

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский  
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт Геологии и Нефтегазового дела им. К.Турысова

Кафедра Химическая и биохимическая инженерия

*Турганова Малика Адилжановна*

*Разработка 3D биореактора с иммобилизованными микроорганизмами для  
производства антибиотиков*

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Специальность 7М05105–Биотехнология

Алматы 2025

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский  
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт геологии и нефтегазового дела им. К.Турысова

УДК 665.622.43.046.6-52 (043)

На правах рукописи

Турганова Малика Адилжановна

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

На соискание академической степени магистра

Название диссертации

Разработка 3D биореактора с иммобилизованными  
микроорганизмами для производства антибиотиков

Направление подготовки

7M05105–Биотехнология

Научный руководитель

Профессор, доктор Ph.D.

 Берилло Д.А.

«17» июня 2025 г.

Рецензент

д.б.н., профессор факультета  
биологии и биотехнологии

 Иващенко А.Т.  
«17» июня 2025 г.

**ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ**

Норм контроль

профессор, доктор Ph.D. КХиБИ,

 Берилло Д.А.

17.06.2025 г.

Заведующий кафедрой

Химической и биохимической инженерии,  
к.х.н., ассоц.проф  Мангазбаева Р.А.

17.06.2025 г.

Алматы 2025

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский  
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турсысова

Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

7M05105–Биотехнология



**ЗАДАНИЕ  
на выполнение магистерской диссертации**

Магистрантке Турганова Малика Адилжановна

Тема: Разработка 3D биореактора с иммобилизованными микроорганизмами для  
производства антибиотиков

Утверждена приказом Проректора по академической работе № 548 П/Ө от 04.12.23 г.

Срок сдачи законченной диссертации: 17.06.2025 г.

Исходные данные к магистерской диссертации получены на основе экспериментальных  
расчетных и лабораторных работ включающие методы культивирования и иммобилизации.

Перечень подлежащих разработке в магистерской диссертации вопросов:

- 1 Изучение процессов получения антибиотиков.
- 2 Рассмотрение процесса иммобилизации для получения антибиотиков в биореакторе.
- 3 Оптимизация процессов получения антибиотиков в суспензионной форме.
- 4 Оптимизация условий иммобилизации микроорганизмов в криогели.
- 5 Оценка эффективности применения иммобилизованных микроорганизмов в  
качестве 3D-биореактора для получения антибиотиков.

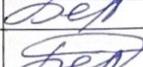
Перечень графического материала: в работе представлено 10 рисунков, 5 таблиц и 8  
графиков.

Рекомендуемая основная литература: состоит из 118 наименований.

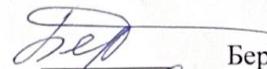
**ГРАФИК**  
подготовки магистерской диссертации

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Введение. Обзор литературы	16.12.2024	выполнено
Материал и методика исследований	14.02.2025	выполнено
Результаты исследований. Заключение и выводы	19.05.2025	выполнено

**Подпись**  
консультантов и нормоконтролера на законченную магистерскую диссертацию с  
указанием относящихся к ним разделов диссертации

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Магистерская диссертация	Берилло Д.А., профессор, доктор Ph.D.	17.06.2025	
Норм контролёр	Берилло Д.А., профессор, доктор Ph.D.	17.06.2025	

Научный руководитель, профессор  
КХиБИ, доктор Ph.D.



Берилло Д.А.

Задание принял к исполнению обучающийся



Турганова М.А.

Дата 17.06.2025

## **АННОТАЦИЯ**

Магистерская исследовательская работа на тему: “Разработка 3D биореактора с иммобилизованными микроорганизмами для производства антибиотиков” включает 10 рисунков, 5 таблиц и 8 графиков, а обзор литературы включает 118 источников научной литературы

**Цель исследования.** Разработка 3D-биореактора с иммобилизованными микроорганизмами для производства антибиотиков.

Исследование подчеркивает важность иммобилизации как процесса биокатализа, которая способствует повышению эффективности, селективности и стабильности микроорганизмов, а задача создания устойчивых систем подчеркивает важность применения подобных биореакторов.

Полученные результаты в исследовании поддерживают использование процесса иммобилизации в качестве основы для биоректора обеспечивающего благоприятные условия для роста и развития микроорганизмов, что в дальнейшем способствует повышению эффективности производства антибиотиков, применяемых в борьбе с инфекционными и бактериальными заболеваниями.

Представленная диссертация включает как теоретические исследования, подкрепленные обширным обзором научной литературы, так и экспериментальными исследованиями, основанных на анализе количества клеток в процессе получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) с использованием бактерии *Escherichia coli*, а также реализована иммобилизация микроорганизмов, результаты представлены в оформленных в тексте таблицах и рисунках, подчеркивающих значимость выбранных методов для разработки 3D-биореактора, предназначенного для эффективного производства антибиотиков. Ключевые слова: микроорганизмы, антибиотики, иммобилизация, криогели, супензия.

## **АНДАТПА**

Магистрлік зерттеу жұмысы «Иммобилизацияланған микроорганизмдермен антибиотиктер өндіруге арналған 3D-биореакторды әзірлеу» тақырыбында жүргізілді. Жұмыс 10 суреттен, 5 кестеден және 8 графиктен тұрады. Әдеби шолу 118 ғылыми дереккөзді қамтиды.

Зерттеу мақсаты: Иммобилизацияланған микроорганизмдермен антибиотиктер өндіруге арналған 3D-биореакторды әзірлеу. Зерттеу барысында биокатализ процесі ретінде иммобилизацияның маңыздылығы атап өтіледі.

Бұл әдіс микроорганизмдердің тиімділігін, селективтілігін және тұрақтылығын арттыруға ықпал етеді. Тұрақты жүйелерді құру міндеті мұндай биореакторларды қолданудың өзектілігін айқындайды.

Алынған нәтижелер иммобилизация процесін биореактордың негізі ретінде қолданудың тиімділігін растайды, ол микроорганизмдердің өсуі мен дамуы үшін қолайлы жағдай туғызып, инфекциялық және бактериялық ауруларға қарсы қолданылатын антибиотиктер өндірісін жақсартуға ықпал етеді.

Бұл диссертация кең көлемдегі әдеби шолу арқылы расталған теориялық зерттеулерді және *Escherichia coli* бактериясын пайдалана отырып 6-аминопенициллан қышқылын (6-АПК) алу үдерісінде жасушалар санын талдауга, микроорганизмдерді иммобилизациялауға негізделген эксперименттік зерттеулерді қамтиды. Нәтижелер мәтінге енгізілген кестелер мен суреттер түрінде ұсынылып, таңдалған әдістердің антибиотиктердің тиімді өндіруге арналған 3D-биореакторды әзірлеудегі маңыздылығын көрсетеді. Түйінді сөздер: микроорганизмдер, антибиотиктер, иммобилизация, криогельдер, суспензия.

## ANNOTATION

Master's research work titled "Development of a 3D Bioreactor with Immobilized Microorganisms for Antibiotic Production" includes 10 figures, 5 tables, and 8 graphs. The literature review comprises 118 scientific sources.

**Research Objective:** To develop a 3D bioreactor with immobilized microorganisms for the production of antibiotics.

The study emphasizes the importance of immobilization as a biocatalysis process that enhances the efficiency, selectivity, and stability of microorganisms. The task of creating robust systems highlights the relevance of applying such bioreactors.

The obtained results support the use of immobilization as a foundation for bioreactors, providing favorable conditions for microbial growth and development, thereby contributing to improved antibiotic production used in the fight against infectious and bacterial diseases.

This dissertation combines theoretical research supported by an extensive literature review with experimental studies focused on analyzing cell count during the production of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) using *Escherichia coli*, along with the implementation of microorganism immobilization. The results are presented through tables and figures in the text, emphasizing the significance of the applied methods for the development of an effective 3D bioreactor for antibiotic production. **Keywords:** microorganisms, antibiotics, immobilization, cryogels, suspension.

## СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	9
1.	Обзор литературы	10
1.1	Микроорганизмы продуценты антибиотиков	10
1.2	Технология получения антибиотиков	15
1.3	Примеры получения различных видов антибиотиков	16
1.4	Процессы иммобилизации микроорганизмов	18
1.5	Иммобилизация микроорганизмов в гели	24
1.6	Преимущества иммобилизации перед супензионными системами	26
1.7	Биореактор, как основной аппарат для получения антибиотиков	27
2	Объект, материалы и методика исследования	28
2.1	Объект исследования	28
2.2	Материалы исследования	28
2.2.1	Приборы и оборудования	28
2.2.2	Питательные среды	28
2.3	Методы исследования	30
2.3.1	Посев микроорганизмов на твердые питательные среды	31
2.3.2	Посев микроорганизмов на жидкие питательные среды	31
2.3.3	Культивирование микроорганизмов	31
2.3.5	Определение количества клеток в 6-АПК с использованием бактерии <i>Escherichia coli</i> .	31
3	Результаты исследования	32
3.1	Подготовка к исследованию	32
3.2	Проведение анализа конвертации и активности <i>Escherichia coli</i> в 6-АПК в супензии	32
3.2.5	Результаты измерений активности <i>Escherichia coli</i> 6-АПК в супензии	34
3.3	Проведение анализа иммобилизации <i>Escherichia coli</i> в 6-АПК в гелях	36
3.3.7	Результаты измерений иммобилизации <i>Escherichia coli</i> в 6-АПК в криогелях	37
3.3.8	Результаты измерений иммобилизации <i>Escherichia coli</i> в 6-АПК в гидрогелях	38
3.3.9	Эффективность и устойчивость иммобилизации <i>Escherichia coli</i>	40
3.3.10	Сравнительный анализ с литературными данными	45
	Заключение	47
	Список использованной литературы	49

## **ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность работы.** Разработка 3D-биореактора, является одной из технологий способствующая использованию процесса иммобилизации в качестве объемной матрицы для более эффективного процесса производства антибиотиков и равномерного распределения микроорганизмов. Использование процесса иммобилизации представляет стабильный и продуктивный процесс, а также позволяет обеспечить наиболее благоприятные условия для их роста и развития, способствующие улучшению производства антибиотиков для борьбы с инфекционными и бактериальными заболеваниями.

**Цель.** Разработка 3D-биореактора с иммобилизованными микроорганизмами для производства антибиотиков.

**Задачи работы:**

1. Рассмотрение процесса иммобилизации для получения антибиотиков в биореакторе.
2. Оптимизация получения антибиотиков в суспензионной форме.
3. Оптимизация условий иммобилизации микроорганизмов в криогели.
4. Оценка эффективности применения иммобилизованных микроорганизмов в качестве 3D-биореактора для получения антибиотиков.

**Научное и практическое значение.** Разработка и экспериментальная проверка 3D-биореактора с использованием иммобилизованных микроорганизмов расширяют представления о возможности создания устойчивых и эффективных биосистем для синтеза биоактивных соединений. Научная новизна заключается в применении трехмерных структур и современных криогелей для создания оптимальных условий, что открывает новые перспективы в производстве антибиотиков. Результаты исследования могут быть применены при разработке и внедрении новых технологических решений в фармацевтической промышленности, а реализация данной разработки способствует снижению затрат на производство, улучшению качества конечного продукта и обеспечению устойчивого биотехнологического процесса в промышленном масштабе. Также полученные данные и методы могут быть адаптированы для производства других биологически активных веществ.

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертационная работа подготовлена на 48 страницах компьютерного текста, состоит из трех разделов – пояснений, основной части и списка литературы. В работе отражены теоретические исследования с использованием 118 литературных источников, экспериментальные исследования интерпретированы в 5 таблицах и 10 рисунках.

## **1. Обзор литературы**

### **1.1 Микроорганизмы продуценты антибиотиков**

Антибиотики представляют собой вещества биологического происхождения, являющиеся вредными для других живых организмов. Микроорганизмы, вырабатывающие антибиотики и полезные для профилактики, либо лечения заболеваний, относятся бактерии и грибы, а именно микромицеты [1]. Антибиотики представляют собой натуральный продукт, который получен из почвенных организмов, а именно при использовании актинобактерий и грибов и ложатся в основу примерно двух третей противомикробных препаратов, которые в свою очередь были открыты в золотой период открытия и расцвета антибиотиков [2].

В 1970 году возросла сложность в культивирования специфичных видов микроорганизмов, весомый вклад внесли разработанные сульфаниламидные и пенициллиновые антибиотики, но последующее использование антибиотиков вызвало серьезную проблему, которая связана с бактериальными патогенами, они приходятся устойчивыми к антибиотикам и к новым выпускающимся лекарствам [3].

#### **Классификация антибиотиков:**

- β-лактамы, макролиды, тетрациклины,
- хинолоны, аминогликозиды [4]
- карбапенемы, гликопептиды [5]

Далее в таблице 1 представлен список штаммов – продуцентов антибиотиков.

**Таблица 1 - Штаммы-продуценты антибиотиков**

<b>Антибиотик</b>	<b>Штамм-продуцент</b>
Пенициллины	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Цефалоспорины	<i>Acremonium chrysogenum</i>
Гризофульвин	<i>P. Griseofulvum, Aspergillus niger, Penicillium albidum, Aspergillus nidulans</i> [6]
Тетрациклины, хлортетрациклин, стрептомицин, эритромицин,	<i>Streptomyces spp.</i> [7]

хлорамфеникол	
Трихоцетин	<i>Trichotecium roseum</i>
Фузидиевая кислота	<i>Fusarium coccineum</i>
Циклоспорины	<i>Beauveria nivea, Trichoderma polyspora</i>
Кумарин	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus u Aspergillus niger</i> [8] [9]
Фриулимицин	<i>Actinoplanes friuliensis</i>
Амикумацин А	<i>Bacillus pumillus</i> [10]
Субтилин, Сурфактин, Микобациллин	<i>B. Subtilis</i>
Бацитрацин	<i>B. Licheniformis</i>
Полимиксин	<i>B. Polymyxa</i>
Гентамицин	<i>Micromonospora spp.</i> [11]
Актиномицин	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Блеомицин	<i>Streptomyces verticilllus</i>
Даптомицин	<i>Streptomyces roseosporus</i>
Грамицидин С, Тироцидин	<i>Bacillus brevis</i>
Пристинамицин I	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>

Хаммед Абиодун Дуроджайе и Джорджия Агу из Нигерии исследовали виды штаммов *Streptomyces somaliensis*, *Streptomyces anulatus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus subtilis*, выделенных из выделенных почв, были исследованы на выделение антибиотиков. Исследование проводили с агаром Мюллера-Хинтона. В результате, минимальные ингибирующие концентрации (МИК) неочищенных экстрактов соответствовала 50% и выше, а также обнаружено, что все патогенные бактерии ингибируются бактериями *Bacillus megaterium* и *Streptomyces somaliensis* с промежутком распространения 12.94% и 18,82% соответственно, тогда как *S. Anulatus* и *B. Subtilis* не смогли ингибировать *Proteus vulgaris* *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* [13]. Второе рассмотренное исследование антимикробного потенциала посвящено изучению экстрактов грибов, выделенных из твердых отходов, которые подвергались вторичному скринингу с помощью диффузационного анализа на агаре против тест-микроорганизмов. Использованный штамм гриба *Aspergillus* SSR-16 идентифицирован с помощью гена последовательности 18S рДНК, а неочищенные экстракты SSR-16 исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). В результате, они проявляли большую антибактериальную активность против всех тестируемых бактерий с зоной ингибирования 2,2 см против *E.coli* и *P.aeruginosa*, 2,0 см против *C.albicans*, 1,8 см против *B.subtilis* [14]. Образцы почвы были собраны в пяти разных местах главного кампуса Университета Ахмаду Белло, Нигерия для выделения грибов продуцирующих антибиотики. Объекты исследования: *Aspergillus niger* (Кумарин, Гризофульвин), *Aspergillus fumigatus* (Кумарин), *Aspergillus sp* (аспергеллин, цитринин), *Penicillium sp* (Пенициллин). Метод, применяемый в исследовании, ориентируется технику серийных разведений и используемая питательная среда: агар Сабуро (SDA). В конечном результате выявлено, что *Aspergillus niger* ингибирует 9 мм; 5 мм; 6 мм по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, тогда как *Aspergillus fumigatus* имеет зоны ингибирования 5 мм в отношении *Escherichia coli*. А если рассматривать *Klebsiella pneumoniae*, *Penicillium sp*, которые имеют промежуток зон размером 10 мм; 7 мм; 6 мм против *Staphylococcus aureus*, отсюда видно, что грибы, которые продуцируют антибиотики могут использоваться фармацевтическими компаниями для производства антибиотиков из местных источников [15].

