разделение белковой смеси возможно при добавлении смешивающихся с водой органических

растворителей, что ведет к снижению диэлектрической проницаемости системы. В результате снижаются гидратация и растворимость белка и происходит осаждение белковой фракции [22].

Представленные методы разделения эффективны, однако их комбинированное применение приводит к получению белков, удовлетворяющих необходимым критериям чистоты. Кроме того, необходимо подобрать такие методы очистки белка, которые могли бы быть воспроизводимы в любой лаборатории без потери эффективности очистки образцов.

2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы, оборудование, химическая посуда

2.1.1 Используемые реактивы и стандартные вещества

Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72

Тауматин (Китай, чистота 99,15 масс. %)

Сывороточный альбумин (бычий) («Sigma-Aldrich», США)

Медь сернокислая 5-водная, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ГОСТ 4165-78, химически чистый (х.ч.).

Натрий лимоннокислый 5,5-водный, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$, ГОСТ 22280-76, чистый для анализа (ч.д.а.).

Натрий углекислый, Na_2CO_3 , ГОСТ 83-79, химически чистый (х.ч.).

Реактив Фолина-Чокальтеу (Hystology, PanReac Applichem)

Калий-натрий виннокислый 4-водный, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ГОСТ 5845-79, чистый для анализа (ч.д.а.).

Натрия гидроокись NaOH , ГОСТ 4328-77, химически чистый (х.ч.)

Йодистый калий KI , ГОСТ 4232-74, чистый для анализа (ч.д.а.).

Кислота борная, H_3BO_3 , ГОСТ 18704-78.

Кислота уксусная, CH_3COOH , ГОСТ 61-75, химически чистая (х.ч.).

Кислота ортофосфорная, H_3PO_4 , ГОСТ 6552-80, химически чистый (х.ч.).

Спирт этиловый очищенный 95 %, ГОСТ Р 51723-2001, химически чистый (х.ч.);

Агароза (Hystology, PanReac Applichem).

Маркер молекулярного веса белков, 10-250 кДа, предокрашенный (Servicebio, Китай).

3', 3'', 5'', 5''' –Тетрабромфенолсульфопфталеинкумасси, ТУ 6-09-5421-90, чистый для анализа (ч.д.а.).

Азоэпоксидсорбент Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ (Кафедра фармацевтической химии КемГУ)

SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, США).

Натрий уксуснокислый 3-водный, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, ГОСТ 199-78, чистый для анализа (ч.д.а.).

Натрий хлористый, NaCl , ГОСТ 4233-77, химически чистый (х.ч.).

Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, ГОСТ 4172-76, химически чистый (х.ч.).

Калий фосфорнокислый однозамещенный, KH_2PO_4 , ГОСТ 4198-75, химически чистый (х.ч.).

Трифторуксусная кислота, ГОСТ 18270, химически чистый (х.ч.).

Ацетонитрил для ВЭЖХ, CH_3CN , ТУ 6-09-14-2167-84, (о.с.ч.)

Спирт изопропиловый, $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$, ГОСТ 9805-84.

2.1.2 Оборудование, используемое для выполнения ВКР

Весы аналитические (класс точности 0,0001 г) (СЕ 124-С, СЕ 224-С, производитель Сартогосм, Россия).

Дозатор одноканальный, переменного объема 10-100 мкл (Россия).

Дозатор одноканальный, переменного объема 100-1000 мкл (Россия).

Дозатор одноканальный, переменного объема 1-5 мл (Россия).

Спектрофотометр универсальный Agilent Cary 60 (Agilent, Германия).

Прибор для определения точки плавления MP50 Melting Point System (MettlerToledo, Швейцария).

рН метр (MettlerToledo, Швейцария).

Учебно-лабораторный комплекс «физическая и коллоидная химия» (Унитех, Россия).

Установка для электрофореза CS-3AMP (Cleaver Scientific, Великобритания).

Трансиллюминатор TI2 (Biometra, германия)

Картридж Bio-Scale Mini UNOsphere S (BioRad, США).

Система ультрафильтрации Vivaflow 200 (Sartorius, Германия)

Хроматограф жидкостной Милихром А-02 (Россия)

2.1.3 Лабораторная химическая посуда, используемая для выполнения ВКР

Колбы мерные 50, 100, 1000 см³ ГОСТ 1770-74

Цилиндры мерные с носиком 25, 50, 100 см³ ГОСТ 1770-74

Стаканы 25, 50 см³ ГОСТ 1770-74

Бюретка 25, 50 см³ ГОСТ 29251-91

2.2 Основные характеристики объекта исследования

Для исследования был использован коммерческий белок тауматин, полученный путем водной экстракции зерен плодов *Thaumatococcus daniellii* Benth, состоящий из белков тауматина I и тауматина II. Паспорт объекта исследования представлен на рисунке 2.1.

 西安普瑞斯生物工程有限公司 XI'AN PRIUS BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD		
检测报告 CERTIFICATE OF ANALYSIS		
产品名称 Product Name: 索马糖 Thaumatococcus	产品批号 Batch No: PR520220215	
检测日期 Analysis Date: 2022.02.17	生产日期 Manufacture Date: 2022.02.15	
检测项目 Analysis Item	检测标准 Specification	检测结果 Result
有效成分含量 Active Content Test		
索马糖 Thaumatococcus (HPLC)	≥98.0%	98.15%
理化检测指标 Physical Tests		
性状 Appearance:	白色粉末, 无臭 White Powder	符合 Complies
气味 Odor:	具其特殊气味 Characteristic	符合 Complies
目数 Particle size:	90%过 80 目 90% pass 80 mesh	符合 Complies
干燥失重 Loss on drying:	≤5.0%	1.8%
灰分 Ash Contents:	≤5.0%	1.5%
卫生检测指标 Chemical Tests		
重金属 Heavy Metals:	≤5.0ppm	<3.0ppm
铅 Lead:	≤3.0ppm	<1.3ppm
砷 Arsenic:	≤3.0ppm	<2.0ppm
溶剂残留 Residual Solvents:	≤50 ppm 乙醇 Only Ethanol	<30 ppm
微生物指标 Microbiological Tests		
菌落总数 Total Bacteria Count:	<1000 cfu/g	<280 cfu/g
霉菌和酵母菌 Yeast & Mold:	<100 cfu/g	<10 cfu/g
大肠菌群 Coliform:	≤30 MPN/g	<3 MPN/g
存储条件: 密封容器, 干燥低温环境。Storage: Sealed container, Dry & Low temperature environment.		
产品包装: 1KG/袋, 25KG/桶。Packing: 1 kg/bag, 25 kg/drum.		
保质期: 正确存储条件下 2 年。Shelf Life: 2 years when properly stored.		
声明: 本产品承诺非转基因。Statement: Product is Non-Transgenic & Non-GMO.		
结论: 检测结果符合各项检测标准, 产品合格。Conclusion: Conform to the criterion.		
检测人: 邵欣 QA: Zouxin	负责人: 曹霞 QC: Cassie	

Рисунок 2.1 – Сертификат коммерческого тауматина

Производство – Китай, компания XI'AN PRIUS BIOLOGICAL ENGINEERING CO.,LTD, с заявленной чистотой 99,15 (масс. %).

2.3 Методика контроля качества тауматина колориметрическими методами

2.3.1 Метод Лоури

Для определения количественного содержания белка использовали метод Лоури, который заключался в образовании комплекса ионов меди (Cu^{2+}) с пептидными связями, при котором ионы меди переходят в форму Cu^+ .

Оценку количественного содержания порошка тауматина в водном растворе проводили на спектрофотометре Agilent Cary 60 при длине волны 750 нм. Перед работой прогревали спектрофотометр в течении 20 минут.

Готовили стандартный раствор альбумина, путем растворения 0,01 г в колбе на 100 см^3 , и исследуемый раствор тауматина, растворением 0,005 г в колбе на 50 см^3 . Из стандартного раствора альбумина готовили серию градуировочных растворов альбумина концентрации г/см^3 : 0,00001; 0,00002; 0,00004; 0,00006; 0,00008 и 0,0001.

Готовили реактив 1 и реактив 2 для рабочего раствора, которые в дальнейшем в день определения смешивали в соотношении 1 см^3 реактива 1 и 50 см^3 реактива 2.

Для приготовления реактива 1 в мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещали 0,5 г меди сернокислой 5-водной и 1 г цитрата натрия, растворяли в 50 см^3 дистиллированной воды и доводили объем раствора тем же растворителем до метки.

Для приготовления реактива 2 в мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещали 2 г карбоната натрия и растворяли в 50 см^3 0,1 н растворе гидроксида натрия, доводили объем раствора до метки.

В пенициллиновых флаконах объемом 5 мл готовили реакционную

смесь. К 1 см^3 стандартного раствора альбумина, содержащего $0,00001 - 0,0001\text{ мгк/см}^3$, и исследуемого раствора, содержащего $0,00005\text{ мкг/см}^3$, приливали $2,0\text{ см}^3$ рабочего раствора, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 10 минут. Затем в пенициллиновые флаконы с реакционной смесью добавляли $0,2\text{ см}^3$ 1 н реактива Фолина – Чокалтеу, тщательно перемешивали и через 30 минут определяли оптическую плотность раствора.

Содержание белка в исследуемом растворе рассчитывали по градуировочному графику.

2.3.2 Биуретовый метод

Метод основан на образовании биуретового комплекса пептидных связей белков с двухвалентными ионами меди.

Оценку количественного содержания тауматина в водном растворе проводили на спектрофотометре Agilent Cary 60 при длине волны 540 нм. Перед работой прогревали спектрофотометр в течении 20 минут.

Готовили стандартный раствор альбумина, путем растворения 1 г в колбе на 100 см^3 , и исследуемый раствор тауматина, растворением 0, 5 г в колбе на 50 см^3 . Из стандартного раствора альбумина готовили серию градуировочных растворов альбумина концентрации г/см^3 : 0,002; 0,004; 0,006; 0,008 и 0,01.

Готовили биуретовый реактив: в мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещали 0,15 г меди сернокислой 5-водной, 0,6 г натрий-калия виннокислого и растворяли в 50 см^3 дистиллированной воды, при энергичном перемешивании приливали 30 см^3 10 % раствора гидроксида натрия, затем добавляли 0,1 г йодида калия. Объем раствора доводили дистиллированной водой.

В пенициллиновые флаконы, содержащие 1 см^3 раствора белка соответствующего разведения добавляли 4 см^3 биуретового реактива, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 минут. Измеряли оптическую плотность раствора в 1 см кювете. Содержание белка в исследуемом растворе

рассчитывали по градуировочному графику.

2.4 Оценка температуры плавления тауматина

Оценку подлинности тауматина методом термического анализа проводили на MP50 Melting Point System производства компании METTLER TOLEDO.

Небольшое количество растертого белка помещали в запаянный с одного конца тонкостенный стеклянный капилляр. Капилляр устанавливали в прибор и по графику зависимости интенсивности сигнала от температуры фиксировали точку плавления белка.

2.5 Определение изоэлектрической точки

Для определения изоэлектрической точки тауматина готовили буферные смеси, для чего в шесть стаканчиков на 50 см³ наливали растворы смеси борной, уксусной и фосфорной кислот и раствор гидроксида натрия в количестве необходимом для получения рН буфера равные 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5.

Смесь борной, уксусной и фосфорной кислоты готовили следующим образом: в мерную колбу объемом 1000 см³ вносили 2,65 см³ фосфорной кислоты, 5,69 см³ уксусной кислоты и 2,4732 г борной кислоты, добавляли 800 см³ дистиллированной воды и перемешивали. Доводили до метки тем же растворителем.

Для приготовления раствора гидроксида натрия в мерную колбу объемом 1000 см³ вносили 8 г гидроксида натрия и растворяли в дистиллированной воде.

К 10 см³ буферной смеси добавляли по 5 см³ 1 % раствора тауматина и по 20 см³ этилового спирта. Содержимое стаканчиков перемешивали стеклянной палочкой и через 30 минут определяли оптическую плотность содер-

жимого всех шести стаканчиков с помощью фотоколориметра.

По результатам измерений строили график в координатах оптическая плотность – рН.

2.6. Определение стабильности белка методом горизонтального электрофореза

Оценку стабильности тауматина проводили методом электрофореза в агарозном геле в горизонтальной камере с источником питания для электрофореза - CS-3AMP - Cleaver Scientific производство Великобритания.

Готовили агарозный гель с 0,7 % агарозы: взвешивали 0.35 г агарозы и доливали 1х ТАЕ буфер до нужного объёма. Полученный раствор импульсами нагревали в СВЧ-печи, до полного растворения агарозы. Гель остужали до 60-70 °С и заливали в форму. Вставляли гребенку для формирования лунок и оставляли на 15-20 минут до полной полимеризации геля.

В лунки по 0,005 см³ вносили следующие образцы: стандарт с молекулярными массами 10-250 Да, раствор тауматина в воде, раствор тауматина с бромфеноловым синим, раствор тауматина с кумасси, бромфеноловый синий и кумасси. Предварительно добавляли буфер для электрофореза.

Электрофоретическую камеру подключали к источнику питания и задавали напряжение 80 В. Проводили электрофоретическое разделение белка в направлении от катода (-) к аноду (+) в течении 40 минут. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя.

По окончании электрофореза гель вынимали из формы и переносили на стекло в УФ-трансиллюминатор. Включали трансиллюминатор и анализировали результаты эксперимента при длине волны 312 нм.

Устойчивость системы определяли по уравнению Гельмгольца-Смолуховского:

$$\xi = \frac{h * \eta * l}{t * \varepsilon * \varepsilon_0 * E}, \text{ мВ,}$$

где h – путь (перемещение границы), м; η – вязкость среды, Н · с/м³; l – расстояние между электродами, м; t – время, с; ε – диэлектрическая проницаемость среды; ε_0 – электрическая постоянная, $8,85 \cdot 10^{-12}$; E – приложенная разность потенциалов, В.

2.7 Очистка белка хроматографическими методами

2.7.1 Методика очистки тауматина методом колоночной хроматографии

Очистка белка проводилась с использованием двух сорбентов: азоэпосиадсорбент Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ, предоставленный кафедрой фармацевтической химии КемГУ, SP Sepharose Fast Flow, и картриджа Bio-Scale Mini UNOsphere S производства компании BioRad.

Для очистки тауматина готовили два буферных раствора: начальный буферный раствор А и элюирующий буферный раствор Б.

Для приготовления 500 см³ начального буфера – натрий-ацетатного рН 5,0, использовали 147,5 см³ 0,5 N раствор уксусной кислоты (30 см³ растворяли в 1000 см³ дистиллированной воды) и 352,5 см³ 0,5 N тригидрат ацетата натрия (68 г соли растворяли в 1000 см³ дистиллированной воды).

Для приготовления элюирующего буфера к начальному буферу добавляли раствор 2М NaCl (11,7 г NaCl растворяли в 100 см³ дистиллированной воды) с содержанием от 0 до 50 %.

Элюирование проводили в градиентном режиме (0-10 %, 0-14'; 10-20 %, 14-28'; 20-30 %, 28-42'; 30-40 %, 42-56'; 40-50 %, 56-70') со скоростью потока 0,25 см³/мин.

Готовили раствор тауматина в буфере концентрацией 0,014 г/ см³.

На штатив устанавливали бюретку на дно которой помещали стеклян-

ную вату и заливали сорбент, высотой около 10 см. Сорбент промывали водой и буфером.

После промывки колонки буфером, вводили образец белка и промывали буфером Б с заданным градиентом соли 2М NaCl от 0 до 50 %. Далее промывали колонку буфером А.

