

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К.И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

Туланова Нигара Кудратжановна

«Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве
антибиотиков»

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Специальность 5В070100 – Биотехнология

Алматы 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Казахский национальный исследовательский технический университет имени
К.И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им К. Турысова

Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

Туланова Нигара Кудратжановна

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ

Зав.кафедрой ХиБИ

Доктор PhD

Амитова А.А.

«30» 05 2022 г.



ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

На тему: «Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при
производстве антибиотиков»

по специальности 5В070100 – Биотехнология

Выполнила

Туланова Н.К.

Научный руководитель

кандидат с.-х наук, доцент, ассоц.
профессор

Джамалова Г.А.

«30» 05 2022 г.

Рецензент

Кандидат б-х наук,
профессор кафедры биотехнологии
факультета биологии и биотехнологии
КазНУ им Аль-Фараби

Атамбаева Ш.А.

«30» 05 2022 г.

Научный консультант

магистр техники и технологии,
тьютор

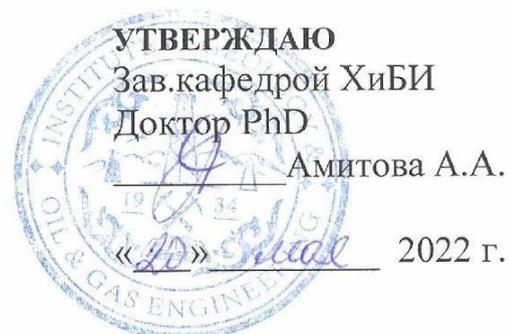
Сериков Т.А.

«30» 05 2022 г.

Алматы 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Казахский национальный исследовательский технический университет имени
К.И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им К.Турысова
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»
5В070100 – Биотехнология



ЗАДАНИЕ
на выполнение дипломной работы

Обучающейся Тулановой Нигаре Кудратжановне

Тема: «Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков»

Утверждена приказом Ректора Университета №–489 от «24» декабря 2021 г.

Срок сдачи законченной работы "12" мая 2022г.

Исходные данные к дипломной работе получены на основе экспериментальных расчетных и лабораторных работ.

Краткое содержание дипломной работы:

- а) Введение. Аналитический обзор литературы
- б) Материал и методика исследований
- в) Результаты исследований

Перечень графического материала: В работе представлены 13 графиков.
Рекомендуемая основная литература состоит из 35 наименований.

ГРАФИК

подготовки дипломной работы (проекта)

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Введение. Литературный обзор	Март	Выполнено
Материал и методика исследований	Март	Выполнено
Результаты исследований	Апрель	Выполнено
Заключение и Выводы	Апрель	Выполнено

Подписи

консультантов и нормоконтролера на законченный дипломный проект с указанием относящихся к ним разделов проекта

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф.(уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Дипломная работа	Джамалова Г.А., к.с.-х.н., доцент	03.06.2022	
Нормоконтролер	Джамалова Г.А., к.с.-х.н., доцент	03.06.2022	
Материалы и методика исследований	Сериков Т.А., магистр техники и технологии, тьютор	31.05.2022	

Научный руководитель _____



Джамалова Г.А.

Задание приняла к исполнению обучающаяся _____



Туланова Н.К.

Дата _____

"30" 05 2022г.

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа на тему «Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков» включает 30 страниц, 16 рисунков, 9 таблиц, 13 графиков. Библиографический указатель включает 35 научных источников.

Цель. Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков.

Задачи:

1 Изучение методом теоретического исследования биологических, культуральных и технологических свойств актиномицетов, продуцирующих антибиотики.

2 Изучение методами математического моделирования оптимальных культуральных условий для актиномицетов, продуцирующие антибиотики.

3 Изучение культуральных свойств актиномицетов, выращенных в твёрдых и жидких питательных средах.

Методом математического моделирования определены оптимальные условия для улучшения культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков. Для этого методом теоретического исследования изучены биологические, культуральные и технологические свойства актиномицетов, продуцирующих антибиотики. Далее методами математического моделирования определены оптимальные культуральные условия для актиномицетов, продуцирующие антибиотики.

Ключевые слова: актиномицеты, антибиотики, культуральные свойства, питательная среда, прирост биомассы.

АНДАТПА

«Антибиотиктер өндірісіндегі актиномицеттердің культуралық қасиеттерін оңтайландыру» тақырыбындағы дипломдық жұмысқа 30 бет, 16 сурет, 9 кесте, 13 графика кіреді. Библиографиялық көрсеткіш 35 ғылыми дереккөзден тұрады.

Мақсаты. Антибиотиктер өндірісіндегі актиномицеттердің культуралық қасиеттерін оңтайландыру.

Міндеттері:

1 Антибиотиктерді шығаратын актиномицеттердің биологиялық, культуралық және технологиялық қасиеттерін теориялық зерттеу әдісімен зерттеу.

2 Антибиотиктерді шығаратын актиномицеттер үшін оңтайлы мәдени жағдайларды математикалық модельдеу әдістерімен зерттеу.

3 Қатты және сұйық қоректік ортада өсірілген актиномицеттердің культуралық қасиеттерін зерттеу.

Математикалық модельдеу әдісімен антибиотиктерді өндіру кезінде актиномицеттердің культуралық қасиеттерін жақсарту үшін оңтайлы жағдайлар анықталды. Ол үшін теориялық зерттеу әдісі антибиотиктер шығаратын актиномицеттердің биологиялық, культуралық және технологиялық қасиеттерін зерттейді. Әрі қарай, математикалық модельдеу әдістері антибиотиктерді шығаратын актиномицеттер үшін оңтайлы мәдени жағдайларды анықтайды.

Түйінді сөздер: актиномицеттер, антибиотиктер, культуралық қасиеттер, қоректік орта, биомассаның өсуі.

ANNOTATION

The thesis on the topic "Optimization of the cultural properties of actinomycetes in the production of antibiotics" includes 30 pages, 16 figures, 9 tables, 13 graphs. The bibliographic index includes 35 scientific sources.

Goal. Optimization of the cultural properties of actinomycetes in the production of antibiotics.

Tasks:

1 Study by the method of theoretical research of biological, cultural and technological properties of actinomycetes producing antibiotics.

2 Study by mathematical modeling methods of optimal cultural conditions for actinomycetes producing antibiotics.

3 Study of the cultural properties of actinomycetes grown in solid and liquid nutrient mediums.

The optimal conditions for improving the cultural properties of actinomycetes in the production of antibiotics have been determined by mathematical modeling. For this purpose, the biological, cultural and technological properties of actinomycetes producing antibiotics were studied by the method of theoretical research. Further, the optimal cultural conditions for actinomycetes producing antibiotics were determined by mathematical modeling methods.

Keywords: actinomycetes, antibiotics, cultural properties.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	9
1 Аналитический обзор литературы	10
1.1 Биологические свойства актиномицетов	10
1.2 Культуральные свойства технологически значимых для фармацевтической промышленности актиномицетов, производящих антибиотики	14
1.3 Биотехнологические свойства актиномицетов, предназначенных для производства антибиотиков	15
2 Объект, предмет, материалы и методика исследования	17
2.1 Объект и предмет исследования	17
2.2 Материалы исследования	17
2.3 Методика исследования	18
3 Результаты исследования	20
3.1 Оптимизация культуральных свойств актиномицетов методом математического планирования	20
3.2 Культуральные свойства актиномицетов	28
Заключение	31
Список использованной литературы	32

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Актиномицеты, как продуценты широкого спектра полезных продуктов, в частности, антибиотиков, обнаружены во многих экосистемах нашей планеты. Известно, что только актиномицеты рода *Streptomyces* производят примерно 80 % антибиотиков. Актуальность выбранной темы определяется тем, что расчетные исследования позволят с высоко вероятной достоверностью спрогнозировать методом математического планирования эффективность производства антибиотиков и необходимость осуществления корректирующих действий для исправления и улучшения технологических условий производства. К корректирующим действиям можно отнести различные работы технологического характера – это и улучшение состава питательной среды, технологического подхода, режима культивирования и многое другое с целью установления оптимальных физико-химических условий для повышения культуральных и производственных свойств у производственных штаммов актиномицетов.

Цель. Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков.

Задачи:

1 Изучение методом теоретического исследования биологических, культуральных и технологических свойств актиномицетов, продуцирующих антибиотики.

2 Изучение методами математического моделирования оптимальных культуральных условий для актиномицетов, продуцирующие антибиотики.

3 Изучение культуральных свойств микроорганизмов, выращенных на твердой и жидкой питательной среде.

Расчетные исследования были направлены на математическое прогнозирование оптимальных условий для улучшения культуральных свойств с целью обеспечения наибольшего прироста биомассы при производстве антибиотиков в условиях научно-производственной лаборатории.

Научная значимость. Результаты дипломной работы, полученные от теоретических методов исследования, могут быть использованы для разработки лекционных занятий по теме «Биотехнология производства антибиотиков» дисциплины «Фармацевтическая биотехнология».

Практическая значимость. Результаты дипломной работы, полученные от расчетных методов исследования, послужат основой для освоения метода математического моделирования по теме «Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков» дисциплины «Фармацевтическая биотехнология».

Дипломная работа на тему «Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков» включает 30 страниц, 16 рисунков, 9 таблиц, 13 графиков. Библиографический указатель включает 35 научных источников.