**Таблица 2 – Химическая природа и спектр действия антибиотиков**

Антибиотик	Продуцент	Химическая природа	Спектр действия

Фриулимицин	<i>Actinoplanes friuliensis</i>	C <sub>59</sub> H <sub>94</sub> N <sub>14</sub> O <sub>19</sub>	Стафилококки, пневмококки и грамотрицательные бактерии
Фосфомицин	<i>Streptomyces fradiae</i>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> P	Грамположительные микроорганизмы: <i>Enterococcus spp.</i> , Грамотрицательные микроорганизмы: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i>
Неомицин	<i>Streptomyces fradiae</i>	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub>	Стафилококки, пневмококки и грамотрицательные бактерии
Актиномицин Д	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	C <sub>62</sub> H <sub>86</sub> N <sub>12</sub> O <sub>16</sub>	Грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии, рак.
Эндофеназин А	<i>Streptomyces anulatus</i>	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NS	Грамположительные бактерии, мицелиальные грибы, активность в отношении маниоки мелкой
Эндофеназин Б	<i>Streptomyces anulatus</i>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Грамположительные микроорганизмы, мицелиальные грибы
Тубермицин В	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>A.flavus</i> , <i>C.albicans</i> и <i>T. rubrum</i> , грибы: <i>F.oxy sporum</i> и <i>R. solani</i>

Эпокарбазолин Б	<i>Streptomyces anulatus</i>	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	5-липоксигеназа
Бацилизин	<i>Bacillus subtilis</i>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> H <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Широкий спектр бактерий, <i>Candida albicans</i> .
Субтилин	<i>Bacillus subtilis</i>	C <sub>148</sub> H <sub>227</sub> N <sub>39</sub> O <sub>38</sub> S <sub>5</sub>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Candida spp.</i>
Бацилломицин Д	<i>Bacillus subtilis</i>	C <sub>45</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub>	Различные грибы, <i>M. globosa</i>
Ризоктицин	<i>Bacillus subtilis</i>	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> P	Различные грибы, <i>Rhizoctonia solani</i>
Амикумацин А	<i>Bacillus pumillus</i>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	<i>S.aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>C.krusei</i> , <i>Cr.neoformis</i> и <i>Prototheca spp.</i>
Грамицидин С	<i>Bacillus brevis</i>	C <sub>60</sub> H <sub>92</sub> N <sub>12</sub> O <sub>10</sub>	<i>Streptococcus spp.</i> : <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , anaerobic bacteria

Тиротрицин	<i>Bacillus brevis</i>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub>	Грамположительные микроорганизмы и спирохеты
Альвейн	<i>Bacillus alvei</i>	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N	Микобактерия туберкулеза, <i>Bacillus sibiriae</i>
Пенициллинацилаза	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> KN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии
Пенициллин G-ацилазы	<i>Escherichia coli</i>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> KN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии
Альдгамицин	<i>Streptomyces lavendulae</i>	C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> O <sub>15</sub>	<i>S. aureus.</i>

## 1.2 Технология получения антибиотиков:

1. *Предферментационный процесс:* на данном этапе происходит подготовка питательной среды и посевного материала с использованием жидких сред, агарового или сыпучего субстрата. Далее проводят стерилизацию питательных сред [16]. Параметры процесса включает значение *pH-среды*, которое чаще всего нейтральное. Следующим параметром является *температура*, например, для микромицетов равна 25–26°C, а актиномицеты активно растут при температуре 27–29°C [17].
2. *Процесс ферментации.* В данном этапе получения антибиотиков применяют *методы культивирования*, которые делятся на 2 вида: поверхностное и глубинное. В качестве аппаратов для промешивания используют такое оборудование как биореактор (ферментер), которые представляют собой герметически закрытые емкости, снабжен приспособлениями для аэрации и перемешивания культуры, поддержания необходимой температуры, а также контрольно-измерительными приборами [18].

3. *Постферментационный (завершающий) процесс.* Выделение антибиотиков происходит с использованием таких процессов как фильтрация или центрифугирование, полученный антибиотик экстрагируют [19]. *Очистку антибиотиков и получение готового продукта* проводят с помощью осаждения и процесса сорбции, а после придания лекарственной формы, где также соблюдаются все санитарные нормы получаем продукт с заданными свойствами [20].

### 1.3 Примеры получения различных видов антибиотиков

Антибиотики бактериального происхождения можно разделить на группы: тиротрицин, грамицидины, полимиксины, бацитрацины, низин и др. Антибиотики тиротрицин и грамицидин С (S) получены из *Bacillus brevis*. Условия образования грамицидина С. Получен грамицидин С. в течение длительного времени на средах, содержащих гидролизат мяса или на 10% гидролизате дрожжей, при поверхностном культивировании организма и температуре около 40 °С. В вышеуказанных условиях образуется до 2000 мкг/мл грамицидина С [21]. Глубокое культивирование продуцента *Bacillus brevis* на синтетических средах для получения грамицидина С в 10-литровом ферментере проводили в течение 42 часов в условиях роста с ограничением кислорода. В результате была получена культура, содержащая 38 г/л биомассы и 5,28 г/л грамицидина С, который содержит примесей 8,44% [22]. Одним из способов получения антибиотика амикумацина А, является использование бактерии *Bacillus pumilus* и его культивирование при 28°С в среде SYC, далее проводят процесс 10 минутного центрифугирования клеток по количеству равные 10 000 g, а в результате работы получают инактивированный аналог Ами 5, который не ингибирует клетки вплоть до концентрации 50 мкг/мл, которая возрастает [23].

Антибактериальный пептид субтилозин А является одним бактериоцинов у *B. subtilis*, выделенных из растительного материала *Passiflora edulis*. Штамм культивировали на чашках Петри с питательным агаром GRM или крахмальным агаром при 30°С и 36°С в течение 24 часов. Культуры проверяли с использованием стандарта бактериальной мутности МакФарланда, активность составляла 102400 ЕД/мл и выделенный пептид был активен в отношении: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*, что делает его привлекательным для использования. как доступный природным антибиотиком [24].

В настоящее время субтилозин можно получать с использованием среды MRS животных в качестве источника углерода, двух животных пептонов. Увеличение количества клеток с увеличением активности субтилозина происходило при выращивании клеток в AF-MRS с добавлением 0,4% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 0,02% MgSO<sub>4</sub>. Продукция субтилозина увеличивалась с 30 до 320 Ед/мл при перемешивании на орбитальном шейкере со скоростью 300 об/мин [25]. Субтилизины (EC3.4.21.62) представляют собой протеазы,

секретируемые *Bacillus subtilis* (МТСС 441). Установлено, что оптимальные условия роста для *B. subtilis* МТСС 441 составляют 37°C и pH 7,5. Установлено, что оптимальным составом среды для продукции субтилизина является дрожжевой экстракт 6,75 г/л, пептон 4,41 г/л, хлорид натрия 6,08 г/л, казеин 10,75 г/л с глюкозой 5 г/л. Прогнозируемый и наблюдаемый ответ составил 181 Ед/мг (при желательности 0,87) и 185,7 Ед/мг соответственно [26]. Дипептидный антибиотик бацилизин активен против широкого спектра бактерий [27]. Бацилизин, дипептидный антибиотик, продуцируемый видами *Bacillus*, активен в отношении широкого спектра микроорганизмов, а также против *Candida albicans*. Благодаря простой структуре и превосходному механизму действия [28]. Другим примером является использование в качестве объекта штаммы *P. Chrysogenum*, которые выращивали при 27°C (120 об/мин) выращивали на жидкой и твердой питательной среде, после использовали 7–дневные споры для получения антибиотиков [29].

Для производства антибиотиков, а именно пенициллина G и пенициллина V, необходимо поддержание температур равный 25–27 °C, pH=6,5, а скорость аэрации должна находиться в промежутке 0,5–1,0 сам процесс проводится погружным методом, а в качестве оборудования используется ферментер [30].

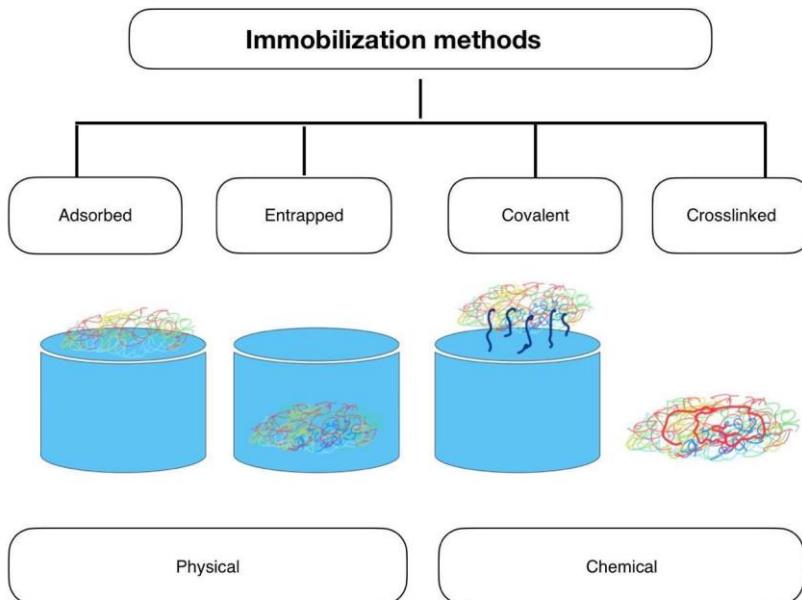
Ферментация цефалоспорина С из штамма высокоурожайных штаммов *A. chrysogenum* 20–25 г/л, используются метод крупномасштабной периодической ферментации подпитываются углеродом в фазе роста, pH = 6,2 - 7.0, температура 24 и 28°C. Стадия артроспор при использовании нефти в качестве субстрата способствует замедлению роста, а кислород приводит к быстрому производству цефалоспоринов, что способствует получению цефалоспоринов, которые относятся к β-лактамным антибиотикам [31]. Для производства цефалоспорина производят белковое удаление, проводят очистку и для получения порошка засушивают, после проведенных манипуляций выход антибиотика цефалоспорина будет составлять более 90% [32]. Для получения цефазолина натрия, добавляли 7-АСА, полученную смесь нагревали до температуры 70–72°C, pH = 4,8, затем охлаждали промешивание проводили в течение 3 часов, после чего добавляли раствор цефазолина температура составляла 10–15°C, а выход уже высущенного продукта равна 98% [33]. Метод получения тетрациклина и хлортетрациклина проводится с помощью ферментации и использованием актиномицета вида *Streptomyces aureofaciens* с использованием палладия, температура приравнивается 100°C [34]. Промежуточным продуктом β-лактамных антибиотиков (пенициллины и цефалоспорины), является 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК), которая стала одной из успешных способов производства лекарственные средства и в лечении инфекционных заболеваний [35]. Чистую (кристаллическую) 6-аминопенициллановую кислоту (6-АПК) получает путем приготовления светлого концентрата, путем адсорбции или же элюирования проводят процесс очистки, что в свою очередь показали наиболее эффективный результат [36]. Массоперенос

пенициллина G для ферментативного получения 6-аминопенициллановой кислоты с использованием биореактора с перемешивающим слоем иммобилизованной пенициллинамида. Значения массовых потоков существенно зависят от скорости внутренней диффузии и скорости ферментативного превращения субстрата. Эти кумулятивные влияния привели к появлению ферментативно неактивной области вблизи центра частицы, ее величина варьируется от 0 до 9,2% от общего объема частиц.[37]. Для 6-аминопенициллановой кислоты (6-APA) применена нанофильтрация из биоконвертированного раствора пенициллина. 6-APA в растворе была сконцентрирована с 0,211 моль/л до 0,746 моль/л с помощью нанофильтрации. Выход 6-APA составил более 98%. Соли, содержащиеся в маточном растворе, такие как  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и  $\text{KCl}$ , можно удалить, позволив им проникнуть через мембрану [38]. Пенициллин G-амида (PGA) была получена путем рекомбинантной экспрессии в *Escherichia coli*. Клетки выращивались в синтетической минимальной среде в биореакторе (рабочий объем 5 л), а продукция PGA была вызвана повторным добавлением индуктора рамнозы, который также служил источником углерода. Выход ферментации составил около 4500 единиц активности PGA на литр культуральной среды [39].

#### 1.4 Процессы иммобилизации микроорганизмов

Иммобилизацией называют процесс, при котором происходит ограничение подвижности клеток, ферментов в пространстве, в качестве носителя применяют полимеры, например, целлюлоза или полиакриламид, а полученную систему в виде «клетка-носитель» называют иммобилизованным биокатализатором [40]. Существуют различные пути иммобилизации клеток микроорганизмов и их условно можно разделить на три типа, на рисунке 1 также представлены существующие методы иммобилизации микроорганизмов:

- химические (связывание биофункциональными реагентами);
- механические (включения в гель, мембрану);
- физические (адсорбция, агрегирование) [41].



**Рисунок 1 - Классификация методов иммобилизации микроорганизмов**

Если рассматривать иммобилизацию целых клеток, то их методы будут представлять следующее: ковалентное связывание на твердой поверхности (называют также адсорбционными методами), далее это процесс захвата клеток в матрицу пористого типа, еще представляется как процесс сшивания клеток или полимеров. При адсорбции образуется биопленка, в которой микроорганизмы заключены в матрицу внеклеточных полимеров. Для адсорбции используют специальные материалы, которые представляют собой неорганические (пески, силикаты, фосфаты, губка); органические (хитозан, древесина, коллаген, шерсть, шелк); искусственные углеродсодержащие / неорганические (силикагель, графит, оксиды, древесный уголь, синтетические полимеры и тд.) [42]. Метод иммобилизации Пенициллин-Г-ацилазы (PGA) на материалах-носителях с использованием магнитных наночастицы Ni 0,3 Mg 0,4 Zn 0,3 Fe<sub>2</sub>O из которого получают гетеродимерный белок для производства полусинтетического пенициллина. Количество иммобилизованного и активность PGA в супернатанте определяли методами Кумасси и Брэдфорда достигший показателя 7121,00 Ед/г при оптимальном pH 8, и температуре 45°C, который проявлял более высокую стабильность к изменениям pH и температуры [43]. Иммобилизованная пенициллинацилаза (ECPVA) была получена путем ковалентного связывания пенициллинацилазы из *S.lavendulae* на Eupergit C. Иммобилизованный фермент показал оптимальное значение pH 9,5–10,5 и оптимальную температуру 60 °C, тогда как его растворимый аналог показал то же оптимальное значение pH и более низкую оптимальную температуру 50 °C [44]. Ацилаза пенициллина V (PVA) находит применение для получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), путем гидролиза 2% Pen V с использованием целых клеток *Escherichia coli* и в дальнейшем

иммобилизованных в гранулах Lentikats, что в свою очередь улучшило хранение целых клеток с активностью 90–100%, а эффективность после 3 месяцев [45]. Процесс иммобилизации метаболитов *Bacillus subtilis*, а именно 72 часа инокулят, приготовленный на триптико-соевом бульоне (рН 7,3) использовали в концентрации 10% (об./об.), добавляли в производственную среду (синтетическая среда ) и инкубировали в течение 24 часов. Клетки центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 30 минут, промывали, затем суспенсировали и смешивали с полиакриламидным раствором, а далее иммобилизованные клетки разрезали на небольшие блоки. Активность пробы проверяли через 0 часов и через 4 часов инкубации с использованием *M. luteus* в качестве тест-организма был почти одинаковый, то есть 18 мм и 19 мм, соответственно [46]. Метод синтеза амоксициллина путем иммобилизации фермента амоксициллинсина на носителе аминоэпоксидного типа. Смешивание иммобилизованного фермента, 6-аминопенициллановой кислоты и производного D-р-гидроксифенилглицина в воде, регулирование рН путем добавления растворов соляной кислоты и гидроксида натрия для достижения оптимальных режимных условий, а также контроль температуры и времени для обеспечения эффективного процесса потока. Завершение режима при использовании остаточной концентрации 6-аминопенициллановой кислоты в диапазоне 0-2 мг/мл [47]. Ферменты, выделенные из прокариотического микроорганизма *S. clavuligerus*, *S. cattleya* и *S. lipmanii*, производящего  $\beta$ -лактамы, иммобилизуют на носителе для получения деацетоксицефалоспорина из L- $\alpha$ -аминоадипил-L-цистеинил-D-валина. Иммобилизованный ферментный реагент включает эпимеразу, циклазу и фермент удлинения цикла. Ферменты иммобилизуют на диэтиламиноэтил-ино-ино-ионообменной хроматографической смоле [48]. Иммобилизация пенициллин-G-ацилазы на винилсульфоновой агарозе оказалась успешной благодаря повышенной ионной силе, что позволяет создать стабильный и активный биокатализатор. Оптимальные условия иммобилизации: 1 М сульфата натрия при рН=7, инкубацию при рН =10 в присутствии глицерина и фенилуксусной кислоты, а также блокирование глицином или этаноламином. Свободные биокатализаторы стабильны, что компенсируется стабильностью глиоксил- ПГК, но обеспечивают чуть менее 55% первичной активности [49]. Бёрнер и др. впервые использовали активированный альдегидными группами полиэтиленимин (ПЭИ-ал) и поливиниловый спирт (ПВС-ал) в качестве сшивящих агентов для иммобилизации *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Полученные криогели сохраняли жизнеспособность клеток и продемонстрировали и продукция растворителя была в 2,7 раза выше в иммобилизованных клетках по сравнению со свободными клетками, а криогель можно было использовать 3-5 раз с частично или полностью свежей средой, достигая максимальной концентрации бутанола в среде 18,2 г/л и выхода 0,41 ( г/г) за цикл [50]. Затем этот подход сшивания с помощью PEI-al и PVA-al был применен для приготовления криогеля и жизнеспособность клеток после ковалентного