Собирали фракции по 1,5 мл каждая.

Степень очистки определяли с помощью метода Лоури и ВЭЖХ.

2.7.2 Методика очистки тауматина методом ультрафильтрации

Для очистки тауматина методом ультрафильтрации использовали систему ультрафильтрации Sartorius Vivaflow 200 производства Германия, состоящая из кассеты с поперечным потоком с мембраной из полиэфирсульфона, насоса, манометра и трубок.

Готовили фосфатный буферный раствор pH 7,4. Для этого готовили раствор гидрофосфата натрия (в колбу на 1000 см³ вносили 35,6 г Na₂HPO₄ и растворяли дистиллированной водой) и раствор дигидрофосфата калия (в колбу на 1000 см³ вносили 27,2 г KH₂PO₄ и растворяли в дистиллированной воде). Полученные растворы смешивали в следующем соотношении 885:115 см³.

Навеску белка 0,35 г растворяли в 250 см³ фосфатного буфера и пропускали через систему ультрафильтрации.

2.8 Анализ белка методом ВЭЖХ

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), основанный на разделении смесей веществ на хроматографической колонке с последующим исследованием элюата с помощью спектрофотометрического детектора, использовали для качественного и количественного анализа белка тауматина до и после очистки на различных сорбентах.

Количественное определение тауматина до и после очистки проводили на хроматографе «Милихром А-02» с УФ-детектированием (ООО ИХ «Эко-Нова», г. Новосибирск) на обращенно-фазовой колонке ProntoSIL 120-5 C18 AQ (ООО ИХ «ЭкоНова», г. Новосибирск) при градиентном элюировании.

Для приготовления подвижной фазы А в мерную колбу вместимостью 100 см³ вносили 90 см³ дистиллированной воды и 0,1 см³ трифторуксусной кислоты. Доводили объем раствора водой до метки, перемешивали и дегазировали на ультразвуковой бане не менее 10 минут.

Для приготовления подвижной фазы Б в мерную колбу вместимостью 100 см³ вносили ацетонитрил, изопропиловый спирт и трифторуксусную кислоту в соотношении 50:50:1. Раствор перемешивали и дегазировали на ультразвуковой бане не менее 10 минут.

Анализируемые образцы разбавляли в 2 раза ацетатным буферным раствором рН 5,0. Подготовленные пробы переносили в вials и устанавливали условия хроматографирования, представленные в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Хроматографические условия

Колонка	ProntoSIL 120-5 C18 AQ		
Подвижные фазы	ПФ А: дистиллированная вода – ТФУ (100:1) ПФ Б: ацетонитрил – изопропиловый спирт – ТФУ (50:50:1)		
Элюирование	Градиентный режим:		
	Время, мин	ПФ А, %	ПФ Б, %
	0	97	3
	1	97	3
	4,5	25	75
	8	0	100
	11	0	100
Скорость потока	0,2 см ³ /мин		
Температура колонки	35 °С		
Детектор	Спектрофотометрический, 210, 220, 260 нм		
Объем пробы	0,002 см ³		

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении исследований белков необходимо, чтобы белок был качественным и имел степень чистоты не менее 99 %. Если белок плохого качества, то это может привести к низкой точности эксперимента или же полному отсутствию результата. Чистота белка особенно важна при попытке кристаллизовать белки. Нежелательное загрязнение может привести к образованию плохо сформированных кристаллов, агрегатов, неправильному связыванию белка с другими молекулами. Кроме того, примеси могут препятствовать кристаллизации белков. Поэтому перед тем как приступить к работе с белком, необходимо провести его проверку на качество, что позволит в будущем сэкономить время и деньги.

Среди основных методов оценки качества белка выделяют:

- 1) Общая количественная оценка: анализ по методу Лоури и биуретовому методу. Так как данный метод позволяет оценить истинное количество белка в пробе.
- 2) Термический анализ идентификации белка. Поскольку при отклонении точки плавления от заявленной, можно судить о наличии посторонних веществ в объекте.
- 3) Определение изоэлектрической точки белка методом потенциометрии. При наличии загрязняющих веществ показания изоэлектрической точки будут отклоняться.
- 4) Метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле.. Электрофорез дает общее представление как размера белка, так и наличия других белковых примесей. Наиболее распространенным является денатурирующий SDS-PAGE.
- 5) Метод высоко эффективной жидкостной хроматографии. Метод позволяет качественно и количественно определить наличие примесей и целевого белка.

В данной работе все представленные методы были использованы для

оценки качества коммерческого белка тауматина производства Китай, компания XI'AN PRIUS BIOLOGICAL ENGINEERING CO.,LTD.

3.1. Общая количественная оценка тауматина в пробе

Наиболее часто для определения концентрации белков в биологических жидкостях и растворах используются колориметрические методы, основанные на цветных реакциях белков. К таким методам можно отнести биуретовую реакцию и метод Лоури. Интенсивность окраски определяется концентрацией белкового раствора [23].

Оценку количественного содержания тауматина в водном растворе проводили на спектрофотометре Agilent Cary 60 с толщиной пропускающего слоя 1 см³ с максимумами поглощения 750 (метод Лоури) и 540 (биуретовый метод) нм. Перед работой прогревали спектрофотометр в течении 20 минут.

3.1.1 Определение содержания кислых фракций белка методом Лоури

Метод Лоури основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина-Чокальтеу в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Метод характеризуется высокой чувствительностью и позволяет определять содержание белка в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг на пробу [23].

Для определения содержания тауматина в образце готовили вспомогательные растворы согласно методике пункта 2.3.1. По полученным оптическим плотностям растворов альбумина различной концентрации и анализируемого белка тауматина (таблица 3.1) строили градуировочный график (рисунок 3.1).

Таблица 3.1 – Результаты определения содержания тауматина методом Лоури

Концентрация, мкг/ см ³		Оптическая плотность, нм
Альбумин	10	0,1707
	20	0,2334
	40	0,2998
	60	0,3721
	80	0,4531
	100	0,5081
Тауматин	150	0,2790

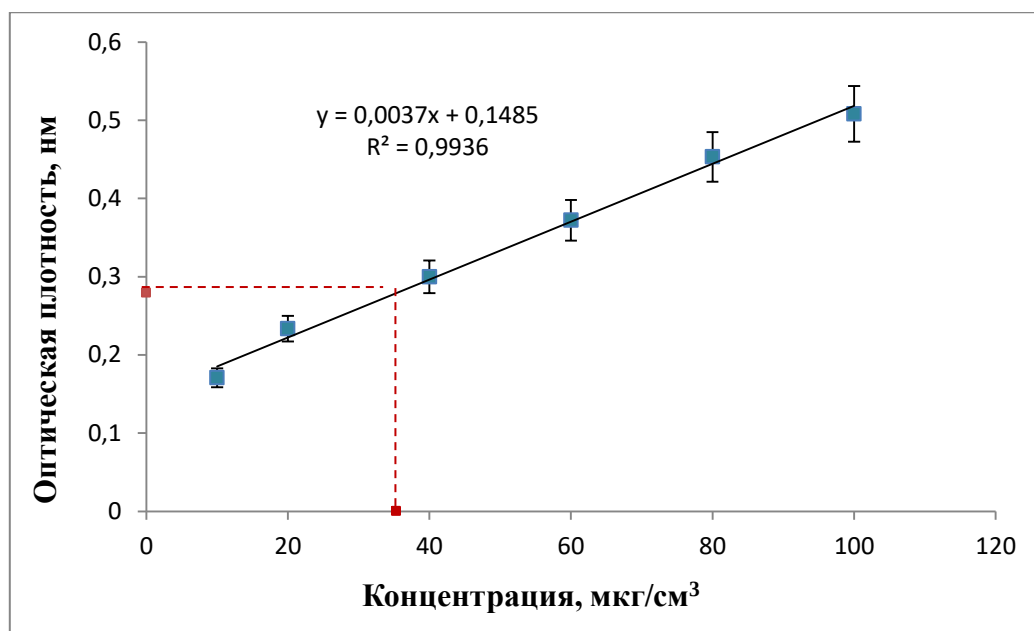


Рисунок 3.1 – Градуировочный график по альбумину (Метод Лоури)

Выявлено, что фактическое содержание кислой фракции белка в пробе составляет 35,31 мкг/см³, при приготовленной 150 мкг/см³, что составляет 24 % содержания белка.

3.1.2 Определение содержания основных фракций белка тауматина биуретовым методом

Метод основан на способности белков давать с раствором сернокислой

меди фиолетовое окрашивание в щелочной среде. Для биуретовой реакции необходимо наличие двух ОН-групп и трех атомов азота, находящихся в полипептидной цепи. Группа образующая пептидную связь ($-\text{OC}-\text{NH}-$) в щелочной среде, присутствует в таутомерной форме. В избытке щелочи происходит диссоциация водорода енольной ОН-группы, при этом возникает отрицательный заряд, с помощью которого кислород, взаимодействуя с медью, образует соль [23]. Кроме того, медь образует дополнительные связи с атомами азота пептидных связей.

Для определения содержания тауматина в пробе готовили вспомогательные растворы согласно методике пункта 2.3.2. По полученным оптическим плотностям растворов альбумина различной концентрации и анализируемого белка тауматина (таблица 3.2) строили градуировочный график (рисунок 3.2).

Таблица 3.2 – Результаты определения содержания тауматина биуретовым методом

Концентрация, мкг/ см ³		Оптическая плотность, нм
Альбумин	2	0,2114
	4	0,3006
	6	0,3953
	8	0,4805
	10	0,5561
Тауматин	15	0,3200

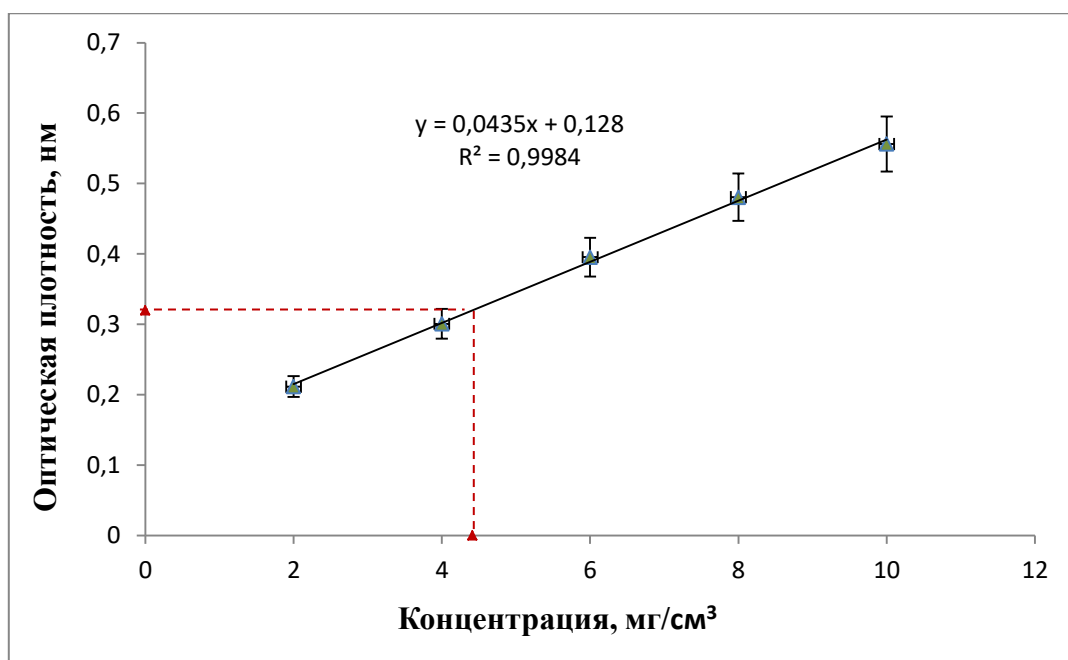


Рисунок 3.2 - Градуировочный график по альбумину (Биуретовый метод)

Выявлено, что фактическое содержание основной фракции белка в пробе составляет 4,41 мкг/см³, при приготовленной 15 мкг/см³, что составляет 29,4 % содержания белка.

Таким образом, по классическим методам определения белка было установлено, что содержание составляет не более 30 (масс. %), а не 99 %, как заявляет производитель. Поэтому для подтверждения белка тауматина был использован термический анализ.

3.2 Анализ термической устойчивости белка

Согласно пункту 1.2 тауматин остается стабильным в условиях ультрапастеризации, т.е. до 120-140 °С. Поэтому оценка графика температуры плавления субстанции дает представление о наличии посторонних веществ в анализируемом образце.

Контроль термической устойчивости белка проводили согласно пункту 2.4, результат представлен на рисунке 3.3.

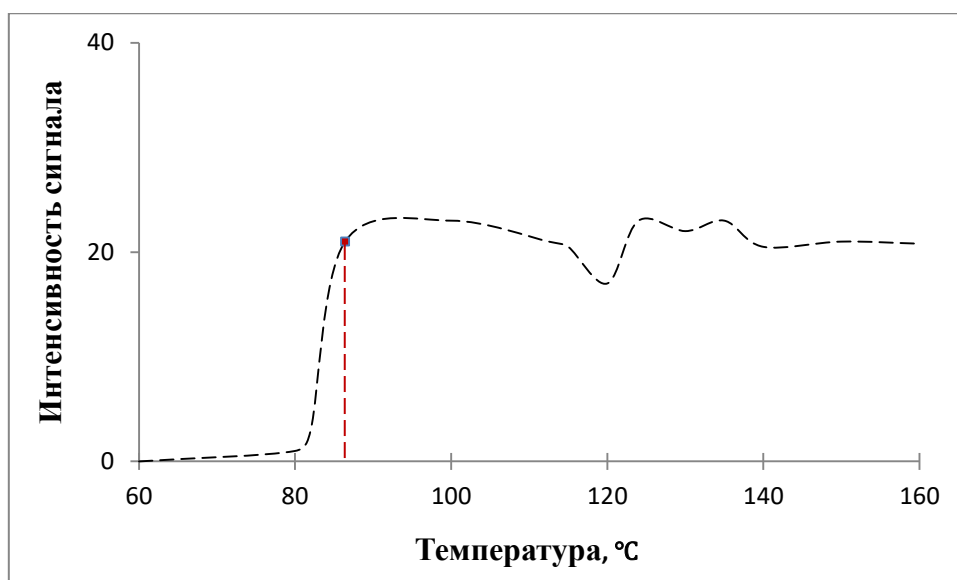


Рисунок 3.3 - График плавления белка в капилляре

Зарегистрировано, что температура плавления образца в капилляре начинается с 86,4 °C, следовательно, температура плавления не соответствует температуре плавления тауматина по литературным данным. Кроме того, на диаграмме видно, что на более высоких температурах также происходит плавление веществ, что свидетельствует о наличии примесей в исследуемом образце.

3.3 Определение изоэлектрической точки белка

Важнейшими адсорбентами белков являются ионообменники и разнообразные аффинные сорбенты. Выбор ионообменника определяется кислотно-основными свойствами белка, которые можно определить по изоэлектрической точке методом потенциометрии. При значениях pH буфера ниже изоэлектрической точки белок имеет положительный заряд и адсорбируется на катионообменнике и, наоборот. Поэтому для правильного выбора сорбента и ионообменника важно знать изоэлектрическую точку анализируемого белка.

