TOMSK POLYTECHNIC UNIVERSITY ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

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

Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология, профиль Химия и технология биологически активных веществ
Научно образовательный центр Н.М. Кижнера

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Исследование ферментингибирующей активности ряда производных уксусной кислоты

УДК 602.42:577.152.3:547.292

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ГМ71	Райымкулова Мадина Кумарбеккызы		10.04.19

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент НОЦ Н.М. Кижнера	Белянин М.Л.	к.х.н.		1.06.19

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент отделения социально-гуманитарных наук	Подопригора И.В.	к.э.н.		18.04.19

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель отделения общетехнических дисциплин	Романова С. В.	–		10.04.19

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Руководитель ООП Химия и технология биологически активных веществ	Сарычева Т.А.	к.х.н., доцент		4.06.19

Томск – 2019 г.

Планируемые результаты обучения
по ООП 18.04.01 «Химическая технология» (магистр)
профиль «Химия и технология биологически активных веществ»

Код результата	**Результат обучения (выпускник должен быть готов)**
Профессиональные компетенции	
Р1	Применять *глубокие* естественно-научные, математические и инженерные *знания* для создания *новых* материалов
Р2	Применять *глубокие знания* в области современных технологий химического производства для решения *междисциплинарных* инженерных задач
Р3	Ставить и решать *инновационные* задачи *инженерного анализа*, связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии
Р4	Разрабатывать химико-технологические процессы, *проектировать* и использовать *новое* оборудование для создания материалов, конкурентоспособных на *мировом* рынке
Р5	Проводить теоретические и экспериментальные *исследования* в области создания *новых* материалов, современных химических технологий, нанотехнологий
Р6	Внедрять, *эксплуатировать* современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их *высокую эффективность*, соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды
Универсальные компетенции	
Р7	Использовать *глубокие знания* по *проектному менеджменту* для ведения *инновационной* инженерной деятельности с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности
Р8	*Активно* владеть *иностранным языком* на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности
Р9	Эффективно работать индивидуально, в качестве *члена и руководителя группы*, состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность *следовать корпоративной культуре* организации
Р10	Демонстрировать *глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов* инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах *устойчивого развития*
Р11	*Самостоятельно учиться* и непрерывно *повышать квалификацию* в течение всего периода профессиональной деятельности

TOMSK POLYTECHNIC UNIVERSITY ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

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

Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология, профиль Химия и технология биологически активных веществ
Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера

УТВЕРЖДАЮ:
Руководитель ООП 18.04.01 Химия и технология биологически активных веществ
_____ Сарычева Т.А.
(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации

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

Студенту:

Группа	ФИО
4ГМ71	Райымкулова Мадина Кумарбеккызы

Тема работы:

Исследование ферментингибирующей активности ряда производных уксусной кислоты	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	12.04.2019 № 2849/с

Срок сдачи студентом выполненной работы:	01.06.2019 г.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе *(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).*	Объектом исследования являются соединения ряда производных уксусной кислоты.

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов *(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).*	Изучение литературных источников; постановка задачи исследования; тестирование соединений (ряд производных уксусной кислоты) по влиянию на процесс дыхания дрожжей Saccharomyces cerevisiae; анализ полученных результатов; финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение; социальная ответственность; заключение по исследовательской работе.
Перечень графического материала *(с точным указанием обязательных чертежей)*	Рисунок –15, таблицы – 26, приложения – 2.

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы

(с указанием разделов)

Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Подопригора И.В., доцент отделения социально-гуманитарных наук, к.э.н.
Социальная ответственность	Романова С.В., старший преподаватель отделения общетехнических дисциплин
Английский язык	Рыбушкина С.В., старший преподаватель отделения иностранных языков

Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:

1. Теоретические основы применения дрожжей в качестве аналога гельминтов
2. Метаболизм дрожжей
3. Экспериментальная часть

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

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Белянин Максим Львович	к.х.н.		28.01.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ГМ71	Райымкулова Мадина Кумарбеккызы		28.01.19

Реферат

Выпускная квалификационная работа состоит из 122 листах, 15 рисунков, 26 таблиц, 95 источников, 2 приложений.

Ключевые слова: дрожжи Saccharomyces cerevisiae, соединение ряда производных уксусной кислоты, процесс дыхание дрожжей, гликолиз, эффект Кребтри, описторхоз.

Объектом исследования являются соединения ряда производных уксусной кислоты.

Цель работы – оценить влияние тестируемых соединений на дрожжи Saccharomyces cerevisiae.

В процессе исследования предложена эффективная методика, позволяющая тестировать соединения по их влиянию на процесс дыхания дрожжей.

В результате исследования выявлены соединения, оказывающие влияние на процесс дыхания в дрожжах, и они могут ингибировать дыхательную цепь у описторхов.

Область применения: фармакология, микробиология.

В будущем планируется протестировать самые активные соединения на живых описторхисах и на лабораторных животных (хомяки).

Работа представлена введением, 6 разделов и заключением, приведен список использованных источников, а также публикаций студента.

Магистерская диссертация выполнена в лаборатории НОЦ Н.М. Кижнера магистрантом группы 4ГМ71 М.Р. Кумарбеккызы под руководством к.х.н., доцента М.Л. Белянина.

Определения, обозначения, сокращения

АДФ - аденозиндифосфат

АМФ - аденозинмонофосфат

АТФ - аденозинтрифосфат

ГХ-МС - газовая хромато-масс-спектрометрия

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ - газожидкостная хроматография

ИК-спектрометрия - инфракрасная спектрометрия

ТСХ - тонкослойная хроматография

ДМСО - диметилсульфоксид

ТФТХ - трифенилтетразолий хлорид

НАД - никотинамидадениндинуклеотид

ФАД - флавинадениндинуклеотид

СДГ - сукцинатдегидрогеназа

ФР - фумаратредуктаза

ЦТК - цикл трикарбоновых кислот

ПВК - пировиноградная кислота

ГТФ - гуанозинтрифосфат

ФЕП - фосфоэнолпировиноградная кислота

ЭМП - Эмбдена – Мейергофа – Парнаса

ЖК - жирные кислоты

КоА - коэнзим А

Оглавление

Введение……... 12

Глава 1 Теоретические основы применения дрожжей в качестве аналога гельминтов…… 15

1.1 Виды дрожжей…… 17

Глава 2 Метаболизм дрожжей…… 22

2.1 Гликолиз…….. 22

2.2 Спиртовое брожение дрожжей…… 28

2.3 Цикл Кребса или цикл трикарбоновой кислоты…….. 31

2.4 Эффект Кребтри……. 33

3 Экспериментальная часть……. 36

4 Результаты проведенного исследования……. 44

4.1 Влияние тест-соединений на процесс дыхания дрожжей…… 44

4.2 Влияние структуры эфиров фенолкарбоновых кислот на активность в тесте, на основе эффекта Кребтри……... 51

Глава 5 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение…….... 56

5.1 Потенциальные потребители результатов исследования…… 56

5.2 Диаграмма Исикава…….. 58

5.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации…….. 60

5.4 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования……. 62

5.5 Инициация проекта…….. 62

5.6 Планирование управления научно-техническим проектом…… 65

5.6.1 Иерархическая структура работ проекта…… 65

5.6.2 Контрольные события проекта…… 66

5.6.3 План проекта……..... 67

5.6.4 Бюджет научного исследования…….. 69

5.6.5 Накладные расходы…….. 73
5.6.6 Реестр рисков проекта……..... 74
5.6.7 Определение ресурсной эффективности исследования…… 75
Глава 6 Социальная ответственность……. 78
6.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности……. 79
6.2 Производственная безопасность……. 79
6.2.1 Анализ выявленных вредных и опасных факторов…… 80
6.2.1.1 Недостаточная освещённость рабочих помещений…….. 81
6.2.1.2 Отклонение показателей микроклимата…… 82
6.2.1.3 Повышенный уровень шума……... 83
6.2.1.4 Вредные вещества…… 83
6.2.1.5 Опасность поражения электрическим током…… 85
6.2.2 Обоснование мероприятий по снижению воздействия…….. 86
6.3 Экологическая безопасность…….……. 87
6.3.1 Защита атмосферы……. 88
6.3.2 Защита гидросферы…… 88
6.3.3 Защита литосферы…….. 88
6.4 Безопасность жизнедеятельности при чрезвычайных ситуациях…... 88
Выводы……... 90
Список публикаций студента…….. 91
Список использованных источников…….. 92
Приложение А……... 102
Приложение В……... 122

Введение

По данным Министерство здравоохранения Российской Федерации в стране ежегодно выявляется более 10 млн. больных, с инфекционными и паразитными заболеваниями, которые являются причиной смерти человечества в нашем веке. На сегодняшний день паразитное заболевание Российской Федерации остается сложным вопросом, так как на территории России из 70 регистрируемых паразитное заболевание (гельминтозов) 30 имеет широкое распространение. По числу больных в России кишечные гельминтозы занимают один из первых мест. Также, регистрируется природно-очаговый гельминтоз, который приводит к инвалидности и к летальному исходу (описторхоз).

Противогельминтные препараты остаются единственными доступными средствами в борьбе с паразитами гельминтов, которые вызывают значительную заболеваемость и смертность среди людей, а также сельскохозяйственных животных. Лечение гельминтозных инфекций стало проблематичным из-за частой лекарственной устойчивости паразитов гельминтов. Ситуация усложняется особенностью физиологии гельминтов (анаэробные условия) и их малой доступностью, что вызывает трудности тестирования противогельминтной активности соединений в условиях in vitro. В связи с этим, становится необходимым выявления микроорганизмов физиологически схожих с гельминтами, что позволило бы использовать их для тестирования соединений используемых в разработке противогельминтных препаратов.

У гельминтов есть процесс дыхания – метаболический распад сложных веществ на более простые или окисление какого-либо вещества, в результате которого выделяется энергия в качестве тепла и виде молекулы АТФ (АТФ является источником энергии всех процессов). В 1890 г. Р. Бунге установил, что гельминты (глисты) в присутствии кислорода жили дольше, чем в бескислородной среде. Если ингибировать процесс дыхания, то гельминты не будут дышать, и процесс их метаболизма значительно замедлится, что может

привести к истощению энергетических запасов паразита. Поэтому соединения, которые будут ингибировать процесс дыхания могут проявить себя как противогельминтное лекарство.

Изучение возможности ингибирования процесса дыхания у гельминтов представляет большой практический интерес с точки зрения разработки противогельминтного препарата, так как процесс дыхания и у гельминтов, и у дрожжей имеет большое сходство (наличие фумаратредуктазы (ФР) и одновременно действующей дыхательной цепи). Нами было предложено использовать в качестве модельного организма пекарские дрожжи Saccharomyces cerevisiae. Дрожжи Saccharomyces cerevisiae не являются патогенными для организма человека.

Таким образом, цель исследовательской работы является: оценить влияние тестируемых соединений (производных ряда уксусной кислоты) на процесс дыхания дрожжей Saccharomyces cerevisiae.

Исходя, из цели были поставлены следующие задачи:

1. Протестировать тест-соединения на процесс дыхания;
2. Протестировать тест-соединения на способность ингибировать ФР.

Научная новизна работы заключается в том, что:

1. Впервые протестированы соединения по их влиянию на процесс дыхания дрожжей Saccharomyces cerevisiae;
2. Впервые найдены соединения, которые ингибируют эффект Кребтри у дрожжей Saccharomyces cerevisiae.

Практическая значимость результатов ВКР: в процессе выполнения исследовательской работы была использована эффективная методика, которая позволяет протестировать полученные соединения, оказывающие влияние на процесс дыхания в дрожжах, и могут быть потенциальными ингибиторами процесса дыхания у описторхов. Протестированные соединения могут быть основой для разработки новых эффективных препаратов против описторхозов.

Реализация и апробация работы: статистический анализ данных полученных в результате исследований был выполнен с использованием пакет

программ Microsoft Excel 2016. Статистическая обработка полученных данных включала определение средних значений величин и стандартной средней ошибки. Результаты исследовательской работы были представлены на XIX международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л. П. Кулёва (2018, РФ, Томск) а также на XX международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л. П. Кулёва (2019, РФ, Томск).

Глава 1 Теоретические основы применения дрожжей в качестве аналога гельминтов

Важность и преимущество изучения дрожжей в качестве аналога гельминтов (описторхов) для решения различных проблем отмечается рядом многих авторов. Так, отмечается, что фермент фумаратредуктаза используется в процессе дыхания гельминтов [1]. Поскольку многие виды гельминтов являются факультативными анаэробами, они содержат дыхательную цепь. Одним из таких важных компонентов является сукцинатдегидрогеназа (СДГ), которая в свою очередь придает гельминтам сходство с дрожжами [2].

Дрожжи являются простыми, но сильными модельными организмами для исследования и управления программами энергетического метаболизма в жестко контролируемых условиях путем снабжения различными источниками углерода. Saccharomyces cerevisiae послужили ценной модельной системой для изучения генетической и регуляторной основой энергетического обмена в масштабах всего генома [3]. Также отмечается, что универсальная генетическая изменчивость дрожжей и высокая степень между клеточными процессами человека сделали его моделью выбора для новаторских исследований в области молекулярной и клеточной биологии за последние четыре десятилетия. Эти характеристики дрожжей, взятые вместе с техническими преимуществами, такими как простые условия роста, быстрое деление клеток и развитие множества генетических инструментов для анализа биологических функций, расширили применение дрожжей в качестве инструмента скрининга в области обнаружения лекарств [3].

Передовые генетические методы, наряду с высокой степенью сохранности основных клеточных процессов, сделали дрожжи Saccharomyces cerevisiae ценной системой для выявления новых лекарств-мишеней, скрининга лекарств на основе мишеней, а также подробного анализа эффективных лекарств. Дрожжи также представляют собой удобную систему для обнаружения противогрибковых препаратов, поскольку они тесно связаны с Candida albicans – главным человеческим патогеном [4].

Влияние избыточных процессов на измеряемую продукцию может быть трудно контролировать и отличить от эффектов, которые будут специфичными для определенной цели. Более того, генетические манипуляции с клетками млекопитающих обычно проблематичны и требуют много времени.