шивания была подтверждена с помощью МТТ-анализа, поскольку анализы Life-dead непрактичны для количественной оценки клеток, однако этот метод широко применяется для иллюстрации общей картины иммобилизованных клеток [51]. В исследовании сшивались молочнокислые бактерии с использованием глутарового альдегида, окисленного декстрана и активированного полиэтиленамина/модифицированного поливинилового спирта (ПЭИ/ПВС), а также использовался монолит в качестве реактора непрерывного и бокового действия, в котором получали 19,7 г/л 3-гидроксипропионовый альдегид (ЗНРА) со скоростью 9,1 г/л., выход составил 77 мол.% [52]. Гидрогелевые мембранные из поливинилового спирта с иммобилизованными клетками *E. coli* (ЕСI-ПВАГМ) готовили из 10% водного раствора ПВС. Нагруженная бактериями пленка имела высокую водостойкость, прочность на разрыв составляла 0,66-0,90 МПа, удлинение - 300-390 %, набухание - 330-800 %. Эффективное бактериальное содержание ЕСI-ПВАГМ составило  $2,375 \times 10^9$ - $10^{10}$  КОЕ/г (сухой вес), что не влияет на исходную кристаллическую структуру ПВАГМ. Биопленка имеет структуру пор 0,2-1,0 мкм, клетки непрерывно культивировали в течение 20 дней с обновлением среды 2 раза в день, эффективность роста составила около 91% после 40 циклов [53]. Описаны процессы иммобилизации лизоцима и систем иммобилизации, а также эффективность удаления бактерий из полигЕМА-ЭГ криогелей. Максимальная загрузка лизоцима = 43,56 мг/г криогеля. Для определения бактерицидного действия иммобилизованного лизоцима использовали бактерии *Micrococcus lysodeikticus* [54]. *Zaushitsyna O.* с коллегами исследовали устойчивость при хранении живых клеток, сшитых в структуре криогелей. Активность криоПЭИ-ал и ПВС-ал снижается незначительно, сохраняя почти 80% исходной активности фермента через 30 дней. Клетки, сшитые с наименьшим (0,45 %) и наибольшим (1,3 %) количеством полимера, проявляли практически одинаковую ферментативную активность. Установлено, что синтетические полимеры мягко действуют на клетки и количество полимера не влияет на метаболическую активность [55]. Показана иммобилизация на криогелях ПВА *Paenibacillus phytohabitans* KG5 и *Cellulosimicrobium cellulans* KG3, при которой удельная активность ксантаназы и вспомогательных ферментов, участвующих в деполимеризации ксантанов, составляет: ксантаназа -  $19,6 \pm 0,6$  Ед/г,  $\beta$ -глюказидаза -  $3,4 \pm 0,1$  Ед/г,  $\alpha$ -маннозидаза -  $68,0 \pm 2,0$  Ед/г,  $\beta$ -маннозидаза -  $0,40 \pm 0,01$  Ед/г; Эндоглюканаза -  $4,0 \pm 0,1$  Ед/г; и ксантанлиаза -  $2,20 \pm 0,07$  Ед/мг. Затем биокатализатор смог завершить деполимеризацию ксантана за 40 циклов без потери активности или деградации матрицы [56]. Сонг и др. изучали поливинилалкогольных криогелей (PVA-KG), параметры которых были улучшены, а механическая прочность PVA-KG была замечательной с точки зрения высокого трения, концентрация ПВС в PVA-KG составляла 10%, Тол-SSID составляла 88,3% при двух циклов замораживания-оттаивания (FTC) и предел прочности. Предел прочности пористого материала составил 0,59 кПа; Для поддержания дыхательной активности добавляли 5% глицерин,

тогда активность иммобилизованных нитрифицирующих бактерий находилась на уровне 0,097 мг-О<sub>2</sub>/г-ОКЦ-мин, а выживаемость - 88,6% [57]. *Ganoderma lucidum* ВССМ 31549, иммобилизованная на пенополиуретане (PUF), показала высокую эффективность при непрерывном производстве экзополисахарида EPS при многократной периодической ферментации (RBF). Семь партий ферментировали последовательно во встряхиваемых колбах при 80%-ном соотношении бульона в течение 55 дней и на 13-й день. Продуктивность иммобилизованной культуры составила 0,045 г/л в первый день и была выше, чем в свободно плавающей культуре (0,029 г/л в первый день) [58]. Выживаемость иммобилизованных и выпущенных спор при изготовлении ловушек путем суспенсирования спор в полимере и замораживания их при -18°C в течение 24 часов была одинаковой, что свидетельствует об отсутствии токсического действия полимера и воздействии низких температур не повреждающих споровую структуру; истечение спор через 24 часа было различным в разных случаях иммобилизации, например, наименьшая составляла 15%, наибольшая - 12%, а через 96 часов наименьшая степень иммобилизации спор составляла 10%, затем 15% и наибольшая - 12%, который сохранялся до 120 часов [59]. Диски криогеля поли(2-гидроксиэтилметакрилата) [Рс-РНЕМА] были приготовлены с использованием нитчатого гриба *Penicillium chrysogenum* в качестве биосорбента Рс-РНЕМА, а 200 гибридных криогелей имели эффективность биосорбции более 82,8% для Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> при концентрациях тяжелых металлов. В диапазоне от 0,1 до 2,5 мг/л [60].

Мономер аллилглицидилового эфира с акриламидом использовали для ковалентной инкапсуляции посредством криополимеризации и иммобилизации  $\alpha$ -амилазы из *Aspergillus oryzae*. Соответственно, максимальный гидролиз крахмала достигался при pH 5,0, концентрации иммобилизованного фермента амилазы/криогель 111 мг, концентрации раствора крахмала 45 г/л и температуре 35°C. При этом иммобилизованный фермент показал степень конверсии 68,2-97,37% в зависимости от pH и температуры [61]. Биокатализаторы иммобилизуют на клетках *Rhizopus oryzae*, которые инкапсулируют в криогель поливинилового спирта для производства L(+)-молочной кислоты (МК) из гидролизата глюкозы и крахмала с выходами 94% и 78% соответственно. Наибольшая производительность процесса (до 173 г/л) достигнута в полустанционарных условиях. Картофельный крахмал (5-70 г/л) также превращался в молочную кислоту с помощью иммобилизованного R. Oryzae, а также затем была продемонстрирована возможность длительной эксплуатации (около 480 часов) иммобилизованных биокатализаторов [62].

Грибы и бактерии использовали в виде клеток для иммобилизации на криогелях (PVA) и через 200 часов количество накопленной молочной кислоты (LA) было одинаковым как для грибных ( $920 \pm 5$  г), так и для бактериальных ( $895 \pm 5$  г) биокатализаторов, а конверсия субстрата в продукт грибного биокатализатора была в два раза выше (0,92 г LA на г глюкозы),

чем у бактериального. Период полураспада иммобилизованного грибного биокатализатора составил 80 суток (96 рабочих циклов), что в 10 раз превышает период полураспада бактериального биокатализатора [63]. Иммобилизация мицелия *Aspergillus fumigatus* и *Alternaria tenuissima* для улучшения их способности продуцировать паклитаксел с использованием пяти различных удерживающих сред: альгината кальция, агар-агара, Na-СМС, желатина и аравийской камеди. Гелевые шарики альгината кальция оказались наиболее проводящим и подходящим удерживающим носителем для максимизации производительности. В результате иммобилизованный мицелий соответствующих мутантов (694,67 и 388,65 мкг/л) оказался перспективным с точки зрения получения продукта [64]. Рассмотрим процесс иммобилизации актиномицета *Streptomyces clavuligerus*, который сшивали с помощью диальдегидов, такими как глиоксалия, глутардиальдегида. В результате, после иммобилизации клетки продуцировали цефалоспорины в течение 96 часов и соответствовали свободным клеткам [65]. Клетки *Bacillus subtilis* иммобилизовали в шариках криогеля ПВА методом замораживания-оттаивания. Условия были оптимизированы для обеспечения как высокой термической, так и механической стабильности. Установлено, что споры бактерий, альгинат натрия и бактериальная целлюлоза ускоряют затвердевание криогелей и изменяют их пористость [66]. Гидрофобизация криогелей поливинилового спирта (ПВС) на основе биосurfактантов для иммобилизации углеводородокисляющих бактерий, тогда полученные гидрофобизированные гранулы криогеля ПВС объемом 5 мкл содержали достаточно 6500 жизнеспособных бактериальных клеток на осадок. В результате при использовании иммобилизованного биокатализатора эффективность окисления н-гексадекана составила 51% после 10-дневной инкубации [67]. Иммобилизация пенициллин-G-ацилазы (ПГА) хитозаном с использованием клеток *Escherichia coli*, для этого вначале клетки пермеабилизировали бромидом N-цетил-N,N,N- trimетиламмония (ЦТАБ) (0,1%, 45 мин), а затем иммобилизовали сшиваящим агентом 5% глутаральдегидом и использовали в качестве матрицы 3% хитозан. В результате иммобилизация на хитозане снизила конверсию (13%), а пермеабилизация клеток вызвала увеличение конверсии пенициллин-G-ацилазы (PGA) на 9% через 15 минут по сравнению с интактными клетками [68]. Клетки *Streptomyces rimosus* иммобилизовали в альгинате кальция и использовали для получения окситетрациклина. Исследовали влияние инкубационного периода, концентрации альгината и хранения в  $\text{CaCl}_2$ . По результатам повторных периодических ферментаций во встраиваемых колбах хороший уровень антибиотика сохранялся в течение примерно 28 дней при использовании 4% альгината кальция. На утечку клеток и концентрацию клеток внутри шариков влияли концентрация альгината и его хранение в растворе  $\text{CaCl}_2$  [69]. Иммобилизация *Photobacterium phosphoreum* проводилась следующим образом, жидкую биомассу смешивали с 13% раствором поливинилового спирта (PVA), гелевый раствор готовили в

течение 24 ч в среде GM; Na-фосфатном буфере + 2% NaCl; 3% NaCl. 0,2 мл гелевого раствора клеток выливали на 96-луночный планшет и переносили в морозильную камеру (20 °C) для образования геля с одновременным включением клеток в полимерную матрицу и в результате при хранении – 80°C активность сохранялась без изменений в течение 2 лет, уровень свечения психрофильных штаммов при 4°C составил более 1 месяца, а при 20°C — 3 суткам [70].

## 1.5 Иммобилизация микроорганизмов в гели

Клетки, которые иммобилизуются заключением в гели, что дает возможность применить высокие концентрации клеток в реакторе, нежели, если сравнивать с обычными ферментерами с содержанием свободных клеток, тогда это будет давать возможность работать в вымывающихся условиях и соответственно способствует увеличению производительности [71].

Например, иммобилизации клеток с использованием фосфорилированного поливинилового спирта (ПВС) и для этого ПВС сшивали с борной кислотой в течение короткого времени (от 10 мин до 2 ч) для формирования сферической структуры, после чего проводили затвердевание гелевых шариков путем этерификации ПВС фосфатом. Эксплуатационная стабильность системы иммобилизованного ила изучалась в реакторе периодического действия и в реакторе непрерывного действия с мешалкой, которые успешно работали в течение 32 дней. В реакторе непрерывного действия устойчивая эффективность денитрификации равна 99% [72].

На иммобилизацию бактерий оказывает влияние различных параметров на бактерии, иммобилизованные в матрицах кремнезема, полученных методом золь-гель. Рассматривались состояния роста, влияние плотности клеток и способность бактерий размножаться внутри матриц. 45 дней после иммобилизации были обнаружены значительные различия в количестве бактерий. В гелях, где бактерии подвергались воздействию различных концентраций NaCl до инкапсуляции, высокое количество бактерий было обнаружено до 550 дней, когда было обнаружено приблизительно 105 КОЕ. [73]. Другим примером было использование лимонной кислоты в золь-гель, который позволяет бактериям выживать в течение длительных периодов времени.

Иммобилизованные микроорганизмы *E.coli* и *S.aureus* в кремниевых матрицах хранились в герметичных пробирках при 20, 4, -20 и -70°C в течение 4 месяцев и анализировалось количество жизнеспособных клеток. Результаты показывают, что с использованием лимонной кислоты для нейтрализации щелочности прекурсоров кремния делает метод иммобилизации биосовместимым и более простым в исполнении, т.к. полимеризация не происходит немедленно, как например при использовании соляной кислоты [74]. Бактерии *Lactococcus lactis*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и споры грибов *Trichoderma viride* были иммобилизованы в агаре и

альгинатных гелях. В большинстве случаев добавление микроорганизмов до  $10^5$  КОЕ/мл геля не изменило прочность геля (напряжение при разрушении), основные изменения свойств геля произошли, когда  $10^7 - 10^9$  микроорганизмов были иммобилизованы на мл гелевой матрицы. После иммобилизации гели стали более хрупкими, о чем свидетельствует снижение их деформации Генки при разрушении [75]. Макропористые гидрогели устанавливаются ниже точки замерзания растворитель называемые криогелями, вызывают значительный интерес благодаря присущей им взаимосвязанной макропористой структуре и простоте формирования по сравнению с другими методами формирования макропор. [76]. Закономерности в свойствах криогелей, связанные с узкими (диаметр  $0,4 < d < 2$  нм), средними ( $2 < d < 50$  нм) и широкими ( $50 < d < 100$  нм) нанопорами, микропорами ( $100$  нм  $< d < 100$  мкм) и макропорами ( $d > 100$  мкм) с граничными размерами в рамках модифицированной классификации, гидратированных криогелях можно выделить по меньшей мере пять состояний воды — свободное несвязанное, слабосвязанное и прочносвязанное), а также слабоассоциированную (химический сдвиг протонного резонанса  $\delta H = 1-2$  ppm) и прочносвязанную ( $\delta H = 3-6$  ppm) воду [77]. Криогелями называют это специальные каркасы, которые были получены путем замораживания и оттаивания полимерного раствора под контролем диапозона времени и температур, которые в свою очередь оказались выгодными включая в систему биореактора или клеточного разделения, а также создание устойчивого каркаса. Криогели по последним исследованиям способны выступить в качестве биореактора способный увеличить клеточную численность и инструмента для разделения клеток. Наконец, эта матрица показала отличный потенциал в качестве каркаса, способствуя возобновлению роста на многочисленных поврежденных участках тканей *in vivo* [78]. Криогели могут быть получены физически и ковалентно сшитых гетерогенных полимерных сетей, а взаимосвязанные системы макропор и губчатая морфология обеспечивает беспрепятственную диффузию растворенных веществ практически любого размера. Помимо, особенность является то, что свойства криогелей можно регулировать температурой криогеляции, временем выдержки образца в замороженном состоянии и скоростями замораживания/оттаивания, природой растворителя и использованием растворимых и нерастворимых добавок [79]. На сегодня большое количество криогелей, изготавливают как из природных биополимеров (желатин, коллаген, хитозан), так и синтетических биополимеров (поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль), и они могут применяться в качестве 3D-биомакроструктур для получения различных продуктов и решения биотехнологических задач [80]. Пенициллинацилаза играла ключевую роль в деацетилировании пенициллина в 6-аминопенициллановой кислоты (6-APA). Значение  $K_m$ , является одной из важных характеристик ферментативной реакции, т.е., чем больше значение  $K_m$ , тем меньше сродство связывания фермента с субстратом и равна 0,004

ммоль, а максимальная скорость образования 6-аминопенициллановой кислоты была определена как 0,048 Е/мл/мин [81].

