

Національний технічний університет України
“Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний технічний університет України
“Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Поліщук Валентина Юріївна

УДК 579.66:663.16:577.164.12

ДИСЕРТАЦІЯ

**Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної
олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill.**

03.00.20 – біотехнологія (технічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ В.Ю.Поліщук

Науковий керівник: **Дуган Олексій Мартем'янович**, доктор біологічних наук,
професор, декан факультету біотехнології і біотехніки

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Поліщук В.Ю. Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2018.

Відомим мікроорганізмом–продуцентом рибофлавіну є аскоміцет *Eremothecium ashbyi*, який використовується у промисловості. Крім надсинтезу рибофлавіну *E. ashbyi* здійснює синтез флавінаденіндинуклеотиду (ФАД). За допомогою *E. ashbyi* можна отримувати як кормовий рибофлавін, що використовується в якості кормової добавки для тварин, так і, при застосуванні певних методів виділення та очистки, рибофлавін медичного призначення.

Одночасно з синтезом рибофлавіну *E. ashbyi* здійснює синтез ефірної олії, яка за ароматом та своїми властивостями ідентична ефірній олії, отриманій з пелюсток троянди. У своєму складі вона містить такі ароматичні речовини, як гераніол (69,5–84,5%), нерол, лінаноол та β -фенілетанол (12,7–27,7%). Це дає можливість розглядати *E. ashbyi* як перспективний продуцент ароматичних речовин, що є необхідними для парфюмерно-косметичної промисловості. Біотехнологія трояндової ефірної олії, однієї з найцінніших олій в світі, досі не розроблена.

На даний момент в Україні не налагоджено виробництво рибофлавіну за допомогою біотехнології, а можливість одночасного отримання ще й ефірної олії робить тему дисертаційної роботи актуальною, своєчасною та важливою.

В ході виконання роботи досліджено морфологічні та культуральні особливості штаму *Eremothecium ashbyi* F-340. Він відноситься до аскоміцетів, що не утворюють плодові тіла, має справжній дихотомічний розгалужений міцелій яскраво-жовтого кольору, який складається з багатоядерних клітин. Колір міцелію обумовлений присутністю рибофлавіну, який накопичується в

такій кількості, що випадає у вигляді кристалів в вакуолях.

Показана природна мінливість штаму. Гриб утворює пігментовані жовті та жовтогарячі колонії з високою здатністю до біосинтезу рибофлавіну, та білі колонії, з низькою. Найчастіше колонії білого кольору з'являються при відновленні музейної культури і майже не з'являються при регулярних пересівах культури та чергуванні рідких та агаризованих поживних середовищ.

Досліджено умови зберігання штаму. Встановлено, що короткотривале зберігання *E. ashbyi* F-340 у активному стані можливе на агаризованих глюкозо-пептонно-дріжджовому та соєвому середовищах за температури зберігання 5°C. Довготривале зберігання культури *E. ashbyi* (протягом 7 місяців) можливе лише за кімнатної температури.

Досліджено вплив температури на життєдіяльність міцелію *Eremothecium ashbyi* F-340. Нижня гранична температура для *E. ashbyi* становить 4°C. Верхня гранична температура дорівнює 38°C. За цієї температури ще спостерігається незначний ріст гриба, а вже при 39°C ріст міцелію не спостерігається та відновлення росту при 28°C не відбувається.

Динаміка росту штаму *E. ashbyi* F-340 у глибинній культурі підкоряється відомим закономірностям для періодичних культур. Фаза експоненціального росту триває протягом 2 діб, потім спостерігається уповільнення росту та перехід культури у стаціонарну фазу росту, яка триває до 5 доби культивування, після чого культура переходить у фазу відмирання або автолізу.

Встановлено, що під час інтенсивного росту штаму відбувається зниження рН до 5,2, а інтенсивне накопичення рибофлавіну у культуральній рідині та у біомасі пов'язане з підвищенням рН до 7,8.

Найбільш інтенсивно накопичення рибофлавіну в культуральній рідині відбувається у стаціонарній фазі росту на 3–4 добу культивування та його концентрація досягає $34 \pm 1,6$ мг/дм³. Другий етап накопичення рибофлавіну відбувається на 5-7 добу та пов'язаний з автолізом культури, вміст рибофлавіну досягає $55,2 \pm 2,7$ мг/дм³. Рибофлавін спочатку накопичується у міцелії *E.ashbyi*,

де досягає рівня 8,1-10,7 мг/г сухої біомаси і залишається на такому рівні протягом 4–5 доби культивування.