Генетические системы дрожжей стали мощным инструментом для измерения активности белков, а также для выявления и характеристики молекулярных взаимодействий [5]. В клетках дрожжей функцию белков человека часто можно воссоздать, но аспекты некоторых физиологических процессов человека можно пересмотреть из-за высокой степени сохранения основных молекулярных и клеточных механизмов между клетками дрожжей и человека [6-9]. Таким образом, дрожжи представляют собой недорогую и простую альтернативную систему клеткам млекопитающих для анализа лекарственных мишеней и скрининга соединений в гетерологичной, но клеточной, эукариотической среде.

Одним из основных преимуществ дрожжей над клетками млекопитающих является обеспечение универсальной генетической пластичности этого организма [10].

Дрожжи Saccharomyces cerevisiae являются наиболее изученными эукариотическими организмами. Дрожжи – это непатогенная модель грибковых патогенов, используемая для выявления противогрибковых мишеней, подходящих для разработки лекарств, и для выяснения механизмов действия противогрибковых агентов. Как модель фундаментальных клеточных процессов и метаболических путей человека, дрожжи улучшили наше понимание и облегчили молекулярный анализ многих генов болезней. Завершение последовательности генома Saccharomyces помогло начать постгеномную эру, сосредоточившись на функциональном анализе целых геномов [11].

Хронологическая продолжительность жизни дрожжей, которая измеряется как время выживания популяций неделящихся клеток, была успешно использована для идентификации ключевых путей, ответственных за

регуляцию старения. Эти пути имеют удивительное сходство с теми, которые регулируют продолжительность жизни у высших эукариот, что позволяет предположить продолжительность жизни в зависимости от активности генов и сигнальных путей, которые имеют общее эволюционное происхождение. Таким образом, одноклеточная Saccharomyces cerevisiae представляет собой простую модельную систему, которая может обеспечить существенное понимание генетики человека и молекулярной биологии старения [12].

Таким образом, изучение дрожжей в качестве заменителя бактерий является одним из актуальных проблем.

1.1 Виды дрожжей

У дрожжей Saccharomyces cerevisiae есть способность адаптировать свой метаболизм к условиям окружающей среды. Когда уровень глюкозы является высоким, дрожжи используют ферментацию в качестве основного метаболического пути, а когда этого источника углерода мало, он может переключиться на окислительный метаболизм. Это регулируется краткосрочными и долгосрочными событиями [13].

Энергетического метаболизма, существует сходство между глюкозо-индуцированной репрессией окислительного метаболизма дрожжей и «аэробным гликолизом» опухолевых клеток (Рисунок 1). В клетках обоих типов наблюдается снижение уровня окислительного метаболизма наряду с усилением ферментации, несмотря на присутствие кислорода [14]. Более того, Saccharomyces cerevisiae является Кребтри-позитивной клеткой [15]. Это указывает на то, что Saccharomyces cerevisiae является подходящей метаболической моделью для скрининга препаратов, нацеленных на метаболизм, используемых для противоопухолевой терапии [14].

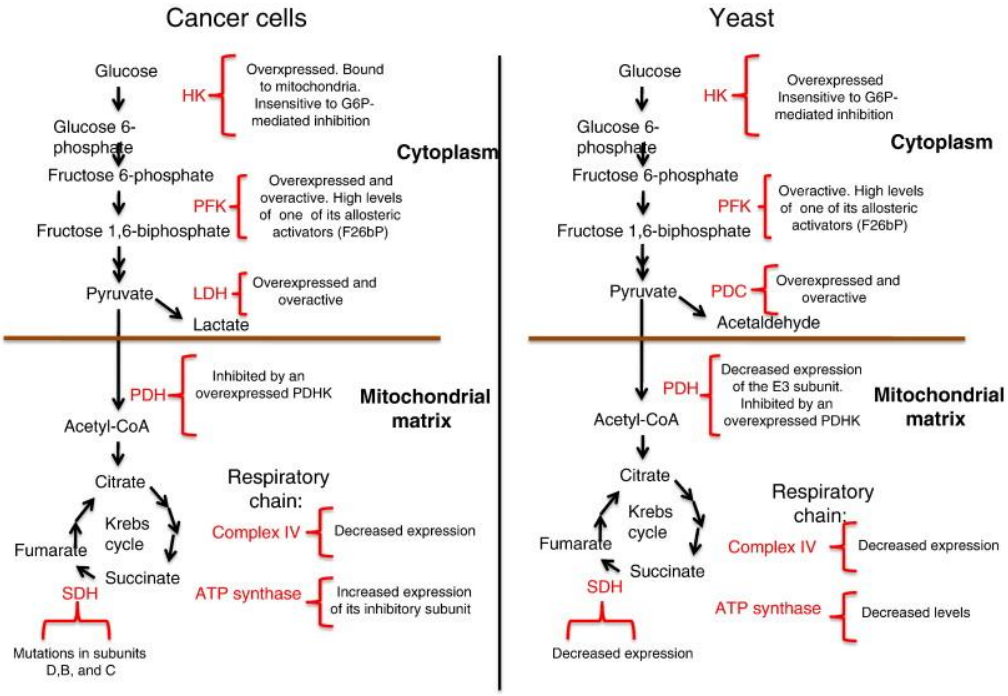


Рисунок 1 Метаболическое сходство между опухлыми клетками и дрожжами.

Изоформы гексокиназы (НК), нечувствительные к глюкозо-6-фосфат-опосредованному ингибированию, сверхэкспрессируются. Фосфофруктокиназа (ФФК) активируется более высокими уровнями одного из ее аллостерических активаторов: фруктоза 2,6-бифосфата (F26bP). Ферменты, которые метаболизируют пируват в цитоплазме клетки, сверхэкспрессируются: лактатдегидрогеназа (ЛДГ) в случае раковых клеток и пируватдекарбоксилаза в дрожжах (PDC). Комплекс пируватдегидрогеназы (PDH) ингибируется за счет фосфорилирования избыточной экспрессией пируватдегидрогеназы киназы (PDHK). Сукцинатдегидрогеназа (SDH) имеет мутации в различных субъединицах в раковых клетках, и ее экспрессия снижена в дрожжах. В обоих случаях наблюдается снижение экспрессии митохондриального комплекса IV, а также подавление АТФ-синтазы.

Дрожжи делятся на виды с опухолевыми клетками метаболическими особенностями, которые определены как основные причины эффекта Варбурга [14]. Например, как опухолевые клетки, ферментирующие дрожжи сверхэкспрессируют все ферменты гликолиза в ответ на глюкозу [16], [17].

Активность и характер экспрессии ключевых ферментов гликолиза (гексокиназа, фосфофруктокиназа и пируваткиназа) также модифицируются в дрожжах. Во время роста на глюкозе экспрессируется только гексокиназа II [17], [18]. Последняя представляет собой изоформу с высоким сродством, которая нечувствительна к опосредованному продуктом ингибированию [18], [19]. Хотя в экспрессии фосфофруктокиназы, по-видимому, нет изменений [20], она очень активна из-за повышенного уровня ее аллостерического активатора (фруктоза 2,6-бифосфат) [21]. В ферментативных условиях экспрессируется изоформа пируваткиназы (Pyk1), которая более эффективно реагирует на аллостерическую активацию, опосредованную фруктозой 1,6-бифосфатом [22].

Как и в опухолях, регуляция на уровне перекрестка пирувата была продемонстрирована у дрожжей. Во время ферментации вступление пирувата в цикл Кребса, по-видимому, ограничивается пониженной регуляцией его окисления, в то время как его цитоплазматический метаболизм очень активен.

Дрожжи Saccharomyces cerevisiae также обладает пируватным транспортом, который перемещает его в митохондриальный матрикс [23]. Что касается гомолога млекопитающих, мало что известно о регуляции этого носителя, и только недавно была идентифицирована последовательность гена, кодирующая дрожжевой гомолог [24].

Дрожжи также экспрессируют гомологи пируватдегидрогеназы киназы (Pdhk) млекопитающих и соответствующих фосфатаз (Pdp) [25], [26]. Активность дрожжей пируватдегидрогеназы ограничивается фосфорилирования фермента [27]. Дефосфорилированная форма была обнаружена у дрожжей, растущих на неферментируемых источниках углерода, т.е. когда эти клетки получают свою энергию в основном за счет окислительного метаболизма [25]. Также комплекс пируватдегидрогеназы также подвергается регуляции транскрипции, так как экспрессия его субъединицы E3 (липоамиддегидрогеназы) снижается во время ферментации [28].

Кроме того, лактатдегидрогеназа также присутствует в дрожжах: две изоформы данного фермента расположены во внутренней мембране митохондрий [29], [30]. Митохондриальные формы необратимо окисляют лактат до пирувата и участвуют в дыхательной цепи [29], [31], и роль цитоплазматической изоформы до сих пор неизвестна. У дрожжей снижение метаболизма пирувата в цитозоле зависит главным образом от пируватдекарбоксилазы (Pdc) [32]. Этот фермент продуцирует ацетальдегид, который либо окисляется в митохондриальной матрице [33], либо восстанавливается до этанола алкогольдегидрогеназой (Adh) в реакции, которая приводит к повторному окислению цитоплазматической НАДН [34]. Несмотря на то что метаболизм цитоплазматического пирувата не является строго таким же, как метаболизм опухолевых клеток, увеличение потока через этот путь подавляет поступление субстрата в окислительный метаболизм, как это видно из повышенной активности лактатдегидрогеназы в опухолевых клетках. В соответствии с этим в начале ферментации активация Pdc сопровождается снижением дыхания [15].

Понижающая регуляция цикла Кребса была также выявлена в ферментирующих дрожжах. В этих условиях ферментативных активности по аконитазам, изоцитратдегидрогеназы и малат дегидрогеназы уменьшаются [36]. Активность митохондриальных дыхательных комплексов II и IV также ниже при ферментации. Это может быть вызвано негативной регуляцией на уровне транскрипции [16], [36].

Как упоминалось выше, Saccharomyces cerevisiae является Кребтри-положительным: после добавления глюкозы дыхание ингибируется [32]. Те же механизмы, которые могли бы объяснить индукцию эффекта Кребтри в опухолевых клетках, могут в равной степени применяться к модели дрожжей: ограничения уровней АДФ и $Ф_н$ [37], вызванное Ca^{2+} снижение дыхания [38], снижение проницаемости митохондриальная наружная мембрана [39] и фруктоза 1,6-бифосфат опосредованного ингибирования дыхательной цепи [35]. Существуют дрожжи, отличные от Saccharomyces cerevisiae, которые

классифицируются как Кребтри-отрицательные, такие как Candida utilis и Kluyveromyces lactis [15]. Характеристика различий между обоими типами дрожжей может дать некоторое представление о точных механизмах, с помощью которых индуцируется эффект Кребтри. В связи с этим было продемонстрировано, что Candida utilis нечувствителен к эффекту, оказываемому фруктозой 1,6-бифосфатом [35]. Это указывает на то, что этот механизм является специфической особенностью Кребтри-положительных клеток.

Хотя можно утверждать, что у ферментирующих дрожжей отсутствуют генетические дефекты, выявленные в раковых клетках, Saccharomyces cerevisiae обладает гомологами генов, связанных с раком (таких как p 53, BRCA1, BRCA2, Cyclin D и Ras) [40]. Интересным подходом было бы введение мутаций в эти гены и использование этих «опухолевых дрожжей» в качестве модели для скрининга противораковых лекарств и для изучения метаболизма, чтобы определить, как каждая из этих мутаций будет влиять на эффект Варбурга при раке.

Глава 2 Метаболизм дрожжей

Метаболизм дрожжей связывает все ферментативное реакции, которые происходит в клетке. Более того, метаболизм дрожжей состоит из следующих процессов: дыхательная цепь, гликолиз, цикл трикарбоновой кислоты и спиртовое брожение.

2.1 Гликолиз

В дрожжевой клетке катаболизм глюкозы может протекать как в аэробных, так и анаэробных условиях. Данные условия являются основной функции – синтеза аденозинтрифосфат (АТФ). Через ряд стандартных ферментативных реакций.

В данных двух условиях глюкоза через ряд стандартных ферментативных реакций распадается с формированием двух молекул пирувата (пировиноградная кислота). Данный процесс называется гликолизом, или путем Эмбдена – Мейергофа – Парнаса (ЭМП) [41].

Аэробное окисление глюкозы. В аэробных средах глюкозы окисляется до CO_2 и H_2O.

$$C_6H_{12}O_6 + 3\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O\ + 2830{,}8\ \text{кДж/моль}$$

Данный процесс состоит из несколько стадий:

– в аэробном гликолизе происходит окисление одной молекулы глюкозы до двух молекул пировиноградной кислоты (ПВК), в результате которого образуется две молекулы АТФ и две молекулы никотинамидадениндинуклеотид ($НАДН_2$).

– две молекулы ПВК превращается в две молекулы ацетил-КоА, в результате выделяется две молекулы CO_2 и две молекулы $НАДН_2$.

– в стадии цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) происходит окисление две молекулы ацетил-КоА, в результате выделяется четыре молекулы CO_2, с образованием две молекул гуанозинтрифосфат (ГТФ), которые дают две

молекулы АТФ, шесть молекулы $НАДН_2$ и две молекулы флавинадениндинуклеотид ($ФАДН_2$) [42].

Гликолиз можно разделить на две фазы: энергопотребление (также называемое химическим грунтованием) и получение энергии. Первая фаза является энергоемкой фазой, поэтому для запуска каждой молекулы глюкозы требуется две молекулы АТФ. Однако в результате реакции образуются четыре АТФ, что приводит к чистому приросту двух молекул энергии АТФ [43]

Гликолиз может быть выражен следующим уравнением:

$C_6H_{12}O_6 + 2\ АТФ + 2\ НАД^+ + 4\ АДФ + Ф_н \rightarrow Пируват + 4\ АТФ + 2\ НАДН + 2\ H^+$

В этом уравнении говорится, что глюкоза в сочетании с АТФ (источником энергии), никотинамидадениндинуклеотид ($НАД^+$) (коферментом, который служит акцептором электронов) и неорганическим фосфатом, распадается на две молекулы пирувата, образуя четыре молекулы АТФ - для чистого выхода двух АТФ и два энергосодержащих кофермента НАДН. НАДН, который вырабатывается в этом процессе, будет позже использован для производства АТФ в митохондриях. Важно отметить, что к концу этого процесса одна молекула глюкозы генерирует две молекулы пирувата, две молекулы АТФ с высокой энергией и две молекулы НАДН, несущие электроны [44].