## **1.6 Преимущества иммобилизации перед суспензионными системами**

Рассматривая цель иммобилизации, является сохранить высокие концентрации клеток в «определенной области пространства», такой как биореактор, и увеличить объемную производительность системы. Преимущества процесса иммобилизации по сравнению с системами свободных клеток: высокая плотность клеток, повышение объемной производительности, уменьшенный размер ферментера, впоследствии чего способствует снижению капитальных затрат. Данная технология иммобилизации, прежде всего, приводит к гораздо более высокой скорости ферментации, которая снижает, улучшает использование субстрата и повышает защитные функции клеток от риска микробного загрязнения [82]. Макропористые гидрогели использовались для создания каркасов или опор для иммобилизации бактериальных, вирусных и др. клеток. Получение композитных материалов с иммобилизованными клетками, которые обладают подходящей механической и химической стабильностью, пористостью, эластичностью и биосовместимостью, предполагает, что эти материалы являются потенциальными материалами для применения в исследованиях. [83]. В другом примере представлена иммобилизация бактериальных клеток *S. pasteurii*, которые были иммобилизованы на цеолитовых и сепиолитовых минералах с одинаковым размером частиц. Было обнаружено, что сепиолит является более подходящим субстратом для микроорганизмов по сравнению с цеолитом, поэтому образцы, содержащие сепиолит, продемонстрировали более высокую производительность, таким образом результаты показали, что иммобилизация вегетативных клеток на локально доступных материалах является простым и экономически целесообразным подходом, способность бактериальных клеток к заживлению может быть затруднена из-за реакционной способности минерала [84]. Инокуляция семян ризобактериями для роста растений (PGPR), является идеальным инструментом для обеспечения почвы высокой плотностью полезных микроорганизмов, но для поддержания жизнеспособности проведена оценка влияния бактериальной иммобилизации в нановолокнах на стабильность и улучшило выживаемость *P. agglomerans* ISIB55 и *B. caribensis* ISIB40 на семенах, хранившихся в течение 30 дней, и способствовало успешной колонизации обеих бактерий на корне растения, тогда примененный метод иммобилизации ризобактерий можно считать перспективным экологически чистым подходом к улучшению производства с использованием микробного инокулянта [85]. Иммобилизация микробных клеток является эффективной для использования цельноклеточных катализаторов, так как упрощает разделение продуктов, позволяет увеличить концентрацию клеток, стабилизирует ферментативную

активность и допускает повторное или непрерывное использование биокатализатора. Наравне с плюсами наблюдаются и минусы, например, ограниченный массоперенос во внутренней части геля, хрупкость геля, утечка клеток из матрицы носителя и каталитическую активность [86].

## 1.7 Биореактор, как основной аппарат для получения антибиотиков

Биореактор – это сосуд, где происходит биологическая реакция, посредством использования микроорганизмов, животных или растительных клеток и различные типы ткани [87]. Биореакторы, делят на следующие виды:

- по фазам (только жидкость или также газ и частицы),
- по техническому исполнению (открытый, закрытый, мембранный),
- по способу смещивания (смешанный, несмешанный, гидравлически смешанный),
- по способу выращивания – подкормка питательных веществ (на одну засыпку, с постепенным добавлением питательные вещества) [88]. В ходе процесса необходимо следить за процессами, происходящими в биореакторе, а именно:
  - расход питательной среды,
  - температура питательной среды и камеры,
  - содержание углерода и газообразный состав,
  - кислотность раствора,
  - контроль содержания веществ в питательной среде [89].

На сегодняшний день можно сказать о том, что существуют системы биологических реакций, их можно разделить на такие 2 вида как: система суспензий и система иммобилизации. Так, например, эрлифтные или барботажные биореакторы применяются для перемешивания культур в суспензии. Для процесса иммобилизации применяют мембранные, псевдоожиженные биореакторы с обеспечением оптимальные условий таких как температура, pH-среды, наличие или исключение кислорода, концентрацию субстрата для обоих видов систем [90].

Биореакторы с иммобилизованной ферментной мембраной (EMBR) выделяются как особый режим для объединения процесса разделения продуктов с ферментативным катализом в непрерывных процессах. Селективная мембрана направлена на отделение ферментов от продуктов реакции. До сих пор EMBR широко использовались в области синтеза тонких химических веществ таких как аминокислоты, антибиотики, противораковые препараты, витамины и оптически чистые энантиомеры и тому подобное [91].

Использование иммобилизованной нитчатой цианобактерии *Scytonema sp.* для получения антибиотиков в биореакторе, с промежутком культивирования в течение 20 дней. Процесс иммобилизации клеток проводился на полоски полиуретановой пены, а накопление антибиотика клетками происходило в стационарной фазе и в конечном

результате процесса была в несколько раз больше, чем при периодическом процессе [92].

## **2. Объект, материалы и методика исследования**

### **2.1 Объект исследования**

Объектом исследований является бактерия: *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* – представитель рода *Escherichia* является грамотрицательной палочковидной бактерией, имеет доступность всей последовательности генома и способность расти как в аэробных, так и в анаэробных условиях (рисунок 2). Большинство штаммов *E.coli* растут в широком диапазоне температур (приблизительно 15–48°C) в почве, воде, желудочно-кишечном тракте человека и животных. Данный вид бактерий способен продуцировать фермент пенициллин G – ацилазу которая применяется для производства антибиотика пенициллина [93].



**Рисунок 2 – Колонии *Escherichia coli* на твердой питательной среде**

### **2.2 Материалы исследования**

В ходе исследовательской работы использовались различные материалы, описанные ниже.

#### **2.2.1 Приборы и оборудование.**

–Аналитические весы РА114С

Предназначение: используют преимущественно для взвешивания испытуемой пробы, компонентов питательных сред и реагентов [94] [95].

Характеристика: Точность - 0.1 мг; I специальный класс; Предел взвешивания: 110 г; Диаметр чаши: 90 мм; Габариты (мм):196×287×320 калибровка и устойчивость (Рисунок 3) [95][96].

–Автоклав ВК-7501

Предназначение: применяется для стерилизации посуды и питательных сред, производит уничтожение патогенных микроорганизмов [95] [97].

Характеристика: Режим работы №1: 132°C; t=20 мин; p=2 атм. Режим работы №2: 120°C; t=45мин; p=1 атм.; Габариты (мм): длина=740±50 ширина=570±50 высота=1070+50 (Рисунок 3) [95] [98].



**Рисунок 3– Аналитические весы РА114С [99] и Автоклав ВК-7501**

–Ламинарный бокс ВО-120-РР

Предназначение: Рабочее помещение биологической безопасности для микробиологических исследований [95] [100].

Характеристика: II класс безопасности; Переднее стекло 3-х слойное 6 мм; Габариты (мм): 1220×800×1500; Размеры (мм): камеры 1135×600×640; Скорость нисходящего потока 0,33 м/с, 60 кадров в минуту (Рисунок 4) [95] [101].

–Термостат ТС-1/80 СПУ

Предназначение: состоит из изолированной камеры, которая позволяет удерживать постоянство температуры, равномерно распределенной в камере [95] [102].

Характеристика: Максимальный температурный диапазон: от Токр+5 до +60 С; Время установления рабочего режима - 120мин; Габариты (мм): длина = 525; ширина = 521; высота = 721; Максимальное отклонение температуры равно 0,4 (Рисунок 4) [95] [103].

–Спектрофотометр ПЭ-5400УФ:

Предназначение: Спектрофотометр для измерения коэффициента пропускания и оптической плотности жидкостей и для определения концентрации растворенных в них компонентов (Рисунок 4) [104].



**Рисунок 4 – Ламинарный бокс ВО-120-РР [105], Термостат ТС-1/80 СПУ [106] и Спектрофотометр**

## 2.2.2. Питательные среды

Nutrient Agar (TM Media, Индия; соответствует ISO 9001:2015, ISO 11133:2014, ISO 13485:2016) – это основная питательная среда, используемая для проведения исследований, культивирования требуемых микроорганизмов. Внешний вид характеризуется, как гомогенный сыпучий порошок. Среда имеет светло-желтую окраску (Рисунок 5) [95] [107].

Nutrient Broth (TM Media, Индия; соответствует ISO 9001:2015, ISO 11133:2014, ISO 13485:2016) – это основная питательная среда, используемая для проведения исследований, культивирования требуемых микроорганизмов. Внешний вид характеризуется, как гомогенный сыпучий порошок. Среда имеет светло-желтую окраску (Рисунок 5) [95] [108].



**Рисунок 5 – Nutrient Agar [109] и Nutrient Broth**

## **2.3. Методы исследования**

### **2.3.1 Посев микроорганизмов на твердые питательные среды.**

Инокулирование микроорганизмов на твердые питательные среды проводили с помощью петли. Небольшое количество исследуемого материала, взятого петлей из пробирки, распределяют штрихами по чашке Петри, а затем петлю прожигают, чтобы уничтожить остатки находящегося материала.

### **2.3.2 Посев микроорганизмов на жидкие питательные среды.**

Инокулирование микроорганизмов проводили с помощью петли, которую погружали в среду с бактериями, а затем суспензировали в предварительно приготовленную чистую жидкую питательную среду путем растирания по стенке пробирки. После чего петлю прожигали, чтобы уничтожить остатки находящегося материала [95].

### **2.3.3 Культивирование микроорганизмов**

Культивирование микроорганизмов проводили в термостате при определенной, заданной температуре 37 °C в течение 8-24 часов.

**2.3.4 Стерилизация.** В данном исследовании использовались различные методы стерилизации:

- Термическая;
- Давлением и насыщенным паром [95].

### **2.3.5 Определение количества клеток в 6-АПК с использованием бактерии *Escherichia coli***

#### **2.3.6 Измерения на спектрофотометре.**

Измерения на спектрофотометре проводили с подготовки образца и переноса культуры в кювету, настраивали прибор при определенном диапазоне длин волн и режим измерения. Далее проводили измерения и вычисляли количественный анализ веществ в растворах – абсорбанс (Abs).

## **3. Результаты исследования**

### **3.1 Подготовка к исследованию**

Лабораторные исследования начали с того, что подготовили образцы микроорганизм выделенные почвы, лабораторную посуду (чашки Петри, колбы, лабораторную петлю и т.д.), питательные среды, приступили к приготовлению питательной среды, на аналитических весах взвесили 12.5 г Nutrient Agar и высыпали содержимое в коническую колбу, затем добавили 250 мл воды. Получили светло-желтую жидкость. Затем отправили в автоклав при температуре 121 °C от 30 до 40 минут (Рисунок 6).

Для проведения количественного анализа веществ в растворах – абсорбанс (Abs) приготовили жидкую питательную среду с использованием 13 г Nutrient Broth на 1000 мл воды, получили желтую жидкость. Помимо этого, приготовили и разлили физиологический раствор (смесь хлорид натрия и воды) в количестве 50 мл. Далее отправили в автоклав при температуре 121 °C (Рисунок 6).



**Рисунок 6 – Приготовление питательных сред из Nutrient Agar / Nutrient Broth и помещение в автоклав**

### **3.2 Проведение анализа конвертации и активности *Escherichia coli* в 6-АПК в суспензии (Abs)**

Культивировали *Escherichia coli* в жидкой питательной среде при температуре 37°C в течение 12 часов для наращивания биомассы, ее центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 минут для получения осадка с сухими клетками. Измерили чистую массу бактерий, которая равна 0,134 г (Рисунок 7).



**Рисунок 7– Наращенная биомасса бактерии *Escherichia coli* и процесс работы над исследованием**

**3.2.1 Приготовление буферного раствора.** Используется 60 мл уксусной кислоты и 82,04 г ацетата натрия. Для получения pH=2, добавляли соляную кислоту по 1 мл и для pH=5 использовали Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, измеряли на pH-метре.

**3.2.2 Приготовление субстанции.** Для этого используется 0.2 г бензилпенициллина и разбавляется в 10 мл буферного раствора с pH =5.

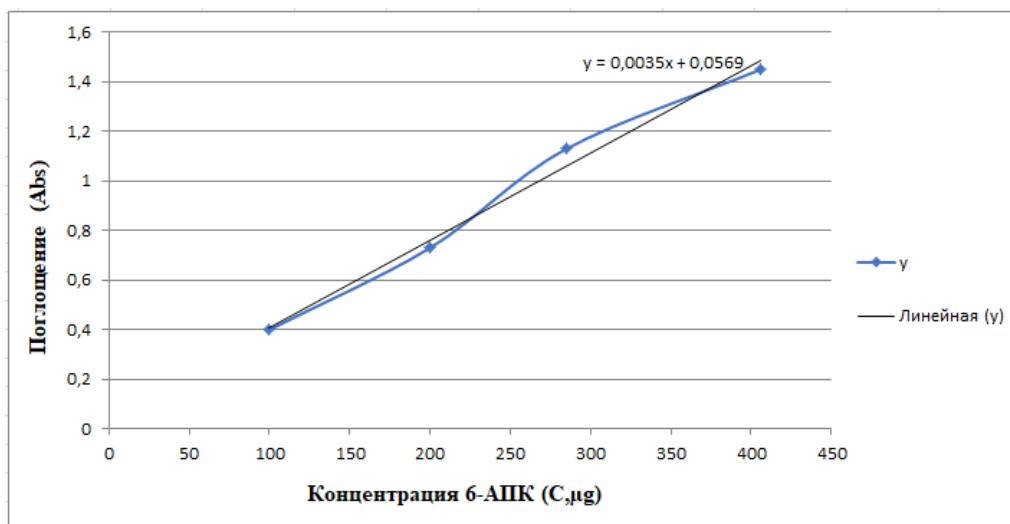
**3.2.3 Приготовление реагента.** Взято 0.125 г н-диметиламин-бензальдегида,которое растворено в 10 мл этилового спирта.

**3.2.4 Получение 6-аминопенициллановой кислоты (6-APA).** Для этого смешиваются чистые массы бактерий с приготовленной субстанцией из бензилпенициллина, которые отправляют на инкубацию при 37С с разным промежутком времени. Далее убирают по 1 мл раствора. Полученный раствор смешивают с 1 мл ацетатного буферного раствора (pH=2) и 1 мл н-диметиламин-бензальдегида и инкубируют в течение 3 минут. Реакция останавливается, далее проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 415 нм и получили следующие данные поглощения (абсорбанс) в таблице 3.

**Таблица 3–Результаты измерений на спектрофотометре при  $\lambda=415$**

<b>Время (t), мин</b>	<b>Поглощение (abs)</b>
15	0,625
20	0,638
40	0,691
50	0,717
90	0,746
120	0,810
150	0,840

По данным исследователей Индии Джайпракаш Г.Ш, Камалеш К.К и др. авторы измерили значения 6-АПК ( $\mu\text{g}$ ) для каждого abs, получили значение концентраций и построили следующее уравнение тренда на рисунке 8. Так, например, при 100  $\mu\text{g}$  значение abs= 0,4, при 200  $\mu\text{g}$  значение abs= 0,73, а при 285  $\mu\text{g}$  значение abs= 1,13, при 406  $\mu\text{g}$  значение abs= 1,45. Тогда, уравнение тренда равно:  $y = 0,0035x + 0,0569$ .



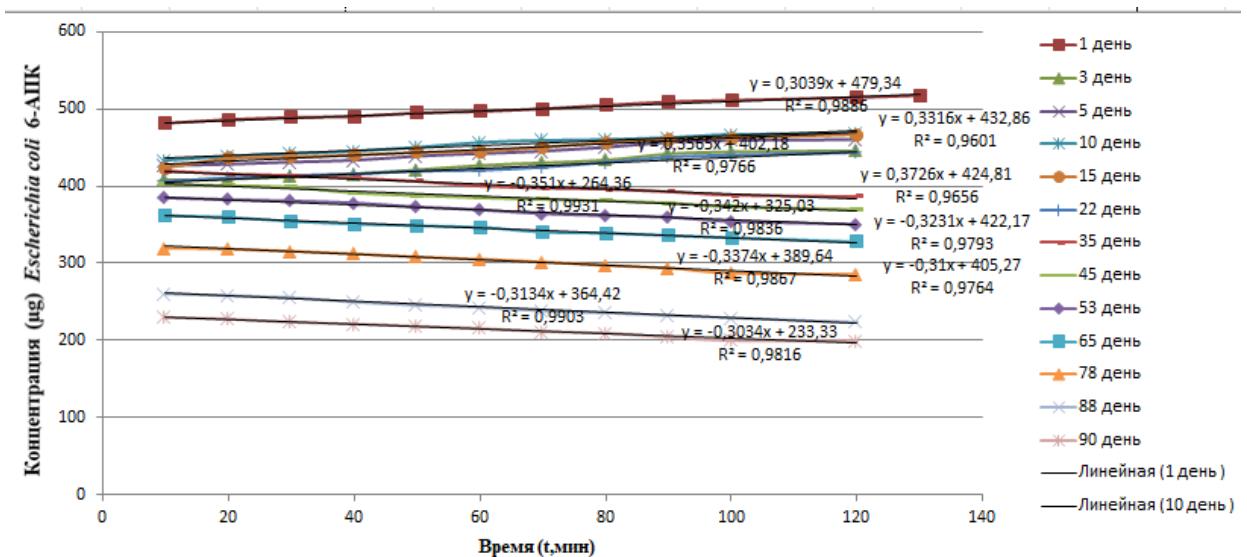
**Рисунок 8–График зависимости поглощения (Abs) по оси у и для 6-АПК (μg) по оси x [110].**

### 3.2.5 Результаты измерений активности *Escherichia coli* 6-АПК в суспензии.

Расчет концентраций по уравнению тренда:  $y = 0,0035x + 0,0569$ , при этом  $x$  неизвестная концентрация, а  $y$  значения поглощения (abs), тогда получим следующие данные концентрации ( $C$ ) по времени. График зависимости с уравнением тренда, которое можно записать как  $y = ax + b$ , где  $a$  (наклон) является коэффициентом, показывающим, насколько изменяется  $y$  (концентрация) при изменении  $x$ ,  $a$  и  $b$  (свободный член) параметр которых указывает, насколько быстро изменяется концентрация за единицу времени. Так, например, если значение  $a$  положительное, то концентрация возрастает, а если наоборот отрицательная, то соответственно снижается, что в результате может говорить о нарастании эффекта или же в другом случае о его уменьшении в зависимости от специфики работы с экспериментом. Если рассматривать  $R^2$  (например, 0,95), которая говорит о том, что линейная зависимость хорошо описывает экспериментальные данные и дает возможность предсказать поведение системы в заданном промежутке времени.