1 Аналитический обзор литературы

1.1 Биологические свойства актиномицетов

1.1.1 Экология актиномицетов

Актиномицеты представляют собой гетерогенную группу грамположительных бактерий с высоким содержанием гуанина (G) и цитозина (C) в их ДНК [1], из которых более 55% [2], характеризуются субстратным и воздушным ростом мицелия, где последнее образуется из нитевидной сети, в связи с чем актиномицеты являются нитчатыми актинобактериями, имеющие похожие свойства как с бактериями, так и с грибами, у которых наблюдается рост мицелия.

Однако сравнение с грибами является лишь поверхностным: как и у всех бактерий, клетки актиномицетов тонкие, с хромосомой, организованной в виде прокариотического нуклеоида (отсутствие ядра) и клеточной стенки пептидогликана (отсутствие хитина и целлюлозы); кроме того, клетки чувствительны к антибактериальным агентам [3].

Актиномицеты обитают в почве, водоемах, воздухе, а патогенные штаммы – в организме растений, животных и человека [4]. Установлено, что только 10% актиномицетов было выделено из природы [5].

Актиномицеты являются важными обитателями ризосферы многих растений, где они усиливают рост растений и защищают корни растений от нападения фитопатогенов [6]. Бактерии *Frankia* являются мицеллообразующими актиномицетами, которые встречаются в качестве азотфиксирующих симбионтов в корневых клубеньках покрытосеменных видов растений [7].

Гиперсальные среды обитания известны как типичные экстремальные среды, которые включают соленые озера, соленые почвы и соленые озера. Примерами родов актиномицетов, выделенных из гиперсальных почв и проявляющих противогрибковую активность в отношении *Fusarium solani*, *Aspergillus nigeru*, *Cryptococcus sp.*, были *Streptomyces alboflavus*, *Nocardia sp.*, *Micromonospora sp.* и *Streptomyces griseoflavus* [8].

Актиномицеты образуются в необычных морских условиях, например в морских глубоководных газогидратных резервуарах и органических агрегатах, где они являются основными компонентами микробных сообществ. Морские актиномицеты являются очень важными микроорганизмами из-за их значительной роли как в биологических, так и в биотехнологических приложениях. Существует 83 вида актиномицетов, принадлежащих к 28 родам, которые были выделены из морских местообитаний, и большинство из них являются новыми для науки [8].

1.1.2 Морфология актиномицетов

Актиномицеты окрашиваются по Граму положительно, приобретая фиолетовый цвет, что означает о наличии у них кислотоустойчивой клеточной

стенки. Диаметр нитей у стрептомицетов колеблется от 0,2 до 2 мкм. Воздушная часть мицелия, которая образует некоторое количество спор, позволяет интенсивно размножаться актиномицетам.

Вегетативный таллус *Actinomycetes* состоит из мицелия, из обильно ветвящихся гифов, терминальные растущие части которых плотно заполнены протоплазмой. К центру таллуса вакуоли увеличиваются в размерах и могут быть связаны с наличием метакроматических гранул, последние не имеют ничего общего с бактериальными эндоспорами или "микрококками", за которые их принимали ранние наблюдатели. Вегетативный мицелий достигает протяженности, несравнимо большей, чем ветвящиеся фигуры, зарегистрированные для бактерий кислотоустойчивой группы, а гифы не имеют однородности в диаметре, характерной для шизомицетов. Воздушный мицелий, образующийся на подходящих субстратах у большинства видов, встречается обычно в виде мата дискретных плодоношений; но у других видов эти плодоношения часто объединяются, образуя многочисленные и своеобразные прямостоячие изариоидные спородохии [9]. Цитологическая структура *Actinomycetes* в равной степени лишена бактериальных характеристик. Ветви, образующие периферию активно растущей оболочки, или молодые спорогенные ветви, прикрепленные с интервалами к поверхностному мицелию, заполнены плотной протоплазмой, которая с помощью гематоксилина приобретает глубокое однородное окрашивание [9].

Мицелиальную фрагментацию можно рассматривать как особую форму вегетативного размножения. Однако актинобактерии, ведущие преимущественно мицелиальный образ жизни, обычно размножаются, образуя бесполое споры.

Актинобактерии демонстрируют большое разнообразие морфологий, различающихся в основном наличием или отсутствием субстратного мицелия или воздушного мицелия, цветом мицелия, продукцией диффундирующих меланоидных пигментов, а также структурой и внешним видом их спор [10] (рисунок 1).

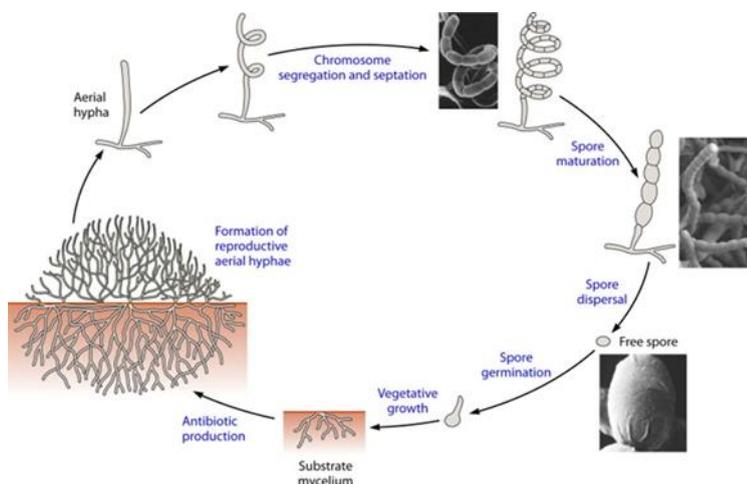


Рисунок 1 – Схематическое изображение жизненного цикла спорулирующих актиномицетов [10]

Количество спор в споровой цепи широко варьируется от рода к роду. Роды *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* и *Promicro-monospora* образуют изолированные споры, тогда как *Microbispora* образует споры продольными парами. Представители родов *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya* и некоторые *Nocardia spp.* имеют короткие цепочки спор, в то время как представители родов *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* и некоторые виды нокардии образуют очень длинные цепочки до 100 спор. Напротив, виды *Frankia* производят спорангии, которые, по сути представляют собой мешочки со спорами. Споровые цепи стрептомицетов можно разделить на прямые или извилистые (*Rectus-Flexibilis*), открытые петли (*Relinaculam-Apertum*), открытые или закрытые спирали (*spira*) или мутовчатые [11].

1.1.3 Генетика, молекулярная биология с основами генной инженерии актиномицетов

Многие выделяют внимание к актиномицетам главным образом из-за их биосинтетических побочных продуктов вторичных метаболитов [12], включая противомикробные препараты природного происхождения (например, β -лактамы, тетрациклины, рифамицины, макролиды, аминогликозиды и гликопептиды) [13]. Используемые в настоящее время стратегии генной инженерии для активации экспрессии BGC и соответствующие соединения у актиномицетов включают множественные копии форм BGC или функции, ограничивающие экспрессию, экспрессию генов-активаторов, делецию генов, кодирующие репрессоры BGC, рефакторинг BGC, случаи замены или модификации нативных регуляторных элементов (например, промоторов) и/или экспрессии BGC в оптимизированных (например, минимизированных по гену, оптимизированных по пропагандам), нативных или гетерологичных хозяевах [14].

Стратегии сборки и клонирования ДНК являются незаменимыми методами в области синтетической биологии. Клонирование последовательностей актиномицетов особенно сложно из-за высокого содержания GC в геномах [15]. Однако за последние 5 лет были разработаны более простые и точные инструменты клонирования и сборки биологических структур. iCatch является усовершенствованием, предложенным в 2014 году для защиты iBrick [16].

iCatch – это в основном обновленная версия точного «отлова» BGC для использования и сборки с использованием ранее представленного метода iBrick. С помощью этого метода был успешно получен актинородин (ACT) BGC из *S. coelicolor* с эффективностью 95,8% правильных клонов и гетерологически экспрессированный в быстрорастущей термофильной культуре штаммов *Streptomyces* sp. Кроме того, полученный кластер ACT был дополнен другими компонентами iBrick, что позволяет использовать их в дальнейшем для других исследований [17].

Клонирование прямого пути (DiPaC) осуществляет сборку полных путей биосинтеза путем покрытия полных BGC полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с длинным ампликоном, а введение гомологичных выступающих нуклеотидов делает возможной последующую сборку ДНК HiFi *in vitro*, такую как сборка Гибсона. Вместо сборки ДНК HiFi также может быть использовано независимое от последовательности и лигирования клонирование (SLIC) [18], которое требует меньше времени, поскольку концевые гомологичные последовательности фрагментов отжигаются *in vitro*, а сшивание пробелов происходит *in vivo* после трансформации внутри клетки *E. coli* [19].

Введение структур для генетических операций с актиномицетами требует надежных носителей и методов проверки переноса и внутриклеточного

исследования введенного материала. Наиболее часто используемые носители для генной инженерии актиномицетов являются репликативными и интегративными продуктами [20].

1.1.4 Физиология и биохимия актиномицетов

Ферментативный аппарат актиномицетов способен разрушать и образовывать сложные органические вещества, например, культуры, имеющие хитиназу, разлагают хитин; кератиназу - кератин, а липаза - липиды и жироподобные вещества. Мезофильные, развивающиеся в пределах от 25 до 30 °С, и термофильные, растущие в пределах от 45 до 60 °С, актинобактерии, встречаются, соответственно, часто и реже. Актиномицеты культивируются в лабораториях на различных субстратах - на жидких и твердых питательных средах [21].