Далее гликолиза включают ферменты, которые ответственные за реакции. Когда глюкоза попадает в клетку, фермент гексокиназа (или глюкокиназа в печени) быстро добавляет фосфат, чтобы превратить его в глюкозо-6-фосфат, Киназа - это тип фермента, который добавляет молекулу фосфата к субстрату (в данном случае глюкозу, но это также может быть верно и для других молекул). Эта стадия превращения требует одного АТФ и по существу, задерживает глюкозу в клетке, предотвращая ее прохождение обратно через плазматическую мембрану, тем самым позволяя гликолизу продолжаться. Он также поддерживает градиент концентрации при более высоких уровнях глюкозы в крови, чем в тканях. Установив этот градиент концентрации, глюкоза в крови сможет перетекать из области высокой концентрации (кровь) в область низкой концентрации (ткани) для

использования или хранения. Гексокиназа встречается практически в каждой ткани организма. Глюкокиназа с другой стороны, экспрессируется в тканях, которые активны при высоком уровне глюкозы в крови, таких как печень. Гексокиназа имеет более высокое сродство к глюкозе, чем глюкокиназа, и, следовательно, способна преобразовывать глюкозу с большей скоростью, чем глюкокиназа. Это важно, когда уровень глюкозы в организме очень низок, поскольку он позволяет глюкозе перемещаться преимущественно в те ткани, которые в ней нуждаются больше.

Корме этого, в начальном этапе происходит гидролиз до моносахаридов, далее дрожжи утилизируют сахарозу, мальтозу, а также внутренние углеродные ресурсы трегалозу и гликоген [42].

Процесс гликолиза начинается с фосфорилирования глюкозы. Далее происходит образование за счет макроэргической связи АТФ глюкозо-6-фосфата. На рисунке 2 представлен метаболизм глюкозы в анаэробных условиях.

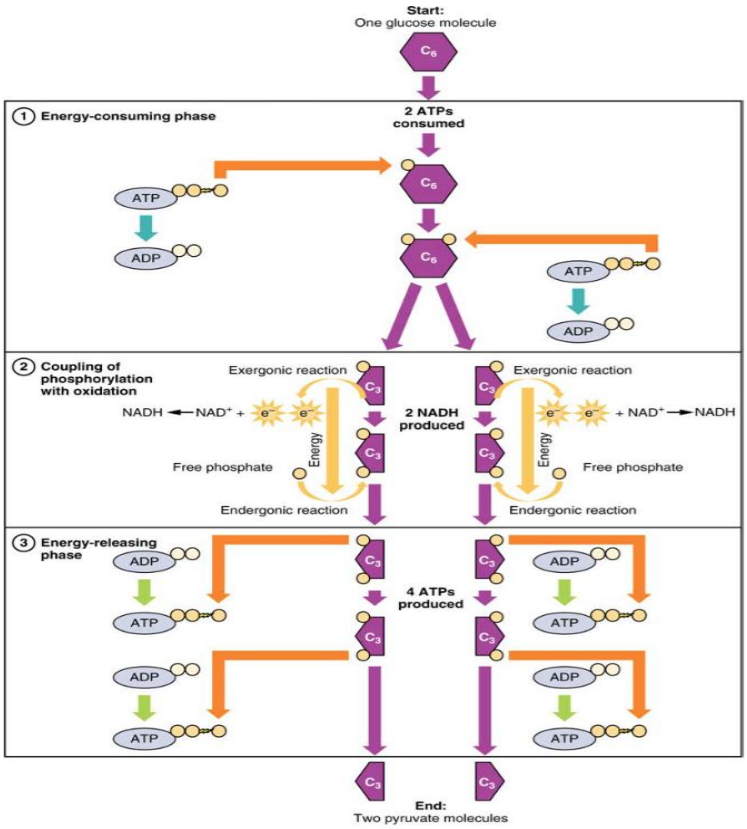


Рисунок 2 Метаболизм глюкозы в анаэробных условиях

Вовремя энергозатратной фазы гликолиза потребляются два АТФ, которые переносят два фосфата в молекулу глюкозы. Затем молекула глюкозы расщепляется на два трехуглеродных соединения, каждое из которых содержит фосфат. Вовремя второй фазы дополнительный фосфат добавляется к каждому из трехуглеродных соединений. Энергия для этой эндергонической реакции обеспечивается удалением (окислением) двух электронов из каждого трехуглеродного соединения. Вовремя фазы выделения энергии фосфаты удаляются из обоих трехуглеродных соединений и используются для получения четырех молекул АТФ. Кроме того, гликоген также служит источником D-глюкозы, которая является субстратом для фермента, отщепляющего остатки гликозидов с концов полисахаридных цепи гликогена.

На следующем этапе первой фазы гликолиза фермент глюкозо-6-фосфат-изомераза превращает глюкозо-6-фосфат в фруктозо-6-фосфат. Данная реакция является обратимой. Как и глюкоза, фруктоза также содержит шесть углеродсодержащих сахаров. На каждую молекулу глюкозы, входящую в цепь, необходимо две молекулы АТФ. Из питательной среды поступает фрутозо-6-фосфат который образуется из фруктозы, а также при гидролизе сахарозы. Затем фермент фосфофруктокиназа-1 добавляет еще один фосфат для превращения фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1-6-дисфосфат, другой шестиуглеродный сахар, с использованием другой молекулы АТФ. Затем альдолаза фермент – фруктозо-дифосфат-альдолаза, который содержит цинк, расщепляет этот фруктозо-1-6-бисфосфат на две трехуглеродные молекулы: D-глицеральдегид-3-фосфат и дегидроксиацетонфосфат. Затем фермент триозофосфат-изомераза превращает дегидроксиацетонфосфат во вторую молекулу D-глицеральдегид-3-фосфата. Следовательно, к концу этой фазы химического заполнения или потребления энергии одна молекула глюкозы расщепляется на две молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Последняя молекула нуждается в дальнейших превращениях по пути ЭМП, происходит равновесие между двумя молекулами триозофосфатами и поддерживается триозофосфатизомеразой [45].

Вторая фаза гликолиза, фаза, дающая энергию, создает энергию, которая является продуктом гликолиза. D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа превращает каждый трехуглеродный глицеральдегид-3-фосфат, образующийся в ходе энергозатратная фаза в 1,3-дисфосфоглицерат. Для данной реакции необходимо неорганического фосфата в качестве источника. Первая реакция в гликолитической цепи, включает в себе окисление субстрата. Кроме этого первая реакция образует макроэргическая связь, и образует свободная энергия окислительного процесса запасается в этой связи. Данная реакция высвобождает электрон, который затем захватывается $НАД^+$ для создания молекулы НАДН. НАДН - это молекула с высокой энергией, подобная АТФ, но в отличие от АТФ, она не используется клеткой в качестве энергетическим источником. Поскольку есть две молекулы глицеральдегид-3-фосфата, две молекулы НАДН синтезируются на этом этапе. Каждый 1,3-дисфосфоглицерат впоследствии дефосфорилируется (то есть фосфат удаляется) с помощью фосфоглицераткиназы в 3-фосфо-D-глицерат. Каждый фосфат, высвобождаемый в этой реакции, может превращать одну молекулу аденозиндифосфат (АДФ) в одну молекулу АТФ высокой энергии (Рисунок 3).

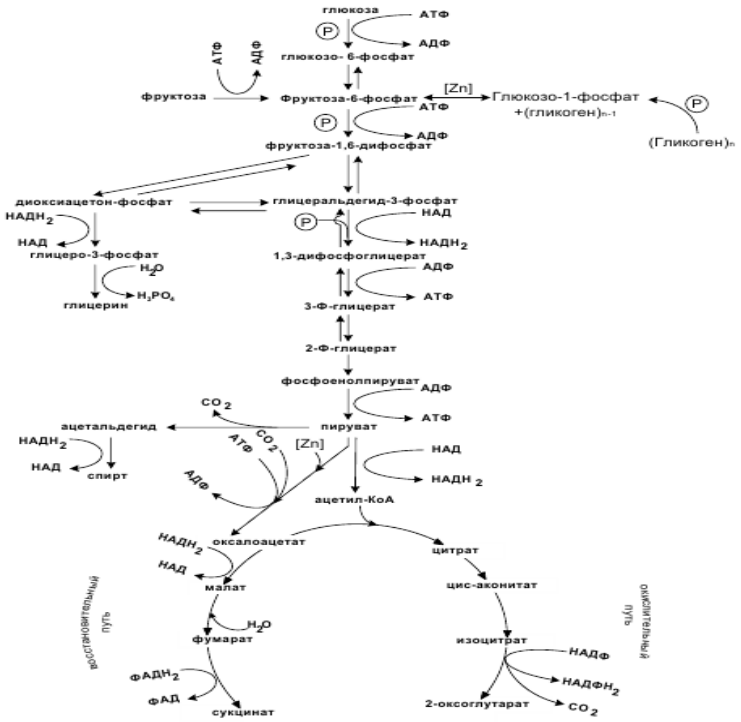


Рисунок 3 Метаболизм глюкозы в анаэробных условиях и цикл Кребса

Каждая молекула D-глюкозы или D-фруктозы вошедшей в данный участок цепи образует две молекулы $НАДН_2$ и две молекулы АТФ. Затем фермент фосфоглицерат мутаза превращает молекулы 3-фосфо-D-глицерата в 2-фосфо-D-глицерат. Далее из 2-фосфо-D-глицерат удаляют воду с помощью энолазы, что приводит к образованию фосфоэнолпировиноградная кислота (ФЕП). ФЕП богатая энергетической связью, которая используется для фосфорилирования АДФ.

Последний этап гликолиза включает дефосфорилирование двух молекул ФЕП с образованием двух молекул пирувата и двух молекул АТФ [45].

Одна молекула глюкозы распадается на две молекулы пирувата, две молекулы АТФ и две молекулы $НАДН_2$ образуется путем гликолиза.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3(CO)COOH + 2\ АТФ + 2\ НАДН_2$$

Пируват является продуктом процесса гликолиза, который используется тремя путями. Также пируват является конечным продуктом гликолиза. В живых организмах гликолиз составляет лишь первую стадию полного аэробного расщепление глюкозы до CO_2 и H_2O (Рисунок 3).

Пируват образуется при процессе гликолиза, с которым затем происходит окислительное декарбоксилирование, то есть отщепляется CO_2, а оставший фрагмент молекулы двухуглерода в виде ацетильной группы заходят в молекулу ацетил-КоА. Затем ацетильная группа окисляется до молекулы CO_2 и H_2O в ЦТК, присутситвии молекулярного кислорода [46].

Суть второго пути заключается в том, что пируват восстанавливается до лактата. Анаэробный гликолиз является важным источником энергии АТФ при напряжённой физической работе. В анаэробных микроорганизмах протекает молочнокислое брожение. Продуктом процесса гликолиза также является лактат (Рисунок 4). Молочная кислота образуется из сахара.

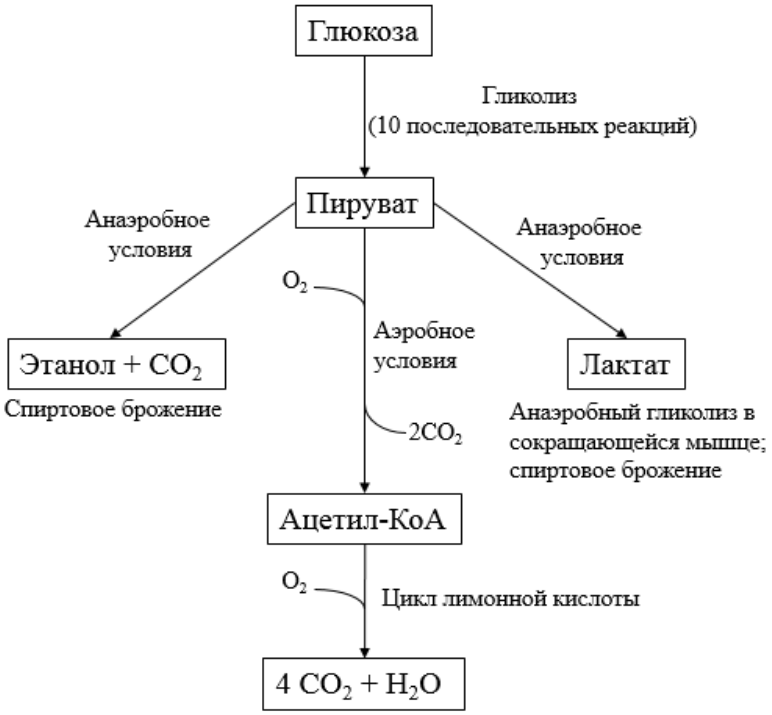


Рисунок 4 Пируват является конечным продуктом гликолиза, который проходит разные катаболические пути в зависимости от вида организма и от условий в которых протекает метаболизм

Третий путь заключается в том, что происходить превращений пирувата и конечным продуктом является этиловый спирт. Микроорганизмы (к ним относятся, например, дрожжи) превращающие пируват, который образовавшийся из глюкозы в процессе гликолиза, в этанол и CO_2. Данный процесс является спиртовое брожение. Брожение – обозначает анаэробное расщепление глюкозы или других органических пищевых веществ для получения энергии в виде АТФ [47].

2.2 Спиртовое брожение дрожжей

При окислении углеродов в результате которого образуется этиловый спирт, углекислота и выделяется энергия - данный процесс называется спиртовое брожение. На рисунке 5 представлена схема превращение химических реакции при спиртовом брожении глюкозы, которая протекает без участия кислорода т.е. анаэробных условиях.