Согласно пункту 1.2 значение изоэлектрической точки белка соответствует значению 11,5. По методике раздела 2.5 были приготовлены вспомо-

гательные растворы и определена изоэлектрическая точка тауматина (таблица 3.3, рисунок 3.4)

Таблица 3.3 – Зависимость оптической плотности белка от pH буфера

pH буфера	Оптическая плотность
10,0	0,157
10,5	0,160
11,0	0,165
11,5	0,179
12,0	0,176
12,5	0,174

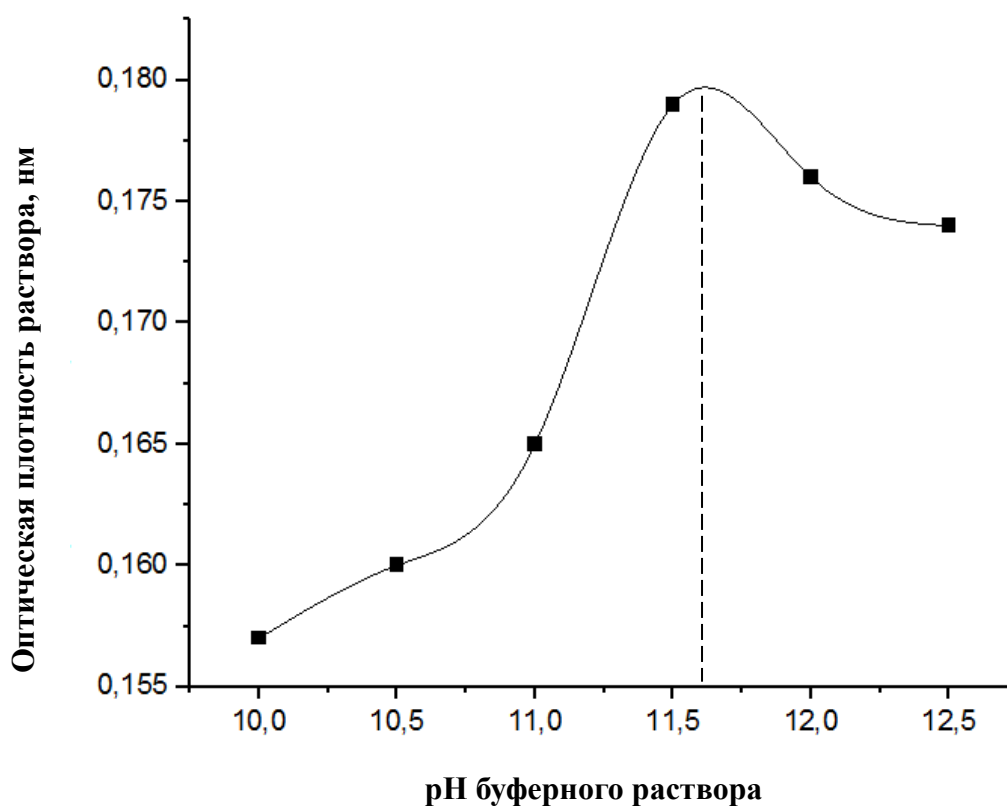


Рисунок 3.4 –Определение изоэлектрической точки тауматина

Таким образом, изоэлектрическая точка тауматина соответствует значению 11,6.

3.4 Определение стабильности тауматина

При проведении анализа белка методом ВЭЖХ особенно важна стабильность вещества. Одним из методов оценки стабильности вещества является оценка значения дзета-потенциала, вычисляемого по уравнению Гельмгольца-Смолуховского, описанного в пункте 2.6.

Дзета-потенциал - основной показатель устойчивости коллоидных систем в жидких средах [24]. Для измерения дзета-потенциала коллоидных частиц в жидких средах оптическими методами используют явление электрофореза, то есть направленного движения заряженных частиц, взвешенных в жидкости, под действием электрического поля.

Дзета-потенциал, соответствующий значению 30 мВ (положительное или отрицательное), можно рассматривать как характерную величину, для условного разделения низко-заряженных поверхностей и высоко-заряженных поверхностей [24]. Чем выше электрокинетический потенциал, тем стабильнее коллоид. Частицы с дзета-потенциалом выше +30 мВ считаются устойчивыми, соответственно частицы с потенциалами дзета ниже, чем 30 мВ считаются не устойчивыми.

По уравнению Гельмгольца-Смолуховского найдем значение дзета потенциала:

$$\xi = \frac{h * \eta * l}{t * \varepsilon * \varepsilon_0 * E} = \frac{0,018 * 1,004 * 10^{-3}}{1500 * 8,85 * 10^{-12} * 78 * 80} = 0,043 \text{ В} = 43 \text{ мВ}$$

Следовательно, анализируемый белок тауматин является стабильным.

3.5 Результаты очистки белка различными сорбентами

Наиболее трудоёмкий этап получения белков — их очистка, поскольку часто анализируемый белок присутствует в небольших количествах, составляющих доли процента от всех белков раствора.

Для разделения белков часто используют хроматографические методы,

основанные на распределении веществ между двумя фазами, одна из которых подвижная, а другая неподвижная. В основу хроматографических методов положены разные принципы: гель-фильтрации, ионного обмена, адсорбции [23].

Белки обычно избирательно адсорбируются на различных твердых фазах. Поэтому адсорбционные методы, особенно колоночная хроматография, широко используются для разделения белков. Наиболее совершенная очистка белков возможна с применением этих методов.

Очистка белков от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации дает хорошие результаты. Зерна сефадекса дольше удерживают низкомолекулярный материал, и за это время белковая фракция может выйти из колонки в чистом виде. Фильтрация с использованием гелей сефадекса широко используется для обессоливания белковых растворов.

3.5.1 Очистка тауматина с использованием азоэпоксисорбента Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 - это сшитая смола на основе декстрана, используемая с подвижными фазами органических растворителей для проникновения в гель, разделения нормальной фазы и адсорбционной хроматографии липидов, стероидов, жирных кислот, гормонов, витаминов и т.д. Он также используется в гель-фильтрационной хроматографии, белковой хроматографии, средах для гель-фильтрации, смолах и разделительных средах.

Сефадекс LH-20 получают путем гидроксипропилирования Sephadex G-25, экструдированной среды, образованной шариком, и специально разработан для гель-фильтрации природных продуктов. Сефадекс LH-20 характеризуется:

- 1) Хроматографической селективностью из-за двойной гидрофильной и липофильной природы матрицы;
- 2) Легко предсказанное поведение элюирования на основе химической

структуры;

3) Химическая и физическая устойчивость;

4) Отличная периодичность для периодической воспроизводимости.

Очистку тауматина проводили согласно методике, описанной в пункте 2.7.1, полученные фракции после очистки контролировали на спектрофотометре Agilent Cary 60 по методам, описанным в пунктах 2.3.1 и 2.8.

Результаты спектрофотометрической оценки количественного содержания белка в фракциях представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Результаты очистки на азоэпоксисорбенте Sephadex LH-20

№ фракции	Оптическая плотность
1	0,1900
2	0,1935
3	0,1594
4	0,2327
5	0,2215
6	0,1738
7	0,2175
8	0,1620
Исходный раствор тауматина ($C=0,0014 \text{ г/см}^3$)	0,2096

В результате очистки тауматина на азоэпоксисорбенте Sephadex LH-20 собрано 8 фракций, прозрачные, не отличающиеся по внешнему признаку. После оценки содержания белка в каждой из фракций по методу Лоури, выявлено, что наибольшее количество белка тауматина содержится в 4 фракции, что соответствует следующему составу элюента: 70 % натрий-ацетатный буфер и 30 % добавки NaCl.

3.5.2 Очистка тауматина с использованием сорбента SP Sepharose Fast Flow

SP Sepharose Fast Flow - это сульфопропиловая (SP) смола для сильной катионообменной хроматографии для быстрой очистки белков.

SP Sepharose Fast Flow характеризуется:

- 1) Хорошо зарекомендовавший себя сильный катионообменник;
- 2) Высокая химическая стабильность;
- 3) Гидрофильная базовая матрица обеспечивает низкий уровень неспецифического связывания и низкий уровень примесей, полученных из клеток-хозяев, в элюирующем растворе;
- 4) Сильно сшитая агарозная смола обеспечивает высокую скорость потока и высокую производительность.

Очистку тауматина проводили согласно методике, описанной в пункте 2.7.1, полученные фракции после очистки контролировали по методам, описанным в пунктах 2.3.1 и 2.8.

Результаты спектрофотометрической оценки количественного содержания белка в фракциях представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Результаты очистки на сорбенте SP Sepharose Fast Flow

№ фракции	Оптическая плотность
1	0,2670
2	0,2555
3	0,1997
4	0,2295
5	0,2317
6	0,1527
7	0,1544
8	0,1431
Исходный раствор тауматина (C=0,0014 г/см ³)	0,2096

В результате очистки тауматина на сорбенте SP Sepharose Fast Flow собрано 8 фракций, прозрачные, не отличающиеся по внешнему признаку. После оценки содержания белка в каждой из фракций по методу Лоури, выявлено, что наибольшее количество белка тауматина содержится в 1 фракции. Смывание белка наблюдается после промывки натрий-ацетатным буфером без добавки.

3.5.3 Очистка тауматина с использованием картриджа Bio-Scale Mini UNOsphere S

Для очистки использовался картридж Bio-Scale Mini UNOsphere S производства компании BioRad.

Катионообменные среды UNOsphere S разработаны для удовлетворения растущих потребностей биофармацевтической промышленности в высокопроизводительных хроматографических средах. UNOsphere, гидрофильная полимерная подложка, основанная на одностадийном процессе полимеризации, обеспечивает высокую производительность благодаря высокой связующей способности и низкому обратному давлению. Одностадийный процесс полимеризации позволяет получить подложку непревзойденного качества и воспроизводимости от партии к партии.

Bio-Scale Mini UNOsphere - картриджи объемом от 1 до 5 см³ с носителем UNOsphere, содержащим функциональные группы для проведения ионообменной хроматографии. Идеально подходит для очистки заряженных белков и пептидов, а так же плазмид.

Особенности носителя UNOsphere:

- 1) Высокая скорость потока при низких давлениях (<3 бар, 45 psi).
- 2) Частицы высокопористой структуры с увеличенной площадью активной поверхности обеспечивают высокий уровень массопереноса.
- 3) Высокая продуктивность благодаря высокой динамической емкости при быстром разделении (скорость потока до 1200 см/ч).

4) Химическая стабильность при pH 1-14.

5) Механическая стабильность > 200 циклов.

Очистку тауматина проводили согласно методике, описанной в пункте 2.7.1, полученные фракции после очистки контролировали по методам, описанным в пунктах 2.3.1 и 2.8.

Таблица 3.6 – Результаты очистки на картридже Bio-Scale Mini UNOspere

№ фракции	Оптическая плотность
1	0,1726
2	0,2744
3	0,1804
Исходный раствор тауматина ($C=0,0014 \text{ г/см}^3$)	0,2096

В результате очистки тауматина на картридже Bio-Scale Mini UNOspere собрано 3 фракции, прозрачные, не отличающиеся по внешнему признаку. После оценки содержания белка в каждой из фракций по методу Лоури, выявлено, что наибольшее количество белка тауматина содержится во 2 фракции.

3.5.4 Очистка тауматина с использованием системы ультрафильтрации Sartorius Vivaflow 200

Для очистки тауматина использовали систему ультрафильтрации Sartorius Vivaflow 200. Система ультрафильтрации Sartorius Vivaflow 200 с номинальным отсечением по молекулярной массе (НОММ) 10 кДа — это многоразовая и готовая к использованию кассета с перекрестным потоком для фильтрации и концентрирования проб объемом от 500 мл до 5 литров. Кассеты данного типа могут использоваться для концентрирования рекомбинантных белков, диафильтрации, для процессов исследования наночастиц,

включая концентрирование, диафильтрацию или удаление низкомолекулярных загрязняющих веществ. Мембрана данного прибора выполнена из полиэфирсульфона (ПЭС/PES).

Полиэфирсульфон (ПЭС) – это неусиленный, аморфный полимер, главными характеристиками которого являются его высокие термические, электрические и механические свойства, которые типичны для кристаллического полимера [25]. Полиэфирсульфоны обладают высокой стойкостью к воздействию высоких температур, гидролизу, химическому воздействию и пару.

Очистку тауматина проводили согласно методике, описанной в пункте 2.7.2, полученные фракции после очистки контролировали по методу, описанному в пункте 2.8.

3.5.5 Оценка содержание тауматина до и после очистки методом ВЭЖХ

Оценку содержания белка тауматина проводили на микроколонке ProntoSIL 120-5 C18 AQ (ООО ИХ «ЭкоНова», г. Новосибирск) методом ВЭЖХ в градиентном режиме, описанным в разделе 2.9. при следующих условиях: ПФ А: ДВ – ТФУ (100:1), ПФ Б: АЦ – ИПС – ТФУ (50:50:1); режим элюирования: 3-3 %, 0-1' ; 3-75 %, 1-4,5' ; 75-100 %, 4,5-8', 100-100 %, 8-11'; скорость потока 0,2 см³/мин; температура колонки 35 °С; детектор – спектрофотометрический, длина волны 210, 220, 260 нм; объем пробы 0,002 см³. Хроматограммы различных фракций белка представлены на рисунке 3.5-3.9. Пик тауматина соответствует времени удерживания 6,65 минут, пик низкомолекулярных веществ, содержащихся в пробе, соответствует времени удерживания около 7,13 минут. Посторонние пики являются системными и появляются от подвижных фаз и буферного раствора.