Незважаючи на постійну підтримуючу селекцію при культивуванні штаму у лабораторних умовах протягом 3 років спостерігалось поступове значне зниження рівня накопичення рибофлавіну та відповідне збільшення рівня накопичення біомаси.

З даних літератури відомо, що надсинтез рибофлавіну грибом *E. ashbyi* у природних умовах здійснюється як захисна реакція на дію сонячних ультрафіолетових променів. Тому нами було запропоновано здійснювати УФ-опромінення продуценту для підвищення синтезу рибофлавіну. Опромінення культуральної рідини продуценту призводить до збільшення біосинтезу рибофлавіну на 72–74%, опромінення водної суспензії міцелію штаму-продуценту – до збільшення синтезу на 80%.

Встановлено, що найбільшому виходу рибофлавіну сприяє використання посівного матеріалу у віці 3-4 діб та у кількості 1%.

На наступному етапі досліджено вплив умов культивування на біосинтетичну здатність продуценту. Показано, що початковий рівень рН середовищ, призначених для отримання біомаси та рибофлавіну, має бути різним. Для отримання максимальної кількості біомаси, а також посівного матеріалу, доцільно створювати у середовищі рН на рівні 5,5–6,0, а от для максимального накопичення рибофлавіну початкове рН середовища має становити 7,5. Встановлено, що за умов аерації на качалці при 180 об/хв синтезується на 70 % більше рибофлавіну, ніж при 70 об/хв.

E. ashbyi здатен рости в широкому діапазоні температур від 20 до 38°C. Оптимальною температурою для максимального виходу цільового продукту є 27–29°C.

Досліджено вплив різних джерел карбону на накопичення біомаси та синтез рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340. Для синтезу рибофлавіну краще підходять моносахариди (фруктоза, галактоза) та шестиатомний спирт сорбіт, а біомаса краще накопичується при наявності в середовищі фруктози, сахарози та

гліцерину. Кращим джерелом нітрогену для *E. ashbyi* F-340 виявився дріжджовий екстракт, кількість рибофлавіну, що синтезована на середовищі з дріжджовим екстрактом на 54% більша, ніж на інших джерелах нітрогену. Однак досі не було запропоновано жодного середовища для культивування *Eremothecium ashbyi*, яке б містило у складі наведені вуглеводи та було досить дешевим та технологічним.

Для вирішення даної проблеми запропоновано використовувати таке перспективне натуральне джерело карбону, як глюкозо-фруктозний сироп (ГФС), який виробляють з кукурудзяного крохмалю ферментативним гідролізом його до глюкози з наступною ізомеризацією частини глюкози у фруктозу та подальшим очищенням. Показано, що найбільша кількість вітаміну синтезується при використанні ГФС-10 (140 мг/дм³), що у 7 разів більше, ніж на середовищі з глюкозою, та у 3,8 разів більше, ніж на середовищі з фруктозою.

З метою здійснення оптимізації поживного середовища був запланований повний факторний експеримент на двох рівнях для 3 факторів, матрицю планування доповнили «зірковими» точками та отримали ортогональний центрально-композиційний план 2-го порядку для 3-х факторного експерименту. В результаті розрахунків отримано рівняння регресії другого порядку. Статистичну значимість коефіцієнтів рівняння перевіряли за критерієм Стюдента, адекватність отриманого рівняння за критерієм Фішера.

В результаті математичної обробки експериментальних даних отримано рівняння регресії залежності концентрації рибофлавіну в культуральній рідині від концентрації ГФС-10 (m), дріжджового екстракту (w) та пептону (v):

$$Y_1 = -758,483 + 41,029 \cdot m + 9,959 \cdot w + 5,777 \cdot v + 0,693 \cdot m \cdot w - 0,472 \cdot m \cdot v - 3,51 \cdot w \cdot v - 0,547 \cdot m^2 + 5,701 \cdot v^2$$

Аналізуючи поверхні відгуку встановлено склад модифікованого середовища: оптимальна концентрація ГФС-10 для максимального накопичення рибофлавіну становить 40 г/дм³, концентрації дріжджового екстракту та пептону у середовищі становлять відповідно 10 та 1 г/дм³. Концентрація рибофлавіну, що спостерігалася при культивуванні на модифікованому

середовищі у культуральній рідині становить 350,4 мг/дм³, що у 17 раз більше, ніж на ГПД середовищі, та у 2,5 рази більше, ніж на початковому середовищі з ГФС-10.