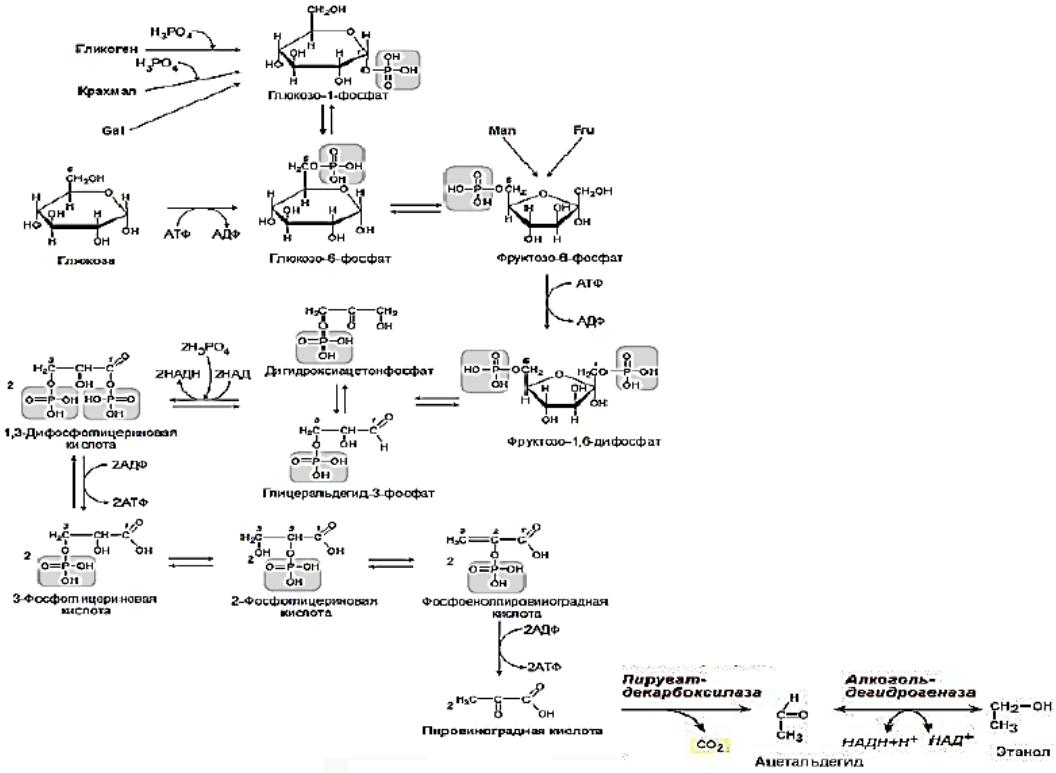


Рисунок 5 Спиртовое брожение глюкозы

Спиртовом брожении пировиноградная кислота превращается в последнем итоге в спирт и углекислоту. Данная реакция проходят в двух стадиях. В начале от пировиноградной кислоты отщепляется CO_2 и в результате образуется уксусный альдегид. Далее к уксусному альдегиду присоединяется водород, затем восстанавливается до этилового спирта. Все реакции протекает в присутствии ферментов. НАД-H_2 участвует в восстановление альдегида [48].

При спиртовом брожении кроме основных продуктов – спирт и CO_2, из глюкозы получаются разные продукты – вторичные продукты брожения. Вторичным продуктом брожения является глицерин, уксусный альдегид, янтарная и уксусная кислота, а также сивушные масла (изоамиловый, изобутиловый, изопропиловый спирты) и т.д. [49].

Первым этап спиртового брожение является гликолиз. В результате образовавшаяся пировиноградная кислота декарбоксилируется (отщепляется CO_2) с участием декарбокислазы в уксусный альдегид, который далее восстанавливается до этанола. Данная реакция проводится алкогольдегидрогеназой при участии НАД-H_2 (Таблица 2). В ходе данной

реакции НАД-H_2 окисляется до $НАД^+$, который вновь участвует в процессе гликолизе. За счет применения ацетальдегида в качестве последнего акцептора электронов клетка оснащает дельнейшее функционирование гликолитического пути, и рассмотрение – дальнейшее образование АТФ для применения в биосинтетических реакция [50].

Химический и энергетический баланс брожения:

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ АТФ + 2\ Ф_н \rightarrow 2\ CO_2 + 2\ CH_3CH_2OH + 2\ АТФ + 2H_2O + 61\ кДж$$

Таким образом, выход АТФ в пути ЭМП составляет две молекулы на одну молекулу глюкозы. Продуктивность брожения составила 26 %; а 74 % энергии в клетке не удерживается, они в основном рассеивается в виде тепла. Скорость брожения изменчивая, и наивысшая активность отмечается первые 24-36 ч. Далее ингибирование клеток этиловым спиртом снижает интенсивность данного процесса.

Процесс спиртового брожения в питательной среде может протекать в присутствии тиамина, а также ионов Zn^{+2}, Co^{+2}, Mg^{+2} и Mn^{+2} (Таблица 1).

Таблица 1 – Активаторы и ингибиторы процесса спиртового процесса

Фермент	Кофермент, кофактор	Активатор, стимулятор	Ингибитор
Пируватдекарбоксилаза	Тиаминпирофосфат	Тиамин, Mg^{+2}, Mn^{+2} или Co^{+2}	Ацетальдегид, O_2
Алкогольдегидрогеназа	НАДН, Zn^{+2}	–	–

Таким образом, в результате спиртовое брожение образует определенные количества энергии, которые хранятся в форме АТФ. Затем они тратиться на все жизненно необходимые процессы клетки [51].

В присутствии кислорода пируват продолжает цикл Кребса (так называемый цикл лимонной кислоты или цикл трикарбоновых кислот (ЦТК)), где дополнительная энергия извлекается и передается. Следовательно, гликолиз генерирует энергию для клетки и создает молекулы пирувата, которые могут быть обработаны в дальнейшем посредством аэробного цикла Кребса;

превращается в молочную кислоту или спирт (в дрожжах) путем ферментации; или использованный позже для синтеза глюкозы посредством глюконеогенеза [52].

2.3 Цикл Кребса или цикл трикарбоновой кислоты

Молекулы пирувата, образующиеся во время гликолиза, транспортируются через митохондриальную мембрану во внутренний митохондриальный матрикс, где они метаболизируются ферментами по пути, называемому циклом Кребса (Рисунок 6). Цикл Кребса также обычно называют циклом лимонной кислоты или циклом трикарбоновых кислот (ЦТК). Во время цикла Кребса создаются молекулы с высокой энергией, включая АТФ, НАДН и $ФАДН_2$. НАДН и $ФАДН_2$ затем пропускают электроны через цепь переноса электронов в митохондриях, чтобы генерировать больше молекул АТФ [53]. Молекула трехуглеродного пирувата, образующаяся в процессе гликолиза, перемещается из цитоплазмы в митохондриальный матрикс, где она превращается ферментом пируватдегидрогеназой в молекулу двухуглеродного ацетил-КоА. Эта реакция является окислительной реакцией декарбоксилирование. Он преобразует трехуглеродный пируват в молекулу ацетила-КоА с двумя атомами углерода, выделяя диоксид углерода и передавая два электрона, которые соединяются с $НАД^+$, образуя НАДН. Ацетил-КоА входит в цикл Кребса, соединяясь с четырехуглеродной молекулой оксалоацетата с образованием шестиуглеродной молекулы цитрата или лимонной кислоты, одновременно выделяя молекулу кофермента-А [54].

Молекула цитрата с шестью атомами углерода систематически превращается в молекулу с пятью атомами углерода, а затем в молекулу с четырьмя атомами углерода, оканчиваясь оксалоацетатом, в начале цикла. Попутно каждая цитратная молекула будет продуцировать один АТФ, один $ФАДН_2$ и три НАДН. $ФАДН_2$ и НАДН войдут в систему окислительного фосфорилирования, расположенную во внутренней митохондриальной

мембране. Кроме того, цикл Кребса поставляет исходные материалы для переработки и расщепления белков и жиров [55].

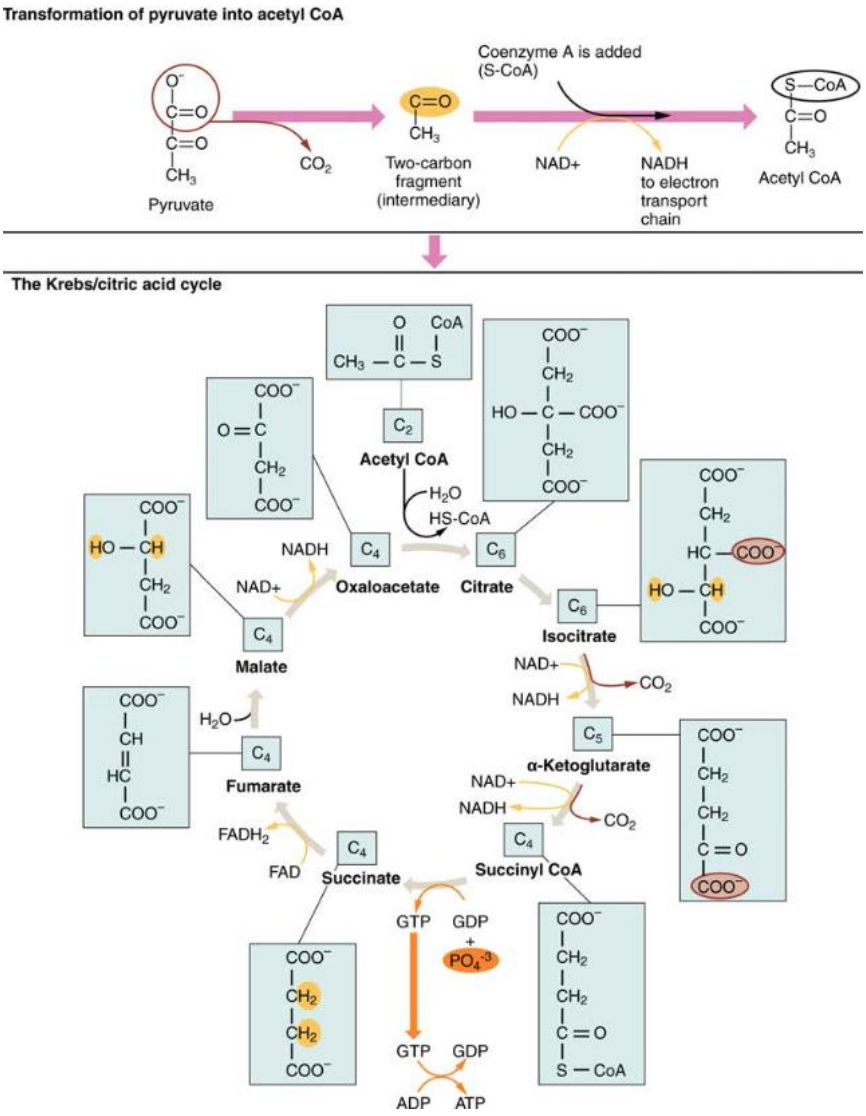


Рисунок 6 Цикл Кребса

Во время цикла Кребса каждый пируват, образующийся при гликолизе, превращается в двухуглеродную молекулу ацетил-КоА систематически обрабатывается в течение цикла и производит высокоэнергетические молекулы НАДН, $ФАДН_2$ и АТФ. Для того, чтобы начать цикл Кребса, цитрат-синтаза объединяет ацетил-КоА и оксалоацетат, образуя молекулу цитрата с шестью углеродами. Впоследствии КоА высвобождается и может объединяться с другой молекулой пирувата, чтобы снова начать цикл. Фермент аконитазы превращает цитрат в изоцитрат. На двух последовательных стадиях

окислительного декарбоксилирование две молекулы CO_2 и две молекулы НАДН образуются, когда изоцитратдегидрогеназа превращает изоцитрат в пятиуглеродный α-кетоглутарат, который затем катализируется и превращается в четырехуглеродный сукцинил-КоА α-кетоглутаратдегидрогеназой. Фермент сукцинил-КоА-дегидрогеназа затем превращает сукцинил-КоА в сукцинат и образует высокоэнергетическую молекулу ГТФ, которая передает свою энергию в АДФ для производства АТФ [56]. Сукцинатдегидрогеназа затем превращает сукцинат в фумарат, образуя молекулу $ФАДН_2$. Затем фумараза превращает фумарат в малат, который затем превращает малат-дегидрогеназу обратно в оксалоацетат, восстанавливая $НАД^+$ до НАДН. Затем оксалоацетат готов объединить со следующим ацетил-КоА, чтобы снова начать цикл Кребса (Рисунок 6). Для каждого хода цикла создаются три НАДН, один АТФ (через ГТФ) и один $ФАДН_2$. Каждый углерод пирувата превращается в CO_2, который выделяется как побочный продукт окислительного (аэробного) дыхания [57].

2.4 Эффект Кребтри

Эффект Кребтри приводит к ингибированию дыхания в зависимости от повышенной концентрации глюкозы (или, когда увеличивается гликолиз). Это наблюдается в гликолитически активных клетках (таких как клетки, участвующие в ферментациях, например, в дрожжах и опухолевых клетках), а не в каждой клетке (что противоречит эффекту Кастера, наблюдаемому у всех видов клеток). Механизм, лежащий в основе «эффекта Кребтри», может быть хорошо понят в терминах АТФ, АДФ, $Ф_н$ [58]. Это соотношение цитозольных АТФ, АДФ и $Ф_н$, которое регулирует скорость дыхания и гликолиза в клетках. Однако регуляторный механизм обоих процессов совершенно различен, что в конечном итоге приводит к появлению эффекта Кребтри в таких клетках. Регуляция дыхания контролируется свободной энергией гидролиза АТФ. Некоторые виды дрожжей, такие как Saccharomyces cerevisiae, используют ферментацию даже в присутствии кислорода, когда концентрации глюкозы достаточно высоки. Использование ферментации в присутствии кислорода и

при высоких концентрациях глюкозы называется эффектом Кребтри [59]. Дрожжи, которые проявляют эффект Кребтри, являются Кребтри-положительными; дрожжи, которые не проявляют эффекта Кребтри, являются Кребтри-отрицательными [60].

Альтернативный взгляд на преимущества и недостатки аэробной ферментации основан на компромиссах, возникающих между скоростью и выходом продукции АТФ и, следовательно, между скоростью роста и выходом организма. Эта точка зрения была концептуально изложена и упоминается как гипотеза компромисса между ставкой и доходностью (короче RYT) [61]. В то время как выход АТФ представляет собой количество АТФ, продуцируемое на единицу субстрата, скорость продуцирования АТФ представляет собой количество АТФ, продуцируемое в единицу времени. Компромисс между скоростью АТФ и доходностью означает, что АТФ может быть произведен быстро (т.е. с высокой скоростью и низкой доходностью) или эффективно (то есть, с низкой скоростью и высокой доходностью). Компромиссы между скоростью и выходом продукции АТФ могут возникать по разным причинам, включая фундаментальные термодинамические ограничения производства АТФ [62] и механистические ограничения данного энергетического метаболического пути, такие как затраты, налагаемые промежуточными продуктами или ферментами путь [63], [64].