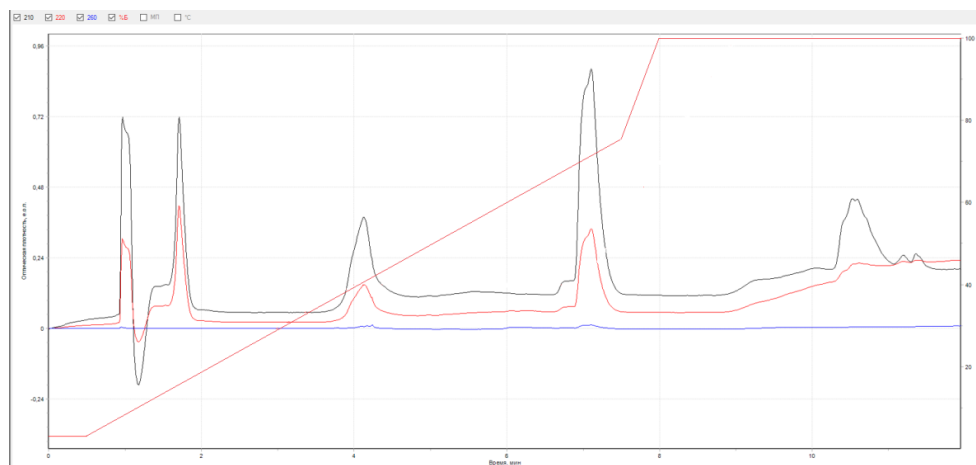


Рисунок 3.5 – Хроматограмма исходного раствора белка (до очистки)

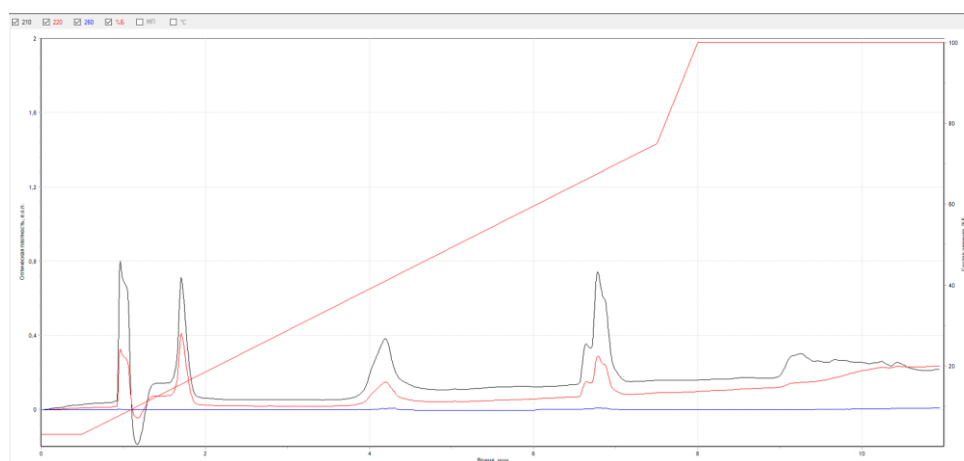


Рисунок 3.6 – Хроматограмма тауматина после очистки на азоэпкси-сорбенте Sephadex LH-20

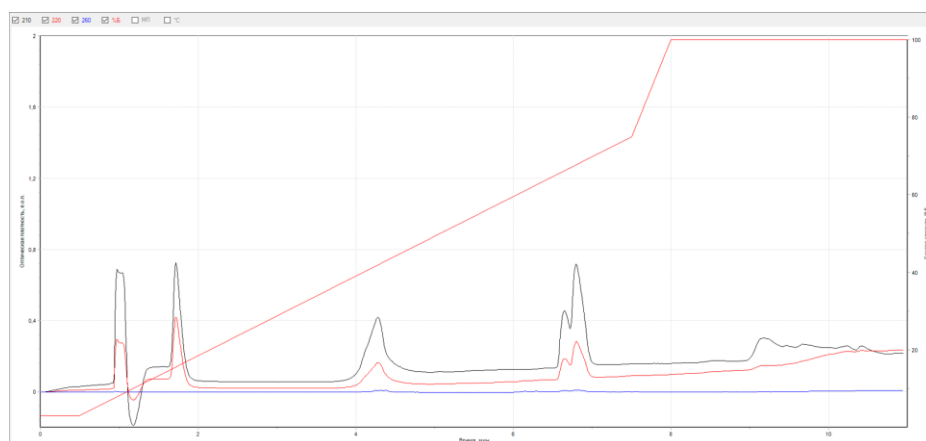


Рисунок 3.7 – Хроматограмма тауматина после очистки на сорбенте SP Sepharose Fast Flow

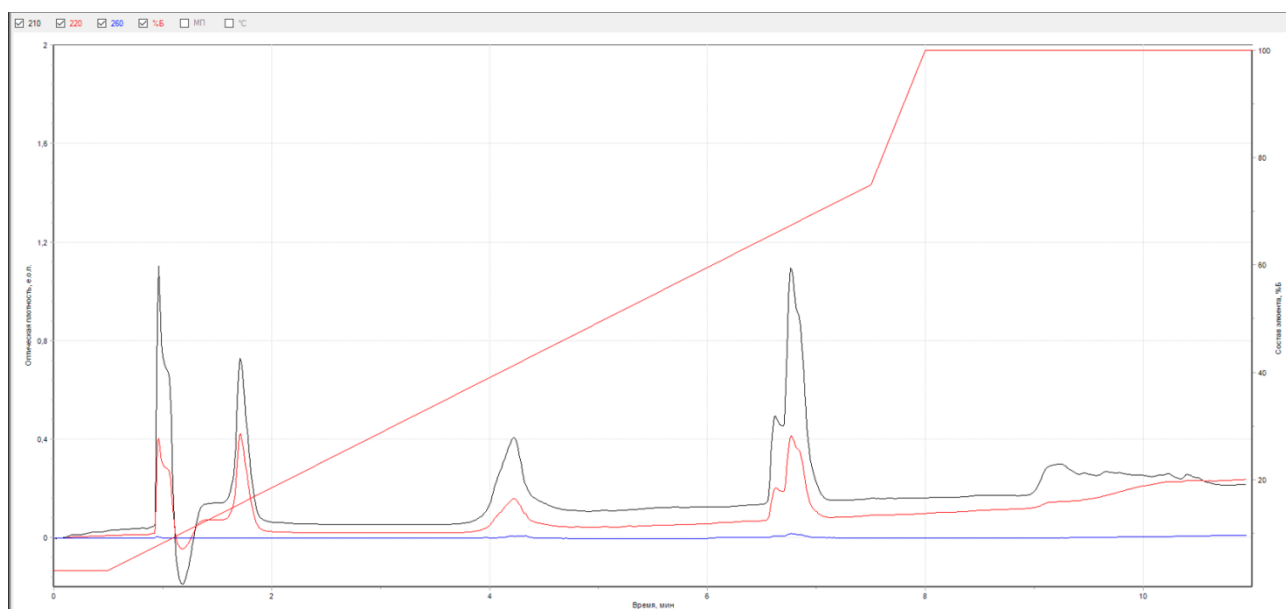


Рисунок 3.8 – Хроматограмма тауматина после очистки на картридже Bio-Scale Mini UNOspere

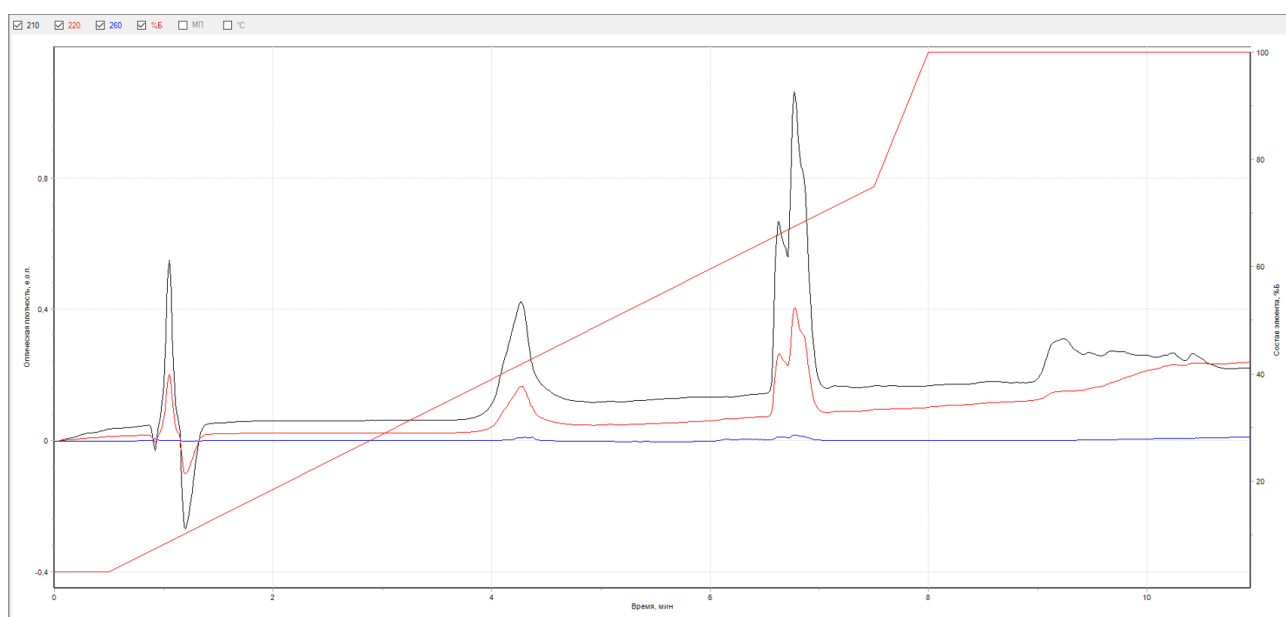


Рисунок 3.9 – Хроматограмма тауматина после очистки на системе ультрафильтрации Sartorius Vivaflow 200

По площади пиков определяем степень качество очистки тауматина (Таблица 3.7, рисунок 3.10).

Таблица 3.7 – Результаты анализа образцов тауматина ВЭЖХ

Образцы		Площадь пика, е.о.п.
Тауматин	$Tau_{исх}$	1,2798
	Tau_{dex}	2,2722
	Tau_{rose}	7,3399
	$Tau_{UNOspere}$	4,0755
	$Tau_{ультр}$	12,0727
Низкомолекулярные вещества	$Mon_{исх}$	40,4164
	Mon_{dex}	13,6331
	Mon_{rose}	17,7672
	$Mon_{UNOspere}$	20,3773
	$Mon_{ультр}$	28,7678

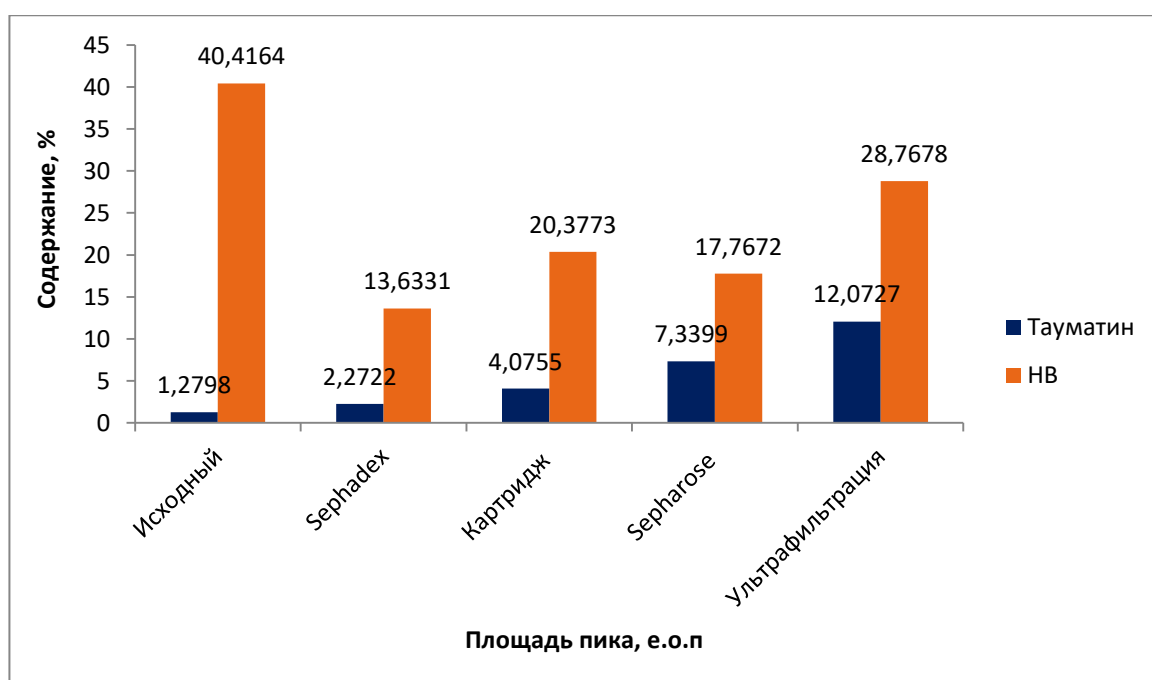


Рисунок 3.10 – Результаты анализа ВЭЖХ

Таким образом, наибольшее содержание целевого белка обнаружено после очистки образца методом мембранной хроматографии, однако данный способ очистки показал большое содержание низкомолекулярных веществ. По соотношению тауматина и НВ лучше всего дает сорбент SP Sepharose Fast Flow. Очистку белка рекомендуется проводить с использованием этого сорбента. Кроме того данный сорбент является наиболее выгодным.

4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

Перспективность любого научного исследования в первую очередь оценивается коммерческой ценностью разработки. Любому, кто претендует на финансирование, необходимо продемонстрировать источникам, что их вложение налоговых денег в научное исследование приносит узнаваемую (для граждан) ценность.

Технико-экономическое обоснование проекта позволяет учесть многие факторы, включая экономические, технические и календарные соображения, для определения вероятности успешного завершения проекта. В рамках его выполнения участники проекта должны определить, достаточно ли у них финансовых ресурсов и эффективных соответствующих технологий. Следовательно, формирование и реализация подходов ресурсоэффективности и ресурсосбережения являются главными задачами стратегического менеджмента, а оценка коммерческой ценности разработки является главным условием при поиске источников финансирования для проведения научного исследования и коммерциализации его результатов.

Таким образом, целью раздела является определение перспектив по проведению научно-исследовательских работ, обоснование целесообразности разработки проекта, а также его конкурентоспособности и материалоемкости в соответствии с современными требованиями в данной сфере.

4.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Выпускная квалификационная работа направлена на исследование кислотно-основных свойств коммерческого белка тауматина с целью подбора

условий очистки от примесей хроматографическими методами.

Сахар естественным образом присутствует во всех продуктах, содержащих углеводы: фруктах, овощах, злаках и молочных продуктах. Однако в настоящее время сахар используется в производстве продуктов питания в огромных количествах. Это привело к тому, что современный человек привык к потреблению сахара в десятки раз больше нормы. Результатом такой привычки стали рост заболеваемости диабетом, ожирение и сердечно-сосудистые заболевания. По оценкам Минздрава России, в нашей стране зарегистрировано 5,2 млн случаев диабета. Росстат подсчитал, что в год появляется 300-400 тыс. новых пациентов. Эксперты предполагают, что реальное число заболевших гораздо выше 5 млн — примерно 10,5 млн человек. Поэтому для сохранения здоровья людей необходимо предлагать такую альтернативу сахару, которая не будет травмировать организм.

Тауматин (E957) – смесь «сладких» белков, получаемых из плодов западноафриканского растения катемфе (*Thaumatococcus danielli* Benth). Несмотря на главное достоинство тауматина - чрезвычайно высокая интенсивность сладости, что требует незначительного количества калорий по сравнению с сахарозой, его масштабное производство и коммерциализация затрудняется качественной очисткой белка.

Поскольку тауматин является пищевой добавкой для различных БАДов, лекарственных сиропов, напитков и кондитерских изделий, основными потребителями разработки в области его очистки являются коммерческие организации: фармацевтические и пищевые предприятия. Конечный товар нацелен на людей, следящих за своим здоровьем, и людей, страдающих различными заболеваниями, связанными с непереносимостью углеводов.

Детальный анализ всех этапов разработки методики очистки белка и обзор конкурирующих технологических разработок дает возможность оценить эффективность данного проекта и определить рациональность применения мероприятий по оптимизации стадий очистки тауматина.

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений

На сегодняшний день существуют разные способы очистки «сладких» белков: высаливание, экстракция, гель-фильтрация, ультрафильтрация, электрофорез, хроматография. Для анализа с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбележения рассмотрим типовой (действующий на мировом рынке) и разрабатываемый методы очистки тауматина.

В качестве типового метода выступает экстракция растворителем, применяемая китайской компанией XI'AN PRIUS BIOLOGICAL ENGINEERING CO.,LTD, по производству и очистке тауматина.

Наглядно представить сравнительную характеристику двух способов помогает оценочная карта, представленная в таблице 4.1, в которой приведены баллы экспертной оценки оптимизированного метода очистки (B_{ϕ}), разработанных в данной работе, типовых (B_k), применяемых компанией конкурентов, а также конкурентоспособность соответствующих объектов – K_{ϕ} , K_k .

Позицию разработки и ее конкурентов оценивали по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая позиция, а 5 – наиболее сильная. Анализ конкурентных технических решений определяли по формуле:

$$K = \sum B_i \cdot B_i$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента; B_i – вес показателя (в долях единицы); B_i – балл i -го показателя.