1.2 Культуральные свойства технологически значимых для фармацевтической промышленности актиномицетов, продуцирующих антибиотики

1.2.1 Питательные среды, предназначенные для культивирования актиномицетов

Условия для культивирования актиномицетов [22, 23]:

1) применяемые среды:

а) соево-глюкозная, содержащая:

соевую муку – 1,5%,

глюкозу – 4%,

карбонат кальция – 0,2%,

сульфат натрия – 0,05%,

хлорид кальция – 0,2%,

хлористый натрий – 0,25%;

б) соево-глицериновая, содержащая:

соевую муку – 1,5%,

глицерин – 3%,

карбонат кальция – 0,3%,

хлористый натрий – 0,3%.

2) подбор, в зависимости от вида штамма, питательных сред для продуцентов антибиотиков;

3) для интенсивного прироста необходимо обеспечивать для штаммов азотное питание, наличие неорганических компонентов (макро- и микроэлементов) и источников углерода (часто крахмал, глицерин, мальтоза, сахароза, этанол, реже - уксусная, молочная, пировиноградная кислоты), факторов роста (аминокислоты, витамины, пурины и пиримидины);

4) оптимальные для культивирования:

- температура – от 28 до 35 ° С,

- время 6-7 суток.

1.3 Биотехнологические свойства актиномицетов, предназначенных для производства антибиотиков

1.3.1 Антибиотики: определение, требования, предъявляемые к антибиотикам

Антибиотик – химическое вещество, вырабатываемое живым организмом, обычно микроорганизмом, которое вредно для других микроорганизмов. Антибиотики обычно производятся почвенными микроорганизмами и, вероятно, представляют собой средство, с помощью которого организмы в сложной среде, такой как почва, контролируют рост конкурирующих микроорганизмов [24].

Принцип, регулирующий использование антибиотиков, заключается в том, чтобы гарантировать, что пациент получает антибиотик, к которому чувствительна бактерия-мишень, в достаточно высокой концентрации, чтобы быть эффективным, но не вызывать побочных эффектов, и в течение определенного периода времени убедиться в том, что инфекция будет полностью искоренена [24].

Требования, предъявляемые к антибиотикам [25]:

1. Антибиотики должны:

- подавлять рост и размножение возбудителя заболевания,
- убивать при низких концентрациях,
- прерывать за короткий период жизненный цикл патогенного микроорганизма,
- способствовать процессу выздоровления.

2. Антибиотики не должны:

- после множественного введения дозы вызывать аллергенность,
- быть токсичными.
- наносить вред организму пациента,
- не должны снижать иммунологические реакции пациента.

1.3.2 Технология производства антибиотиков актиномицетами

Общепризнано, что продукция антибиотиков строго регулируется пирамидальными регуляторными каскадами транскрипции у *Streptomyces*, поскольку данный род актиномицетов синтезирует большее количество антибиотиков.

Первый – это начало производства антибиотиков, которое запускается сопряженными рецепторами «гормонов» стрептомицетов или другими сигналами. Среди них А-фактор, химическая структурная характеристика γ -бутиролактона (GBL), является первым гормоном *Streptomyces*, о котором в 1967 г. сообщалось как о сигнале, запускающем выработку стрептомицина у *Streptomyces griseus*.

Второй уровень – глобальные регуляторы, оказывающие плеiotропное воздействие на нижний уровень регуляторов. Глобальные регуляторы влияют

более чем на один метаболический путь и могут не влиять напрямую на какие-либо конкретные биосинтетические генные кластеры (BGC).

Третий уровень – это регуляторы, специфичные для путей (PSR), которые рассматриваются как главные переключатели производства антибиотиков. PSR расположены в BGCs вторичных метаболитов и непосредственно регулируют транскрипцию генов биосинтеза. Поэтому их назвали «кластерными регуляторами (CSR)».

Четвертый уровень представляет собой регуляцию с обратной связью, которая обеспечивается антибиотиками и/или промежуточными продуктами для координации производства и транспорта антибиотиков [26].

Процесс развития продуцентов антибиотиков складывается из 2-х фаз [27]:

1 Тропофаза, как первая фаза развития, сопровождается:

- интенсивным накоплением биомассы продуцента,
- синтезом продуцентом белков, ферментов, углеводов, нуклеиновых кислот,
- потреблением основных компонентов питательной среды,
- поглощением кислорода,
- снижением из-за накопления органических кислот, pH,
- началом продуцирования антибиотиков.

2 Идиофаза характеризуется:

- фазой несбалансированного роста,
- снижением, из-за автолитических процессов, количества биомассы,
- активным синтезом антибиотиков,
- продолжением возрастания кислотности среды,
- обогащением продуктами автолиза клеток.

2 Объект, предмет, методика и материалы исследования

2.1 Объект и предмет исследования

Объект исследования. Актиномицеты, продуцирующие антибиотики

Предмет исследования. Математическое прогнозирование оптимальных условий для улучшения культуральных свойств с целью обеспечения наибольшего прироста биомассы при производстве антибиотиков.

2.2 Материалы исследования

Подготовка и стерилизация лабораторной посуды при 120 °С от 30 до 45 мин.



а) автоклав

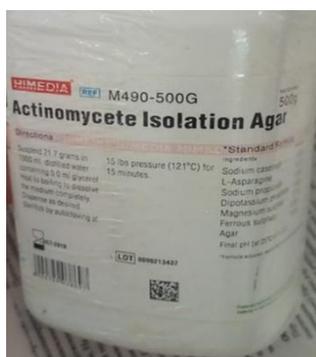


б) спектрофотометр



в) ламинарный бокс

Рисунок 2 – Приборы и оборудования, использованные в ходе работы



а) Actinomycetes isolation agar



б) Nutrient broth

Рисунок 3 – Питательные среды

Использование следующих оборудований: автоклав – для стерилизации посуды и питательных сред, спектрофотометр – для замеров оптической плотности среды и коэффициентов пропускания, термостат – для поддержания постоянного температурного режима, ламинарный бокс – для работы с микроорганизмами в стерильном условиях (рисунок 2).

Приготовление питательных сред: высокопитательная среда *Actinomycetes isolation agar*, универсальный питательный бульон *Nutrient broth* и разлив в чашки Петри под ламинарным боксом (рисунок 3).

2.3 Методика исследования

Метод математического планирования. В основе оптимизации культуральных свойств актиномицетов лежит многофакторная зависимость (в нашем примере пятифакторная), поскольку планирование пятифакторного эксперимента способствует определению эмпирической зависимости, которая описывается с приемлемым приближением влияния исследуемых пяти факторов на конечный результат, в нашем случае – на прирост биомассы в заданных условиях.

В исследованиях применен метод математического планирования эксперимента, в основу которого положена нелинейная множественная корреляция [28, 29]:

$$R = \sqrt{1 - \frac{(N-1) \times \sum (Y_{\text{э}} - Y_m)^2}{(N-K-1) \times \sum (Y_{\text{э}} - Y_{\text{ср}})^2}}$$

где: N – число описываемых точек, K – число действующих факторов, $Y_{\text{э}}$ – экспериментальный результат, Y_m – теоретический (расчетный) результат, $Y_{\text{ср}}$ – среднее экспериментальное значение

Величина значима, если выполняется условие:

$$t_R = \frac{R \times \sqrt{N-K-1}}{1-R^2} > 2 \quad (2)$$

В основе большинства приемов подбора аппроксимирующей функции лежит метод наименьших квадратов.

Применительно к уравнению прямой линии:

$$Y = a + b \times X.$$

$$(3) \quad b = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{\sum X^2 - (\sum X)^2} \quad (4) \quad a = \frac{\sum Y - b \sum X}{n}$$

После выявления значимости частных функций на основании полученных результатов выводится обобщенное уравнение $Y_{об}$:

$$Y_{об} = \frac{Y_1 \times Y_2 \times \dots \times Y_n}{Y_{cp}^{n-1}}$$

где: $Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_n$ – частные функции, Y_{cp} – общее среднее всех учитываемых значений обобщенной функции в степени, на единицу меньшей числа частной функции (5)

Обобщенное уравнение анализируется на адекватность по величине R (коэффициент корреляции) и t_R (достоверность)

Анализ обобщенного уравнения (5) позволяет определить оптимальные условия для улучшения культуральных свойств исследуемых актиномицетов для обеспечения максимального прироста биомассы при производстве антибиотиков.

Метод отбора почвы. Отбор почвы проводился согласно ГОСТ 17.4.3.01-83 в Талгарском районе Алматинской области. Во время процесса учитывались такие факторы, как климат района, структура почвы. Почва отбиралась с глубины от 5 до 20 см объемом 100 гр. стерильным шпателем с соблюдением правил асептики.

Бактериальный посев. На начальной стадии исследований было произведено нулевое, первое и второе разведение почвы с водой в соотношении 1:10, 1:9 соответственно. На следующем этапе был осуществлён посев на твёрдую питательную среду *Actinomycetes isolation agar* и сохранение в термостате при температуре 28 °С. После 144 часов с момента посева, колонии актиномицетов были переведены в жидкую питательную среду *Nutrient broth* по 100мл в две колбы: первая колба хранилась при 34 °С, вторая колба при 28 °С.