По мере повышения уровня глюкозы или фруктозы пируват отводится от цикла лимонной кислоты (первая фаза генерации аэробной энергии) в синтез этанола путем превращения в ацетальдегид и CO_2 с помощью пируватдекарбоксилазы. Это явление, при котором глюкоза подавляет аэробный метаболизм, является эффектом Кребтри. У большинства организмов, использующих кислород, наблюдается эффект Пастера: гликолиз подавляется при наличии газа. В клетках Saccharomyces cerevisiae высокие уровни глюкозы приводят к изменениям в экспрессии генов [65]. Эти изменения способствуют внедрению переносчиков гексозы в плазматическую мембрану (что приводит к быстрому переносу глюкозы в клетку), синтезу гликолитических ферментов и

ингибированию синтеза ферментов аэробного дыхания. Считается также, что утечка пирувата в производство этанола является результатом явления переполнения. Молекул пируватдегидрогеназы слишком мало, чтобы полностью превратить пируват в ацетил-КоА. Следовательно, пируватдекарбоксилаза превращает избыточные молекулы пирувата в ацетальдегид (Рисунок 7) [66].

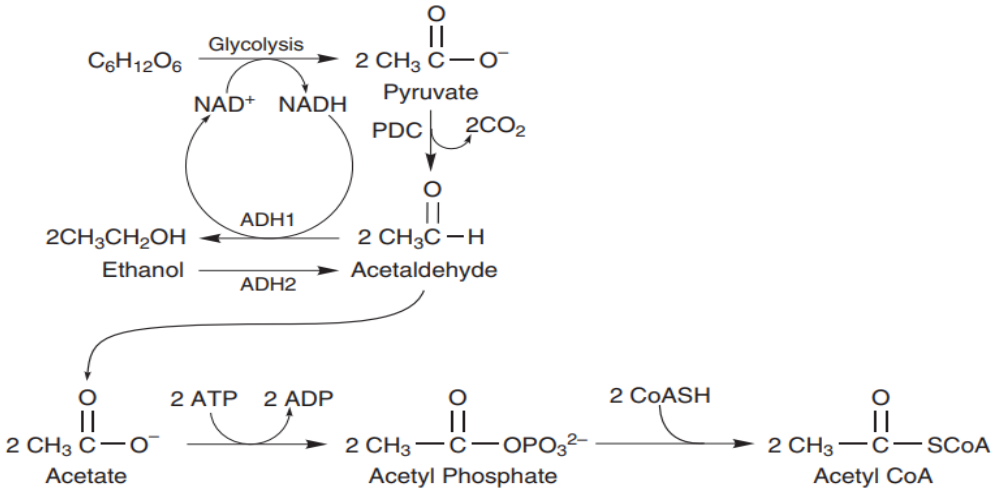


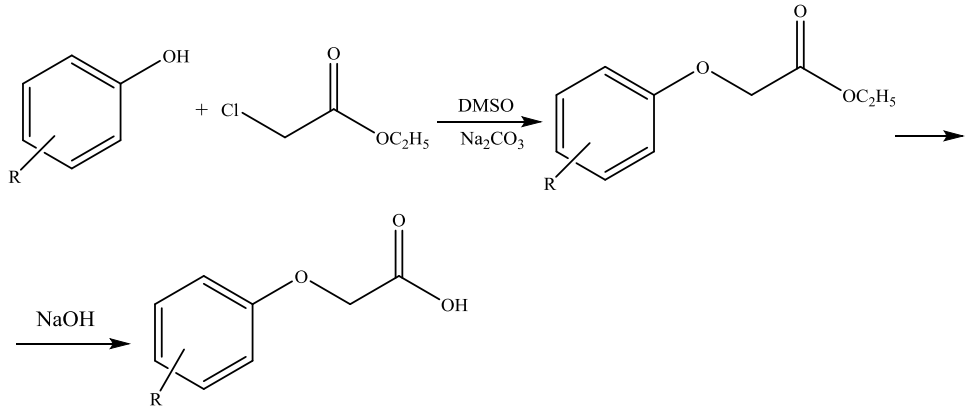
Рисунок 7 Метаболизм этанола у Saccharomyces cerevisiae

Когда уровень глюкозы является высоким, дрожжевые клетки переходят в путь производства, накопления и потребления этанола. Сначала глюкоза превращается в молекулы этанола для регенерации НАД$^+$. Затем этанол попадает в окружающую среду, где он убивает конкурирующие микробы. Как только глюкоза истощается, репрессия глюкозы заканчивается. Среди результатов дерепрессии является то, что ADH_2, фермент, который превращает этанол обратно в ацетальдегид, синтезируется. Ацетальдегид впоследствии превращается в ацетил-КоА, субстрат для цикла лимонной кислоты [67].

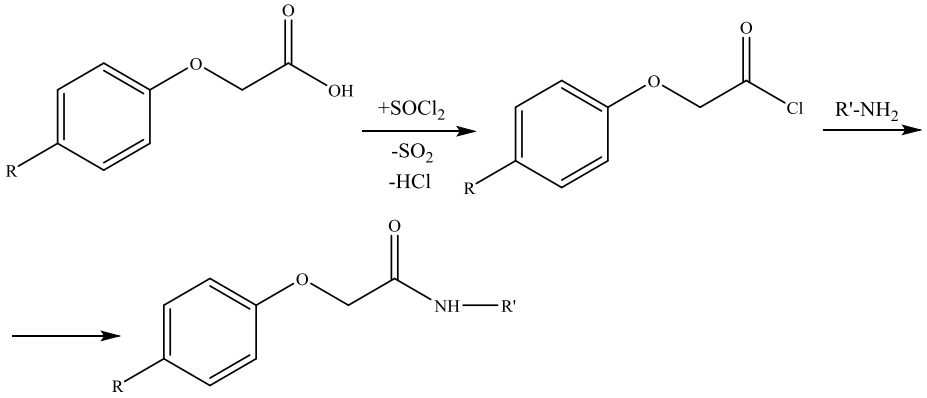
3 Экспериментальная часть

Тестируемые соединения (Таблица 2) были получены по известным и доступным методикам из доступных соединений. Идентичность полученных веществ подтвердили методами газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и тонкослойная хроматография (ТСХ). Также строение впервые полученных веществ подтвердили с помощью ИК-спектроскопии.

Общая схема синтез феноксиуксусных кислот:



Общая схема синтез амидов феноксиуксусных кислот:



Синтез бензилгентизата:

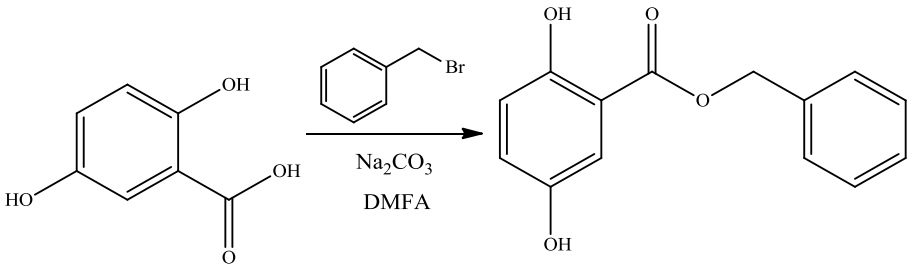
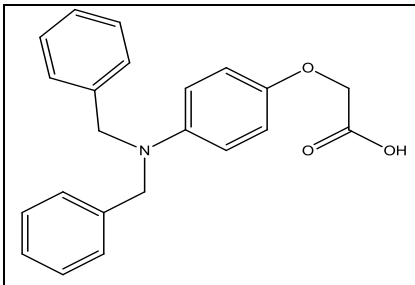
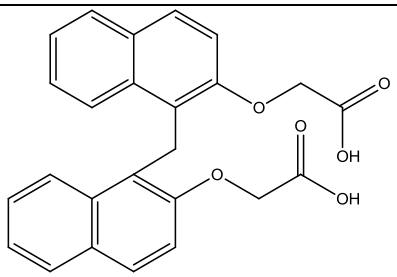
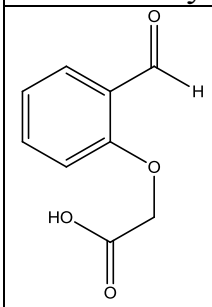
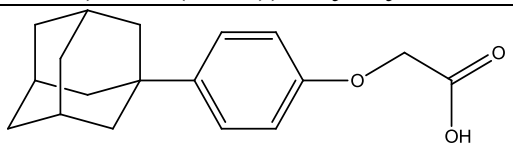
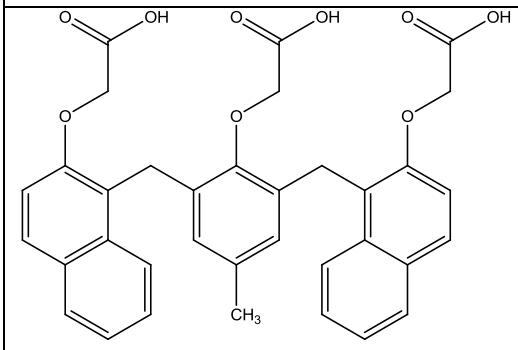
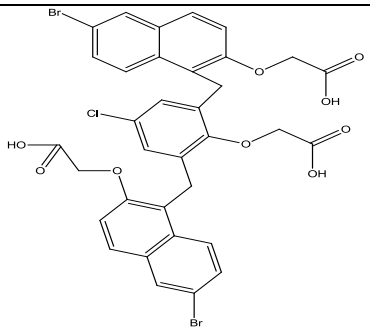
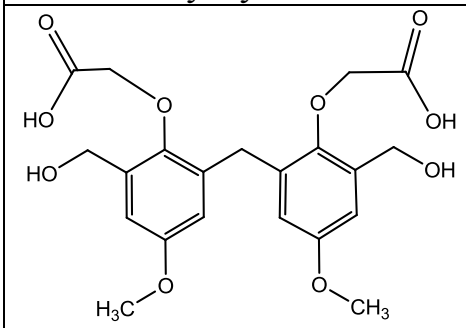
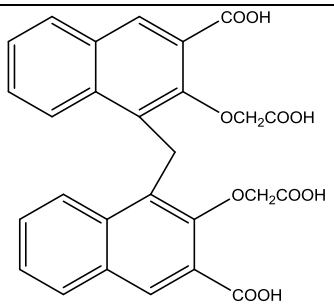
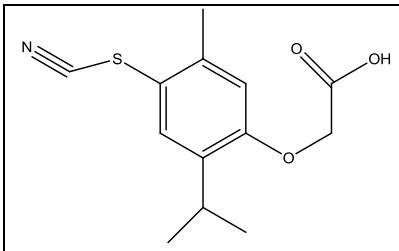
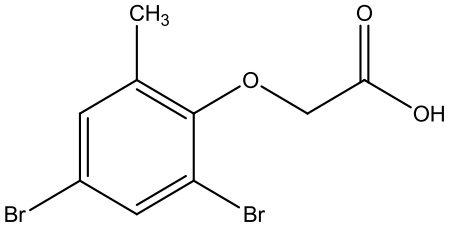
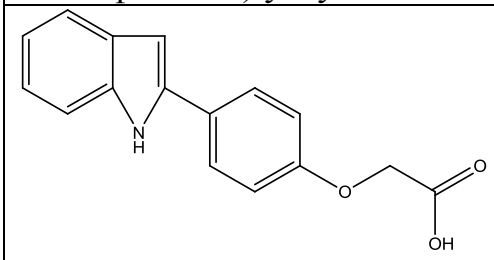
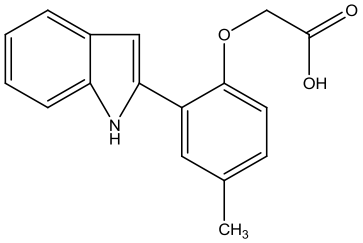
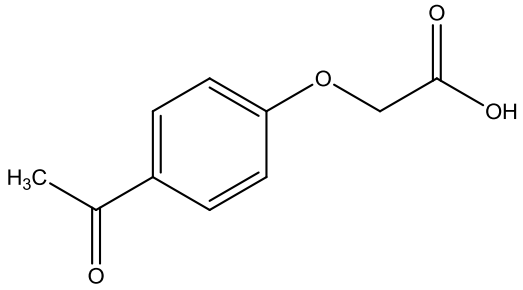
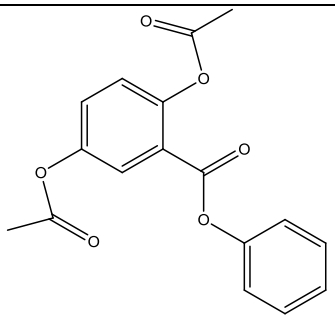
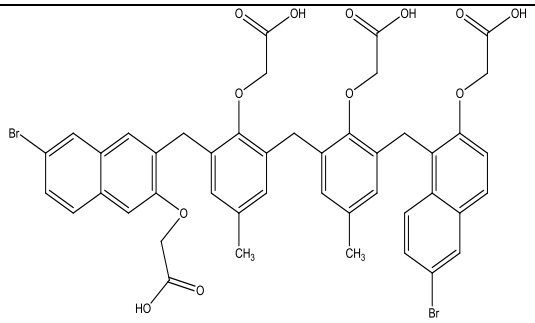
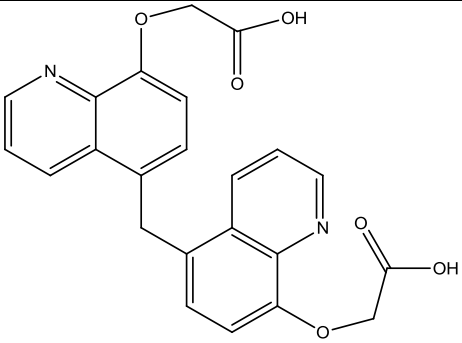