Таблица 4.1 – Оценочная карта сравнения конкурентных разработок

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы		Конкурентоспособность	
		B_{ϕ}	B_k	K_{ϕ}	K_k
1	2	3	4	6	7
Технические критерии оценки ресурсоэффективности					
1. Простота реализации методики очистки	0,1	2	2	0,2	0,2
2. Безопасность	0,3	4	3	0,8	0,6

Продолжение таблицы 4.1

3. Надежность методики	0,1	4	3	0,4	0,3
4. Воспроизводимость результатов	0,2	5	3	1	0,6
Экономические критерии оценки эффективности					
1. Затраты на реагенты	0,1	3	4	0,4	0,6
2. Затраты на оборудование	0,1	4	5	0,4	0,5
3. Предполагаемый срок эксплуатации	0,1	4	4	0,4	0,4
Итого	1	26	24	3,6	3,2

Подставив полученные значения, получим:

$$K = \frac{K_{\phi}}{K_{\kappa}} = \frac{3,6}{3,2} = 1,13$$

Расчет показал значение больше 1, что говорит о конкурентоспособности научной разработки. Несмотря на большую стоимость оборудования и реагентов, которую продемонстрировал анализ оценочной карты, разрабатываемый метод является более безопасными и соответствует высокому уровню воспроизводимости, в сравнении с применяемыми на китайском предприятии.

4.1.3 SWOT-анализ

В данной работе первый этап анализа проводили путем нахождения слабых и сильных сторон проекта, выявляли угрозы и оценивали его потенциал. Результаты представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – первичный SWOT-анализ научно-исследовательской работы

Сильные стороны технологии	Слабые стороны технологии
С1. Более безопасный конечный продукт по сравнению с конкурентами; С2. Высокий уровень воспроизводимости; С3. Уменьшение расходов реактивов; С4. Экологичность; С5. Простота технологии.	Сл1. Более дорогой способ очистки по сравнению с конкурентами; Сл2. Закупка исходного сырья у иностранных поставщиков; Сл3. Увеличенное время очистки.

Продолжение таблицы 4.2

Возможности	Угрозы
В1. Увеличение производительности; В2. Появление дополнительного спроса на новый продукт; В3. Перспективы внедрения данного метода очистки в другие проекты компании; В4. Быстрая регистрация продукта.	У1. Введение дополнительных требований к сертификации продукции; У2. Развитая конкуренция технологий производства У3. Узкая направленность.

На втором этапе SWOT-анализа устанавливали степень необходимости проведения изменений, путем построения интерактивных матриц проекта, позволяющих установить комбинации взаимосвязей. Каждый отдельный фактор обозначали знаком «+», в случае если он соответствовал возможностям, или знаком «-», если соответствие было слабое. При наличии сомнений в расстановке знаков ставили «0». Построенные матрицы представлены в таблицах 4.3-4.6.

Таблица 4.3 – Интерактивная матрица сильных сторон и возможностей

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

Таблица 4.4 – Интерактивная матрица слабых сторон и возможностей

Слабые стороны проекта				
Возможности проекта		Сл1	Сл2	Сл3
	B1	+	+	+
	B2	-	+	-
	B3	0	+	0
	B4	-	-	-

Таблица 4.5 – Интерактивная матрица сильных сторон и угроз проекта

Сильные стороны проекта						
Угрозы		C1	C2	C3	C4	C5
	У1	+	+	+	0	-
	У2	+	+	0	+	+
	У3	-	-	-	-	+

Таблица 4.6 – Интерактивная матрица слабых сторон и угроз проекта

Слабые стороны проекта				
Угрозы		Сл1	Сл2	Сл3
	У1	+	+	+
	У2	-	0	+
	У3	-	-	-

Объединив результаты интерактивных матриц, получим конечную матрицу SWOT-анализа, представленную в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – SWOT-анализ итоговая матрица

	Сильные стороны С1.Более безопасный конечный продукт по сравнению с конкурентами; С2.Высокий уровень воспроизводимости; С3.Уменьшение расходов реактивов; С4.Экологичность; С5.Простота технологии.	Слабые стороны Сл1.Более дорогой способ очистки по сравнению с конкурентами; Сл2. Закупка исходного сырья у иностранных поставщиков; Сл3.Увеличенное время очистки.
Возможности В1.Увеличение производительности; В2.Появление дополнительного спроса на новый продукт; В3.Перспективы внедрения данного метода очистки в другие проекты компании; В4.Быстрая регистрация продукта.	Поле СИВ Возможность развития потребительского спроса зависит от качества продукта и его безопасности, следовательно, с ростом спроса высокий уровень воспроизводимости позволит нарастить производительную мощность компании, а полученный опыт проекта и его экологичность увеличивает возможность применения к другим аналогичным проектам.	Поле СЛив Более высокая стоимость метода, так же как и необходимость закупки исходных реагентов у иностранных поставщиков и увеличенное время на реализацию одного цикла, могут создать трудности по внедрению проекта, однако перспективы по увеличению производительности могут превысить возможные недостатки проекта.
Угрозы У1.Введение дополнительных требований к сертификации продукции; У2.Развитая конкуренция технологий производства У3.Узкая направленность.	Поле СИУ Высокие показатели воспроизводимости, безопасность продукта и экологичность метода делают проект конкурентоспособным, но введение дополнительных требований к паспорту продукта повлечет за собой изменения к требованиям по чистоте и, как следствие, к большому расходу ресурсов.	Поле СЛиУ Возможность введения дополнительных требований при регистрации продукта приведет к увеличению числа анализов и валидаций, что еще больше увеличит время и затраты на очистку белка данным методом.

4.2 Планирование научно-исследовательских работ

4.2.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для определения эффективности выполняемой работы необходимо составить план комплекса предполагаемых работ в рамках проведенного научного исследования, провести распределение исполнителей по видам работ. Примерный порядок составления этапов и работ, распределение исполнителей по данным видам работ приведен в табл. 4.8

Таблица 4.8 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Руководитель темы
Выбор направления исследований	2	Подбор и изучение материалов по теме	Инженер
	3	Обзор патентных исследований	Инженер
	4	Выбор направления исследований	Руководитель, инженер
	5	Календарное планирование работ по теме	Инженер
Теоретические и экспериментальные исследования	6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Инженер
	7	Построение схемы работы и проведение экспериментов	Инженер
	8	Сопоставление результатов экспериментов с теоретическими исследованиями	Инженер
	9	Корректировка схемы работы и проведение дополнительных экспериментов	Руководитель, инженер
	10	Сбор результатов и их сравнение с теоретическими исследованиями	Инженер
Обобщение и оценка результатов	11	Оценка эффективности полученных результатов	Инженер
	12	Определение целесообразности проведения выполненных работ	Инженер

Составление документации			
Оформление отчета по НИРС	13	Выбор наиболее успешной модели эксперимента	Руководитель, инженер
	14	Оценка эффективности и применения разработанной методики	Инженер
	15	Составление пояснительной записки (ВКР)	Инженер

4.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ

Поскольку трудовые затраты – это большая часть стоимости разработки, необходимо учесть трудоемкость работ каждого участника научного исследования. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости $t_{ожі}$ используется следующая формула:

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

где $t_{ожі}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения i -ой работы чел.-дн.; $t_{\min i}$ – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы (оптимистическая оценка: в предположении наиболее благоприятного стечения обстоятельств), 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.

$$T_{p_i} = \frac{t_{ожі}}{Ч_i},$$

где T_{p_i} – продолжительность одной работы, раб. дн.; $t_{ожі}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел.-дн.; $Ч_i$ – численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

4.2.3 Разработка графика проведения научного исследования

Для удобства и наглядности при оценке проведенной работы построим диаграмму Ганта. Для этого длительность каждого из этапов работ из рабочих дней переведем в календарные дни по следующей формуле:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}$$

где T_{ki} – продолжительность выполнения i -й работы в календарных днях; T_{pi} – продолжительность выполнения i -й работы в рабочих днях; $k_{\text{кал}}$ – коэффициент календарности.

Коэффициент календарности определяется по следующей формуле:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}},$$

где $T_{\text{кал}}$ – количество календарных дней в году; $T_{\text{вых}}$ – количество выходных дней в году; $T_{\text{пр}}$ – количество праздничных дней в году

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}} = \frac{365}{365 - 104 - 14} = 1,48$$

Все полученные значения сведем в таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Временные показатели проведения научного исследования

Название работы	Трудоёмкость работ			Исполнители	Длительность работ в рабочих днях T_{pi}	Длительность работ в календарных днях T_{ki}
	$t_{\min}$, чел-дни	$t_{\max}$, чел-дни	$t_{\text{ожид.}}$, чел-дни			
1. Составление и утверждение ТЗ	3	5	3,8	Рук.	3,8	6
2. Подбор и изучение материала	15	25	19	Инж.	19	28
3. Проведение патентных исследований	10	20	14	Инж.	14	21

Продолжение таблицы 4.9

4. Выбор направления исследований	2	4	2,8	Рук., инж.	1,4	2
5. Календарное планирование работ	1	3	1,8	Инж.	1,8	3
6. Проведений теоретических расчетов	10	20	14	Инж.	14	21
7. Проведение экспериментов	21	30	24,6	Инж.	24,6	36
8. Анализ результатов	5	10	7	Инж.	7	10
9. Корректировка методики работы и проведение экспериментов	12	15	13,2	Рук., инж.	6,6	10
10. Анализ результатов	5	10	7	Инж.	7	10
11. Оценка эффективности полученных результатов	2	5	3,2	Инж.	3,2	5
12. Определение целесообразности проведения выполненных работ	2	4	2,8	Инж.	2,8	4
13. Выбор наиболее удачной модели эксперимента	1	2	1,4	Рук., инж.	0,7	1
14. Оценка эффективности и применения разработанной методики	2	5	3,2	Инж.	3,2	5
15. Составление ВКР	12	25	17,2	Инж.	17,2	25

На основе таблицы 4.9 построим календарный план-график (Приложение А).

4.2.4 Бюджет научно-технического исследования

Данная статья включает стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта. Чтобы рассчитать материальные затраты воспользуемся следующей формулой:

$$З_{\text{м}} = (1 + k_T) \cdot \sum_{i=1}^m Ц_i \cdot N_{\text{расх}i}$$

где m – количество видов материальных ресурсов, потребляемых при выполнении научного исследования; $N_{расхi}$ – количество материальных ресурсов i -го вида, планируемых к использованию при выполнении научного исследования (шт., кг, м, м² и т.д.); $Ц_i$ – цена приобретения единицы i -го вида потребляемых материальных ресурсов (руб./шт., руб./кг, руб./м, руб./м² и т.д.); k_T – коэффициент, учитывающий транспортно-заготовительные расходы.

Материальные затраты, необходимые для данной работы, представлены в таблице 4.10. Значения цен на материальные ресурсы устанавливались в соответствии с ценами в online магазинах поставщиков и напрямую у изготовителей.

Таблица 4.10 – Материальные затраты

Наименование	Ед. изм.	Количество	Цена за ед. руб.	Затраты на материалы (З _м), руб.
Сорбент SP Sepharose Fast Flow	см ³	25	320	8380
Сорбент Sephadex LH-20-НГ-ЭпКГ	см ³	25	640	17540
Картридж Bio-Scale Mini UNOsphere S	шт	1	1500	1840
Тауматин	г	15	4	60
Альбумин	г	2	160	330
Медь надсерноокислая-5-водная	г	3	7	20
Цитрат натрия	г	5	2	10
Карбонат натрия	г	10	0, 12	1,2
Стандарт-титр гидроксид натрия	шт	3	57	170
Реактив Фолина-Чокальтеу	см ³	1	38	40
Натрий-калий виннокислый	г	1,8	0, 84	1,5
Йодид калия	г	0,3	13,5	4
Борная кислота	г	2,47	1,03	2,5

Продолжение таблицы 4.10

Фосфорная кислота	см ³	2,65	2	5,3
Ледяная уксусная кислота	см ³	100	8	800
Этиловый спирт	см ³	400	0, 5	200
Агароза	г	0,35	52,8	19
Маркеры белков	см ³	0,015	45000	5230
Кумасси бриллиантовыйсиний R-250	г	3	199	610
Додецилсульфат натрия	г	6	1,6	10
Трис(гидроксиметил) аминометана	г	84	13	1100
Глицин	г	20	1,3	30
Акриламид	г	22	7	150
Персульфат аммония	г	5	5	25
Стандарт-титр хлористоводо- родной кислоты	шт	2	64	130
Дитиотреитол	г	1	1200	1420
Глицерин	см ³	6	0,78	4,7
Бромфеноловый синий	см ³	0,5	764	430
TEMED	см ³	2	106	220
Тригидрат ацетата натрия	г	136	0,45	61
Хлорид натрия	г	23,4	0,264	6,2
Микропробирки типа эппен- дорф	уп	0,2	560	120
Наконечники для дозаторов	уп	0,2	6000	2280
Итого				41250,4

В таблице 4.11 отражено все спецоборудование, необходимое для выполнения работы. Учтем, что для научной работы никакое оборудование не покупалось, поэтому рассчитаем для каждого оборудования дороже 40 тыс.руб. только амортизацию по следующей формуле:

$$A = \frac{C_n \cdot H_a \cdot n}{100 \cdot k},$$

где C_n – первоначальная стоимость оборудования; N_a – норма амортизации, %; n – число проработанных месяцев; k – количество месяцев в году.

Таблица 4.11 – Расчет бюджета затрат на спецоборудования для научных работ

Наименование оборудования	Кол-во ед. оборудования	Цена ед. оборудования, тыс.руб.	Общая стоимость оборудования, тыс.руб.	Норма амортизации, %	Время использования, мес.	Амортизация, тыс.руб.
Спектрофотометр Agilent Cary 60	1	550	550	10	2	9,2
Прибор для определения точки плавления MP50 Melting Point System	1	400	400	10	0,3 (10 дней)	1
pH метр	1	16	16	-	-	16
Система для горизонтального и вертикального электрофореза	1	300	300	10	5	12,5
Жидкостный микроколоночный хроматограф Милихром	1	1314	1314	10	0,3 (10 дней)	3,29
УФ-трансиллюминатор	1	200	200	10	0,5 (15 дней)	0,83
Термостат для пробирок типа эппендорф	1	60	60	20	1	0,5

Продолжение таблицы 4.11

Аналитические весы	1	108	108	10	7	6,3
Дозатор одноканального объема 5-50 мкл	1	9	9	-	-	9
Дозатор одноканального объема 100-1000 мкл	1	9	9	-	-	9
Дозатор одноканального объема 1-5 мл	1	9	9	-	-	9
Итого						76,62

Основную и дополнительную заработную плату рабочей группы проекта, рассчитывают по следующей формуле:

$$З_{зп} = З_{осн} + З_{доп} ,$$

где $З_{осн}$ – основная заработная плата; $З_{доп}$ – дополнительная заработная плата (12-20 % от $З_{осн}$).

Основная заработная плата находится по формуле:

$$З_{осн} = З_{дн} \cdot T_{раб} ,$$

где $З_{осн}$ – основная заработная плата одного работника; $З_{дн}$ – среднедневная заработная плата работника, руб; $T_{раб}$ – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.

Среднюю заработную плату рассчитывают следующим образом:

$$З_{дн} = \frac{З_{м} \cdot М}{F_{д}}$$

где $З_{м}$ – месячный должностной оклад работника, руб.; $М$ – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 24 раб. дня $М=11,2$ месяца, 5-дневная неделя; при отпуске в 48 раб. дней $М=10,4$ месяца, 6-дневная неделя; $F_{д}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-

технического персонала, раб. дн.