3. Результаты исследования

3.1 Оптимизация культуральных свойств актиномицетов методом математического планирования

Для оптимизации культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков необходимо, согласно поставленным задачам, методом математического планирования изучить оптимальные условия для их культивирования.

Биотехнологический метод продуцирования антибиотиков зависит, как отметила в своей работе Попова Е.Д. (2015), от физико-химических условий культивирования актиномицетов [30]:

- температура,
- рН,
- химический состав питательной среды и др.

В дополнение следует отметить, что качественная и количественная характеристика питательной среды для культивирования актиномицетов зависит от продуцента, поэтому питательная среда подбирается индивидуально. Основными компонентами питательной среды служат источники углерода, азота, микро- и макроэлементы [30].

Для математического планирования и оптимизации культуральных свойств актиномицетов, как это видно из таблицы 1, были отобраны следующие факторы:

1. Кислотность питательной среды (X_1). Показатель влияет на:

- скорость роста,
- свойства клеточных стенок,
- транспорт питательных веществ.

рН питательной среды, согласно данным Гайдашева И.И. (2011) приняли в интервале 6-8 [31].

2. Температура культивирования (X_2 , °С), согласно данным [32] может варьировать в пределах 28-37 °С.

3. Концентрация глицерина (X_3 , г/л). В качестве источника углерода для питательной среды используем глицерин, содержание которого может находиться в интервале 20-50 г/л [33].

4. Концентрация соевой муки (X_4 , %) может находиться в интервале от 1,0 до 3,5 % [33].

5. Концентрация фосфата аммония (X_5 , %). Актиномицеты показывают высокую чувствительность к соединениям фосфора, следовательно, этот показатель играет существенную роль для проявления у актиномицетов культуральных и биотехнологических свойств и может составлять в составе питательной среды 3-7% [34].

Изученные факторы послужили основой для определения области факторного пространства (таблица 1) в целях изучения методом математического планирования оптимальных для культивирования условий.

Таблица 1 – Область факторного пространства

	Факторы	Уровни факторов				
		1	2	3	4	5
X_1	pH	6	6,5	7	7,5	8
X_2	Температура культивирования, °С	28	29,8	31,6	33,4	35,2
X_3	Концентрация глицерина, г/л	20	30	35	40	50
X_4	Концентрация соевой муки, %	1	2	2,5	3	3,5
X_5	Концентрация фосфата аммония, %	3	4	5	6	7

На основе исследуемых пяти факторов составлена на основе латинского квадрата матрица планирования, которая включает 25 экспериментов ($n = p^2$, где p – число уровней, равное 5), по этой методике распределяются независимые переменные/факторы X_1, X_2, \dots, X_5 по уровням от 1 до 5 (таблица 2).

Таблица 2 – Пятифакторная матрица планирования эксперимента

№ оп ыт а	Пятифакторная матрица планирования эксперимента										Прир ост биом ассы %
	X_1		X_2		X_3		X_4		X_5		
	Уро вень	Знач ение	Уро вень	Знач ение	Уро вень	Знач ение	Уро вень	Знач ение	Уро вень	Знач ение	
1	1	6	1	28	5	50	4	3	1	3	42
2	1	6	2	29,8	4	40	2	2	2	4	48
3	1	6	3	31,6	3	35	1	1	4	6	50
4	1	6	4	33,4	2	30	3	2,5	3	5	44
5	1	6	5	35,2	1	20	5	3,5	5	7	50
6	2	6,5	1	28	5	50	4	3	1	3	49
7	2	6,5	2	29,8	4	40	2	2	2	4	46
8	2	6,5	3	31,6	3	35	1	1	4	6	52
9	2	6,5	4	33,4	2	30	3	2,5	3	5	48
10	2	6,5	5	35,2	1	20	5	3,5	5	7	50
11	3	7	1	28	5	50	4	3	1	3	48
12	3	7	2	29,8	4	40	2	2	2	4	41
13	3	7	3	31,6	3	35	1	1	4	6	50
14	3	7	4	33,4	2	30	3	2,5	3	5	41
15	3	7	5	35,2	1	20	5	3,5	5	7	51
16	4	7,5	1	28	5	50	4	3	1	3	42
17	4	7,5	2	29,8	4	40	2	2	2	4	49

18	4	7,5	3	31,6	3	35	1	1	4	6	45
19	4	7,5	4	33,4	2	30	3	2,5	3	5	51
20	4	7,5	5	35,2	1	20	5	3,5	5	7	45
21	5	8	1	28	5	50	4	3	1	3	49
22	5	8	2	29,8	4	40	2	2	2	4	42
23	5	8	3	31,6	3	35	1	1	4	6	56
24	5	8	4	33,4	2	30	3	2,5	3	5	51
25	5	8	5	35,2	1	20	5	3,5	5	7	43

Проводим расчет экспериментальных значений частных функций:

$$X_1: (42+48+50+44+50)/5=46,8 \text{ (1 уровень)}$$

$$(49+46+52+48+50)/5=49 \text{ (2 уровень)}$$

$$(48+41+50+41+51)/5=46,2 \text{ (3 уровень)}$$

$$(42+49+45+51+45)/5=46,4 \text{ (4 уровень)}$$

$$(49+42+56+51+43)/5=48,2 \text{ (5 уровень)}$$

$$X_2: (42+49+48+42+49)/5=46 \text{ (1 уровень)}$$

$$(48+46+41+49+42)/5=45,2 \text{ (2 уровень)}$$

$$(50+52+50+45+56)/5=50,6 \text{ (3 уровень)}$$

$$(44+48+41+51+51)/5=47 \text{ (4 уровень)}$$

$$(50+50+51+45+43)/5=47,8 \text{ (5 уровень)}$$

$$X_3: (50+50+51+45+43)/5=47,8 \text{ (1 уровень)}$$

$$(44+48+41+51+51)/5=47 \text{ (2 уровень)}$$

$$(50+52+50+45+56)/5=50,6 \text{ (3 уровень)}$$

$$(48+46+41+49+42)/5=45,2 \text{ (4 уровень)}$$

$$(42+49+48+42+49)/5=46 \text{ (5 уровень)}$$

$$X_4: (50+52+50+45+56)/5=50,6 \text{ (1 уровень)}$$

$$(48+46+41+49+42)/5=45,2 \text{ (2 уровень)}$$

$$(44+48+41+51+51)/5=47 \text{ (3 уровень)}$$

$$(42+49+48+42+49)/5=46 \text{ (4 уровень)}$$

$$(50+50+51+45+43)/5=47,8 \text{ (5 уровень)}$$

$$X_5: (42+49+48+42+49)/5=46 \text{ (1 уровень)}$$

$$(48+46+41+49+42)/5=45,2 \text{ (2 уровень)}$$

$$(44+48+41+51+51)/5=47 \text{ (3 уровень)}$$

$$(50+52+50+45+56)/5=50,6 \text{ (4 уровень)}$$

$$(50+50+51+45+43)/5=47,8 \text{ (5 уровень)}$$

Полученные результаты вносим в таблицу 3 и находим для исследуемых факторов средние значения.

Таблица 3 – Расчет экспериментальных значений частных функций

№ фактора	Уровень					Среднее значение
	1	2	3	4	5	
X ₁	46,8	49	46,2	46,4	48,2	47,32
X ₂	46	45,2	50,6	47	47,8	47,32
X ₃	47,8	47	50,6	45,2	46	47,32
X ₄	50,6	45,2	47	46	47,8	47,32
X ₅	46	45,2	47	50,6	47,8	47,32

По полученным экспериментальным данным строим графики, указывающие на прирост биомассы актиномицетов в зависимости от исследуемых факторов (рисунки 4-8).