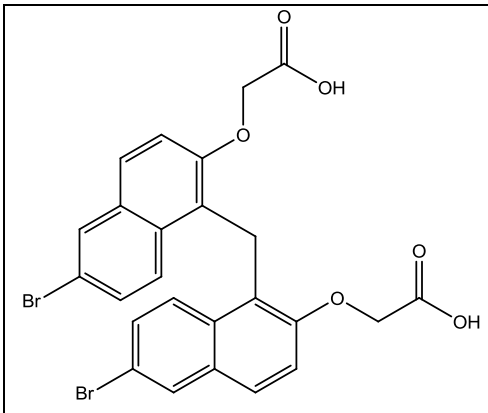
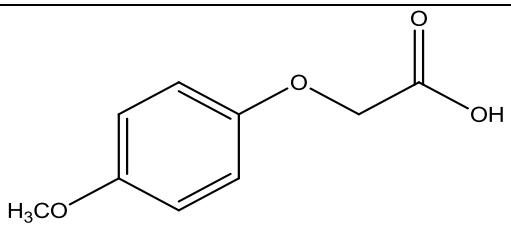
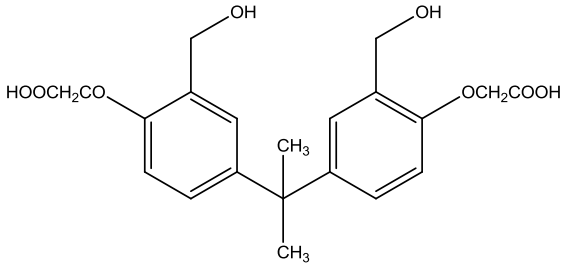
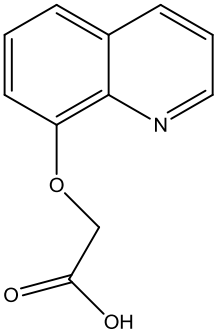
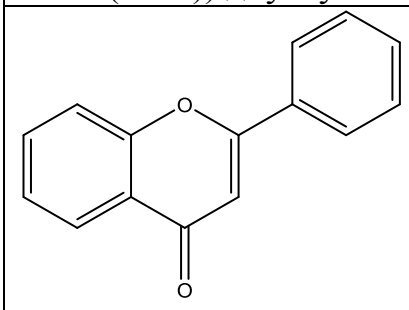
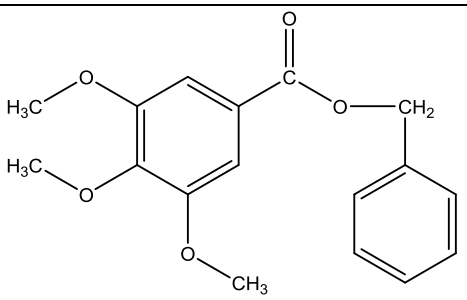
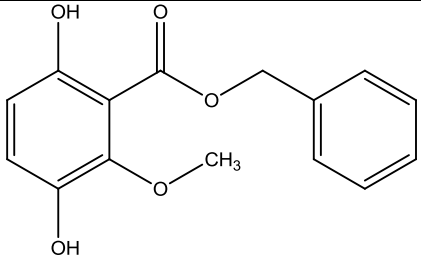
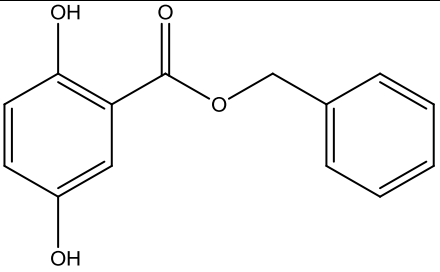
Таблица 2 – Структуры протестированных соединений

 **1.** 4-(N,N-дибензиламино)-фенокси уксусная кислота	 **2.** 2,2’-((метилен (нафталин-1,2 диил) бис (окси)) диуксусная кислота
 **3.** 2-(2-формилфенокси) уксусная кислота	 **4.** 4-адамантилфеноксиуксусная кислота
 **5.** 2,2’-(1,1’-(2-карбоксиметокси)-5-метил-1,3-фенилен) бис (метилен) бис (нафталин-2,1-диил)) бис (окси) уксусная кислота	 **6.** 2,2'-((((2- (карбоксиметокси)-5-хлор-1,3-фенилен) бис (метилен)) бис (6-бромнафталин-1,2-диил)) бис (окси)) диуксусная кислота
 **7.** 2,2’-((6,6’-метиленбис (2-гидроксиметил)-4-метокси-6,1-фенилен) бис (окси) уксусная кислота	 **8.** диэтил 2,2’-(1,1’-метиленбис (нафталин-2,1-диил) бис (окси) бис диацетат

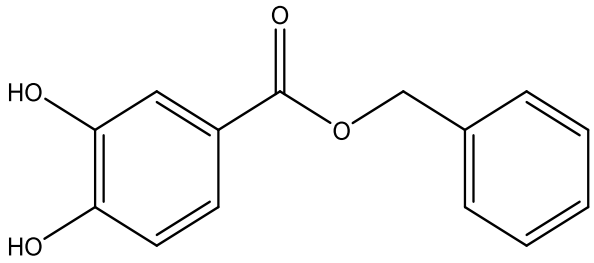
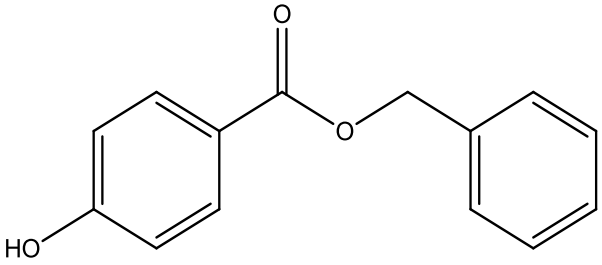
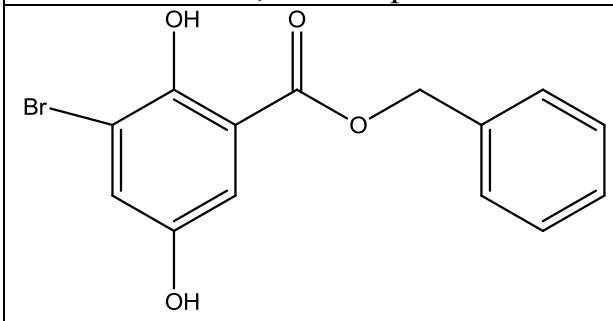
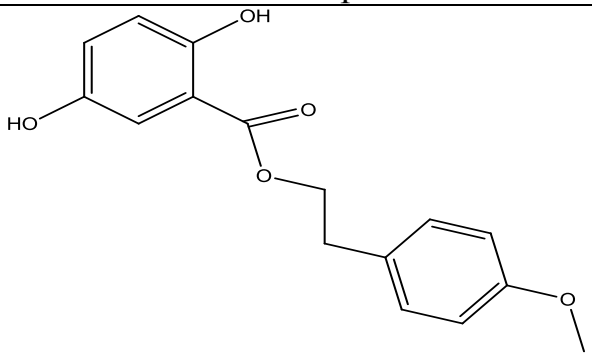
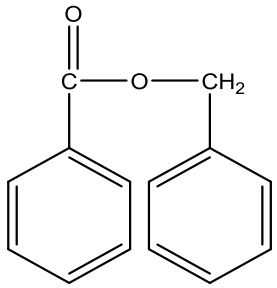
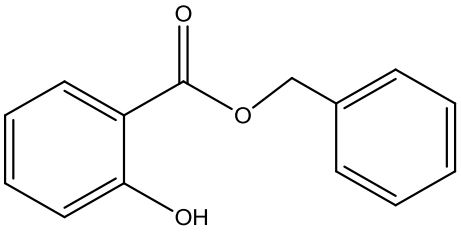
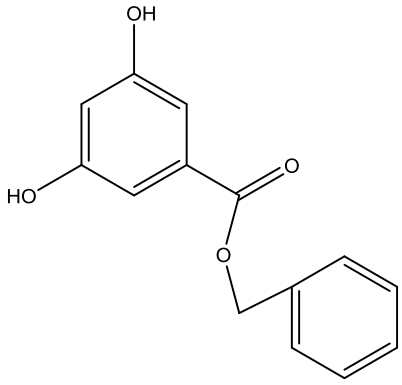
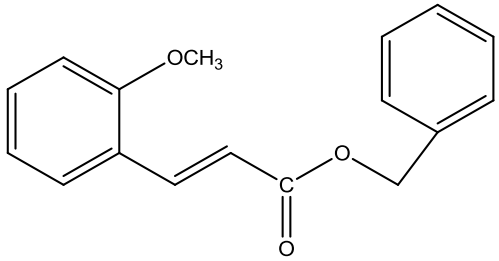
Продолжение таблицы 2

 **9.** 2-(2-изопропил-4-тиоцианато фенокси) уксусная кислота	 **10.** 2-(2,4-дибром-6-метилфенокси) уксусная кислота
 **11.** 2-(4-(1H-индол-2-ил) фенокси) уксусная кислота	 **12.** 2-(2-(1H-индол-2-ил)-4-метилфенокси) уксусная кислота
 **13.** 2-(4-ацетилфенокси) уксусная кислота	 **14.** 2-(феноксикарбонил)-1,4-фенилендиацетат
 **15.** 2-((6-бром-1-(3-(3-((7-бром-3-(карбоксиметокси) нафталин-2-ил) метил)-2-(карбоксиметокси)-5-метилбензил)-2-(карбоксиметокси)-5-метилбензил) нафталин-2-ил) окси) уксусная кислота	 **16.** 2,2 '- ((5,5'-метиленбис (хинолин-8,5-диил)) бис (окси)) диуксусная кислота

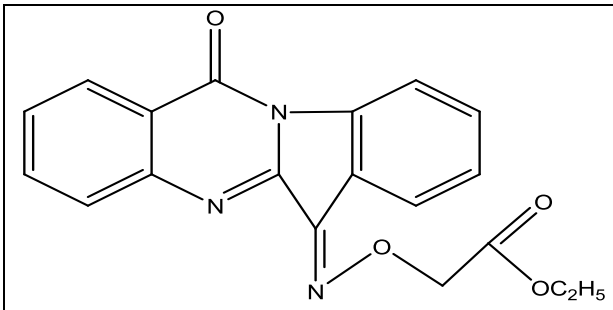
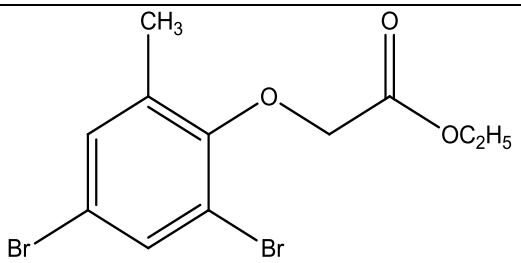
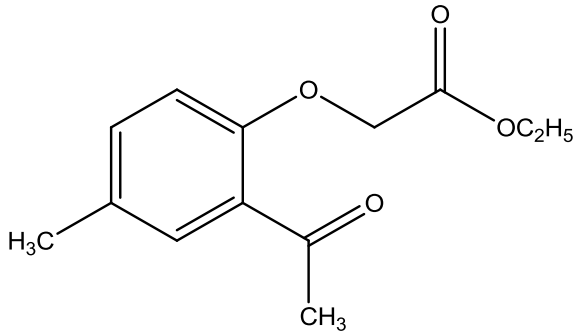
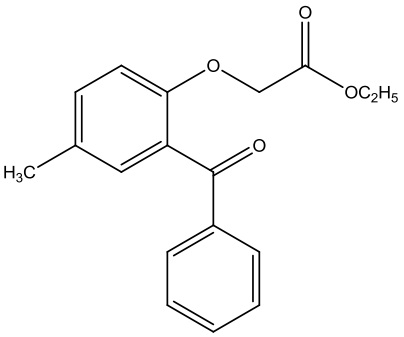
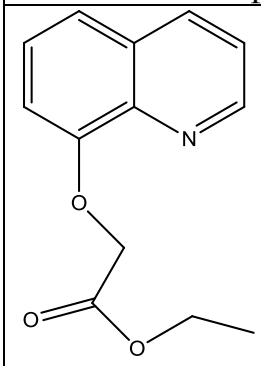
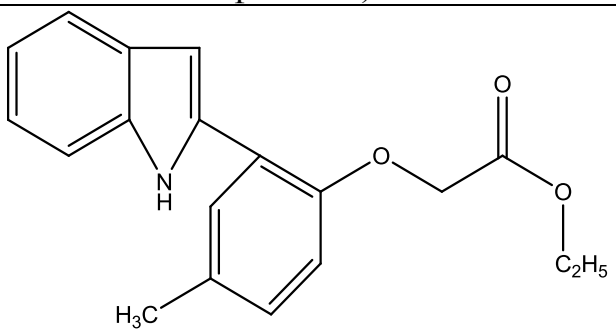
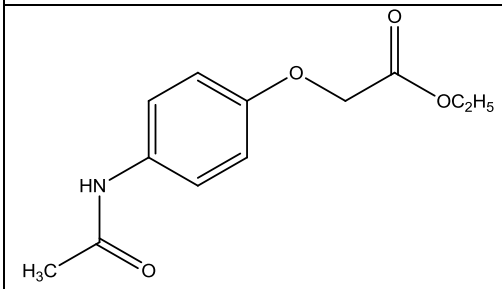
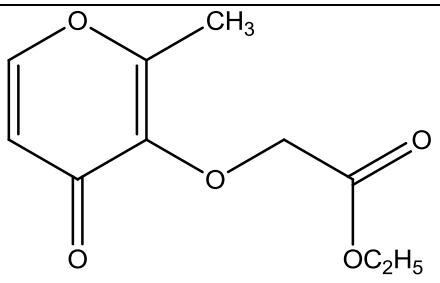
Продолжение таблицы 2

 **17.** 6,6-дибром-(2,2’-(метиленбис (нафталин-1,2-диил)) бис (окси)) диуксусная кислота	 **18.** 2-(4-метоксифенокси) уксусная кислота
 **19.** 2,2 '- ((пропан-2,2-диилбис (2-(гидроксиметил) -4,1-фенилен)) бис (окси)) диуксусная кислота	 **20.** 2- (хинолин-8-илокси) уксусная кислота
 **21.** флавон	 **22.** бензил 3,4,5-триметоксибензоат
 **23.** бензил-3,6-дигидрокси-2-метоксибензоат	 **24.** бензил-2,5-дигидроксибензоат