Таблица 4.12 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней (выходные + праздничные)	104 + 14 = 118	104 + 14 = 118
Потери рабочего времени	24	24
Действительный годовой фонд рабочего времени	223	223

Месячный должностной оклад работника определяют как:

$$З_{\text{м}} = З_{\text{тс}} \cdot (1 + k_{\text{пр}} + k_{\text{д}}) \cdot k_{\text{р}},$$

где $З_{\text{тс}}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.; $k_{\text{пр}}$ – премиальный коэффициент, равный 0,3 (30 % от $З_{\text{тс}}$); $k_{\text{д}}$ – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2–0,5; $k_{\text{р}}$ – районный коэффициент, равный 1,3 для Томска.

Таблица 4.13 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	Оклад	$k_{\text{пр}}$	$k_{\text{д}}$	$k_{\text{р}}$	$З_{\text{м}}$, руб	$З_{\text{дн}}$, руб	$T_{\text{р}}$, раб. дн.	$З_{\text{осн}}$, руб.
Руководитель	39300	0,3	0,3	1,3	81744	4105,5	12,5	51318,75
Инженер	20064	0,3	0,3	1,3	41733,12	2096,0	122,5	256760,0

Рассчитаем дополнительную заработную плату:

$$З_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \cdot З_{\text{осн}}$$

где $k_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной заработной платы (на стадии проектирования принимается равным 0,12 – 0,15).

$$З_{\text{доп.рук.}} = 0,12 * 51318,75 = 6158,25 \text{ руб.}$$

$$З_{\text{доп.инж.}} = 0,12 * 256760,0 = 30811,2 \text{ руб.}$$

Под страховыми отчислениями (внебюджетные фонды), понимают обязательные отчисления по установленным законодательствам Российской Федерации. Для НИ ТПУ, осуществляющего научную и образовательную деятельность, ставка по отчислениям составляет 30,2 %

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из формулы:

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

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

Подставив числовые значения основной заработной платы руководителей проекта, студента и консультантов получим внебюджетные отчисления в размерах, представленных в таблице 4.14.

Таблица 4.14 – Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб	Отчисления во внебюджетные фонды, руб
Руководитель	51318,75	6158,25	17358,054
Инженер	256760,0	30811,2	86846,502
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	30,2		
Итого			104204,556

В накладные расходы включают траты на печать и ксерокопирование графических материалов и набранных текстов, оплату услуг связи, электроэнергии и прочее. Их определяется по формуле:

$$З_{\text{н}} = k_{\text{нр}} \cdot (З_{\text{м}} + З_{\text{об}} + З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}} + З_{\text{внеб}}),$$

где $k_{\text{нр}}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы, который примем равным 16 %.

$$Z_n = 0,16 * (123477,12 + 76620 + 308078,75 + 36969,45 + 104204,556) \\ = 103895,98 \text{ руб.}$$

Найдем затраты на электроэнергию, потребляемую оборудованием и запишем значения в таблицу 4.15. Стоимость 1 кВт/час – составляет 5,8 руб.

Таблица 4.15 – Прочие прямые затраты

Наименование оборудования	Мощность, кВт	Время использования, час	Расход, кВт/час	Затраты, руб.
Спектрофотометр Agilent Cary 60	0,038	8	0,304	1,76
Прибор для определения точки плавления MP50 Melting Point System	0,120	2	0,24	1,39
pH метр	0,015	8	0,12	0,70
Система для горизонтального и вертикального электрофореза	0,300	20	6	34,8
Жидкостный микроколоночный хроматограф Милихром	0,200	10	2	11,6
УФ-трансиллюминатор	0,050	5	0,25	1,45
Термостат для пробирок типа эппендорф	0,200	5	1	5,8
Аналитические весы	0,011	25	0,275	1,60
Итого				59,1

Для наглядности сводные данные по статьям затрат представлены в таблице 4.16.

Таблица 4.16 – Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статьи	Сумма, руб.
1. Материальные затраты НТИ	41250
2. Затраты на специальное оборудование для научных работ	76620
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	308078,75
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	36969,45
5. Отчисления во внебюджетные фонды	104204,556
6. Накладные расходы	103895,98
7. Прочие прямые затраты	59,1
8. Бюджет затрат НТИ	671077,806

Проведенный анализ сметы затрат на выполнение исследовательской работы показал, что на реализацию данного метода ушло бы 671077,806 рублей. Определим эффективен ли данный проект.

4.3 Определение ресурсной, финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования.

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

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i \cdot b_i^a; \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i \cdot b_i^p$$

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); n – число параметров сравнения.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{фр}}^{\text{исп } i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\text{max}}},$$

где $I_{\text{фр}}^{\text{исп } i}$ – интегральный финансовый показатель разработки; Φ_{pi} – стоимость i -го варианта исполнения; Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения технологического проекта (в т.ч. аналоги).

Для разрабатываемого метода:

$$I_{\text{фр}}^p = \frac{\Phi_{p1}}{\Phi_{\text{max}}} = \frac{671077,806 \text{ руб}}{1006616,709 \text{ руб}} = 0,7 \quad I_{\text{фр}}^a = \frac{\Phi_{p2}}{\Phi_{\text{max}}} = \frac{1006616,709 \text{ руб}}{1006616,709 \text{ руб}} = 1,0 ;$$

Из расчетов видно, финансовый показатель разработки в разрабатываемой методике, равен 0,7, то есть меньше единицы, но больше нуля, что говорит о численном уменьшении затрат по сравнению с аналогом.

Для наглядности сравнительную оценку характеристик вариантов исполнения проекта можно представить в виде таблицы 4.17.

Таблица 4.17 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерий	Объект исследования		
	Весовой параметр	Разрабатываемая методика	Аналог
1. Материалоемкость	0,15	3	4
2. Простота исполнения	0,15	4	4
3. Точность (достоверность)	0,20	5	3
4. Воспроизводимость результатов	0,25	5	4
5. Рост производительность	0,25	4	3
Итого	1	4,3	3,55

Интегральные показатели ресурсоэффективности для каждого варианта рассчитывали следующим образом:

$$I_m^a = 0,15 \cdot 4 + 0,15 \cdot 4 + 0,20 \cdot 3 + 0,25 \cdot 4 + 0,25 \cdot 3 = 3,55 ;$$

$$I_m^p = 0,15 \cdot 3 + 0,15 \cdot 4 + 0,20 \cdot 5 + 0,25 \cdot 5 + 0,25 \cdot 4 = 4,3 ;$$

Интегральный показатель эффективности технологической разработки ($I_{\text{фин.р}}^p$) и аналога ($I_{\text{фин.р}}^a$) определяется на основании интегрального финансового показателя и показателя ресурсоэффективности по формулам:

$$I_{\text{фин.р}}^p = \frac{I_{m1}}{I_{\text{исп 1}}^{\text{фр}}} ; \quad I_{\text{фин.р}}^a = \frac{I_{m2}}{I_{\text{исп 2}}^{\text{фр}}}$$

Подставив ранее полученные числовые значения получим:

$$I_{\text{фин.р}}^p = \frac{4,3}{0,70} = 6,14 ; \quad I_{\text{фин.р}}^a = \frac{3,55}{1,00} = 3,55$$

Для определения сравнительной эффективности выполним сравнение интегральных показателей эффективности текущего проекта и его аналога:

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{фин.р}}^p}{I_{\text{фин.р}}^a} = \frac{6,14}{3,55} = 1,73 ; \quad \mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{фин.р}}^a}{I_{\text{фин.р}}^p} = \frac{3,55}{6,14} = 0,58 ;$$

Для наглядности представим сравнение по всем вышерасчитанным показателям эффективности текущей разработки и ее аналога в виде таблицы 4.18.

Таблица 4.18 - Сравнительная эффективность разработки

№	Показатели	Разрабатываемый метод	Аналог
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,7	1,0
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,3	3,55
3	Интегральный показатель эффективности	6,14	3,55
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1,73	0,58

Исходя из результатов оценки сравнительной эффективности технологических методов очистки белка тауматина, можно сделать вывод о том, что настоящая разработка является более ресурсоэффективной, по сравнению с методом очистки белка конкурентов.

5 СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Сущность проекта выпускной квалификационной работы заключается в исследовании кислотно-основных свойств коммерческого белка тауматина для очистки от примесей хроматографическими и электрофоретическими методами. Тауматин – сладкий белок, который в 100 000 раз слаще сахарозы в молярном пересчете. Он используется в пищевой и фармацевтической промышленности для производства жевательной резинки, молочных продуктов, безалкогольных напитков, а также как подсластитель для лекарственных сиропов, пастилок для рассасывания, витаминов. Сладкие белки используются как альтернатива сахару и сахарозаменителям для людей, страдающих сахарным диабетом, ожирением, сердечно-сосудистыми заболеваниями и другое. Поскольку получение тауматина ограничивается двумя основными способами: природным и микробиологическим синтезом, в обоих из которых существует проблема качественной очистки, влияющей на выход белка и его органолептические свойства, исследования в данной области являются актуальными в пищевой и фармацевтической промышленности.

Представленное исследование проводилось в учебной лаборатории №223 второго корпуса ТПУ площадью 30,5 м², по адресу: Проспект Ленина, 43а. При работе осуществлялся контакт с химическими реактивами различного класса опасности. Кроме того, работник данной лаборатории подвергается воздействию опасных и вредных факторов, обусловленных работой оборудования.

В данном разделе обсуждаются вопросы безопасных условий труда, охраны окружающей среды, а также рассматриваются потенциально вредные факторы, возникающие при выполнении экспериментальных и аналитических работ.

5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

В данном подразделе рассматриваются специальные правовые нормы трудового законодательства. Основой законодательного обеспечения безопасности является Конституция Российской Федерации, в которой базовой статьей является статья 37 о свободном труде и о труде в условиях, отвечающих требованиям безопасности и гигиены.

На основании Трудового кодекса Российской Федерации указываются следующие особенности: установленные права и обязанности работодателей и работников в отношении охраны труда, исполнение которых контролируется специальными государственными органами и инспекциями [26].

5.1.1 Специальные правовые нормы трудового законодательства

В соответствии с Федеральным законом от 28.12.2013 N 426-ФЗ (ред. от 30.12.2020) «О специальной оценке условий труда» работники фармацевтических и биотехнологических компаний по степени вредности относятся к 2-ой (допустимой) и 3-ей (вредной) категории подкатегории 1, в которых подразумевается (СОУТ) [27]:

- в первом случае уровень воздействия опасных производственных факторов не превышает установленных гигиеническими нормативами норм, а состояние организма восстанавливается во время отдыха или к началу следующего рабочего дня;
- во втором случае условия труда имеют завышающие уровни опасных факторов, установленных нормативами, и относятся к 1-ой степени вредности, которая подразумевает, что после воздействия опасных производственных факторов измененное состояние организма восстанавливается при более длительном, чем в первом случае, времени, а риск повреждения здоровья увеличивается.

Согласно специальной оценке условий труда для третьего класса вредности первого подкласса предусматриваются [27-30]:

- компенсационные выплаты;
- сокращение числа рабочих часов в неделю до 36;
- добавочные выплаты за негативные факторы в размере 4 % от оклада работника;
- возможность выхода на пенсию ранее установленного федеральным законом N 350-ФЗ от 3 октября 2018 года возраста при условии, если контакт с опасным фактором составляет 80 % времени трудящегося, а стаж на месте более 12 лет;
- медицинские осмотры в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России от 12.04.2011 N 302н (ред. от 18.05.2020);
- предоставление молока и/или молочной продукции;
- страхование жизни и здоровья в соответствии с Федеральным законом «Об обязательном социальном страховании от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний» от 24.07.1998;
- средства индивидуальной защиты (СИЗ): спецодежда, обувь, перчатки, респираторы, средства дезинфекции.

Поскольку первый подкласс третьего класса опасности относится к вредным, законодательством запрещено привлечение к труду несовершеннолетних лиц, беременных сотрудников и инвалидов I и II группы.

5.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны

Место проведения исследований должно соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.032-78 «Система стандартов безопасности труда. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования» и ГОСТ 12.2.033-78 «Система стандартов безопасности труда [31,32]. Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования», так как

часть работ проводится в положении сидя и стоя. В качестве примера рассмотрим работу на спектрофотометре и рН метре.

Конструкция рабочего места должна обеспечивать выполнение необходимых в работе операций в пределах зоны досягаемости моторного поля человека, а также учитывать его антропометрические данные, физиологические и психологические требования.

При работе с спектрофотометром и его элементами необходимо учитывать: рабочую позу оператора, размещение документации и материалов, необходимых для удовлетворительного выполнения операционных процедур.

Расположение кресла, пульта, органов управления и средств отображения информации должно соответствовать антропометрическими, психофизиологическими и биомеханическими показателям [31]. Органы управления, связанные с четкой последовательностью действий работника, должны быть единообразными и расположенными близко друг к другу, а функционал осуществляться слева направо и сверху вниз. Зоны зрительного наблюдения в вертикальной плоскости оператора, находящегося в рабочей позе, должны находиться в оптимальной зоне информационного поля под углом $\pm 15^\circ$ от нормальной линии взгляда и в горизонтальной плоскости под углом $\pm 15^\circ$ от сагиттальной плоскости. Высота рабочей поверхности при организации рабочего места должна быть 655 мм, а сиденья около 420 мм.

При работе с рН метром и его элементами необходимо учитывать: рабочую позу оператора, размещение документации и материалов, необходимых для удовлетворительного выполнения операционных процедур.

Конструкция, взаимное расположение элементов рабочего места должны соответствовать антропометрическим, физиологическим и психологическим требованиям, а также характеру работы [32]. Рабочее место должно обеспечивать выполнение трудовых операций в пределах зоны досягаемости моторного поля. Организация рабочего места и конструкция оборудования должны обеспечивать прямое и свободное положение корпуса тела работающего или наклон его вперед не более чем на 15° . Конструкцией производ-

ственного оборудования и организацией рабочего места должно быть обеспечено оптимальное положение работающего, которое достигается регулированием высоты рабочей поверхности. Высота рабочей поверхности при организации рабочего места должна быть 1025 мм, а средств отображения информации 1365 мм. Для обеспечения удобного, возможно близкого подхода к столу, станку или машине должно быть предусмотрено пространство для стоп размером не менее 150 мм по глубине, 150 мм по высоте и 530 мм по ширине. Очень часто используемые средства отображения информации, требующие точного и быстрого считывания показаний, следует располагать в вертикальной плоскости под углом $\pm 15^\circ$ от нормальной линии взгляда и горизонтальной плоскости под углом $\pm 15^\circ$ от сагиттальной плоскости.

Помимо вышеперечисленных требований по организации рабочего места, должны быть предусмотрены необходимые средства защиты работника от воздействия вредных производственных факторов в соответствии с системой стандартов безопасности труда по ГОСТ 12.0.003-2015 «Опасные и вредные производственные факторы», а также условия для экстренной эвакуации сотрудника с рабочего места [33].

К самостоятельной работе допускаются работники не моложе 18 лет, прошедшие предварительный медицинский осмотр, вводный инструктаж по охране труда и пожарной безопасности, инструктаж по электробезопасности, первичный инструктаж на рабочем месте, обучение безопасным приемам и методам труда по основной профессии, стажировку под руководством опытного работника и проверку знаний требований охраны труда.