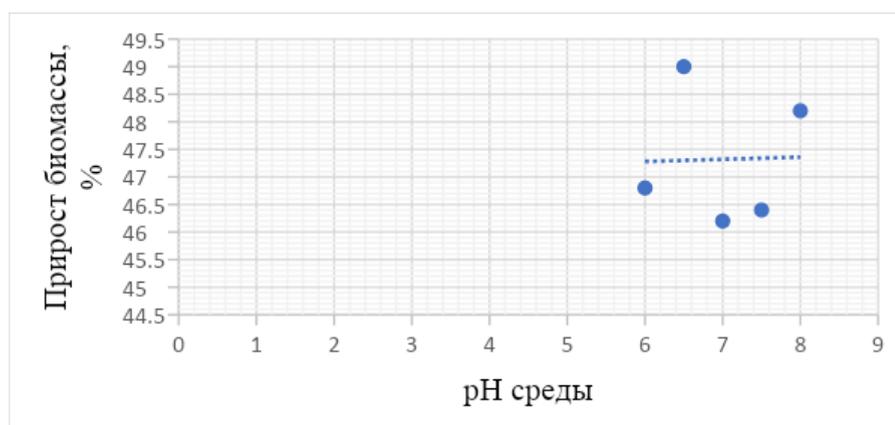


Рисунок 4 – Зависимость прироста биомассы от кислотности среды

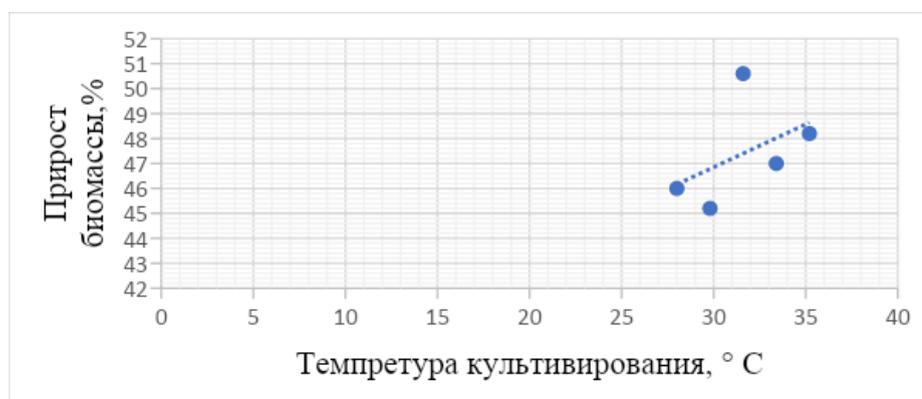


Рисунок 5 – Зависимость прироста биомассы от температуры культивирования

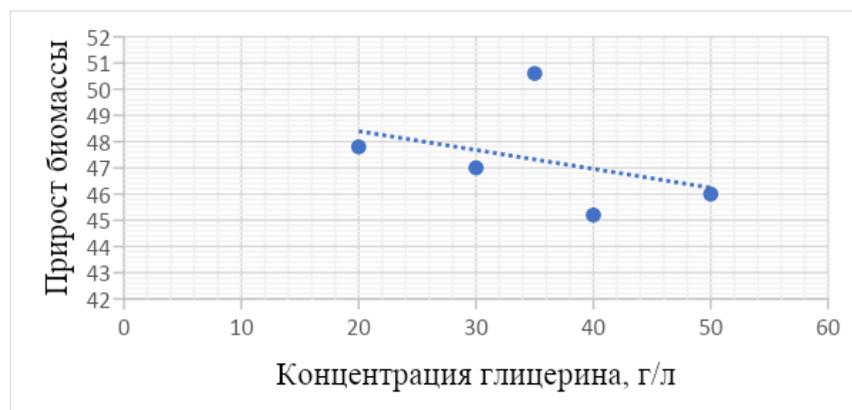


Рисунок 6 – Зависимость прироста биомассы от концентрации глицерина

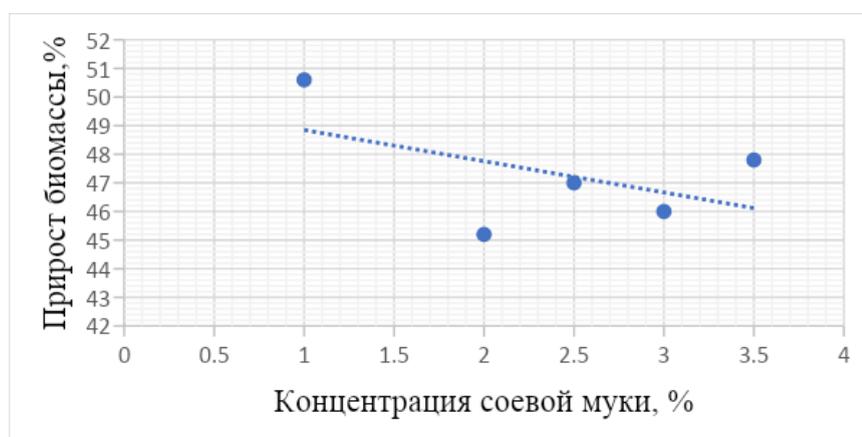


Рисунок 7 – Зависимость прироста биомассы от концентрации соевой муки

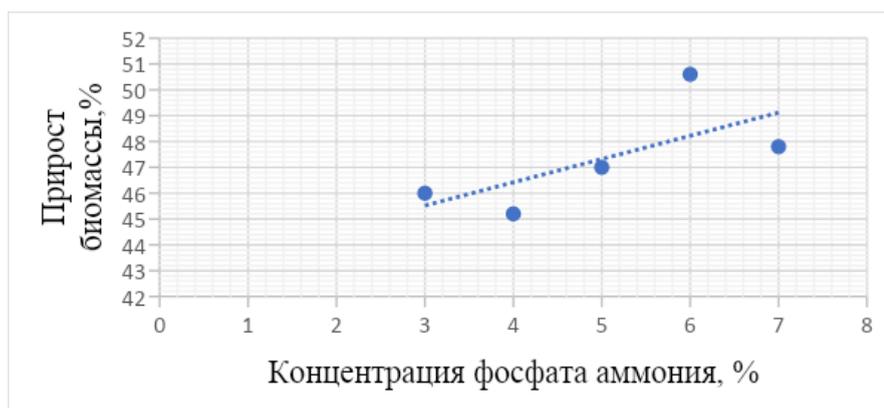


Рисунок 8 – Зависимость прироста биомассы от концентрации фосфата аммония

Как видно из рисунков 4-8, показатели прироста биомассы непоследовательны в зависимости от рассматриваемых факторов.

Для оптимизации исследуемых факторов с целью повышения роста культур по алгебраическому описанию функций провели анализ моделей методом наименьших квадратов (таблица 4).

Таблица 4 – Расчетные значения исследуемых функций

№ опыта	X ₁				X ₂			
	X	Y	X ²	XY	X	Y	X ²	XY
1	6	46,8	36	280,8	28	46	784	1288
2	6,5	49	42,25	318,5	29,8	45,2	888,04	1346,96
3	7	46,2	49	323,4	31,6	50,6	998,56	1598,96
4	7,5	46,4	56,25	348	33,4	47	1115,56	1569,8
5	8	48,2	64	385,6	35,2	47,8	1239,04	1682,56
Σ	35	236,6	247,5	1656,3	158	236,6	5025,2	7486,28

продолжение таблицы 4

№ опыта	X ₃				X ₄				X ₅			
	X	Y	X ²	XY	X	Y	X ²	XY	X	Y	X ²	XY
1	20	47,8	400	956	1	50,6	1	50,6	3	46	9	138
2	30	47	900	1410	2	45,2	4	90,4	4	45,2	16	180,8
3	35	50,6	1225	1771	2,5	47	6,25	117,5	5	47	25	235
4	40	45,2	1600	1808	3	46	9	138	6	50,6	36	303,6
5	50	46	2500	2300	3,5	47,8	12,25	167,3	7	47,8	49	334,6
Σ	175	236,6	6625	8245	12	236,6	144	563,8	25	236,6	625	1192

На следующем этапе производим аппроксимацию исследуемых функций (таблица 5).

Таблица 5 – Аппроксимация исследуемых функций

Формулы	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
$b = \frac{n\sum XY - \sum X \sum Y}{n\sum X^2 - (\sum X)^2}$	0,04	0,3	-0,072	-0,035	0,018
$a = \frac{\sum Y - b\sum X}{n}$	47,04	37,84	49,84	47,4	47,23
$Y = a + b \times X$	$Y_1 = 47,04 + 0,04 \cdot X_1$	$Y_2 = 37,84 + 0,3 \cdot X_2$	$Y_3 = 49,84 + (-0,072 \cdot X_3)$	$Y_4 = 47,4 + (-0,035 \cdot X_4)$	$Y_5 = 47,23 + 0,018 \cdot X_5$

Теоретические значения частных функций представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Теоретические значения частных функций

$Y_{n1}=a+b \cdot X_{n1}$	47,28	46,24	48,4	47,36	47,28
$Y_{n2}=a+b \cdot X_{n2}$	47,3	46,78	47,68	47,33	47,30
$Y_{n3}=a+b \cdot X_{n3}$	47,32	47,32	47,32	47,31	47,32
$Y_{n4}=a+b \cdot X_{n4}$	47,34	47,86	46,96	47,29	47,34
$Y_{n5}=a+b \cdot X_{n5}$	47,36	48,4	46,24	47,27	47,36

По полученным теоретическим данным строим графики, указывающие на прирост биомассы актиномицетов в зависимости от исследуемых факторов (рисунки 9-13).