Далее в работе на рисунке 9 представлены графики результатов измерений активности *Escherichia coli* в 6-АПК в суспензионной форме с указанием уравнений тренда, для которых константа ( $K$ ) будет равна следующим значениям: 0,3039 – 1 день измерений; 0,3783 – 3 день; 0,3519 – 5 день; 0,3316 – 10 день; 0,3726 – 15 день; 0,3565 – 22 день. Тогда по данным за 6 измерений можно вывести среднюю константу равную:  $K_{ср} = 0,3483$ . Проверка данных равна следующим значениям: повтор 1 = 92,9%, повтор 2 = 87,2%, повтор 3 = 108,6 %, повтор 4 = 101,0%, повтор 5 = 95,2%, повтор 6 = 106,9%, а средне возможное отклонение составит 6,3 %. Далее в процессе последующих

измерений внесли изменения в ацетатный бланк, в который добавили 1 мл бензальдегида, 1 мл воды для получения более конкретных данных. На 35 день измерений наблюдается изменение активности, и константа (K) приравнивается -0,3231; -0,31 – на 45 день; -0,3374 – 53 день; -0,3134 – 65 день; -0,342 – 78 день; -0,351 – 88 день; -0,3034 – 90 день. Используя, перечисленные данные можно вывести среднюю константу равную:  $K_{ср} = -0,3294$ . Проверка данных представляется следующими значениями: повтор 7 =98,4%, повтор 8 = 94,1%; повтор 9 = 100,1%; повтор 10 = 102,4%; повтор 11 = 95,1%; повтор 12 = 103,8%; повтор 13 = 106,5%. Тогда, средне возможное отклонение составляет 4,2% и в этом случае можно сказать, что полученные данные способствуют оценке кинетики процесса на выработку или разрушение антибиотика, а также корректировке параметров процесса для получения максимальной эффективности.



**Рисунок 9 – График зависимости концентрации ( $\mu\text{g}$ ) *Escherichia coli* 6 - АПК на основе суспензии по оси у и времени ( $t$ , мин) по оси x**

В соответствии с приведенным графиком активности *Escherichia coli* в 6 - АПК на основе суспензии на рисунке 9 можно сказать о том, что начальное значение концентрации на каждый цикл измерения в эксперименте снижается, так как это связано со снижением каталитической активности и периодом хранения суспензии. Так, например, на 1 день начальная концентрация при 120 мин составила 514,8  $\mu\text{g}$ , на 15 день приравнивается 466,7  $\mu\text{g}$ , на 35 уменьшается до 386,5  $\mu\text{g}$ , наименьшие значения приходятся на 78 день, в который концентрация составила 285,9  $\mu\text{g}$  и 90 день - 199,7  $\mu\text{g}$ , что можно также объяснить тем, что при длительном хранении, в данном случае 3 месяца происходит деградация ферментов при воздействии кислорода и отсутствия дополнительных стабилизирующих питательных веществ для поддержания активности клетки, в результате приводит к снижению протекающей реакции, другой причиной может являться

выделение в побочных продуктах метаболизма, что в свою очередь подавляют активность клетки *Escherichia coli* и выделение б-АПК.

### **3.3 Проведение анализа иммобилизации *Escherichia coli* в б-АПК в гелях**

**3.3.1. Культивирование *Escherichia coli* в жидкой питательной среде.** Процесс проводился при температуре 37°C в течение 12 часов, после чего проводилось центрифугирование при 5000 об/мин в течение 5 минут для получения сухого осадка масса, которого составила 1,347 г. Измерили чистую массу бактерий, которая равна 0,134 г.

**3.3.2. Приготовление криогеля на основе гелана.** Для приготовления 2% гелана, использовали 100 мл дистиллированной воды и 1 г гелана, нагревали до его полного растворения. После разлили гелан по 1 мл в пробирки эппendorф и отправили в морозилку для полного застывания при температуре -20°C на 12 часов.

**3.3.3 Приготовление криогелей на основе поливинилового спирта (ПВС).** В 100 мл дионизированной воды перемешивая магнитной мешалкой, добавляли 10 г ПВС и нагревали до 60°C пока частицы ПВС полностью не диспергировались в воде, далее раствор автоклавировали при 121°C в течение 20 минут и получили 10% раствор ПВС.

**3.3.4 Приготовление гидрогеля на основе поливинилового спирта (ПВС), глицерина и водного раствора тетрабората натрия.** Для приготовления использовали 10% раствор ПВС и 1% водного раствора тетрабората натрия к 82% масс. Дистиллированной воды, после хорошего перемешивания для усиления структуры и лучшего сшивания добавляли 2% глицерина. Перемешивание продолжалось до полного застывания и образования геля.

**3.3.5 Контрольный эксперимент приготовления криогеля на основе поливинилового спирта (ПВС) и глицерина.** После подготовки 10% ПВС использовали 0,95 мл ПВС и 0,55 мл глицерина, отправили в морозилку (-20°C) на 10 минут для застывания, но этого не произошло, через 40 минут гель также остался без каких-либо изменений. Затем после 12 часов в морозилке, 4 часов оттаивания при комнатной температуре и обратном замораживании на 12 часов, ПВС стал густым, а глицерин остался на поверхности без образования геля, который представлен на рисунке 10.



**Рисунок 10 – Контрольный эксперимент криогеля на основе поливинилового спирта (ПВС) и глицерина**

**3.3.6 Контрольный эксперимент приготовления гидрогеля на основе поливинилового спирта (ПВС), глицерина и водного раствора тетрабората натрия.** В эксперименте использовали 3 мл поливинилового спирта (ПВС), 1 мл водного раствора тетрабората натрия, смешивали и после достаточного и хорошего встряхивания и полного перемешивания добавили 1 мл глицерина, далее отправили в морозилку при температуре -20°C в течение 10 минут для застывания, а в результате получили полностью эластичный гель, который показан на рисунке 11. После эксперимент повторили с использованием бактерии *Escherichia coli* с использованием стекленной посуды для предотвращения адгезии (прилипания) и оставили на замораживание течение 24 ч для формирования крупных ледяных кристаллов, пористой матрицы и ее стабилизации.

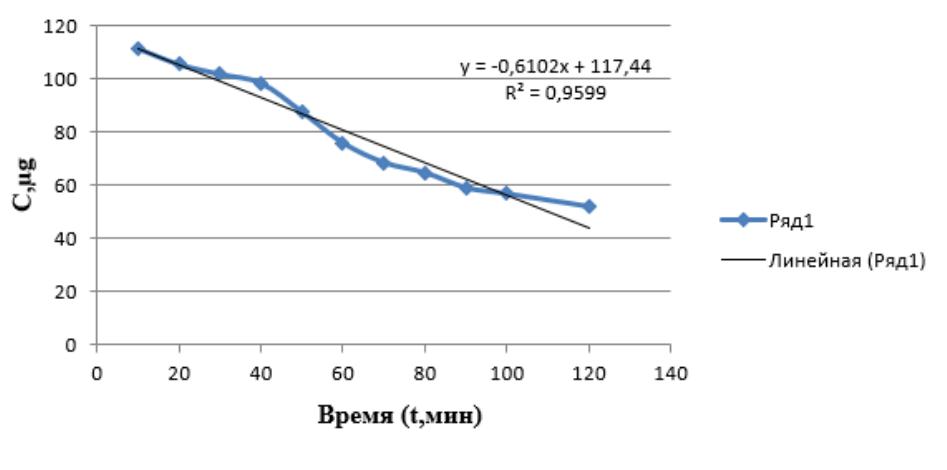


**Рисунок 11– Контрольный эксперимент приготовления гидрогеля на основе ПВС, водного раствора тетрабората натрия и глицерина**

**3.3.7 Результаты измерений иммобилизации *Escherichia coli* в 6-АПК в криогелях**

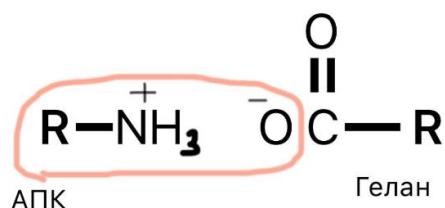
После частичного размораживания криогеля при комнатной температуре 20-25°C на основе гелана, иммобилизованную структуру помещали

приготовленный раствор из бензилпенициллина для активации 6-АПК с добавлением 0,1% хлорида кальция для поддержания стабильной структуры, который далее отправили на инкубацию при 37°C с разным промежутком времени. Далее убирали по 1 мл раствора и смешивали с 1 мл ацетатного буфера (pH=2) и 1 мл n-диметиламино-бензальдегида с концентрацией 1 %? и инкубировали в течение 3 минут, после чего реакция останавливается, далее проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 415 нм и получили следующие данные поглощения (абсорбции) и график зависимости, с уравнением тренда показанный на рисунке 12:  $y = -0,6102x + 117,44$ ,  $R^2 = 0,9599$ .



**Рисунок 12–График зависимости концентрации ( $\mu\text{g}$ ) *Escherichia coli* в 6-АПК на основе гелана 2 % по оси  $y$  и времени ( $t$ , мин) по оси  $x$**

После проведения процесса иммобилизации гелан сшивается 6-АПК и *Escherichia coli* как показано на рисунке 13, в результате чего были получены следующие данные, при котором константа ( $K$ ), которая связана с уравнением тренда и равна  $K = -0,6102$ , что говорит о произошедшей адгезии при подготовлении геля и измерении в пластиковой кювете, но данные способствуют получению более точных результатов дальнейшего анализа активности *Escherichia coli* в 6-АПК в гелях.

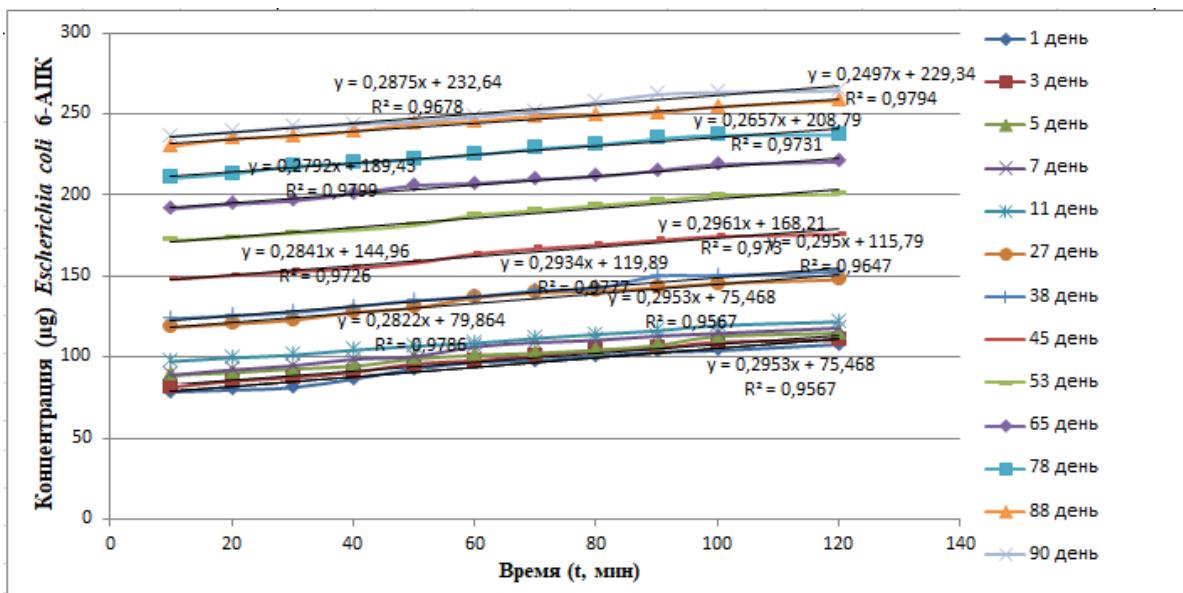


**Рисунок 13–Связывание (адсорбция) 6-АПК на основе матрицы гелана**

### **3.3.8 Результаты измерений иммобилизации *Escherichia coli* в 6-АПК в гидрогелях**

После частичного размораживания гидрогеля при комнатной температуре (22°C) на основе поливинилового спирта (ПВС), глицерина и водного раствора тетрабората натрия минимизирует термический шок и максимально сохраняет клеточную активность. Далее иммобилизованную структуру помещали приготовленный раствор из бензилпенициллина для активации 6-АПК, который отправили на инкубацию при 37°C с разным промежутком времени. Далее убирали по 1 мл раствора и смешивали с 1 мл ацетатного буфера (рН=2) и 1 мл n-диметиламин-бензальдегида 1% и инкубировали в течение 3 минут, после чего реакция останавливается, далее проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 415 нм и получили следующие данные поглощения (абсорбанс).

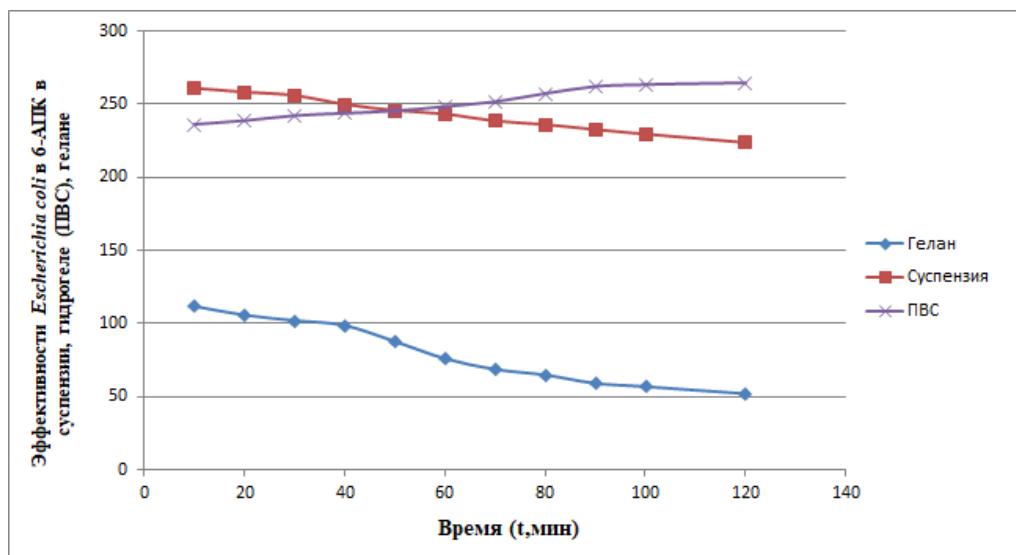
Так, в данной работе по процессу иммобилизации на рисунке 14 представлены графики с уравнениями тренда, для которых константа кинетики реакции (K) равна: 0,2953 для первого дня измерений; 0,2822 – 3 день; 0,2483 - 5 день; 0,2782 -7 день; 0,2342 - 11 день; 0,295 - 27 день; 0,2934 - 38 день; 0,2841- 45 день; 0,2961– 53 день; 0,2792- 65 день; 0,2657– 78 день; 0,2497 - 88 день; 0,2875 – 90 день (Рисунок 14 ). Используя, перечисленные данные можно вывести среднюю константу равную:  $K_{cp} = 0,2668$ . Проверка данных представляется следующими значениями: повтор 1 = 110,6%, повтор 2 = 105,7%, повтор 3 = 93%, повтор 4 = 104,2%, повтор 5 = 87,7%, повтор 6 = 110,5%, повтор 7 = 109,9%, повтор 8 = 106,4%, повтор 9 = 110,9%, повтор 10 = 104,6%, повтор 11 = 99,5%, повтор 12 = 93,5%, повтор 13 = 107,3%. Далее для представления полученных результатов константы кинетики в моль/л, рассчитаем молекулярную массу 6-аминопенициллановой кислоты, которая равна 216,3 г / моль, тогда  $K_m$  варьировался с 0,001365 моль/л до 0,001329 моль/л в течение с 1 по 90 день. Тогда, среднее возможное отклонение составляет 7 %. Тогда, можно сказать, что полученные данные способствуют оценке кинетики процесса на выработку или разрушение антибиотика и корректировке параметров процесса для получения максимальной эффективности.