5.2 Производственная безопасность

Во время проведения научно-исследовательских работ работник может подвергаться воздействию комплекса неблагоприятных факторов, установленных в соответствии с ГОСТ 12.0.003-2015 [33]. Полный список опасных и вредных факторов с соответствующими нормативными документами при-

веден в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Опасные и вредные факторы

№	Опасные и вредные производственные факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Нормативные документы
1	Производственные факторы, связанные с аномальными микроклиматическими параметрами воздушной среды	СанПиН 2.2.4.548–96 «Физические факторы производственной среды. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений» [34]; ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны [35]; Р 2.2.2006-05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда» [36].
2	Отсутствие или недостаток необходимого искусственного освещения	СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23 05-95 [37].
3	Повышенный уровень шума	ГОСТ 12.1.003-83 «Система стандартов безопасности труда. Шум. Общие требования безопасности» [38]; СП 51.13330.2011 Защита от шума. Актуализированная редакция СНиП 23-03-2003 [39]
4	Производственные факторы, связанные с электрическим током	ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [40]
5	Производственные факторы, обладающие свойствами химического воздействия на организм работающего	ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности [41]; ГОСТ 12.1.044-89 (ИСО 4589-84) Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожаровзрывоопасность веществ и материалов. Номенклатура показателей и методы их определения [42]
6	Пожарная опасность	СНиП 21-01-97* Пожарная безопасность зданий и сооружений [43]

Рассмотрим более подробно представленные опасные и вредные производственные факторы.

5.2.1 Производственные факторы, связанные с аномальными микроклиматическими параметрами воздушной среды

Микроклимат производственных лабораторий – это климат внутренней среды, которая определяется действующими на организм человека сочетаниями таких параметров, как температура, влажность, скорость движения воздуха, а также в некоторых случаях интенсивность теплового излучения от нагреваемых поверхностей. Несоответствие этих факторов оптимальным микроклиматическим условиям в долговременной перспективе может привести к профессиональным заболеваниям.

Нормальная жизнедеятельность и высокая работоспособность человека являются возможно только при наличии баланса между производством тепла и его выделением в окружающую среду. Высокая влажность воздуха (более 70%) отрицательно влияет на теплообмен. Если температура воздуха высокая (более 30 °С), то повышенная влажность, затрудняющая испарение пота, приводит к перегреву. При низких температурах повышенная влажность воздуха способствует более сильному охлаждению. Очень сухой воздух также действует неблагоприятно. Поэтому оптимальная влажность находится в пределах 40–60% (таблица 5.2) [34-36].

Таблица 5.2 – Оптимальные показатели микроклимата лаборатории

Период года	Температура воздуха, °С	Температура поверхностей, °С	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
Холодный	19-21	18-22	60-40	0,2
Теплый	20-22	19-23	60-40	0,2

Перепады температуры воздуха по высоте и по горизонтали при обеспечении оптимальных величин микроклимата на рабочих местах не должны превышать 2 °С и выходить за пределы величин, указанных в таблице 2.

Для снижения неблагоприятного воздействия параметров микроклима-

та используются защитные мероприятия: системы местного кондиционирования воздуха, воздушное душирование, компенсация неблагоприятного воздействия одного параметра микроклимата изменением другого, спецодежда и другие средства индивидуальной защиты, помещения для отдыха и обогрева, регламентация времени работы, в частности, перерывы в работе, сокращение рабочего дня, увеличение продолжительности отпуска, уменьшение стажа работы и некоторые другие. Особенно в целях профилактики переохлаждения необходимо утеплять окна и двери, устанавливать воздушные завесы.

В результате анализа оптимальных микроклиматических параметров воздушной среды лаборатории, можно сделать вывод о соответствии реальных показателей допустимым показателям по нормативным документам. Температура воздуха и влажность воздуха в лаборатории в теплый период соответствует установленным нормам. В холодный период года температура в помещении ниже оптимальной, устанавливаются дополнительные обогреватели и вентиляторы. Условия труда по микроклимату соответствуют допустимым согласно результатам проведения СОУТ в НИ ТПУ в 2022 году [44].

5.2.2 Отсутствие или недостаток необходимого искусственного освещения

Отсутствие или недостатки необходимого искусственного освещения относятся к вредным производственным факторам, поскольку приводят к снижению внимания и производительности рабочего и увеличению утомляемости, что в свою очередь может стать причинами несчастных случаев на производстве.

Тип освещения лаборатории комбинированный, при котором общее искусственное освещение дополняется местным. Потолок и стены в лаборатории имеет светлую окраску, пол – темную. Разряд зрительных работ согласно СП 52.13330.2016 [37] в лаборатории составляет IVв (работа со средней точ-

ностью). Требования к освещению и характеристики разряда зрительных работ представлены в таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Требования к освещению помещений [37]

Характеристика зрительной работы	Наименьший или эквивалентный размер объекта различения, мм	Разряд зрительной работы	Подразряд зрительной работы	Контраст объекта с фоном	Характеристика фона	Искусственное освещение	
						Освещённость, лк	
						При системе комбинированного освещения	При системе общего освещения
Средняя точность	От 0,5 до 1,0	IV	в	Малый, средний, большой	Светлый, средний, темный	400	200

Для химической лаборатории рекомендуемая величина освещённости составляет 300–500 лк согласно ГОСТ Р 55710-2013 [45]. Для обеспечения указанной освещённости в качестве источников общего и местного освещения используют светодиодные лампы. Условия труда по фактору, связанному с отсутствием или недостатками необходимого искусственного освещения, соответствуют допустимым (2 класс) согласно результатам проведения СО-УТ в НИ ТПУ в 2022 году [44].

5.2.3 Повышенный уровень шума

Поскольку большинство вибрирующих машин и инструментов производят шум, рабочий, подвергающийся воздействию вибрации, одновременно подвергается и воздействию шума. Потеря слуха, вызванная шумом, является одним из наиболее распространенных профессиональных заболеваний.

В соответствии с ГОСТ 12.1.003-83 допустимым уровнем шума на местах, где проводится высококвалифицированная работа, требующая сосредоточенности, измерительных и аналитических работ, уровень шума должен составлять не более 80 дБА [38]. Для установления предельно допустимых шумовых характеристик машин в соответствии с допустимым уровнем шума на рабочем месте используют ГОСТ 12.1.023-80, в котором описаны методы, порядок внесения и контроль шумовых характеристик [46].

Мероприятиями по снижению воздействия повышенного уровня шума является применение средств защиты: противошумные шлемы, противошумные вкладыши, противошумные наушники. Также применяются такие устройства, как оградительные, звукоизолирующие, звукопоглощающие, глушители шума, автоматического контроля и сигнализации, дистанционного управления.

При выполнении научно-исследовательской работы непостоянным источником шума является только центрифуга для проведения лабораторных испытаний. По паспорту уровень шума около 60 дБ, что соответствует норме. По данному фактору негативное воздействие на организм сотрудника не оказывается. Условия труда по шумовому фактору соответствует допустимым по результатам проведения СОУТ в НИ ТПУ в 2022 году [44].

5.2.4 Производственные факторы, связанные с электрическим током

Согласно правилам устройства электроустановок (ПУЭ) лабораторные помещения по степени опасности поражения электрическим током относятся к классу помещений без повышенной опасности, поскольку в этих помещениях влажность воздуха не превышает 75 %; температура окружающей среды не превышает 35 °С; отсутствует токопроводящая пыль и токопроводящие полы; отсутствует возможность одновременного касания проводящих конструкций здания, аппарата, механизма соединенных с землей и проводящих

частей электрооборудования [47]. В лаборатории содержится большое количество электрооборудования, представляющие потенциальную опасность при несоблюдении правил безопасности, такое как спектрофотометр, термостат, хроматограф жидкостной, микроцентрифуга, прибор для определения точки плавления, рН метр, камера для горизонтального и вертикального электрофореза с прилагающим источником питания, УФ-камера с длиной волны 312 нм.

Для снижения рисков случайного соприкосновения с токоведущими частями, находящимися под напряжением, на которых остался заряд, и поражения электрическим током необходимо применять защиты: защитные ограждения, оболочки, изоляция токоведущих частей (рабочая, дополнительная, усиленная, двойная), различные сигнализирующие и блокирующие устройства, знаки безопасности. Кроме того, сотрудники должны проходить периодически инструктаж и обучение.

При выполнении работы использовалось следующее электрооборудование: ПК, спектрофотометр, установка для электрофореза, аналитические весы. Все оборудование отвечает требованиям электробезопасности: провода имеют изоляцию, на оборудовании имеются надписи и указатели. Благодаря соблюдению защитных мер условия труда по фактору, связанному с электрическим током, соответствуют допустимым (2 класс) согласно результатам проведения СОУТ в НИ ТПУ в 2022 году [44].

5.2.5 Производственные факторы, обладающие свойствами химического воздействия на организм работающего

Работа в химической лаборатории 223 – 2 учебного корпуса НИ ТПУ подразумевает частый контакт с токсичными и легковоспламеняющимися химическими реактивами разных классов опасности, значения предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны (ПДКр.з) которых регламентируются определяются по ГН 2.2.5.3532–18 и ГОСТ 32419-2013 [48,49].

Список используемых в научно-исследовательской работе веществ приведен в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Перечень вредных и легковоспламеняющиеся веществ

Вещество	Характеристика	Класс опасности	ПДК _{кр.з} мг/м ³	Влияние на организм
1	2	3	4	5
Акриламид (не регламентируется)	Белое кристаллическое вещество	2	0,03	Вещество оказывает раздражающее воздействие на глаза, кожу и дыхательные пути. Вещество может оказать воздействие на нервную систему. Является канцерогенным для человека.
Ледяная уксусная кислота (ТУ 6-09-4191-76)	Жидкость со специфическим запахом	3	5	Пары раздражают слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Способна вызывать сильные химические ожоги
Меркаптоэтанол (не регламентируется)	Горючая жидкость с характерным запахом	2	1	Вызывает раздражение дыхательных путей, кожи, боли в животе, может приводить к смерти
Аммоний надсерноокислый (ГОСТ 20478-75)	Белый кристаллический порошок, растворимый в воде	3	0,1	Вещество оказывает раздражающее воздействие на глаза, кожу и дыхательные пути. Вдыхание пыли может вызвать реакции, похожие на астматические.
Этанол 95% (ГОСТ 5962-2013)	Летучее бесцветное вещество с отчетливым запахом	3	10	Способен вызвать кому, ступор, нечувствительность к боли, угнетение функций ЦНС, при вдыхании паров в большой концентрации наносит вред здоровью

Опасные (горючие и негорючие) вещества и материалы, обладающие свойствами, проявление которых может привести к травмированию, отравлению, заболеванию работающих, взрыву, пожару, повреждению сооружений, необходимо хранить в соответствии с нормативными документами, а также проводить их учет и инструктировать персонал, работающий с опасными классами веществ.

Работы с легковоспламеняющимися (ЛВЖ) и горючими (ГЖ) жидкостями, горючими (ГГ) газами и другими опасными в пожарном отношении веществами и материалами должны проводиться в соответствии с требованиями инструкции по охране труда. Хранить опасные вещества и материалы необходимо с учетом их пожароопасных физико-химических свойств. При горении веществ и материалов в атмосферу выделяются ядовитые продукты горения, которые в результате попадания в организм человека вызывают острые отравления. Кроме того, все ЛВЖ имеют маркировку и паспорт.

Для снижения рисков, связанных с вредными и легковоспламеняющимися химическими веществами лаборатория снабжена приточно-вытяжной вентиляцией и вытяжным шкафом для защиты органов дыхания и слизистой оболочки глаз. Помимо этого, необходимо обеспечить каждого работника средствами индивидуальной защиты: резиновыми перчатками, защитными очками, лабораторным халатом.

Анализируя условия работы с токсичными и ЛВЖ можно сделать вывод, что учебная лаборатория соответствует требованиям: персонал работает только с маркированными веществами в вытяжном шкафу в специальной защитной одежде согласно результатам проведения СОУТ в НИ ТПУ в 2022 году [44].

5.2.6 Пожарная опасность

Пожары возникают вследствие взаимодействия открытого огня с огнеопасными веществами, применяемыми в научно-исследовательской работе (акриламид, этанол и т.д.). В соответствии с Федеральным законом «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности» в лаборатории возможно возникновение следующих классов пожаров [50]:

1. класс А – пожары твердых горючих веществ и материалов;
2. класс Е – пожары горючих веществ и материалов электроустановок, находящихся под напряжением.

К возникновению пожаров данных классов может привести нарушение порядка хранения пожароопасных материалов, нарушение правил эксплуатации электрического оборудования, применение неисправных осветительных приборов, электропроводки и устройств, дающих замыкание, курение в не-установленных местах.

По пожарной и взрывопожарной опасности помещение лаборатории относится к категории В1–В4 (пожароопасность), поскольку в данном помещении находятся горючие и трудногорючие вещества и материалы (картон, бумага, пластмассы и так далее). Ввиду наличия данных веществ и материалов пожароопасные зоны относятся к классу П-Па и требуют применения пожарозащищенного электрооборудования согласно ФЗ «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности» [50].

Для профилактики пожаров подобного рода необходимо осуществление следующего ряда предупреждающих мер: перед работой с оборудованием работник обязан пройти инструктаж по технике безопасности и по пожарной безопасности; оборудование не должно загромождать пути эвакуации в случае ЧС и закрывать собой предупредительные знаки и сигналы; около каждой электроустановки должен быть автомат аварийного отключения электроэнергии, а в электрической цепи присутствовать устройство защитного отключения; все лабораторные помещения должны соответствовать требованиям пожарной безопасности согласно ГОСТ 12.1.004-91 [51] и иметь необходимые средства пожарной безопасности согласно ГОСТ 12.4.009-83 [52], такие как пожарная сигнализация, один порошковый и углекислотный огнетушитель, один пожарный ящик с песком. Условия труда по пожарной опасности соответствует допустимым по результатам проведения СОУТ в НИ ТПУ в 2022 году [44].

5.3 Экологическая безопасность

Лаборатории при несоблюдении норм и правил по утилизации произ-

водственных отходов способны оказывать сильное негативное влияние на состояние литосферы и гидросферы, поскольку большой ряд отходов устойчив к естественному разрушению и способен изменять свою активность с образованием физико-химических трансформантов, представляющих потенциальную опасность для живых организмов и человека.

Органические растворители, используемые во многих лабораторных процессах, могут попадать в поверхностные и грунтовые воды в результате неправильной утилизации. Хотя растворители органической природы обычно относительно быстро улетучиваются и разлагаются в поверхностных водах, но в зависимости от климатических условия они способны сохраняться повышенный уровень концентрации. Оценку оказываемого влияния проводят в соответствии с ГОСТ 17.1.3.06-82 и ГОСТ 17.1.3.13-86 [53,54].

Для предотвращения загрязнения водных систем попадания фармацевтическими отходами необходимо осуществлять их сбор в соответствующие сосуды из темного инертного стекла с обязательной подписью компонентов, содержащихся в сливе, или, в случае твердых отходов, в герметично закрытые контейнеры и мешки черного цвета с указанием класса опасности и описанием содержимого. Емкости хранят в специальном здании или изолированном помещении с отдельным входом. Они должны соответствовать всем требованиям санитарно-пожарных норм. При вывозе больших объемов составляют паспорт и оформляют номенклатурный список, а после утилизации – предоставляют соответствующий акт.

При проведении опытно-исследовательских работ в лаборатории образуется большое количество пластиковых отходов, за счет использования большого количества расходного материала: пробирки, планшеты, наконечники для пипеток и многое другое. Пластик вызывает загрязнение земли, за счет медленного выброса токсичных химических веществ в почву и воду. Полихлорированные бифенилы, обнаруженные в пластмассах, угрожают воздуху и естественной растительности, а также всем видам жизни, подверженным воздействию почвы. Оптимальным решением данной проблемы явля-

ется сортировка разных видов пластика, используемого в лаборатории, и его дальнейшая переработка.