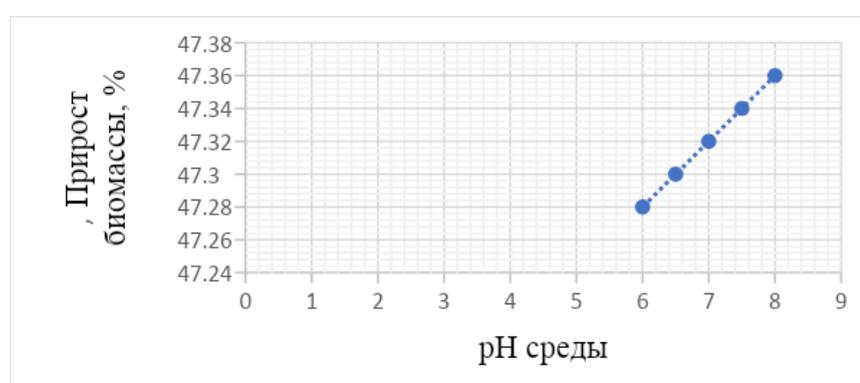


Рисунок 9 – Зависимость прироста биомассы от кислотности среды

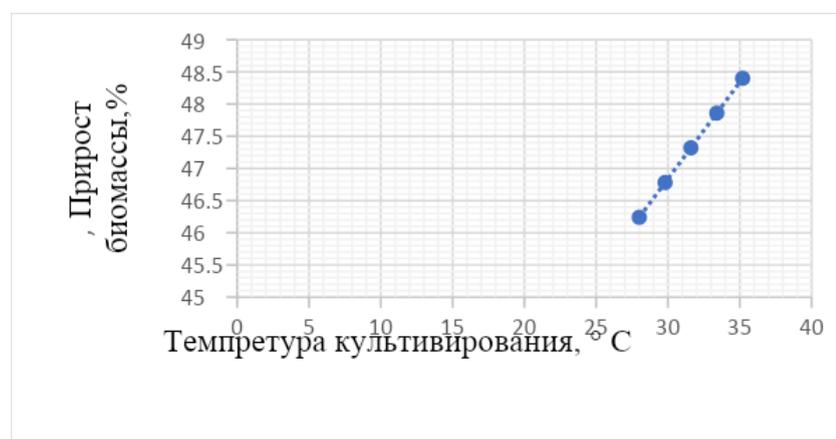


Рисунок 10 – Зависимость прироста биомассы от температуры культивирования

Рисунок 10 показывает, что рост биомассы достигает максимума (48,5 %) при температуре 35 ° C.

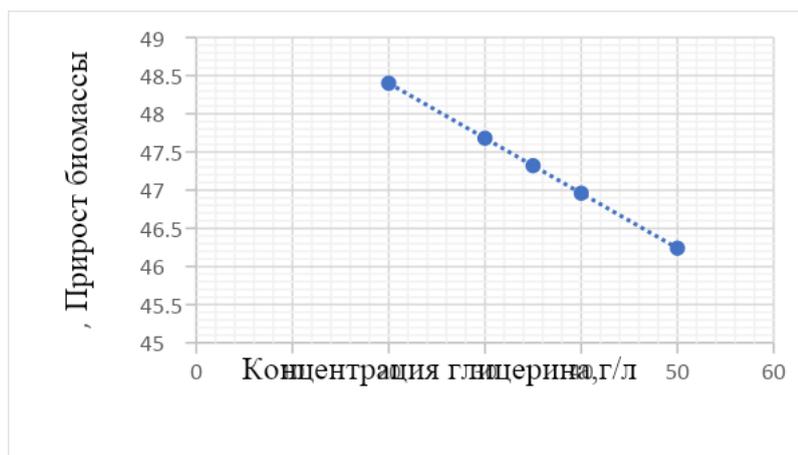


Рисунок 11 – Зависимость прироста биомассы от концентрации глицерина

Как видно из графика, оптимальным условием для культивирования актиномицетов будет проведение процесса при рН равной 8, поскольку в данном случае прирост биомассы составит 47,36%.

В данном случае наблюдается максимальный прирост биомассы при минимальной концентрации химического вещества (20 г/л).

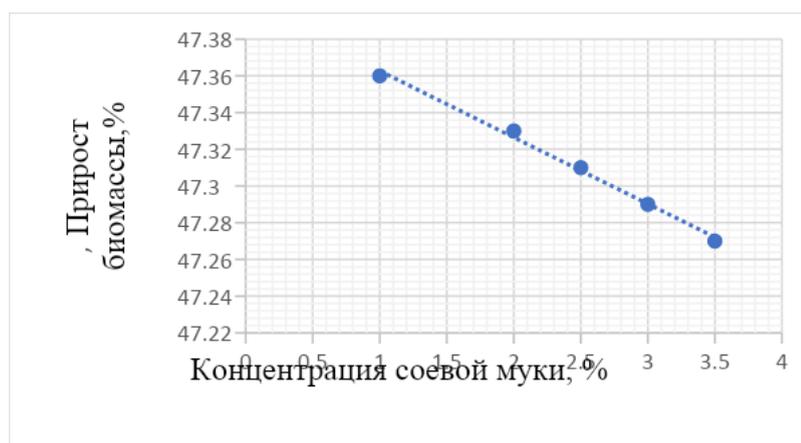


Рисунок 12 – Зависимость прироста биомассы от концентрации соевой муки

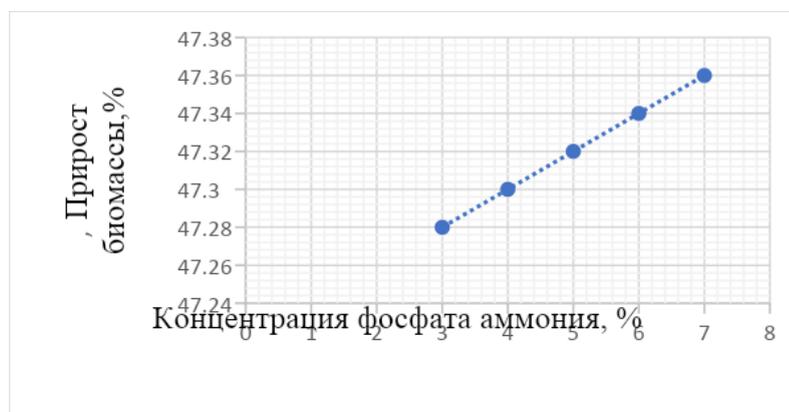


Рисунок 13 – Зависимость прироста биомассы от концентрации фосфата аммония

На рисунке 12 можно наблюдать, что чем больше концентрация соевой муки, тем ниже процент прироста биомассы, следовательно, оптимальным будет применение данного вещества в минимальной концентрации (1 %).

Оптимальным решением, как видно из рисунка 13, для максимального роста микроорганизмов будет содержание фосфата аммония на уровне 7%.

Далее частные функции объединены в обобщенное уравнение. Анализ обобщенного уравнения показал (0,93), что прирост биомассы актиномицетов будет оптимальным, если принять следующие значения для исследуемых факторов:

- рН (X_1) = 8, тогда прирост биомассы составит 47,36%;
- температура культивирования = 33,4 °С, рост биомассы составит 47,86%;
- концентрация глицерина = 20 г/л, прирост биомассы = 48,5 %;
- концентрация соевой муки = 1 %, в данном случае рост актиномицетов – 47,36%;
- концентрация фосфата аммония = 7%, прирост биомассы составит 47,36%.

В комплексе такой подход обеспечит для научно-производственной лаборатории повышение культуральных свойств за счет увеличения скорости роста до 47-49 % по сравнению с имеющимися на сегодня приростом биомассы, которое не превышает на третий день культивирования 36 %.

3.2 Культуральные свойства актиномицетов

Таблица 7 – Фиксация числа колоний актиномицетов через каждые 24 часа

Время	24 ч.	48 ч.	72 ч.	96 ч.	120 ч.	144 ч.
Число колоний	0/0	0/0	3/0	5/3	13/9	25/19

После посева на твёрдую питательную среду Actinomycetes Isolation Agar было проведено изучение обсемененности в начале и в конце эксперимента (таблица 8).

Таблица 8 – Количественный учет микроорганизмов, выделенных из почвы

Время	Обсемененность	
	$\bar{X} \pm m_{\bar{x}}$ КОЕ/г	C_v , %ч.
24 ч.	0	-
144ч.	22±3,01	19,27

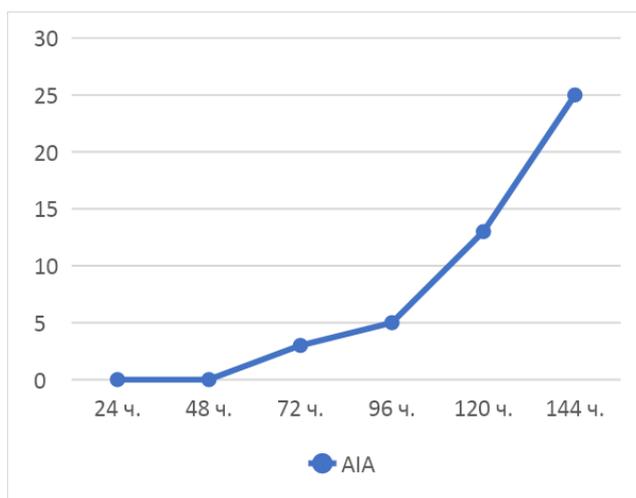


Рисунок 14 – Скорость роста актиномицетов на питательной среде Actinomycetes Isolation Agar

Культуральные свойства микроорганизмов изучались с помощью показаний спектрофотометра по коэффициенту пропускания и оптической плотности. Для этого культуры актиномицетов были выделены на питательной среде Actinomycetes Isolation Agar. Выбранный микроорганизм был переведен в жидкую питательную среду Nutrient Broth (рисунок 15).



Рисунок 15 – Актиномицеты в жидкой питательной среде при 28 °С и 34 °С

Показания спектрофотометра фиксировались каждые 24 часа. Полученные данные представлены в таблице 9 и на графике 12 (рисунок 16).