**Рисунок 14 – График зависимости концентрации ( $\mu\text{g}$ ) *Escherichia coli* 6-АПК на основе гидрогеля по оси  $y$  и времени ( $t$ , мин) по оси  $x$**

### 3.3.9 Эффективность и устойчивость иммобилизации *Escherichia coli*.

Для дальнейшей оценки жизнеспособности и стабильности иммобилизованных бактерий *Escherichia coli* проводили циклический тест культуры в суспензии и иммобилизованных в мембранах. Далее была рассчитана относительная эффективность пролиферации бактерий для промежутка времени равные 120 минутам и результаты показаны на графике 15, как показано в суспензионной форме концентрация *Escherichia coli* составила 199,7  $\mu\text{g}$  одной из причин падения графика связано с тем, что происходит лизис клеточной структур, который связан с растворением клетки под действием химических веществ и утрата ферментативной активности по причине автолиза клетки. Тогда как использование гелана, где произошел процесс адгезии концентрация *E.coli* в составе 6-АПК составила 64,8  $\mu\text{g}$ , поры гелана из-за их плотности, ограничивают подвижность клетки и защищают ее от химического воздействия, что приводит к снижению эффективности массопереноса субстрата и продукта в матрице. В процессе иммобилизации на основе гидрогелиевой матрицы (ПВС) при 120 мин концентрация *Escherichia coli* составила 264,4  $\mu\text{g}$ , что представляет высокую биосовместимость с матрицей иммобилизации бактерии, что способствует равномерному распределению клеток по гелиевой структуре, а также эффективному массопереносу субстрата и продукта без ограничений ферментативной активности. Полученные результаты эффективности показывают, что кинетика и стабильность синтеза 6 - аминопенициллановой кислоты зависит от выбранной матрицы иммобилизации.

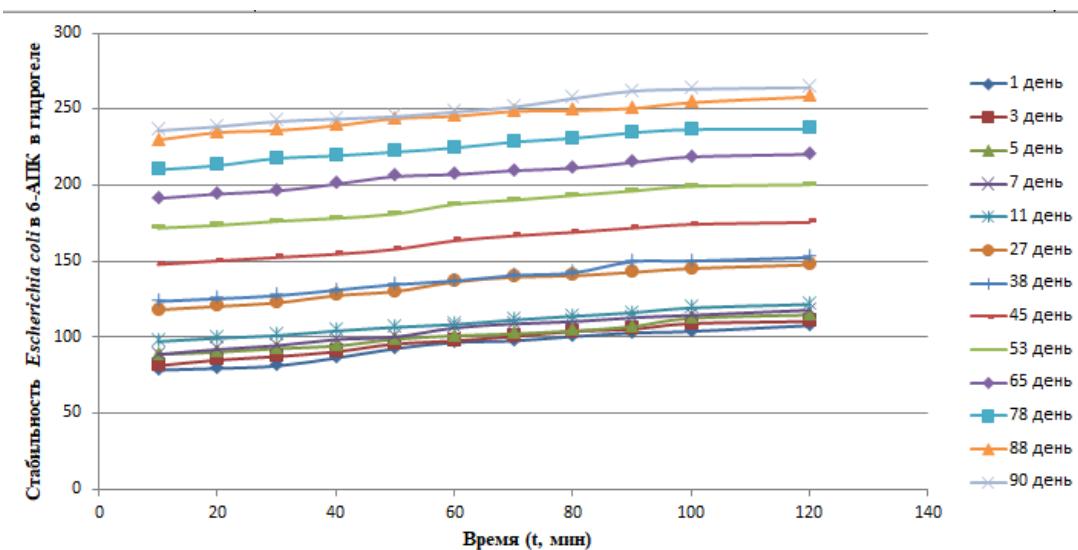


**Рисунок 15– График эффективности *Escherichia coli* в 6-АПК в супензии, гидрогеле гелане по оси у и времени (t, мин) по оси x при  $\lambda = 415$**

На рисунке 16 и таблице 4 показан график стабильности гидрогелей, время приходится на 120 мин. Повышение активности наблюдается в проведенном процессе иммобилизации, результаты приведены с 1 по 90 день. Тогда видно, что в 1 день концентрация *Escherichia coli* при 120 мин приравнивается 107,8  $\mu\text{g}$  ( $0,49 \text{ моль}/\text{л} \cdot 10^{-3}$ ), на 5 день составила 114,8  $\mu\text{g}$  ( $0,53 \text{ моль}/\text{л} \cdot 10^{-3}$ ). Стабильность измерений наблюдается с 3 - 45 день средняя концентрация равна 134,4  $\mu\text{g}$  ( $0,63 \text{ моль}/\text{л} \cdot 10^{-3}$ ), а на 53 день повышается до 200,4  $\mu\text{g}$  ( $0,93 \text{ моль}/\text{л} \cdot 10^{-3}$ ), наибольший показатель в процессе измерения приходится на 90 день, который равен 264,4  $\mu\text{g}$  ( $1,23 \text{ моль}/\text{л} \cdot 10^{-3}$ ). Далее можно рассчитать порядок реакции ( $k$ ), но так как в исследовании происходит накопление вещества и скорость реакции будет зависеть от концентрации вещества, то реакция подчиняется уравнению первого порядка, тогда интегрированная форма кинетического процесса первого порядка выглядит следующим образом:  $\ln C = -kt + \ln C_0$  [111], отсюда константа скорости ( $k$ ) равна  $0.0027 \text{ день}^{-1}$ , что говорит о накоплении продукта в процессе измерений, максимальное значение концентрации равно  $1,23 \text{ моль}/\text{л} \cdot 10^{-3}$  и накопление продукта 6-АПК происходит медленно, но стабильно. Если сравнивать с другими исследователями, то ферментативные свойства иммобилизованной Пенициллин G-ацилазы (PGA) из, которой получают 6-АПК показал лучшую катализическую стабильность  $K_m = 0,0436 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ . После пяти циклов активность иммобилизованного фермента все еще превышала 25% [112], а в другом примере значение  $K_m$  и энергия активации реакции ферментативного гидролиза пенициллина G внутриклеточным ферментом были оценены как 0,004 ммоль и 6,2 ккал/моль соответственно [113].

**Таблица 4–Результаты стабильности *Escherichia coli* в 6-АПК в гидрогеле по оси у и дням по оси x (t =120 мин)**

Количество дней	Концентрация (C, $\mu\text{g}$ ) при 120 мин
1	107,8
3	110,6
5	114,8
7	117,9
11	121,7
27	147,7
38	152,6
45	175,7
53	200,4
65	220,4
78	237,1
88	250,6
90	264,4



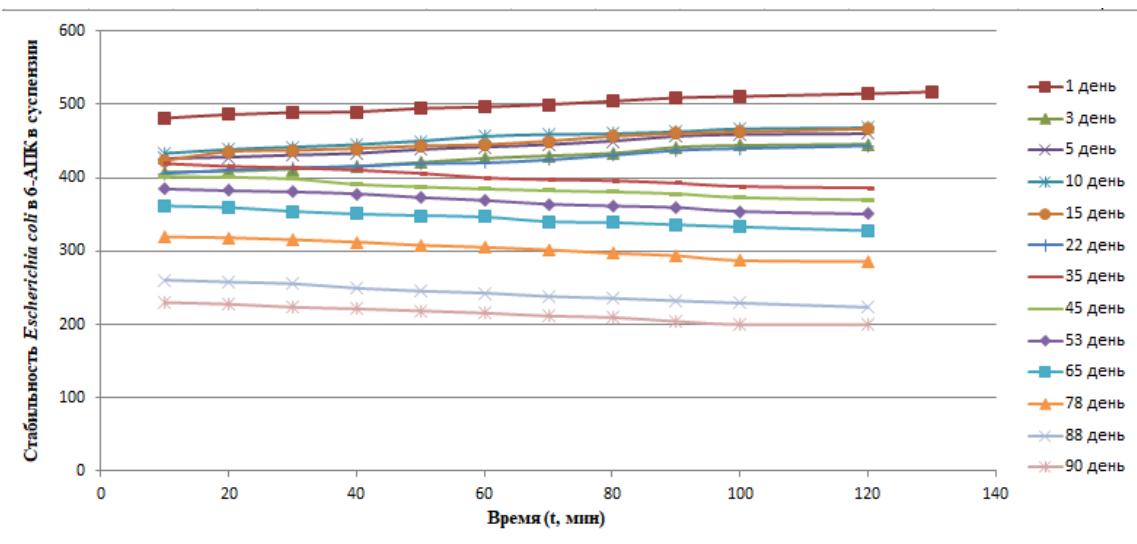
**Рисунок 16 – График стабильности *Escherichia coli* в 6-АПК в гидрогеле по оси у и времени (t, мин) по оси x**

На следующем рисунке 17 изображен график стабильности суспензии при 120 мин, а в таблице 5 приведены результаты измерений. Для процесса наблюдается как повышение активности, так и уменьшение, а данные приведены за 90 дней. Для процесса наблюдается как повышение активности, так и уменьшение, а данные приведены за 90 дней. Так, например, на 1 день концентрация *Escherichia coli* при 120 мин составила 514,8  $\mu\text{g}$ , что представляет собой наибольший показатель, но при дальнейших измерениях с 3 - 45 дни наблюдается стабильность суспензии, которая равна 445,8  $\mu\text{g}$  -

369,9  $\mu\text{g}$  средняя концентрация ( $C_{\text{ср}}$ ) за эти дни составила 434,4  $\mu\text{g}$ , весомое изменение активности наблюдается на 78 день, происходит постепенное падение активности до 285,9  $\mu\text{g}$ , а на 90 день концентрация абсолютно снижается, и составляет 199,7  $\mu\text{g}$  равная наименьшему показателю, константа скорости ( $k$ ) равна  $0.010 \text{ день}^{-1}$  согласно уравнению первого порядка ( $1/C$ ) что говорит о том, что происходит постепенная потеря активности 6-АПК из-за уменьшения питательных веществ и субстрата. Если сравнивать с исследователями Бразилии, которые тоже изучали кинетику раствора 6-АПК и получили следующее значение константы скорости  $\ln \frac{kg}{kg_0} = -19.3 \pm 00.4$  из-за наличия примесей происходит ингибирование роста. Некоторые примеси полностью подавляют рост и оказывают влияние при очень низких концентрациях, менее 1 ppm, тогда как другие должны присутствовать в довольно больших количествах, прежде чем оказаться какое-либо влияние [114].

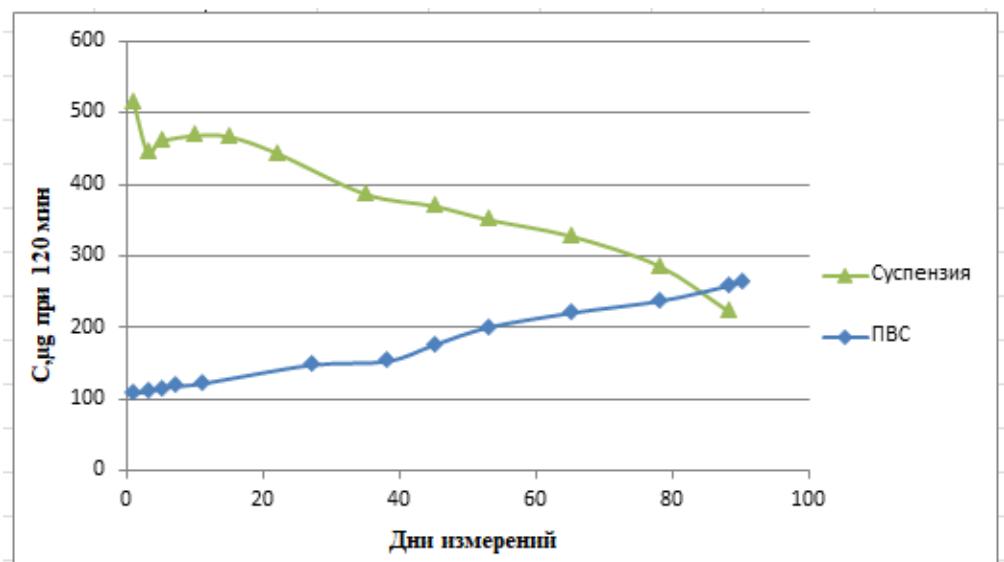
**Таблица 5–Результаты стабильности *Escherichia coli* в 6-АПК в суспензии по оси у и дням по оси x ( $t = 120$  мин)**

Количество дней	Концентрация ( $C, \mu\text{g}$ ) при 120 мин
1	514,8
3	445,8
5	460,3
10	468,2
15	466,7
22	443,6
35	386,5
45	369,9
53	350,7
65	327,9
78	285,9
88	223,6
90	199,7



**Рисунок 17 – График стабильности *Escherichia coli* в 6-АПК в суспензии по оси у и времени (t = 120 мин) по оси x**

Если сравнивать стабильность полученных результатов гидрогеля с суспензионной формой по дням и при 120 мин, то видно, что при одном и том же промежутке времени происходит повышение концентрации гидрогеля и уменьшение концентрации суспензии, результаты представлены на рисунке 18. Отсюда можно сказать о том, что суспензии проявляется высокая активность на 1 день измерения равная 514,8  $\mu\text{g}$ , но при дальнейших измерениях с 3 - 45 дни наблюдается стабильность суспензии, а на 90 день концентрация абсолютно снижается, и составляет 199,7  $\mu\text{g}$ . Процесс уменьшения активности может быть связано с тем, что с течением времени ферменты, отвечающие за активность, начинают разрушаться из-за нестабильности суспензии, даже если соблюдаются оптимальные условия хранения. Другой причиной может являться то, что бактерия *E.coli* с течением времени начинают стареть или погибать и в результате выделяют вещества, которые впоследствии ингибируют активность 6-АПК.



**Рисунок 18 – График стабильности *Escherichia coli* в 6-АПК в супензии, гидрогеле по оси у и дням по оси x (t = 120 мин)**

Для процесса иммобилизации наблюдается, наоборот, повышение активности. Начальный параметр стабильности на 1 день измерений равен 107,8 µg, на 27 день составила 147,7 µg, на 53 день составила 200,4 µg, а на 90 день повысилась и стала равна 264,4 µg. Отсюда, можно сказать о том, что иммобилизованные бактерии в гидрогелиевой матрице могут оставаться стабильными в течение 8 повторяющихся циклов в течение 45 дней. Процесс повышение активности на 53 - 90 день связан с тем, что 6-АПК содержит в своей химической структуре карбокси- и -аминогруппы, которые участвуют в процессе и образуют устойчивые связи с матрицей иммобилизации это и усиливает фиксацию бактерий, при этом не нарушает физиологической функции бактерий *E.coli*, что как раз и способствует поддержанию жизнедеятельности.

Отсюда, можно сказать, что наибольшую стабильность получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) показал процесс иммобилизации в гидрогелиевой матрице (ПВС), а супензионная форма клеток *Escherichia coli* описывается снижением активности и далее подтверждает эффективность метода иммобилизации для увеличения продолжительности и повторяемости биокаталитического процесса для получения синтетических антибиотиков.

### 3.3.10 Сравнительный анализ с литературными данными.

Сравнивая результаты других исследователей, можно сказать, что учёные Ирана провели исследование на конвертацию *Escherichia coli* в 6-АПК, тогда константа свободного субстрата равна 12.5 мг/мл, а иммобилизованного 10 мг/мл [115]. Тогда как в другом примере, авторы Родригес М.Э., Кинтеро Р. и другие авторы из Мексики рассмотрели, как пенициллинацилаза (ПА) гидролизует пенициллин G (PG) с получением 6-аминопенициллановой

кислоты (6-АРА). Кинетика периодической реакции при 10 % концентрации пенициллина с постоянной активностью 0,34мг/мл [116]. Клетки *Escherichia coli* (ATCC 11105) permeабилизовали N-цетил-N,N,N,N-триметиламмонийбромидом, затем иммобилизовали глутаровым альдегидом 5% и хитозаном (3% мас./об), иммобилизация на хитозане снизила конверсию по сравнению с неиммобилизованными обработанными клетками (13%), новый биокатализатор показал приемлемую эксплуатационную стабильность, сохранив более 90% исходной активности после 20 циклов. После 210 дней хранения в фосфатном буфере при 4°C было потеряно только 16% активности [117]. Иммобилизованная пенициллин G ацилаза (PGA) используется для получения 88% 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), который необходим при синтезе новых пенициллинов. Удельная активность ПГА 0,05 мг/мл биомассы были получены интактные клетки. В клетках, проницаемых хлороформ, увеличение активности PGA на 350% по сравнению с необработанных клеток было достигнуто и составило всего 0,04 мг/мл биомассы. Тогда в проведенном исследовании наблюдается активность клеток и выделение 6-АПК с учетом свободного члена равного 159,97 [118].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение разработки 3D биореактора, которая представляется в качестве процесса иммобилизации микроорганизмов. Объектом исследования выбрана бактерия *Escherichia coli* для проведения процесса иммобилизации и изучения активности полупродукта 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), для последующего производства  $\beta$ -лактамных антибиотиков полусинтетического широко специфичного вида. По выполненной работе можно сделать следующие *выводы*:

- Получение 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) путем культивирования бактерии *Escherichia coli* на твердой и жидкой питательной среде и активации реакции с помощью субстанции природного бензилпенициллина и инкубировали при 37°C.
- В результате измерений активности *Escherichia coli* в 6-АПК для оптимизации процесса получения антибиотиков в суспензии получили значение средней константы за 6 измерений (1 - 22 день), которая равна  $K_{cp} = 0,348$  (среднее возможное отклонение составило 6,3 %), за 7 измерений (35-90 день) средняя константа равна  $K_{cp} = -0,3294$  (среднее отклонение равно 4,2%), что говорит о разрушении ферментов и уменьшению активности.
- В результате измерений активности *Escherichia coli* масса, которой составила 1,134 г в 6-АПК для оптимизации процесса получения антибиотиков в гелях. Температура заморозки составляла -20°C, а для получения более пористой структуры и для стабилизации матрицы оставляли ее на 24 часа, а далее процесс оттаивания происходил при комнатной температуре (22°C), что способствовал целостности структуры, уменьшению повреждений клеточных мембран и одновременно сохранению жизнеспособности микроорганизмов. Так, для процесса иммобилизации бактерии в криогеле на основе гелана 2% константа равна:  $K = -0,6102$ , что говорит о произошедшей адгезии при приготовлении геля. Для иммобилизации бактерии в гидрогелях (ПВС, 10%) средняя константа равна:  $K_{cp} = 0,2668$  (среднее возможное отклонение составляет 7 %).
- В работе сравнительный анализ процессов получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) суспензии и иммобилизации бактерии, который показал следующие результаты оценки эффективности и стабильности при 120 мин и длине волны равной 415 нм. Так, например, в суспензии концентрация *Escherichia coli* на 1 день измерения равная 514,8  $\mu\text{g}$ , а на 90 день концентрация снижается до 199,7  $\mu\text{g}$  вследствие лизиса клеточных структур, для процесса иммобилизации на основе гелана, где произошла адгезии, концентрация составила 64,8  $\mu\text{g}$ . Тогда как для иммобилизации на основе гидрогелевой матрицы (ПВС) концентрация *Escherichia coli* стабильность измерений наблюдается с 3 - 45 день средняя концентрация равна 134,4  $\mu\text{g}$ , а на 90 день повысилась и стала равна 264,4  $\mu\text{g}$ , что говорит о высокой биосовместимости бактерий с матрицей иммобилизации и равномерному распределению клеток по гелевой

структуре. Отсюда, можно сказать о том, что иммобилизованные бактерии в гидрогелиевой матрице могут оставаться стабильными в течение 8 повторяющихся циклов в течение 45 дней.