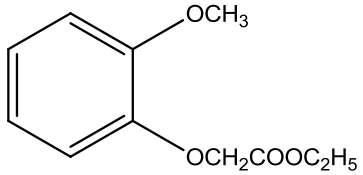
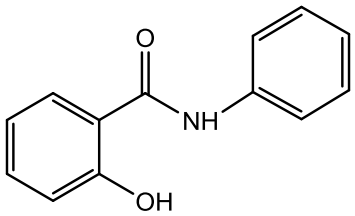
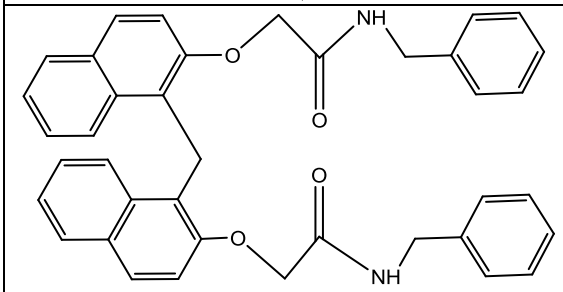
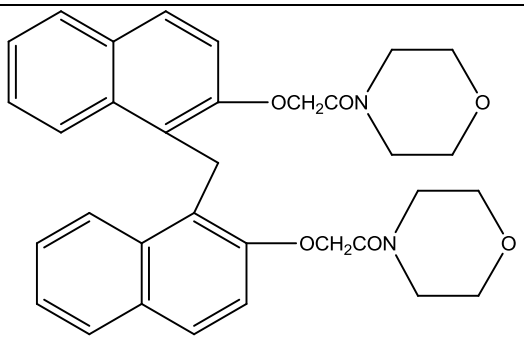
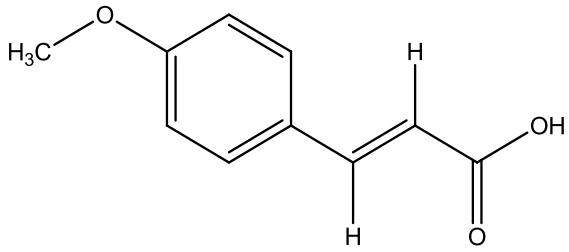
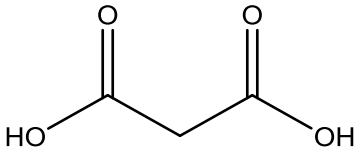
Продолжение таблицы 2

 **25.** бензил 3,4-дигидроксибензоат	 **26.** бензил 4-гидроксибензоат
 **27.** 2-((бензилокси) карбонил)-1,4-фениленбензоат	 **28.** 4-метоксифенетил-2,5-дигидроксибензоат
 **29.** бензилбензоат	 **30.** бензилсалицилат
 **31.** бензил 3,5-дигидроксибензоат	 **32.** (E)-бензил-3-(2-метоксифенил) акрилат

Продолжение таблицы 2

 **33. (**E)-этил 2-(12-оксоиндоло[2,1-b] хиназолин-6(12H)–или денаминоокси) ацетат	 **34.** метил 2-(2,4-дибром-6-метилфенокси) ацетат
 **35.** этил 2-(2-ацетил-4-метилфенокси) ацетат	 **36.** этил 2-(2-бензоил-4-метилфенокси) ацетат
 **37.** этил 2- (хинолин-8-илокси) ацетат	 **38.** этил 2-(2-(1H-индол-2-ил)-4-метилфенокси) ацетат
 **39.** этил 2- (4-ацетамидофенокси) ацетат	 **40.** этил 2 - ((2-метил-4-оксо-4H-пиран-3-ил) окси) ацетат

Продолжение таблицы 2

 **41.** этил 2- (2-метоксифенокси) ацетат	 **42.** 2-гидрокси-N-фенилбензамид
 **43.** 2,2’-(1,1’-метиленбис(нафталин-2,1-диил)) бис (окси) бис (N-бензилацетамид)	 **44.** 2,2 '- ((метиленбис (нафталин-2,1-диил)) бис (окси)) бис (1-морфолиноэтанон)
 **45.** (E)-3-(4-метоксифенил) акриловая кислота	 **46.** малоновая кислота

Методика 1. Исследование влияния тест-соединений на процесс дыхания дрожжей. Сухие дрожжи в количестве 200 мг добавляли в 10 мл воды и оставили на 15 минут для того, чтобы она разбухла (суспензия). В каждую пластиковую пробирку центрифуги «Эппендорф» (2 мл) вносили исследуемые образцы по 2-4 мкл (концентрация вещества 30 мМ в ДМСО). Затем добавляли 100 мкл полученной суспензии, 20 мкл глюкозы (10 мл/мг) или 0.4М раствора янтарной кислоты (pH=7) и 20 мкл трифенилтетразолий хлорид (ТФТХ 10 мл/мг) оставляли на 1 час 30 минут, в результате которого дрожжи окрашивались в розовый цвет в процессе дыхания. Центрифугировали 3

минуты при 14 500 об. мин. Происходит процесс осаждения дрожжей внизу пробирки. Далее добавили 250 мкл диметилсульфоксид (ДМСО) и оставили на 30 минут, для извлечения красителя из дрожжей. Затем центрифугировали 3 минут при 14 500 об. мин. В каждую лунку 96 луночного планшета вносили 200 мкл полученного раствора, и измеряли оптическую плотность при λ=490 нм на микропланшетном ридере (Приложение В).

Методика 2. Сухие дрожжи массой 200 мг добавляли в 10 мл воды и оставили на 15 минут для того, чтобы она разбухла (суспензия). В каждую лунку 96 луночного планшета вносили исследуемые образцы по 2-4 мкл (концентрация вещества 30 мМ в ДМСО). Затем добавляли 100 мкл полученной суспензии, 10 мкл ТФТХ (трифенилтетразолий хлорид 10 мл/мг) и 10 мкл глюкозы (10 мл/мг) или 10 мкл янтарной кислоты (0.4 М) (pH=7) или и оставляли на 40 минут, в результате которого дрожжи окрашивались в розовый цвет в процессе дыхания. После измеряли оптическую плотность при λ=490 нм на микропланшетном ридере.

Все эксперименты проводили в дублях повторах. В таблице 3 приведены средние значения процентного содержания глюкозы по сравнению с контролем (без добавления тест-соединений).

Глава 5 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

На сегодняшний день перспективность научного исследования определяется ни сколько масштабом открытия, оценить который на первых этапах жизненного цикла высокотехнологического и ресурсоэффективного продукта бывает затруднительно, как коммерческой ценностью разработки. Оценивание коммерческого потенциала разработки является потребным условием при поиске источников финансирования для проведения научного исследования и коммерциализации его результатов.

Коммерческая привлекательность научного исследования определяется не только превышением технических параметров над предшествующими разработками, но и насколько быстро разработчик сумеет найти ответы на такие вопросы – будет ли продукт востребован на рынке, какова будет его стоимость, чтобы удовлетворить потребителя, какова бюджет научного проекта, сколько времени потребует для выхода на рынок и т.д.

Таким образом, целью раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» является определение перспективности и успешности научно-исследовательского проекта, разработка механизма управления и сопровождения конкретных проектных решений на этапе реализации.

5.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Для анализа потребителей результатов научного исследования необходимо подвергнуть к рассмотрению целевой рынок и провести его сегментирование.

Целевой рынок – сегменты рынка, на котором в будущем будут продаваться разработки. В свою очередь, сегмент рынка – это особым образом выделенная часть рынка, группы потребителей, обладающих определенными общими признаками.

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

В настоящее время во всем мире и в Российской Федераций, в том числе в Томской области, отмечается направление развития ареала многих природно-очаговых гельминтозов. Поэтому, в нашей исследовательской работе исследуются соединений, которые обладают способностью влиять на жизненно важные системы гельминтов (описторхоз). В ходе проведение исследование были получены результаты, которые в дальнейшем могут быть использованы в производстве лекарств таких как противогельминтные и противоопухолевые.

Продукт: противогельминтные препараты

Целевой рынок: предприятия фармацевтической отрасли и медицинское учреждения.

Исходя из сегментирования, обнаружено, что основными сегментами рынка противогельминтных препаратов являются муниципальные медицинское учреждения (средние - аптеки, больницы, крупные - научно исследовательские институты), а также малые химико – фармацевтические предприятия (так как производство веществ с фармакологическими свойствами является малотоннажным) (Рисунок 13).

Размер компании	Предприятия фармацевтической отрасли и медицинские учреждения		
	ВУЗы	Мед. Учреждения	Хим-фарм предприятия
крупные			
средние			
малые			

Противогельминтный препараты

Рисунок 13 Карта сегментирования рынка

5.2 Диаграмма Исикава

Для выявления различных причинно-следственных связей был использован метод диаграмм Исикавы.

Диаграмма причины-следствия Исикавы (Cause-and-Effect-Diagram) – это графический метод анализа и формирования причинно-следственных связей, инструментальное средство для систематического определения причин проблемы и последующего графического представления.

Область применения диаграммы:

- Выявление причин возникновения проблемы;
- Анализ и структурирование процессов на предприятии;
- Оценка причинно-следственных связей.

С помощью диаграммы Исикавы были рассмотрены все факторы данной работы (Рисунок 14).

Рисунок 14 Общий вид диаграммы Исикавы для функционализации противогельминтных препаратов

5.3 Оценка готовности проекта к коммерциализации

На какой бы стадии не находилась научная разработка полезно и правильно оценить степень ее готовности к коммерциализации и выяснить уровень собственных знаний и умений для ее проведения. Для этого было заполнена специальная таблицу, которая содержит показатели о степени проработанности научного проекта с позиции коммерциализации и компетенциям разработчика научного проекта (Таблица 6).

Таблица 6 – Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

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

Продолжение таблицы 6

12.	Проработаны вопросы использования услуги инфраструктуры поддержки, получения льгот	4	4
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	3	3
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	3	2
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	5	4
	ИТОГО БАЛЛОВ	51	46

При проведении анализа по таблице, приведенной выше, по каждому показателю ставится оценка по пятибалльной шкале. При этом система измерения по каждому направлению (степень проработанности научного проекта, уровень имеющихся знаний у разработки) отличается. Так, при оценке степени проработанности научного проекта 1 балл означает не проработанность проекта, 2 балла – слабую проработанность, 3 балла – выполнено, но в качестве не уверен, 4 балла – выполнено качественно, 5 баллов – имеется положительное заключение независимого эксперта. Для оценки уровня имеющихся знаний у разработчика система баллов принимает следующий вид: 1 означает не знаком или мало знаю, 2 - в объеме теоретических знаний, 3 – знаю теорию и практические примеры применения, 4 – знаю теорию и самостоятельно выполняю, 5 – знаю теорию, выполняю и могу консультировать.

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (уровень имеющихся знаний у разработчика) определяется по формуле:

$$Б_{сум} = \sum Б_i, \qquad (2)$$

где $Б_{сум}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению;

$Б_i$ – балл по i-му показатель.

$$Б_{сум} = 46$$

Вывод: Как видно из таблицы выше, итоговый балл 46 означает то что перспектива коммерциализации данной разработки выше среднего.

5.4 Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

При коммерциализации научно-технических разработок продавец преследует вполне определенную цель, которая во многом зависит от того, куда в последующим он намерен направить полученный коммерческий эффект. При этом продвижения товара на рынок во многом зависит от правильности выбора метода коммерциализации.

Из существующих методов одним из наиболее походящих является торговля патентными лицензиями, то есть, это означает продажа разработки исследования третьим лицам, так как данный вариант является самым простым. Также с помощью организации совместных предприятий, которые работают по схеме «российское производства – зарубежное распространение».

Использование метода торговли патентными лицензиями, приведет нас к сотрудничеству с другими зарубежными странами, что увеличит, то есть повысит эффективность данного исследования и будут осуществляться технологический и научно-технический обмен и обмен опытом работы. Экономическое развитие страны и развитие международных экономических отношений происходит в результате технологического обмена.

При привлечении в страну передовых технологий, управленческого опыта, дополнительные, материальные и финансовые ресурсы, привлекать иностранный капитал в отечественную экономику, расширение экспортной базы, сокращение импорта и расширение рынков сбыта происходит в результате работы совместного предприятия.

5.5 Инициация проекта

Группа процессов инициации состоит из процессов, которые выполняются для определения нового проекта или новой фазы существующего проекта. Инициация проекта определяет изначальные цели данного проект и содержание работы, также в этом разделе определяются изначальные экономические и финансовые затраты. По этой работе также надо изначально

определить внешние и внутренние заинтересованные стороны проекта, которые будут, влияют на общий результат данного научного проекта. Для данного научного проекта тоже имеются заинтересованные группы (Таблица 7). Изначальные цели и результаты данного проекта указаны ниже (Таблица 8). Также представлена рабочая группа данного научного проекта (Таблица 9) приведены ниже.

1. Цели и результаты проекта. В этом разделе необходимо привести информацию о заинтересованных сторонах проекта, иерархии целей проекта и критериях достижения целей.

Таблица 7 – Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Научный руководитель	Разработка методик получения противогельминтных препаратов.
Магистрант	

Таблица 8 – Цели и результат проекта

Цели проекта:	Разработка методик получение противогельминтных препаратов, оценивая влияния тестируемых соединений на процесс гликолиз, процесс цикла Кребса и ингибирование эффекта Кребтри, осуществляемый бесклеточной средой Saccharomyces cerevisiae.
Ожидаемые результаты проекта:	Новые соединения, обладающие антигельминтной активностью.
Критерии приемки результата проекта:	Повторяемость методик: ТСХ и ВЭЖХ .
Требования к результату проекта:	Разработанная методика должна иметь противогельминтные препараты с широким спектром действия. Высокие выходы целевых препаратов по методике.

2. Организационная структура проекта. На данном этапе инициации научного проекта приведена вся рабочая группа данного проекта и определена роль каждого участника, а также прописаны функции каждого участника и их трудозатраты в проекте.