Таблица 9 – Показания спектрофотометра во времени

Пройденное время со дня посева	0 ч.		24 ч.		48 ч.		72 ч.	
	Температура культивирования, °С	34	28	34	28	34	28	34

Оптическая плотность	0,02	0,03	0,110	0,679	0,235	0,684	1,733	1,185
Коэффициент пропускания, %	98	97,8	77,7	21	58,5	20,7	1,84	6,45

Как видно из рисунка 16, более высокую динамику роста микроорганизм показывает при температуре 34 °С. В первые дня оба температурных режима показывали стадию адаптации на разных уровнях оптической плотности. За первый день рост составил 450% и 2163,3% для температур культивирования 34 °С и 28 °С соответственно. На второй день эти показатели имели значения в 113,6% и 0,7%, что является достаточно сильным замедлением, связанным с адаптацией. Сравнения замедление можно прийти к выводу, что при температуре 34 °С темпы роста остаются выше. Период экспоненциального роста приходится на переход 3 на 4 день по графику. Для температуры культивирования в 28 °С показатели оптической плотности прибавили 73,2%, а для температуры 34 °С – 637,4%.

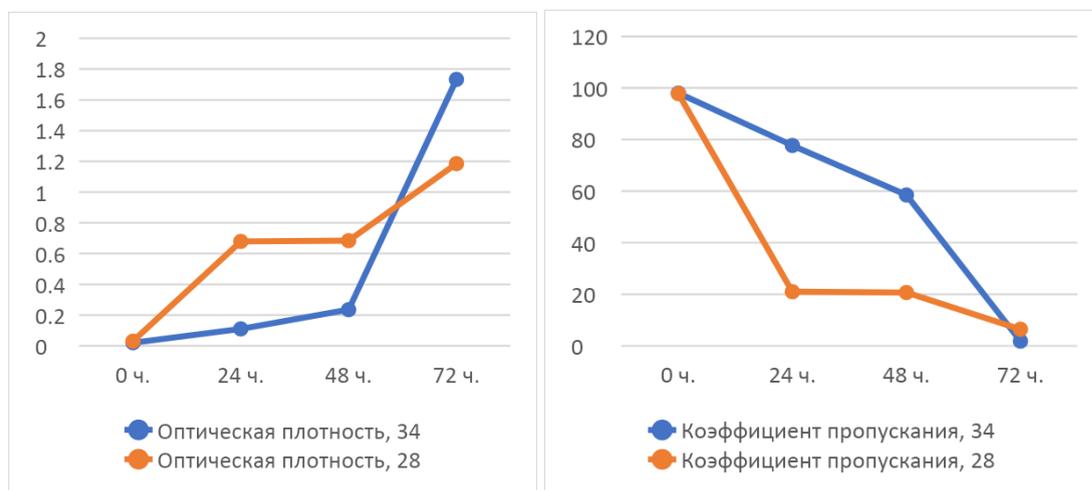


Рисунок 16 – Показания оптической плотности и коэффициентов пропускания

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом математического моделирования определены оптимальные условия для улучшения культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков. Для этого методом теоретического исследования изучены биологические, культуральные и технологические свойства актиномицетов, продуцирующих антибиотики. Далее методами математического моделирования определены оптимальные культуральные условия для актиномицетов, продуцирующие антибиотики.

Выводы:

Прирост биомассы актиномицетов будет оптимальным, если принять следующие значения для исследуемых факторов:

- рН (X_1) = 8, тогда прирост биомассы составит 47,36%;
- температура культивирования = 33,4 ° С, рост биомассы составит 47,86%;
- концентрация глицерина = 20 г/л, прирост биомассы = 48,5 %;
- концентрация соевой муки = 1 %, в данном случае рост актиномицетов – 47,36%;
- концентрация фосфата аммония = 7%, прирост биомассы составит 47,36%.

В комплексе такой подход обеспечит для научно-производственной лаборатории повышение культуральных свойств за счет увеличения скорости роста до 47-49 % по сравнению с имеющимися на сегодня приростом биомассы, которое не превышает на третий день культивирования 36 %.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Takahashi Y, Nakashima T. Actinomycetes, an Inexhaustible Source of Naturally Occurring Antibiotics. *Antibiotics*. 2018; 7(45):1-17.
URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020045>
- 2 Doroghazi, J.R., Metcalf, W.W. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes // *BMC Genomics*. 2013. №14, p.611. DOI={ 10.1186/1471-2164-14-611 }. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-611>.
- 3 Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria [published correction appears in *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Nov 9;80(4):iii]. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015;80(1):1-43. Published 2015 Nov 25. DOI = { 10.1128/MMBR.00019-15 }.
- 4 Сергеева А. Г., Куимова Н. Г. Актиномицеты как продуценты биологически активных веществ // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2006. №S22. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/aktinomitsety-kak-produtsenty-biologicheskii-aktivnyh-veschestv> (дата обращения: 03.03.2022).
- 5 Kuster E, Williams S.T. Production of hydrogen sulphide by *Streptomyces* and methods for its detection. 1964. *Applied and Environmental Microbiology*. 12(1). p. 46–52. URL: <https://doi.org/10.1128/AM.12.1.46-52.1964>.
- 6 Gonzalez-Franco A. S. et al. Molecular and cultural analysis of seasonal actinomycetes in the soils of the *Artemisia tridentata* range // *Phyton*. - 2009. – Vol. 78. – p. 83.
- 7 Benson D. R. and Silvester W. B.. 1993. Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants// *American Society for Microbiology// Microbiol. Review*. 1993. DOI={ 10.1128/mr.57.2.293-319.1993 }.
URL: <https://doi.org/10.1128/mr.57.2.293-319.1993>.
- 8 Selim, M.S.M., Abdelhamid, S.A., Mohamed, S.S. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021. p.72. DOI={ 10.1186/s43141-021-00156-9 }.
URL: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>.
- 9 Drechsler, C. C., “Morphology of the Genus *Actinomyces*. I.” *Botanical Gazette*. p.65–83.
- 10 Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria [published correction appears in *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Nov 9;80(4):iii]. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015;80(1):1-43. Published 2015 Nov 25. DOI = { 10.1128/MMBR.00019-15 }.
- 11 Pridham T.G, Hesseltine C.W, Benedikt R.G. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Applied Microbiology*. 1958;6(1):52-79. DOI = { 10.1128/am.6.1.52-79.1958 }.

12 Lena Mitousis, Yvonne Thoma, Ewa M. Musiol-Kroll. An Update on Molecular Tools for Genetic Engineering of Actinomycetes-The Source of Important Antibiotics and Other Valuable Compounds. *Antibiotics* (Basel).2020 // NCBI, №9.DOI={10.3390/antibiotics9080494}.URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7460540>, p.494.

13 Robertsen, Helene L, and Ewa M Musiol-Kroll. Actinomycete-Derived Polyketides as a Source of Antibiotics and Lead Structures for the Development of New Antimicrobial Drugs. *Antibiotics* (Basel, Switzerland).2019 // NCBI, № 8. DOI={10.3390/antibiotics8040157}. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6963833>, p.1.

14 Bu, Q. T., Yu, P., Wang, J., Li, Z. Y., Chen, X. A., Mao, X. M., & Li, Y. Q. (2019). Rational construction of genome-reduced and high-efficient industrial *Streptomyces* chassis based on multiple comparative genomic approaches. *Microbial cell factories*, 18(1), p.16. DOI={10.1186/s12934-019-1055-7}. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1055-7>.

15 Ventura M, Canchaya C, Tauch A, et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007.71(3): p.495-548. DOI={10.1128/MMBR.00005-07}. URL: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>.

16 J. K.Liu, W. H.Chen,S. X.Ren,G. P.Zhao,J.Wang. (2014). iBrick: a new standard for iterative assembly of biological parts with homing endonucleases// *PloS one*.2014.9(10). DOI={10.1371/journal.pone.0110852}.

URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110852>.

17 Jingman Wang, Anrui Lu, Jiakun Liu, Weiren Huang, Jin Wang, Zhiming Cai, Guoping Zhao.iCatch: a new strategy for capturing large DNA fragments using homing endonucleases//*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*.2019.Vol. 51(1),p.97–103. DOI={10.1093/abbs/gmy139}. URL: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy139>.

18 J.Y. Jeong, H.S. Yim, J.Y.Ryu, et al. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies//*Appl Environ Microbiol.* 2012.78(15),p.5440-5443. DOI={10.1128/AEM.00844-12}. URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-12>.

19 D'Agostino P.M., Gulder T.A. Direct Pathway Cloning Combined with Sequence- and Ligation-Independent Cloning for Fast Biosynthetic Gene Cluster Refactoring and Heterologous Expression//*ACS Synth. Biol.* 2018, №7, p.1702–1708.

DOI= {10.1021/acssynbio.8b00151}.URL:<https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00151>.

20 Lena Mitousis, Yvonne Thoma, Ewa M. Musiol-Kroll. An Update on Molecular Tools for Genetic Engineering of Actinomycetes– The Source of Important Antibiotics and Other Valuable Compounds. *Antibiotics* (Basel).2020// NCBI, №9. DOI={10.3390/antibiotics9080494}.URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7460540>, p.494.

21 Фёдоров А.А. Введение. Бактерии и актиномицеты // Жизнь растений. Том 1.1974. С.284–286.

22 Кашкин П.Н.. Антибиотики и их практическое использование: моногр. / П.Н.Кашкин. - М.: Государственное издательство медицинской литературы. 2012. - 252 с.

23 Попова Е.Д. Подбор и оптимизация питательных сред для культивирования актиномицетов – продуцентов антибиотиков/ Е.Д.Попова // Международный научно–исследовательский журнал. –2015. – №3 (34) Часть 2. – С. 11–13. – URL:<https://research-journal.org/biology/podbor-i-optimizaciya-pitatelnyx-sred-dlya-kultivirovaniya-aktinomicetov-producentov-antibiotikov/> (дата обращения: 28.03.2022).