Соответственно, можно сделать заключение о том, что процесс иммобилизации микроорганизмов представляет собой трехмерный (3D) биореактор, который обеспечивает стабильный и продуктивный процесс и помимо этого позволяет обеспечить стабильные и благоприятные условия для их роста и развития, которые в дальнейшем способствуют улучшению производства антибиотиков для борьбы с инфекционными и бактериальными заболеваниями.

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Lancelot Th., Hogben S. Antibiotic chemical compound // Article History, Health & Medicine: The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2023.
2. Guillaume A. D., Didier R. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives // International Journal of Antimicrobial Agents, 2019. – vol 53. – pp. 371-382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>.
3. Hiroshi Y., Ryoichi K. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006. – vol 70. – pp.1060–1075.<https://doi.org/10.1271/bbb.70.1060>.
4. Küçükbay F. Z., Küçükbay H. Chemical Structures and Classification of Antimicrobial Drugs // Bentham Science Publishers, 2009. – pp.214-28.doi: 10.2174/9781681084794117060005.
5. Ebimieowei E., Ibemologi A. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives // Department of Medical Laboratory Sciences, Niger Delta University, 2016.
6. Trubiano J., Grayson L. 24 - Fusidic Acid. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice // Infectious Diseases (Eighth Edition), 2015. – vol 1. – pp. 304-309. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00024>.
7. Dr. Yamunarani K., Dr. Sundaram A. K., Dr. Pandiyan M. Streptomyces as a potential biocontrol agent // Journal of Entomology and Zoology Studies, 2019. – pp. 637-644.
8. Aguirre-Pranzoni C., Alejandro Orden. Coumarin metabolic routes in Aspergillus spp. // Fungal Biology, 2011. doi: 2011.<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.12.009>.
9. Muller C., Nolden S., Gebhardt P., Heinzelmann E. Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic Friulimicin in Actinoplanes friuliensis. Antimicrob Agents Chemother // Antimicrob Agents Chemother, 2007. doi:1028-37.doi: 10.1128/AAC.00942-06.
10. Musliu A., Waziri U. Screening and Isolation of the Soil Bacteria for Ability to Produce Antibiotics // European Journal of Applied Sciences, 2012. – vol 4. – pp. 211-215.doi: 10.5829/idosi.ejas.2012.4.5.2011.
11. Halkman A.K. Antibiyotikler // MERCK Mikrobiyoloji Hızlı Erişim, 2021.
12. Alev U.. Topraktan antibiyotik üreten bacillus sp.' lerin taranması, antibiyotik üretimi üzerine bazı parametrelerin etkisi ve sporulasyonla ilişkisinin belirlenmesi // Uludağ üniversitesi,2012.
13. Hammed A.D., Chinemenwa A. Antibiotics producing bacteria isolated from farmlands // Bacteriology Articles, 2019. – vol 2.doi: <https://doi.org/10.36547/be.2019.2.4.99-102>.
14. Shruti D., Vinod C., Hemlata B., Rohit C. Isolation and screening of antibiotic producing fungi from solid-state waste // Hisar India Institutions, 2020. – vol 4. – pp.59-71.
15. James E., Okpe P.I. Isolation and Characterization of Antibiotic Producing Fungi from Soil // Adole Microbiology Research Journal International, 2022. – vol

32. <https://www.doi.org/10.9734/mrji/2022/v32i91343>.
16. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках // Изд-во: МГУ, 2004. — 185 с.
17. Лукашов Д.В., Веремчук Р.И. Фармацевтическая биотехнология // Изд-во: ВГМУ, 2019. — 210 с.
18. Артемук Е.Г. Антибиотики // Изд-во: Университет ИТМО, 2010. — с.7.
19. Орехов С. Н. Фармацевтическая биотехнология // Изд-во: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 384 с.
20. Першин Г. Н., Гвоздева Е. И. Учебник фармакологии // Изд-во: Иркутск: ИГМУ, 1967. — 126 с
21. Ause G.F. Lectures on antibiotics // Publishing house: Publishing center "Academy", 2010. – p.25.
22. Shleikin A.G. Medicinal reference book GEOTAR // Publishing house: GEOTAR-Media, 2020.– p.3.
23. Shmygarev V.I. , Prokopenko Yu.A., Terekhov S.S. Amicumacin-based approach to the development of prodrugs // Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogova, Moscow, Russia,2022.doi: 10.24075/brsmu.2022.073.
24. Pokhilenko V.D., Kalmantaev T.A., Dunaytsev I.A., Detushev K.V., Kislichkina A.A., Mukhina T.N., Chukina I.A. Isolation and characterization of a bacteriocin from a strain of *Bacillus subtilis* isolated from passionflower // Bacteriology, 2022. – vol 7 . – pp.9–17.DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-9-17.
25. Nikiforova O.A., Klykov S., Volsky A. The production of subtilisin A by *Bacillus subtilis* and the morphology of the colonies are influenced by the nutrient medium // Ann Microbiol, 2016. – vol 66. – pp.661–671.<https://doi.org/10.1007/s13213-015-1149-3>
26. Navaneeth. S., Bhuvanesh V. B. Optimization of media for subtilisin production from *Bacillus subtilis* MTCC 441S // African Journal of Biotechnology, 2014.– vol 8.doi:10.5897/AJB2009.000-9480.
27. Koenig M., Abraham E.P. Antimicrobial activity and antagonists of bacilisin and anticapsin // Journal Gen Microbiol,2013. – vol 94. – pp.37-45.doi: 10.1099/00221287-94-1-37.
28. Islam T., Rabbi M.F., Choi J., Baek K.H. Biosynthesis, molecular regulation and applications of bacilisin produced by *Bacillus* species // Journal Metabolites, 2022.– vol 12.doi: 10.3390/metabo12050397.
29. Ziemons S., Koutsantas K., Becker K. Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* // BMC Biotechnology, 2017. – vol 17.– pp. 325-341.
30. Nigam P.S., Singh A. Metabolic Pathways Production of Secondary Metabolites – Fungi // Reference Module in Food Science Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), 2014. – pp. 570-578. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00202-0>.
31. Elander R.P. Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics // Applied microbiology and biotechnology, 2003. – pp. 385-392.
32. Minghui Q., Weihong X. Example: Cephalosprin production // Comprehensive

- Membrane Science and Engineering (Second Edition), 2017
33. Hussain S.A, Mahmood T., Chawala N. Improved and economical synthesis of cefazolin sodium // Drug Regulatory Authority Lahore, University of the Punjab, Pakistan, 2012. – vol 1. – pp. 23-26.
34. Miller P.A. Production of tetracycline // United States Patent US3005023A, 1957.
35. Rolinson G.N., Geddes A.M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) // International Journal of Antimicrobial Agents, 2016. – vol 29. – pp. 3-8.
36. Batchelor F.R., Ernst B.C., Hardy T.L., Mansford R. L.6-Aminopenicillanic acid III // Isolation and purification, Biological sciences, 2010. <https://doi.org/10.1098/rspb.1961.0047>.
37. Matran A. I., Turnea R.M., Blaga, A. M.C. Engineering aspects of penicillin g transfer and conversion to 6-aminopenicillanic acid in a bioreactor with a mobile bed of immobilized penicillin amidase // Chemical Engineering Communications, 2014. – vol 201. – pp.1568–1581. <https://doi.org/10.1080/00986445.2013.819801>.
38. Cao, X., Wu, X., Wu, T. et al. Concentration of 6-aminopenicillanic acid from penicillin bioconversion solution and its mother liquor by nanofiltration membrane // Biotechnol. Bioprocess Eng, 2001. – vol 6. – pp.200–204. <https://doi.org/10.1007/BF02932551>.
39. Deak P.M., Lutz-Wahl S., Bothe H. Bioreactor cultivation of *Escherichia coli* for production of recombinant penicillin G amidase from *Alcaligenes faecalis* // Biotechnology Letters, 2003. – vol 25. – pp.397 – 400. <https://doi.org/10.1023/A:1022498314354>.
40. Крякунова Е.В., Канацкий А.В. Иммобилизация микроорганизмов и ферментов // Инст. биохим. физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 2009. URL:<file:///C:/Users/%D0%B0%D1%81%D1%83%D1%81/Downloads/imobilizatsiya-mikroorganizmov-i-fermentov.pdf>.
41. Демидова Ю.Е. Иммобилизация клеток микроорганизмов // Научно-технический сборник №35, Харьков, 2001 – с.4.
42. Zajkoska P., Rebroš M., Rosenberg M. Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli* // Applied Microbiology and Biotechnology, 2013. – vol 97. – pp.1441–1455. doi:10.1007/s00253-012-4651-6.
43. Mingyi M., Xiu C. Immobilization and property of penicillin G acylase on amino functionalized magnetic Ni0.3Mg0.4Zn0.3Fe2O4 nanoparticles prepared via the rapid combustion process // Front. Bioeng. Biotechnol., 2023. – vol 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1108820>.
44. Torres-Bacete J., Arroyo M., Torres-Guzmán R., Castillón M.P., Acebal C. Optimization of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) production by using a new immobilized penicillin acylase // Biotechnol Appl Biochem, 2000. – vol 32. doi: 10.1042/ba20000042.
45. Amol M. S., Avinash V.S., Koteswara R.V., Sureshkumar R. Process Development for 6-Aminopenicillanic Acid Production Using Lentikats-Encapsulated *Escherichia coli* Cells Expressing Penicillin V Acylase // ACS

- Omega, 2020. – vol 5. – pp.28972-28976.DOI: 10.1021/acsomega.0c02813.
46. Awais M., Pervez A., Asim Y., Shah M.M. Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* Immobilized in Polyacrylamide Gel // Life Sciences Services (MA, AP, AY), and Biotechnology Programme (MMS), Department of Env Pakistan J. Zool., 2016.– vol 42. – pp.267-275.
47. Lin Bingwang, Wang Ling, Luo Wenjun, Yang Shenyong // Patent: An enzymatic synthesis process of Amoxicillin, 2015.
48. Saul W., Donald W., Jensen S. // Patent : Enzyme immobilization for producing cephalosporin antibiotics Institutions Queen's University,2015.
49. Thays N., Morellon-Sterling R. Immobilization of Penicillin G Acylase on Vinyl Sulfone-Agarose: An Unexpected Effect of the Ionic Strength on the Performance of the Immobilization // Molecules,2022. – vol 5.doi: 10.3390/molecules27217587.
50. Börner R.A., Zaushitsyna O., Berillo D., Scaccia N., Matthiasson B. Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 as macroporous aggregates via cryogelation for butanol production // Technological Biochemistry, 2014. – vol 49. – pp.10-18.
51. Al-Jwaid A.K., Berillo D., Savina I.N., Kandi A.B., Caplin J.L. One-step formation of three-dimensional macroporous bacterial sponges as a new approach to the preparation of bioreactors for bioremediation and green water purification // RSC advances,2018. – vol 8.
52. Zaushitsyna O., Disisha T., Hatti-Kaul R., Matthiasson B. Cross-linked cryostructured *Lactobacillus reuteri* monoliths for the production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol // Journal of Biotechnology, 2017. – vol 241. – pp.22–32.
53. Zhi-Hao Zhong, Yu-Qing Zhang. Immobilization of green color and effective proliferation of *E.coli* in polyvinyl alcohol hydrogel membranes using unidirectional nanopore dehydration // Microbial Cell Factories,2022.<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01995-y>.
54. Günay N., Kilimci U., Öztürk G. Lysozyme modified cryogels for efficient bacteria removal // Chemical Paper, 2023. – vol 77. – pp.5839–5846. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02901-5>.
55. Zaushitsyna O., Berillo D., Kirsebom H., Matthiasson B. Cryostructured and cross-linked viable cells forming monoliths suitable for use in bioreactors // Topics in Catalysis,2014.– vol 57. – pp.339–348.
56. Zhurishkina V., Yeneyskaya V. Whole-cell PVA, microbial consortium LE-C1 immobilized in cryogel for depolymerization of xanthan // Catalysts,2023. – vol 12.DOI:10.3390/catal13091249.
57. Song M., Park J., Jeon J., Kim W., Bae H. Application of poly(vinyl alcohol) cryogels for immobilization of nitrifiers: improved resistance to shear stress failure and viability control // Scientific Total Environment,202310.doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.158835.
58. Wan W.A., Abd Malek R., Harvey L.M. Production of *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides immobilized on polyurethane foam through multiple batch

- fermentations // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,2016. – pp. 24-31.
59. Perez S.Z.,Gazo U.G. Viability of Aspergillus awamori spores immobilized in cryogel,2021.
60. Bayrak G., Idil N., Perchin I. Hybrid cryogel discs filled with Penicillium chrysogenum for heavy metal removal // Chemical Papers,2023. – vol 77.– pp.3921-3936.
- 61.Oliveira J.P., Carvalho L.M., Brandi I.V., Carvalho G.P., de Carvalho B. Synthesis of supermacroporous cryogel for continuous starch hydrolysis bioreactors // Electrophoresis, 2017. – vol 38.– pp.2940–2946.doi: 10.1002/elps.201700208.
- 62.Efremenko E.N., Spiricheva O.V., Veremeenko D.V., Baybak A.V., Lozinsky V. I. L (+) – production of lactic acid using fungal cells of Rhizopus oryzae captured in polyvinyl alcohol // Journal of Chemical Engineering and Biotechnology: International Research in Process, Environment and Clean Technology,2006. – vol 81.– pp.519-522.
- 63.Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Efremenko E. N. Production of lactic acid using free cells of bacteria and filamentous fungi and cells immobilized in polyvinyl alcohol cryogel: comparative analysis of the characteristics of biocatalysts and processes // Catalysis in Industry,2016.– vol 8.– pp.280–285.
- 64.El-Sayed E.R., Ahmed A.S., Hasan I.A., Ismail A.A., Karam El-Din A.A. Strain improvement and immobilization techniques to increase production of the anticancer drug paclitaxel by Aspergillus fumigatus and Alternaria tenuissima // Appl Microbiol Biotechnol,2019.– vol 103.doi: 10.1007/s00253-019-10129-1/.
65. Freeman A., Aharonowitz Y. Immobilization of microbial cells in crosslinked, prepolymerized, linear polyacrylamide gels: Antibiotic production by immobilized Streptomyces clavuligerus cells // Biotechnology and Bioengineering,2001. – vol 23.– pp.2747-2759.<https://doi.org/10.1002/bit.260231209>.
66. Szczęsna-Antczak M., Galas E. Bacillus subtilis cells immobilised in PVA-cryogels // Biomolecular Engineering,2001. – vol 17.– pp. 55-63 [doi.org/10.1016/S1389-0344\(00\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(00)00065-4).
- 67.Maria S. Kuyukina A, Irena B. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly(vinyl alcohol) cryogels hydrophobized using a biosurfactant // Journal of Microbiological Methods, 2006. – vol 65. – pp. 596-603.<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.006>.
- 68.Bagherinejad M.R, Korbekandi H., Tavakoli N., Abedi D. Immobilization of penicillin G acylase using permeabilized Escherichia coli whole cells within chitosan beads // Res Pharm Sci,2012.– vol 7. – pp.79-85.
- 69.Mohamed A., Farid A.I., Diwany El.H., Enshasy A.El. Production of oxytetracycline by immobilized Streptomyces rimosus cells in calcium alginate gels // Acta Biotechnologica 2007. – vol 14. – pp.303-309, <https://doi.org/10.1002/abio.370140316>.
70. Alenina K.A., Aleskerova L.E., KascheyevatP.B., Ismailov A.D.The Poly(vinyl alcohol)-Immobilized Photobacteria for Toxicology Monitoring // Engineering, 2012. – vol 4. doi:10.4236/eng.2012.410B030.