Таблица 9 – Рабочая группа проекта

№ п/п	Ф.И.О. место работы, должность	Функции в проекте	Основные обязанности
1	2	3	4
1	Белянин Максим Львович, к.х.н. доцент	Руководитель проекта	Осуществляет детальное планирование научного проекта; Информацию для создания и актуализации планов работ; контролирует сроки выполнения работ по проекту
2	Райымкулова Мадина Кумарбеккызы, магистр	Исполнитель по проекту	Выполняет проект
3	Подопригора Игнат Валерьевич	Консультант раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	Оказание методической помощи при работе над разделом «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» в магистерской диссертации
4	Романова Светлана Владимировна, старший преподаватель	Консультант раздела «Социальная ответственность»	Оказание методической помощи при работе над разделом «Социальная ответственность» в магистерской диссертации
5	Рыбушкина Светлана Владимировна, старший преподаватель	Консультант раздела «Иностранный язык»	Оказание методической помощи при работе над переводом из глав магистерской диссертации на иностранный язык

3. Ограничения и допущения проекта

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

Таблица 10 – Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/ допущения
3.1. Бюджет проекта	–
3.1.1. Источник финансирования	–
3.2. Сроки проекта:	11.09.2018 – 04.06.2019
3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом	04.09.2018
3.2.2. Дата завершения проекта	04.06.2019
3.3. Прочие ограничения и допущения*	Не имеются

Таким образом, нами было определены в рамках инициации проекта изначальные цели и финансовые ресурсы, заинтересованные стороны данного проекта, действия которых направленные на получение общего результата. Также мы провели анализ всех ограничительных факторов научного проекта.

5.6 Планирование управления научно-техническим проектом

5.6.1 Иерархическая структура работ проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создание ИСР структурируется и определяется содержание всего научного проекта. Определения цели работы, разработка последовательности действ и общего содержания работы требуемых для достижения определенных целей входят в процесс планирование научного проекта.

Рисунок 15 Иерархическая структура работ по проекту

5.6.2 Контрольные события проекта

В рамках данного раздела необходимо определить ключевые события проекта, определить их даты и результаты, которые должны быть получены по состоянию на эти даты. Эта информация представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	2	3	4
1	Изучение литературных источников	10.09.2018-19.10.2018	Составление литературного обзора
3	Работа над магистерской диссертацией	22.10.2018-30.04.2019	Исследование и редактирование методик
4		01.05.2019-04.06.2019	Написание магистерской диссертации
5	Защита магистерской диссертации	17.06.2019	Диплом

5.6.3 План проекта

В рамках планирования научного проекта необходимо построить календарный и сетевой график проекта. Календарный план данного научного проекта представлен в таблица 12.

Таблица 12 – Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длитель-ность, дни	Дата начала работ	Дата окончание работ	Состав участников (Ф.И.О. ответственных исполнителей)
1	Литературный обзор	25	10.09.2018	19.10.2018	Райымкулова М.К.
2	Составление методик работы	17	02.10.2018	22.10.2018	Белянин М.Л.
03	Проведение исследований по влиянию тестируемых соединений на эффект Кребтри	98	22.10.2018	12.03.2019	Райымкулова М.К.
04	Исследование свойств	46	12.03.2019	30.04.2019	Райымкулова М.К.
05	Составление отчета	35	30.04.2019	05.06.2019	Райымкулова М.К. Белянин М.Л.
06	Защита работы	1	17.06.2019	17.06.2019	Райымкулова М.К.
Итого:		222			

Таблица 13 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме

Код работы (из ИСР)	Вид работ	Исполнители	$T_к$, кал., дн.	Продолжительность выполнения работ																													
				сентябрь		октябрь			ноябрь			декабрь			январь			февраль			март			Апрель			май			июнь				
				2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2		
1	Литературный обзор	Инженер (магистрант)	25																														
2	Составление методик работы	Руководитель	17																														
3	Проведение исследований по влиянию тестируемых соединений на эффект Кребтри	Инженер (магистрант)	98																														
4	Исследование свойств	Инженер (магистрант)	46																														
5	Составление отчета	Руководитель, инженер (магистрант)	35																														
6	Защита работы	Инженер (магистрант)	1																														
i			222																														

5.6.4 Бюджет научного исследования

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

Сырье, материалы, покупные изделия (за вычетом отходов)

В этом разделе включаются затраты на приобретение всех видов материалов, комплектующих изделий и полуфабрикатов, необходимых для выполнения работы. Таблица ниже показывают, сколько денег затрачено на научные исследования: приведены цены сырья, оборудования, заработная плата и другие расходы.

Таблица 14 – Сырье и материалы

Наименование	Марка, размер	Количество	Цена за ед., руб.	Сумма, руб
Сырье и реагенты				
Диметилсульфоксид	67-68-5	0,1л	560	560
Фосфатный буфер	-	9,2	54,5	5,9
Глюкоза	77938-63-7	100	125	125
АТФ	-	50	2200	2200
НАД	-	25	1300	1300
Трифенилтетразолий хлорид	-	50	1223	1123
Янтарная кислота	110-15-6	50	30	30
Малоновая кислота	141-82-2	50	1360	68
Посуда химическая				
Колба круглодонная	ГОСТ 23932-90	3	220	660
Прямой холодильник	ХСН-300-29/32	1	512	512
Мерные стаканы	Н-1-600	6	84	504
Палочки стеклянные	ГОСТ 27460-87	3	13	39
Колба плоскодонная	ГОСТ 25336-82	3	65	195
Пипетка мерная, 0,1 мл	ГОСТ 21400-75	1	171,9	171,9

Продолжение таблицы 14

Пипетка мерная, 1 мл	ГОСТ 21400-75	3	54	162
Пипетка мерная, 10 мл	ГОСТ 29228-91	3	46	138
Прочее				
Средство, моющее д/посуды	Пемолюкс	1	50	50
Халат белый х/б	-	1	650	650
Перчатки латексные	-	20	22	440
Оформление документации				
Бумага для офисной техники	Svetocopy	1	130	130
Ручка шариковая	Pilot	2	30	60
Всего за материалы				**9123,8**
Транспортно-заготовительные расходы (3-5%)				**456,19**
Итого по статье См				**9579,99**

Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ.

В данную статью включают все затраты, связанные с приобретением специального оборудования, необходимых для проведения научного работ по конкретной теме. Определение стоимости спецоборудования производится под действующим прейскурантам. Стоимость оборудования, которые используется при выполнении конкретного научного проекта и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в виде амортизационных отчислений (Таблица 15).

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

№ п/п	Наименование	Цена единицы оборудования, $К_{об.}$, руб.	Время использования, $Т_{об.}$, дни	Норма амортизации, $Н_{ам}$, %	Сумма амортизационных отчислений, $Е_{ам.}$, руб.
1	Весы аналитические HTR-120CEShinko	40120	5	8,8	9,67
2	Весы лабораторные	44200	90	8,8	9,67

Продолжение таблицы 15

3	Центрифуга	98430	90	9,5	1640,5
4	Фотометр-iMark MircoplateReader	177500	90	10	2958,33
5	Электроплитка с магнитной мешалкой HP-20D-Unit	18500	90	10,4	474,4
	Итого				**5092,57**

Основная заработная плата. В данном разделе включены основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, которые принимают участие в выполнении работы по магистерской теме. Расходы по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда. В состав основной заработной платы включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы (размер определяется Положением об оплате труда).

Месячный должностной оклад работника:

$$З_м = З_б \cdot (k_{пр} + k_д) \cdot k_{р,} \quad (3)$$

где $З_б$ – базовый оклад, руб.;

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

$k_д$ – коэффициент доплат и надбавок;

$k_р$ – районный коэффициент, равный 1,3

Базовый оклад $З_б$ такого руководителя как д.х.н. доцент, составляет 31000 руб. Рассчитываем месячный должностной оклад научного руководителя:

$$З_м = 31000 \cdot 1,3 = 40300 \text{ руб.}$$

Среднедневная заработная плата руководителя:

$$З_{дн.} = \frac{40300 \cdot 10,4}{251} = 1669,8 \text{ руб.}$$

Базовый оклад $З_б$ магистранта, составляет 1906 руб. Рассчитываем месячный должностной оклад инженера:

$$З_м = 1960 \cdot 1{,}3 = 2477{,}8 \text{ руб.}$$

Среднедневная заработная плата инженера:

$$З_{дн.} = \frac{2477{,}8 \cdot 10{,}4}{188} = 137 \text{ руб.}$$

Таблица 16 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Магистрант
Число дней (календарное)	365	365
Число дней (нерабочих) - выходные - праздничные дни	 52 14	 52 14
Потери рабочего времени - отпуск или невыходы по болезни	48	48
Действительный годовой фонд рабочего времени	251	251
Действительное рабочее время реализуемого проекта	188	188

Таблица 17 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	$З_б$, руб.	$k_{пр}$	$k_д$	$k_р$	$З_м$, руб.	$F_д$, раб.дн.	$З_{дн}$, руб.	$Т_р$, раб.дн.	$З_{осн}$, руб.
Руководитель	31000	0	1,3	403000	251	1996,8	1669,8	44	73471
Инженер (магистрант)	1960	0	1,3	2477,8	251	125,9	125,9	170	21403
Итого									94874

Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнение темы (Таблица 18).

$$З_{доп} = k_{доп} \cdot З_{осн}, \quad (4)$$

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

$k_{доп}$ – коэффициент дополнительной зарплаты;

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

Таблица 18 – Дополнительная заработная плата

Заработная плата	Руководитель	Инженер (магистрант)
Основная зарплата	73471	21403
Дополнительная зарплата	8816,5	2568,4

5.6.5 Накладные расходы

В эту статью включается затраты на управление и хозяйственное обслуживание, которые могут быть отнесены непосредственно на конкретную тему.

А) Расход электроэнергии для персонального компьютера равен 0,16 кВт/ч.

Длительность использование: 4 месяца (компьютер работал в среднем 24 дня в месяц по 6 часов).

Е = 4 мес. * 24 дня * 6 часов * 0,16 = 92,16 кВт

Б) Освещение (4 лампы по 100 Вт)

7 месяцев * 24 дня * 8 часов

Е = (7*24*8)*0,4 = 537,6 кВт

Основная сумма затрат на электроэнергию составляет, согласно действующему тарифу (5,10 руб. за 1 кВт/ч).

$С_{эл}$ = (92,16 + 537,6) * 5,10 = 3214,02 руб.

В) затраты на водоснабжение

Тариф на водоснабжение – 34,14 р на $м^3$. Примерный расход воды за время исследований составляет – 30 $м^3$.

Затраты на водоснабжение за весь период исследования составляет 1024,2 руб.

Вода использовалась для мытья химической посуды, так же для нагревания.

Итого расходы:

$С_1 = С_в + С_{эл}$ = 1024,2 + 3214,02 = 4238,22 руб.

Отчисления на специальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{внеб} = k_{внеб} \cdot (З_{осн} + З_{доп}), \quad (5)$$

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

Отчисления на социальные нужды составляет 28 %.

$C_{внеб} = 0,271 \cdot (94874 + 11384,9) = 29752,49$ руб.

Таблица 19 – Бюджет научного исследования

Наименование статьи	Сума, руб.
1. Материальные затраты НИТ	9123,8
2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ.	5092,57
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	94874
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	11384,9
5. Отчисления во внебюджетные фонды	29752,49
6. Затраты на научные и производственные материалы	-
7. Контрагентские расходы	6100
8. Накладные расходы	60497,43
Итого:	216825,19

5.6.6 Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределенные события, которые могут возникнуть в проекте и вызвать последствия, которые повлекут за собой нежелательные эффекты. Полностью избежать риска практически невозможно, но снизить их угрозу можно. Возможные риски приведены в таблице 20.

Таблица 20 – Возможные риски проекта

№	Риск	Вероятность наступления (1-5)	Выявление риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска
1	Низкий выход целевого продукта	4	5	высокий	Точное следования методики
2	Образование большого количества побочных продуктов	3	5	высокий	Точное следования методики

5.6.7 Определение ресурсной эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

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

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{ф}}^{\text{р}} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{max}}, \qquad (6)$$

где $I_{\text{ф}}^{\text{р}}$ – интегральный финансовый показатель разработки;

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

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

Получения величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в разах (значение больше единицы), либо соответствующее численное

удешевление стоимости разработки в разах (значение меньше единицы, но показатель больше ноля).

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

$$I_{pt} = \sum a_i \cdot b_i, \qquad (7)$$

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

a_i – весовой коэффициент i-го варианта исполнения разработки;

b_i – бальная оценка i-го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания:

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности приведен в форме таблицы (Таблица 21).

Таблица 21 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования Критерии	Весовой коэффициент параметра	Исп.	Аналог 1	Аналог 2
1. Способствует росту производительности труда	0,1	4	5	5
2. Удобство в эксплуатации	0,15	4	5	5
3. Энергосбережение	0,15	4	4	4
4. Надежность	0,20	5	5	5
5. Воспроизводимость	0,25	4	4	5
6. Материалоемкость	0,15	4	4	4
Итого	1	4,2	4,45	4,7

Интегральный показатель эффективности вариантов исполнения разработки ($I_{исп1}$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{исп1} = \frac{I_{р-исп1}}{I_{финр}^{исп1}}, \quad I_{исп2} = \frac{I_{р-исп2}}{I_{финр}^{исп2}}, \qquad (8)$$

Сравнение интегрального показателя эффективности вариантов исполнения разработки позволит определить сравнительную эффективность проекта и выбрать наиболее целесообразный вариант из предложенных (Таблица 22). Сравнительная эффективность проекта ($Э_{ср.}$).

$$Э_{ср} = \frac{I_{исп1}}{I_{исп2}}, \quad (9)$$

Таблица 22 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Исп.	Аналог 1	Аналог 2
1	2	3	4	5
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,999	0,999	1,000
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	4,2	4,45	4,7
3	Интегральный показатель эффективности	4,2	4,45	4,7
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	0,94	0,95	1

Таким образом, сравнение значений интегральных показателей эффективности показало, что все варианты исполнения являются равнозначными с точки зрения финансовой и ресурсной эффективности.

Список публикаций студента

1. Райымкулова М. К., Белянин М.Л. Разработка методики тестирования биологически активных соединений на модели пекарских дрожжей. XIX Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л. П. Кулёва. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2018. – С. 224-226.
2. Райымкулова М. К., Белянин М.Л. Влияние сложных эфиров фенолкарбоновых кислот на дыхание пекарских дрожжей. XX Международной научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке» имени профессора Л. П. Кулёва. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2019. – С. 325-326.
3. Джамбаев М.Т., Барановская Н.В., Липихина А.В., Боев В.В., Райымкулова М.К., Апсаликова З.С., Судыко А.Ф. Индикаторы ядерного техногенеза на примере территории, прилегающей к бывшему семипалатинскому испытательному полигону. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов, 2019. – Т. 330. – № 4. – С. 217-229.