При проведении научно-исследовательской работы все опасные органические растворители попадают в тару для слива, которая в дальнейшем утилизируется в соответствии с нормативными документами. Пластиковая посуда тщательно моется и используется повторно, однако непригодная пластиковая посуда не подвергается сортировки, а просто выбрасывается в общий мусор. Не все требования выполняются в лаборатории.

5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Несчастные случаи или чрезвычайные ситуации могут возникнуть в результате несоблюдения правил техники безопасности персоналом лаборатории, а также вследствие внешних антропогенных и неантропогенных факторов [55], к которым относятся: пожары и взрывы; внезапное обрушение зданий; землетрясения; метеорологические и агрометеорологические явления.

Для химической лаборатории самыми распространенными являются проливы и выбросы опасных химических веществ. Работы по ликвидации разливов следует проводить в средствах индивидуальной защиты (СИЗ), таких как фартук прорезиненный, очки защитные, кислотно-щелочные перчатки, маска полнолицевая, специальная обувь [55].

Если пролита концентрированная кислота/щелочь, то необходимо засыпать место пролива сорбентом, или сорбирующим материалом (впитывающие салфетки, рулоны, бобы, подушки), затем удалить пропитанный сорбент пластиковым совком и смёткой, после чего промыть место пролива большим количеством воды, промыть перчатки под струей проточной воды, просушить. При ликвидации разливов неизвестного объема, последовательно засыпать участок разлива слоем сорбента не менее 5-7 см превышающим уровень жидкости. Время контакта сорбента с концентрированной кислотой/щелочью должно быть не менее 1 часа. Отработанный сорбент следует собрать, закрыть плотной крышкой

и вынести в ближайшее место накопления отходов. После необходимо промыть место пролива водой и вытереть насухо склизками.

При проливе ЛВЖ и горючих жидкостей (ГЖ) необходимо немедленно обесточить все приборы и принять меры, обеспечивающие индивидуальную защиту. Место пролива ЛВЖ и ГЖ следует засыпать сорбентом или промыть водой. При ликвидации разливов необходимо действовать так же, как и в случае пролива кислот/щелочей.

При обнаружении первых признаков пожара (запах дыма, отблески пламени, искры) работник по возможности должен принять меры по тушению пожара в начальной стадии первичными средствами пожаротушения (огнетушителями, ящиком с песком) с соблюдением мер предосторожности. На рисунке 5.1 представлен план эвакуации 2 этажа 2 корпуса ТПУ.



Рисунок 5.1 – План эвакуации 2 этажа 2 корпуса ТПУ

Анализ безопасности в ЧС показал, что лаборатория оснащена всеми необходимыми средствами пожаротушения, а также веществами для нейтрализации пролитых кислот и щелочей. Кроме того, представлен план пожарной эвакуации из лаборатории в случае возникновения пожара.

Таким образом, в разделе были рассмотрены правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности при выполнении работ в учебной лаборатории, проанализированы потенциально вредные и опасные факторы, такие как шум, ЛВЖ и ядовитые вещества. Помимо этого, описаны возможные неблагоприятные воздействия на окружающую среду отходов при проведении научно-исследовательской работы и способы минимизации их воздействия. Также был проведен анализ возможных чрезвычайных ситуаций и план мероприятий для их ликвидации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения научно-исследовательской работы были изучены основные характеристики анализируемого объекта – коммерческого белка тауматина производства Китай, компания XI'AN PRIUS BIOLOGICAL ENGINEERING CO.,LTD, с заявленной чистотой 99,15 % (масс.), а также различные хроматографические способы очистки белков, в основе которых могут лежать принципы: гель-фильтрации, ионного обмена, мембранной хроматографии.

Проведена оценка подлинности белка и анализы на наличие примесей следующими методами:

- 1) Определение содержания кислых и основных фракций белка методами спектрофотометрии: метод Лоури (24 %) и биуретовый метод (29 %);
- 2) Контроль точки плавления вещества, анализ термической устойчивости белка, что составило около 84,6 °C;
- 3) Определение изоэлектрической точки белка, что составило порядка 11,6;
- 4) Определение стабильности белка по дзета-потенциалу ($\xi = 42$ мВ, что говорит о стабильности белка в растворе);

Выполнен подбор наиболее эффективного сорбента для очистки белка от низкомолекулярных веществ и мономеров. По результатам очистки белка тауматина на азопоксисорбенте Sephadex LH-20, сорбенте SP Sepharose Fast Flow, картридже Bio-Scale Mini UNOspere S, системе ультрафильтрации Sartorius Vivaflow 200 с мембраной из полиэфирсульфона, наиболее эффективная очистка наблюдалась на сорбенте SP Sepharose Fast Flow.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СТУДЕНТА

Новикова А.А., Чернова А.П. Оценка чистоты сладких белков // Химия. Экология. Урбанистика: матер. всерос. науч.- практ. конф. (с междунар. участием): в 4т. Т.2. – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2023.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Дорохович А.Н. Сахарозаменители нового поколения низкой калорийности и гликемичности/ А.Н. Дорохович, В.В. Дорохович, Н.П. Лазоренко // Продукты & ингредиенты. – 2011 – №6(8). – С. 46-48.
2. Jean-Michel Mérillon, Kishan Gopal Ramawat. / Sweeteners. Pharmacology, Biotechnology and Applications – Springer, 2018 – 652 p.
3. Танирбергенова А.А., Тулебаев К.А., Аканов Ж.А. Современные тенденции заболеваемости населения сахарным диабетом в мире / А.А. Танирбергенова, К.А. Тулебаев, Ж.А. Аканов // Вестник КазНМУ. – 2018. – №3. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennyye-tendentsii-zabolevaemosti-naseleniya-saharnym-diabetom-v-mire> (дата обращения: 01.12.2021).
4. Федотова Е. Сахарный диабет: причины, заболеваемость и смертность / Е. Федотова // Коммерсантъ. – 2022. - № 14. – URL: <https://www.kommersant.ru/doc/5667416>. (Дата обращения: 15.12.2022).
5. Ravi Kant. / Sweet proteins – Potential replacement for artificial low calorie sweeteners. In: Nutrition Journal. 2005; Vol. 4, No. 5.
6. M. Lindley. / Taste–ingredient interactions modulating sweetness. In: Optimising Sweet Taste in Foods. 2006; pp 85-96.
7. СанПиН 2.3.2.1293-03 Гигиенические требования по применению пищевых добавок
8. Jonathan Kingsman, Corina Gafner. Sugar Trading Manual - Elsevier Science, 2004 – 1249 p.
9. M.B.A. Glória. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition – Academic Press, 2003 – 600 p.
10. Lew Mander, Hung-Wen Liu. Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology – 2010 – 7388 p.
11. Lindley MG / Natural high-potency sweeteners. In: O'Donnell K, Kearsley MW (eds) Sweeteners and sugar alternatives in food technology, 2nd edn.

2012.

12. RCSB Protein Data Bank : официальный сайт. – США, 1971. – URL : <https://www.rcsb.org/structure/2vhk> (дата обращения 01.12.2022).

13. Andrew Taylor, Joanne Hort. Modifying Flavour in Food – 2007 – 296 p.

14. James N. BeMiller. Carbohydrate Chemistry for Food Scientists – 2018 – 904 p.

15. Bartoszewski, G., Niedziela, A., Szwacka, M., and Niemirowicz-Szczytt, K. (2003). Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breed.* 122, 347–351.

16. Yeboa SO, Hilgerand TH, Kroschel J (2003) *Thaumatococcus danielli* (Benn.) Benth: a natural sweetener from the rain forest zone in west Africa with potential for income generation in small scale farming. In: Proceedings of international research on food security, National Resource Management and Rural Development. Georg-August-Universitat Gottingen.

17. Waliszewski WS, Oppong S, Hall JB, Sinclair FL (2005) Implications of local knowledge of the ecology of a wild super sweetener for its domestication and commercialization in West and Central Africa. *Econ Bot* 59:231–243.

18. Lebedev VG et al (2002) Pear transformation with the gene for super-sweet protein thaumatin II. *Acta Hort* 596:199–202.

19. Хайруллин Р.Ф. Экспрессия рекомбинантных белков в *E.coli*: учеб. пособие / Р.Ф. Хайруллин, Р.Г. Киямова, А.А. Ризванов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2018 – 142 с.

20. Edens L et al (1982) Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* 18:1–12.

21. Faus I et al (1996) Expression of a synthetic gene encoding the sweet-tasting protein thaumatin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 229:121–127.

22. Якубке Х.Д. Аминокислоты, пептиды белки / Х.Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 456 с.

23. Практикум по биохимии: Учеб.пособие / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.

24. ГОСТ Р 8.887-2015 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Потенциал электрокинетический (дзета-потенциал) частиц в коллоидных системах. Оптические методы измерения : национальный стандарт Российской Федерации: дата введения 2016-06-01 / Росстандарт. – Изд. Официальное. – Москва : Стандартинформ, 2019. – 15 с.

25. Асуева Л. А. Ароматические полиэфирсульфоны. Синтез и свойства / Л.А. Асуева; М-во образования и науки Рос. Федерации, Гос. образоват. учреждение высш. проф. образования Чечен. гос. пед. ин-т. - Назрань : Пилигрим, 2010. - 67 с.

26. Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (редакция от 25.02.2022)

27. Федеральный закон "О специальной оценке условий труда" от 28.12.2013 N 426-ФЗ

28. Постановление Правительства РФ от 19.06.2012 N 608 «Об утверждении Положения о Министерстве здравоохранения Российской Федерации»

29. Приказ Минтруда России от 10.12.2018 N 778н «Об утверждении Типовых норм бесплатной выдачи специальной одежды, специальной обуви и других средств индивидуальной защиты работникам организаций легкой промышленности, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, а также на работах, выполняемых в особых температурных условиях или связанных с загрязнением»

30. Майстренко Г. А., Майстренко А. Г. Источники правового регулирования защиты персональных данных работника в России // Legal Bulletin. – 2020. – Т. 5. – №. 1. – С. 24-29.

31. ГОСТ 22269-76 Система "Человек-машина". Рабочее место оператора. Взаимное расположение элементов рабочего места. Общие эргономические требования : государственный стандарт союза ССР: дата введения 1978-

01-01 / Госстандарт СССР. – Изд. Официальное. – Москва : Издательство стандартов, 1990. – 4 с.

32. ГОСТ 12.2.033-78 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования // Система стандартов безопасности труда: Сб. ГОСТов. - М.: ИПК Издательство стандартов, 2001 г.

33. ГОСТ 12.0.003-2015 «Опасные и вредные производственные факторы» : межгосударственный стандарт : дата введения 2017-03-01 / Росстандарт. – Изд. Официальное. – Москва : Стандартиформ, 2019. – 9 с.

34. СанПиН 2.2.4.548-96 «Физические факторы производственной среды. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений».

35. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (с Изменением N 1) - М.: Стандартиформ, 2008 г.

36. Р 2.2.2006-05 «Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда».

37. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. Актуализированная редакция СНиП 23-05-95* (с Изменениями N 1, 2) №52.13330.2016 // Официальный сайт Минстроя России www.minstroyrf.ru, 18.03.2020.

38. ГОСТ 12.1.003-83 «Система стандартов безопасности труда. Шум. Общие требования безопасности» : межгосударственный стандарт : дата введения 1984-07-07 / Госстандарт СССР. – Изд. Официальное. Система стандартов безопасности труда. Сб. ГОСТов. – Москва.: ИПК Издательство стандартов, 2002. – 10 с.

39. СП 51.13330.2011 Защита от шума. Актуализированная редакция СНиП 23-03-2003 (с Изменениями N 1, 2, 3) №51.13330.2011 // Минрегион России - М.: ОАО «ЦПП», 2010 г.

40. ГОСТ 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты (с Поправкой) - М.: Стандартиформ, 2019 г.

41. ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности : межгосударственный стандарт : дата введения 1977-01-01 / Госстандарт СССР. – Изд. Официальное. – Москва.: Стандартиформ, 2007. – 7 с.

42. ГОСТ 12.1.044-89 (ИСО 4589-84) Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожаровзрывоопасность веществ и материалов. Номенклатура показателей и методы их определения : межгосударственный стандарт : дата введения 1991-01-01 / Госстандарт СССР. – Изд. Официальное. – Москва.: Стандартиформ, 2006. – 196 с.

43. СНиП 21-01-97* Пожарная безопасность зданий и сооружений

44. Сводная ведомость результатов проведения специальной оценки условий труда в ФГАОУ НИ ТПУ в 2022 году [Электронный ресурс] - Режим доступа: https://portal.tpu.ru/departments/otdel/oot/Tab1/Tab1/svod_2022.pdf.

45. ГОСТ Р 55710-2013 Освещение рабочих мест внутри зданий. Нормы и методы измерений : национальный стандарт Российской Федерации : дата введения 2014-07-01 / Росстандарт. – Изд. Официальное. – Москва.: Стандартиформ, 2016. – 19 с.

46. ГОСТ 12.1.023-80 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Шум. Методы установления значений шумовых характеристик стационарных машин : государственный стандарт союза ССР : дата введения 1981-01-01 / Госстандарт СССР. – Изд. Официальное. – Москва.: Издательство стандартов, 1991. – 11 с.

47. Правила устройства электроустановок (ПУЭ). Издание 7.

48. ГН 2.2.5.3532-18 Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны

49. ГОСТ 32419-2013 Классификация опасности химической продукции. Общие требования : межгосударственный стандарт : дата введения

2014-08-01 / Росстандарт. – Изд. Официальное. – Москва.: Стандартинформ, 2019. – 25 с.

50. Федеральным законом «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности»

51. ГОСТ 12.1.004-91. Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования : межгосударственный стандарт : дата введения 1992-07-01 / Госстандарт СССР. – Изд. Официальное. – Москва.: Стандартинформ, 2006. – 63 с.

52. ГОСТ 12.4.009-83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание : межгосударственный стандарт : дата введения 1985-01-01 / Госстандарт СССР. – Изд. Официальное. – Москва.: ИПК Издательство стандартов, 2005. – 8 с .

53. ГОСТ 17.1.3.06-82 Охрана природы (ССОП). Гидросфера. Общие требования к охране подземных вод : межгосударственный стандарт : дата введения 1983-01-01 / Госстандарт СССР. – Изд. Официальное. – Москва.: "СТАНДАРТИНФОРМ", 2010. – 2 с.

54. ГОСТ 17.1.3.13-86 Охрана природы (ССОП). Гидросфера. Общие требования к охране поверхностных вод от загрязнения : межгосударственный стандарт : дата введения 1986-07-01 / Госстандарт СССР. – Изд. официальное. – Москва.: "СТАНДАРТИНФОРМ", 2010. – 2 с.

55. Федеральный закон от 21 декабря 1994 г. № 68-ФЗ. О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера.

Таблица 4.10 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме

Вид работ	Исп.	T _{кi} , кал. дн.	Продолжительность выполнения работ																	
			Сен 2021	Окт 2021	Дек 2021	Янв 2022	Фев 2022	Мар 2022	Апр 2022	Май 2022	Сен 2022	Окт 2022	Дек 2022	Янв 2023	Фев 2023	Мар 2023	Апр 2023	Май 2023	Июн 2023	
Состав. и утв.ТЗ	Рук.	6																		
Подбор и изуч.мат.	Инж.	28																		
Обз.пат.и ссл.	Инж.	21																		
Выб.напр .иссл.	Рук. Инж.	2																		
Ка- лен.план. раб.	Инж.	3																		
Пров.тео р.расч.	Инж.	21																		
Пров.экс п.	Инж.	36																		
Ан.рез.	Инж	10																		