24 Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Antibiotic". *Encyclopedia Britannica*. 2021. URL: <https://www.britannica.com/science/antibiotic>.

25 Кашкин П.Н. Антибиотики и их практическое использование: моногр. / П.Н.Кашкин. М.: Государственное издательство медицинской литературы. 2012. - 252 с.

26 Xia, Haiyang and Li, Xiaofang and Li, Zhangqun and Zhan, Xinqiao and Mao, Xuming and Li, Yongquan. The Application of Regulatory Cascades in Streptomyces: Yield Enhancement and Metabolite Mining // *Frontiers in Microbiology*, № 11. DOI={10.3389/fmicb.2020.00406}. URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00406>.

27 Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ: учеб. пособие: в 2 ч.– Ч.1/ Ю.М.краснопольский, Н.Ф.Клещев – Харьков: НТУ «ХПИ»,2013. 35–38с.

28 Малышев В.П. Математическое планирование металлургического и химического эксперимента. Алма-Ата: Наука, 1977. – 35 с.

29 Казова Р.А. Моделирование обезвреживания техногенных материалов // Материалы XI международной научно-технической конференции «Новое в безопасности жизнедеятельности. Экология». Алматы: КазНТУ имени К.И.Сатпаева. 2008. – С.56 – 59

30 Попова Е.Д. Подбор и оптимизация питательных сред для культивирования актиномицетов – продуцентов антибиотиков / Е.Д.Попова // Международный научно–исследовательский журнал. –2015. – №3 (34) Часть 2. – С. 11–13.

URL:<https://research-journal.org/biology/podbor-i-optimizaciya-pitatelnyx-sred-dlya-kultivirovaniya-aktinomicetov-producentov-antibiotikov/> (дата обращения: 28.03.2022).

31 Гайдашева И.И. Культивирование штамма *Streptomyces lateritius* 19/97М: перспективы создания биопрепарата для стимуляции роста и защиты растений от болезней. Москва. –2011. –С.21 (дата обращения:29.03.2022).

32 El Karkouri, Abdenbi et al. “Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope.” *The Pan African medical journal* vol. 33329. 29 Aug. 2019. DOI = {10.11604/pamj.2019.33.329.19018}.

33 Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. Бином. Лаборатория знаний, 2014. С.340.

34 Поконова Ю.В., Стархова В.И. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Часть 2. АНО НПО «Мир и Семья», 2002. С.145.

35 ГОСТ 17.4.3.01-83 Охрана природы (ССОП). Почвы. Общие требования к отбору проб от 21 декабря 1983.

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу

Туланова Нигара Кудратжановна

5B070100 – «Биотехнология»

На тему: Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков

Выполнено:

- а) графическая часть на 5 листах
- б) пояснительная записка на 30 страницах

ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ

Дипломная работа Тулановой Н. по содержанию целостная, объём и оформление соответствует заявленным требованиям. Актуальность работы заключается в расчётных и практических исследованиях, позволяющие с высокой вероятной достоверностью спрогнозировать методом математического планирования эффективность производства антибиотиков и необходимость осуществления корректирующих действий для исправления и улучшения технологических условий производства.

Дипломная работа состоит из 3 разделов, где теоретическая часть включает в себя 3 подраздела на основе проработки 34 источников литературы, и указывает на то, что студент действительно изучил современную научную литературу. Во введении изложена актуальность исследования, корректно сформулированы научная и практическая значимости работы. В целом, работа соответствует заявленной теме исследования и выполнена путём последовательного решения поставленных задач в начале работы.

Оценка работы

Среди положительных моментов следует отметить:

- 1) хорошую подборку литературного материала для изучения и самостоятельного анализа выбранной темы для дипломной работы;
- 2) методически грамотно проведенные лабораторные микробиологические исследования, которые указывают на освоение студентом профессиональных компетенций. Также не менее важна логическая концовка, поскольку выводы подтверждают практическую значимость результатов, то есть совпадение теоретических данных с исследовательскими лабораторными.

В дипломной работе по методическому исполнению не выявлены ошибки и неточности.

Дипломная работа студента соответствует требованиям и может быть оценена на отлично – 98 %.

Рецензент

Кандидат биологических наук,
профессор кафедры биотехнологии
факультета биологии и биотехнологии
КазНУ им. Аль-Фараби

Атамбаева Ш.А.

2022 г.



ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

на дипломную работу

Туланова Нигара Кудратжановна

5B070100 – Биотехнология

Тема: «Оптимизация культуральных свойств актиномицетов при производстве антибиотиков»

Тема дипломной работы студента соответствует профилю специальности и является весьма актуальной. Автор работы грамотно провёл анализ научной литературы в первой главе и охватил необходимые пункты по содержанию для проведения дальнейших теоретических и лабораторных исследований. В дипломной работе было проведено изучение темы методами теоретического исследования, математического планирования опыта для выявления оптимальных физико-химических условий культивирования актиномицетов и закрепление последнего изучением основного объекта в лабораторных условиях.

В заключительной части можно увидеть итоги изучения темы и формулировку вывода. Работа проиллюстрирована графическим материалом, таблицами и рисунком.

В целом, содержание и объём дипломной работы полностью соответствуют заданию и направлению специальности, характеризуя достаточную теоретическую подготовку студента.

Студентка Туланова Н. качественно и добросовестно отнеслась к выполнению дипломной работы и необходимых лабораторных опытов на базе университета. Цель и задачи работы достигнуты.

Дипломная работа Тулановой Н. не содержит существенных недостатков и замечаний. Работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым к дипломным работам образовательно-квалификационного уровня «бакалавр», по специальности «Биотехнология», к защите допускается, рекомендованная оценка «Отлично – 98 %».

Научный руководитель

Кандидат с.-х.н., доцент

Джамалова Г.А.



«01» июня 2022 г.



Метаданные

Название

2022_БАК_Туланова Нигара.docx

Автор

Туланова Н.

Научный руководитель

Гуля Джамалова

Подразделение

ИГИНГД

Список возможных попыток манипуляций с текстом

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся текстовых искажений. Эти искажения в тексте могут говорить о ВОЗМОЖНЫХ манипуляциях в тексте. Искажения в тексте могут носить преднамеренный характер, но чаще, характер технических ошибок при конвертации документа и его сохранении, поэтому мы рекомендуем вам подходить к анализу этого модуля со всей долей ответственности. В случае возникновения вопросов, просим обращаться в нашу службу поддержки.

Замена букв		19
Интервалы		0
Микропробелы		265
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)		23

Объем найденных подобию

Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.

**25**

Длина фразы для коэффициента подобия 2

**4629**

Количество слов

**36191**

Количество символов

Подобия по списку источников

Посмотрите список и проанализируйте, в особенности, те фрагменты, которые превышают КП2 №2 (выделенные жирным шрифтом). Используйте ссылку «Обозначить фрагмент» и обратите внимание на то, являются ли выделенные фрагменты повторяющимися короткими фразами, разбросанными в документе (совпадающие сходства), многочисленными короткими фразами расположенные рядом друг с другом (парафразирование) или обширными фрагментами без указания источника ("хриптоцитаты").

10 самых длинных фраз

Цвет текста

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	72	1.56 %
2	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	41	0.89 %
3	https://ru.e7cielo.es/cat/kakoj-kot/kakie-antibiotiki-dlya-koshek/kakie-antibiotiki-ispolzuyutsya-dlya-lecheniya-pnevmonii-u-koshek	37	0.80 %
4	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	34	0.73 %
5	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	27	0.58 %

6	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	24	0.52 %
7	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	23	0.50 %
8	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	21	0.45 %
9	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	19	0.41 %
10	https://blogsummit.ru/raznoe/soderzhanie-antibiotikov-v-raznyh-produktah-pitaniya-tablica.html	19	0.41 %

из базы данных RefBooks (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из домашней базы данных (0.43 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	Разработка технологии переработки отработанных золотосодержащих угольных отходов Акбайкайского месторождения 6/22/2021 Satbayev University (ИХиБТ)	10 (2)	0.22 %
2	Моминова Рисалят dr.doc 5/13/2020 Satbayev University (ИХиБТ)	5 (1)	0.11 %
3	Diplom_Aliny_Kазбековой.doc 5/9/2020 Satbayev University (ИХиБТ)	5 (1)	0.11 %

из программы обмена базами данных (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из интернета (8.51 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	ИСТОЧНИК URL	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	https://science-education.ru/en/article/view?id=21293	320 (15)	6.91 %
2	https://ru.e7cielo.es/cat/kakoj-kot/kakie-antibiotiki-dlya-koshek/kakie-antibiotiki-ispolzuyutsya-dlya-lecheniya-pnevmonii-u-koshek	37 (1)	0.80 %
3	https://blogsummit.ru/raznoe/soderzhanie-antibiotikov-v-raznyh-produktah-pitaniya-tablica.html	27 (2)	0.58 %
4	http://oreluniver.ru/file/chair/thkimp/study/Koryachkina_oversh_tehnologiy.pdf	10 (1)	0.22 %

Список принятых фрагментов (нет принятых фрагментов)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	СОДЕРЖАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	------------	---