Визначення вмісту у культуральній рідині ефірної олії проводили трьохкратною екстракцією гексаном з наступним видаленням розчинника. Показаний широкий діапазон варіювання кількості ефірної олії. Найбільша кількість спостерігається на середовищі, що містить в якості джерела карбону ГФС-10 (273...453 мг/дм³). Кількість ефірної олії збільшується зі збільшенням концентрації ГФС у середовищі.

Наведено технологічну схему одночасного отримання рибофлавіну та ефірної олії методом гідродистиляції з подальшим розділенням потоків виділення рибофлавіну та ефірної олії.

Наукова новизна одержаних результатів:

- досліджено динаміку росту, виходу біомаси, накопичення рибофлавіну та ефірної олії обраним штамом-продуцентом *Eremothecium ashbyi* на середовищах з різними джерелами живлення;

- визначено склад та кислотність середовищ, які є сприятливими для росту штаму-продуценту в глибинній культурі;

- знайдено раціональні біотехнологічні параметри для отримання максимального виходу рибофлавіну та ефірної олії: температура культивування 27-29°C, початкове рН середовища 7,5, перемішування 180 об/хв;

- за допомогою методів планування експерименту оптимізовано поживне середовище для накопичення рибофлавіну та ефірної олії, що складається з ГФС-10, дріжджового екстракту та пептону, та перевірена можливість одночасного отримання цих продуктів;

- вперше науково обґрунтовано та створено біотехнологію отримання рибофлавіну та ефірної олії з вітчизняної відновлюваної сировини – глюкозо-фруктозного сиропу, що виготовляється з кукурудзи.

Ключові слова: *Eremothecium ashbyi*, рибофлавін, ефірна олія, посівний матеріал, глибинне культивування, джерела карбону, оптимізація.

ABSTRACT

V.Yu. Polishchuk Development of technology for production of riboflavin and essential oil produced by *Eremothecium ashbyi* Guill. – Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of technical sciences in specialty 03.00.20 – biotechnology. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”, Kyiv, 2018.

A well-known microorganism-producer of riboflavin is ascomycete *Eremothecium ashbyi* used in industry. Besides overexpression of riboflavin, *E. ashbyi* also performs synthesis of flavinadeninedinucleotide (FAD). Using *E. ashbyi*, one can obtain either forage riboflavin used as a feed additive for livestock, or, using certain isolation and purification methods, riboflavin of medical purpose.

Concomitantly with riboflavin synthesis, *E. ashbyi* performs synthesis of essential oil, identical by its aroma and properties to essential oil derived from rose petals. It contains such aromatic substances as geraniol (69.5–84.5%), nerol, linalool, and β -phenylethanol (12.7–27.7%). This allows viewing *E. ashbyi* as a promising producer of aromatic substances, which are necessary for perfume and toiletry industry. Biotechnology of rose essential oil, one of the most valuable in the world, has not been developed so far.

At present, manufacture of riboflavin using biotechnology is not established in Ukraine, and the potential of concomitant production of essential oil as well makes the topic of this thesis urgent, timely, and important.

During the work, morphological and cultural peculiarities of the strain *Eremothecium ashbyi* F-340 have been investigated. It belongs to ascomycetes not generating ascocarps, has true dichotomic branched bright-yellow mycelium composed of multinucleate cells. Mycelium color is due to the presence of riboflavin, which is accumulated in such quantities that it is precipitated in vacuoles as crystals.

Natural variability of the strain has been shown. The fungus forms pigmented yellow and orange colonies with high ability to riboflavin biosynthesis, and white colonies with low biosynthetic ability. Most frequently, white colonies develop upon

archive culture reactivation and almost do not appear upon regular reinoculations and alterations of liquid and agar nutrient media.