- 71.Westrin B. A., Axelsson A. Diffusion in gels containing immobilized cells: A critical review // Biotechnology and Bioengineering, 1991. – vol 38. – pp.439–446. doi:10.1002/bit.260380502.
- 72.Kuo-Cheng Chen, Ying-Feng Lin. Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel // Enzyme and Microbial Technology,2013. – vol 16. – pp.79-83. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90113-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90113-9).
- 73.Alvarez G.S., Foglia M.L., Copello G.J., Desimone M.F.,Diaz L.E. Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol–gel-derived silica matrices // Applied Microbiology and Biotechnology,2008. – vol 82. – pp.639–646. doi:10.1007/s00253-008-1783-9.
- 74.Alvarez G.S., Desimone M.F., Diaz, L.E. Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol–gel process // Appl Microbiol Biotechnol,2007. – vol 73. – pp.1059–1064. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0580-6>.
- 75.Nussinovitch A.M., Nussinovitch R. Shapira Z. Influence of immobilization of bacteria, yeasts and fungal spores on the mechanical properties of agar and alginate gels // Food Hydrocolloids,2006. – vol 8. – pp. 361-372. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80348-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80348-2).
76. Timothy M., Henderson K., Haylock N.Cryogels for biomedical applications,, // Journal of Materials Chemistry,2013. <https://doi.org/10.1039/C3TB20280A>.
77. Gun'ko V.M., Savina I.N., Mikhalovsky S.V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterization // Advances in Colloid and Interface Science,2013.– vol 187–188. – pp.1-46.<https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.11.001>.
78. Hixon K.R., Lu T., Scott A.A. Comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications // Sell, Acta Biomaterialia,2017. – vol 62. – pp.29.<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.033>.
79. Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Y. The potential of polymeric cryogels in bioseparation // Bioseparation, 2001. – vol 10. – pp.163–188. <https://doi.org/10.1023/A:1016386902611>.
- 80.Mehdi R., Yang Q., Avnesh S. Thakor Three-dimensional cryogels for biomedical applications // Journal of Biomedical Materials Research,2019. – vol 107. – pp.2736-2755. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36777>.
- 81.Sedigheh J., Dariush N., Akbarzadeh A., Mirdamadi S., Behrokh F.Isolation of a Penicillin Acylase Producing E.coli and Kinetic Characterization of the Whole Cell Enzyme Activity // Iranian Biomedical Journal,2002. – vol 6. – pp.93-96.
- 82.Nedovic V.A., Obradovic B., Leskosek-Cukalovic I., Vunjak-Novakovic G. Immobilized Yeast Bioreactor Systems for Brewing—Recent Achievements Engineering and Manufacturing for Biotechnology // Focus on Biotechnology, 2001. – vol 4.[https://doi.org/10.1007/0-306-46889-1\\_18](https://doi.org/10.1007/0-306-46889-1_18).
83. Berillo D. Overview of viable Bacteria Immobilisation // Encyclopedia, 2021.
- 84.Sandalci I.,Basaran Z.B. Immobilization of Bacterial Cells on Natural Minerals for Self-Healing Cement-Based Materials // Built Environ.,Sustainable Design and Construction,2021. – vol 7. <https://doi.org/10.3389/fbuil.2021.655935>.

85. De Gregorio P.R., Michavila G., Muller L.R. Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants // PLOS, USA, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176930>.
86. Yoshimoto S., Ohara Y., Nakatani H. Reversible bacterial immobilization based on the salt-dependent adhesion of the bacterionanofiber protein AtaA // Microb Cell Fact, 2017 – vol 16. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0740-7>.
87. Jian-Jiang Z. Recent advances in bioreactor engineering // Korean Journal of Chemical Engineering, 2010. – vol 27. – pp.1035–1041.
88. Klaas V.R., Tramper J. Basic bioreactor design // CRC press, 2012.
89. Ferenc'ík N., Hudak R. Overview Article: Bioreactors Designed for 3D Bioprinted Tissue and Process Parameters // World Symposium on Applied Machine Intelligence and Informatics. Slovakia, 2021. DOI: 10.1109/SAMI50585.2021.9378697
90. Si-Jing W. Chapter 6 - Bioreactor Engineering // Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources New Technologies and Applications, 2007. – pp.131-161. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50007-4>.
91. Yan F., Xiao-Jun H., Peng-Cheng C., Zhi-Kang X. Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization // Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, 2011.
92. Chetsamon A., Maeda I., Umeda F. Continuous antibiotic production by an immobilized cyanobacterium in a seaweed-type bioreactor // J Appl Phycol, 2002. – pp. 135–139. <https://doi.org/10.1007/BF00693059>.
93. Basavaraju M., Gunashree B.S. Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics, 2022. DOI: 10.5772/intechopen.105508.
94. Межгосударственный Стандарт Гост ISO 7218 – 2015. URL: [http://www.mibio.ru/docs/110/gost\\_7218-2015.pdf](http://www.mibio.ru/docs/110/gost_7218-2015.pdf).
95. Турганова М.А. Изучение влияния температуры на культуральные и antimикробные свойства микромицетов, продуцентов антибиотика // Дипломная работа, КазНИТУ им. Сатпаева, 2023. URL: [https://official.satbayev.university/download/document/39754/2023\\_%D0%91%D0%90%D0%9A\\_%D0%A2%D1%83%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%20%D0%9C%D0%B0%D0%BB%D0%88%D0%BA%D0%B0.pdf](https://official.satbayev.university/download/document/39754/2023_%D0%91%D0%90%D0%9A_%D0%A2%D1%83%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%20%D0%9C%D0%B0%D0%BB%D0%88%D0%BA%D0%B0.pdf).
96. OHAUS. Аналитические и прецизионные весы Pioneer техническое описание. URL: <https://ohaus.nt-rt.ru/images/manuals/pioneer.pdf>
97. Межгосударственный Стандарт Гост ISO 7218 – 2015. URL: [http://www.mibio.ru/docs/110/gost\\_7218-2015.pdf](http://www.mibio.ru/docs/110/gost_7218-2015.pdf).
98. Паспорт Стерилизатор паровой. URL: <http://sterilizator.by/wpcontent/uploads/2016/08/vk-75-01-pasport.pdf>.
99. Рисунок. Аналитические и прецизионные весы. URL: [https://images.satu.kz/75825395\\_w640\\_h640\\_laboratornye-analiticheskivesy.jpg](https://images.satu.kz/75825395_w640_h640_laboratornye-analiticheskivesy.jpg).
100. Межгосударственный Стандарт ГОСТ ISO 7218 – 2015. URL: [http://www.mibio.ru/docs/110/gost\\_7218-2015.pdf](http://www.mibio.ru/docs/110/gost_7218-2015.pdf)

- 101.Бокс ламинарный 2 класс защиты, БО-PP. URL:  
<https://labtorg.kz/labfurniture/laminars/laminar-bo-pp.html>.
- 102.Межгосударственный Стандарт Гост ISO 7218 – 2015. URL:  
[http://www.mibio.ru/docs/110/gost\\_7218-2015.pdf](http://www.mibio.ru/docs/110/gost_7218-2015.pdf).
- 103.TC-1/80 СПУ Термостат Электрический Суховоздушный URL:  
<https://labmall.ru/products/termostat-sukhovozdushnyi-tv-80-1?yclid=8250664465642029055>.
- 104.Спектрофотометр ПЭ-5400УФ.Паспорт и руководство по эксплуатации. URL:<https://vikonservice.nethouse.ru/static/doc/0000/0000/0141/141087.3t9prom12h.pdf>.
- 105.Рисунок. Бокс ламинарный 2 класс защиты, БО-PP. URL:  
<https://labtorg.kz/labfurniture/laminars/laminar-bo-pp.html>
- 106.Рисунок.TC-1/80 СПУ Термостат Электрический Суховоздушный URL:  
<https://labmall.ru/products/termostat-sukhovozdushnyi-tv-80-1?yclid=8250664465642029055>.
- 107.Питательные среды, Nutrient Agar. URL:  
<https://www.tmmmedia.in/product/nutrient-agar-3/>.
- 108.Питательные среды, Nutrient Broth. URL:  
<https://www.tmmmedia.in/product/nutrient-broth/>.
- 109.Рисунок. Питательные среды, Nutrient Agar. URL:  
<https://www.tmmmedia.in/product/nutrient-agar-3/>.
- 110.Jaiprakash G.S., Kamalesh K. Evaluation of determination of g-aminopenicillanic acid by p-dimethyl aminobenzaldehyde // Biotechnology Techniques, India, 1987. - vol 27. URL:  
file:///C:/Users/%D0%B0%D1%81%D1%83%D1%81/Downloads/method%206APC%20benzal%20(2).pdf.
111. Su M., Sun H., Zhao Y., Lu A., Cao X., Wang J. Degradation Kinetics // Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. - vol 105.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.026>.
112. Shaobo W., Xiang Y. Enhanced catalytic performance of penicillin G acylase by covalent immobilization onto functionally-modified magnetic Ni0.4Cu0.5Zn0.1Fe2O4 nanoparticles // PLOS Biology, USA, 2024.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297149>.
113. Sedigheh J., Norouzian D. Isolation of a Penicillin Acylase Producing E.coli and Kinetic Characterization of the Whole Cell Enzyme Activity // Iranian Biomedical Journal, 2002. - vol 105. URL:  
file:///C:/Users/%D0%B0%D1%81%D1%83%D1%81/Downloads/--v6n2p93-en.pdf.
- 114.Ferreira J.S., Adrie J.J., Xiaonan L. Solution Crystallization Kinetics of 6-Aminopenicillanic Acid // American Chemical Society (ACS), Engineering Chemistry Research, 2006.- vol 45.<https://doi.org/10.1021/IE0601652>.
- 115.Norouzian D., Javadpour S., Moazami N., Akbarzadeh A. Immobilization of whole cell penicillin G acylase in open pore gelatin matrix // Enzyme and Microbial Technology, 2002. - vol 30. – pp.26–29. doi:10.1016/s0141-

0229(01)00445-8.

116.Rodríguez M. E., Quintero R., Munguía L.A. Design and kinetic characterization of a whole cell penicillin acylase biocatalyst using *E. coli* // Process Biochemistry,1994. - vol 29. – pp.213–218. doi:10.1016/0032-9592(94)85006-2.

117. Bagherinejad M.R, Korbekandi H., Tavakoli N., Abedi D. Immobilization of penicillin G acylase using permeabilized *Escherichia coli* whole cells within chitosan beads // Res Pharm Sci, 2012.- vol 29. – pp.79-85.

118. De León A., García B., Barba A., Villaseñor F., Estrada A., Revilla R. Periplasmic penicillin G acylase activity in recombinant *Escherichia coli* cells permeabilized with organic solvents // Process Biochemistry,2003. - vol 39. – pp.301–305.doi:10.1016/s0032-9592(03)00079-7.



## Отчет подобия

### Метаданные

Название организации

Satbayev University

Название

Разработка 3D биореактора с иммобилизованными микроорганизмами для производства антибиотиков

Автор Научный руководитель / Эксперт

Турганова Малика Адилжановна Дмитрий Берилло

Подразделение

ИГиНГД

### Объем найденных подобий

КП-ия определяют, какой процент текста по отношению к общему объему текста был найден в различных источниках.. Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.



25

Длина фразы для коэффициента подобия 2



9061

Количество слов



68878

Количество символов

### Тревога

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		20
Интервалы		0
Микропробелы		60
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)		79

### Подобия по списку источников

Ниже представлен список источников. В этом списке представлены источники из различных баз данных. Цвет текста означает в каком источнике он был найден. Эти источники и значения Коэффициента Подобия не отражают прямого плагиата. Необходимо открыть каждый источник и проанализировать содержание и правильность оформления источника.

### 10 самых длинных фраз

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	ЦВЕТ ТЕКСТА
1	Изучение влияния температуры на культуральные и антимикробные свойства микромицетов, продуцентов антибиотика.docx 5/26/2023 Satbayev University (ИГиНГД)	190 2.10 %

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	Изучение влияния температуры на культуральные и антимикробные свойства микромицетов, продуцентов антибиотика.docx 5/26/2023 Satbayev University (ИГиНГД)	190 2.10 %

2	РАЗРАБОТКА 3Д БИОРЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ [REDACTED] 3/16/2025 Satbayev University (ИГиНГД)	104 1.15 %
3	РАЗРАБОТКА 3Д БИОРЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ [REDACTED] 3/16/2025 Satbayev University (ИГиНГД)	93 1.03 %
4	РАЗРАБОТКА 3Д БИОРЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ [REDACTED] 3/16/2025 Satbayev University (ИГиНГД)	60 0.66 %
5	РАЗРАБОТКА 3Д БИОРЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ [REDACTED] 3/16/2025 Satbayev University (ИГиНГД)	53 0.58 %
6	РАЗРАБОТКА 3Д БИОРЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ [REDACTED] 3/16/2025 Satbayev University (ИГиНГД)	41 0.45 %
7	Изучение влияния температуры на культуральные и антимикробные свойства микромицетов, продуцентов антибиотика.docx [REDACTED] 5/26/2023 Satbayev University (ИГиНГД)	40 0.44 %
8	РАЗРАБОТКА 3Д БИОРЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ [REDACTED] 3/16/2025 Satbayev University (ИГиНГД)	40 0.44 %
9	Изучение влияния температуры на культуральные и антимикробные свойства микромицетов, продуцентов антибиотика.docx [REDACTED] 5/26/2023 Satbayev University (ИГиНГД)	35 0.39 %
10	РАЗРАБОТКА 3Д БИОРЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ [REDACTED] 3/16/2025 Satbayev University (ИГиНГД)	31 0.34 %

из базы данных RefBooks (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
<b>из домашней базы данных (13.52 %)</b>		
ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	РАЗРАБОТКА 3Д БИОРЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ [REDACTED] 3/16/2025 Satbayev University (ИГиНГД)	802 (35) 8.85 %
2	Изучение влияния температуры на культуральные и антимикробные свойства микромицетов, продуцентов антибиотика.docx [REDACTED] 5/26/2023 Satbayev University (ИГиНГД)	423 (13) 4.67 %

из программы обмена базами данных (0.00 %)

ОТЗЫВ

НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

на магистерскую диссертацию

(наименование вида работы)

Тургановой Малики Адилжановны

(Ф.И.О. обучающегося)

7М05105 – Биотехнология

(шифр и наименование ОП)

Тема: Разработка 3D биореактора с иммобилизованными  
микроорганизмами для производства антибиотиков

Магистерская диссертация Тургановой М.А. посвящена разработке лабораторной модели 3D-биореактора с иммобилизованными микроорганизмами, применяемыми для синтеза антибиотиков. Актуальность темы не вызывает сомнений — биокатализ в иммобилизованной форме позволяет повысить эффективность, селективность и стабильность микробиологических процессов, особенно в условиях масштабирования. Современные тренды в биотехнологии требуют создания устойчивых и воспроизводимых систем, что делает разработку подобных биореакторов исключительно важной задачей.

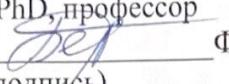
Магистрантка продемонстрировала понимание как теоретических основ (иммобилизация клеток, биореакторостроение, особенности синтеза антибиотиков), так и практических подходов к реализации задачи. Работа включает комплексный обзор литературы, подробное описание методик, систематический анализ полученных результатов и обоснованные выводы.

Малика проявила самостоятельность в постановке и реализации экспериментов, овладела методиками спектрофотометрического анализа, работа с оборудованием (автоклав, термостат, ламинарный бокс, спектрофотометр), а также навыками подбора оптимальных условий для иммобилизации клеток в полимерные матрицы (в частности, в криогели на основе ПВС). Опубликована обзорная статья в журнале входящий в базу данных Скопус и публикация короткой статьи в сборнике материалов конференции «Сатпаевские чтения 2025», но магистрант не выступала с устным или постерным докладом на этой конференции.

Выпускная квалификационная работа выполнена на хорошем уровне, обладает достаточной степенью завершённости и практической ценностью. Результаты могут быть использованы как основа для дальнейших исследований или внедрения в лабораторные биотехнологические установки. Работа соответствует требованиям магистерской диссертации и заслуживает оценки «хорошо», а её автор — допуска к защите и присвоения академической степени магистра по специальности «Биотехнология».

Научный руководитель Берилло Д.А.

НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени К.И.САТПАЕВА»

доктор PhD, профессор  
  
Ф. И.О.  
(подпись)  
«30» мая 2025г.