The strain storage conditions have been investigated. It has been established that short-term storage of *E. ashbyi* F-340 in the active state is possible on agar glucose-peptone-yeast and soybean media at storage temperature 5°C. Long-term storage of *E. ashbyi* culture (for 7 months) is possible only at room temperature.

Temperature effects on viability of *Ermothecium ashbyi* F-340 mycelium have been investigated. The lower limit temperature for *E. ashbyi* is 4°C. The upper limit temperature is equal to 38°C. Minor growth of the fungus is still observed at this temperature, and at 39°C no mycelium growth is observed, and growth restoration at 28°C is not observed.

Growth dynamics of *E. ashbyi* strain F-340 in submerged culture follows the known regularities for periodic cultures. Exponential growth phase lasts for about 2 days; after this, growth deceleration and culture switch into stationery growth phase are observed; the latter one lasts for about 5 days of culturing, after which the culture is switched into die-off or autolysis phase.

It has been established that pH decrease to 5.2 occurs during intensive strain growth; intensive riboflavin accumulation in cultural fluid and biomass is associated with pH increase to 7.8.

The most intensive riboflavin accumulation occurs in stationery growth phase on culturing day 3–4, and its concentration reaches $34 \pm 1,6 \text{ mg/dm}^3$. The second stage of riboflavin accumulation occurs on day 5–7 and is associated with culture autolysis; riboflavin content reaches $55,2 \pm 2,7 \text{ mg/dm}^3$. Riboflavin is accumulated at the beginning in *E.ashbyi* mycelium, where it reaches the level of 8.1–10.7 mg/g of dry biomass and remains at that level until completion of culturing.

Despite continuous maintenance selection during the strain culturing under laboratory conditions for 3 years, gradual considerable decrease in riboflavin accumulation and relevant increase in biomass accumulation level has been observed.

It is known from literature data that riboflavin overexpression by fungus *E. ashbyi* in natural conditions occurs as a defense reaction on the effect of sun

ultraviolet radiation. That is why we suggested to perform UV irradiation of the producer in order to increase riboflavin synthesis. Irradiation of the producer cultural fluid results in increase of riboflavin biosynthesis by 72-74%, and irradiation of aqueous suspension of mycelium of the producer strain results in synthesis increase by 80%.

It has been established that the highest riboflavin yield is achieved when the inoculum aged 3-4 days in quantity 1% is used.

The effect of culturing conditions on biosynthetic ability of the producer has been investigated at the following stage. It has been shown that the initial pH level of media intended for biomass and riboflavin production has to be different. In order to obtain maximum quantities of biomass and inoculum, it is expedient to adjust the medium pH to the level 5.5–6.0, and for maximum riboflavin accumulation, initial medium pH has to be 7.5. It has been established that, under aeration conditions on a rocker at 180 rpm, 70 % more riboflavin is synthesized compared to 70 rpm.

E. ashbyi is capable to growth in a wide range of temperatures from 20 to 38°C. The optimal temperature for maximum target product yield is 27-29°C.

The effect of various carbon sources on biomass accumulation and riboflavin synthesis by *E. ashbyi* strain F-340 has been studied. Monosaccharides (fructose, galactose) and hexatomic alcohol sorbitol are better suitable for riboflavin synthesis, and biomass is accumulated better in the presence of fructose, sucrose, and glycerol in the medium. The best nitrogen source for *E.ashbyi* F-340 turned out to be yeast extract; riboflavin quantity synthesized in a medium with yeast extract was 54% more compared to other nitrogen sources. Nevertheless, no medium for *Eremothecium ashbyi* culturing containing the said carbohydrates and being cheap and technological enough has been suggested yet.

In order to solve this problem, we have suggested to use such a promising natural carbon source as glucose-fructose syrup (GFS), manufactured from corn starch via its enzymatic hydrolysis to glucose with following isomerization of glucose parts into fructose and further purification. It has been shown that the highest vitamin quantity is synthesized with the use of GFS-10 (140 mg/dm³), which is 7 times as

high as in a medium with glucose, and 3.8 times as high as in a medium with fructose.

For the nutrient medium optimization, we have planned a complete factorial experiment at two levels for 3 factors; the planning matrix was supplemented with “star” points, and orthographic central composite design of second order for 3-factor experiment has been obtained. As a result of calculations, regression equation of the second order has been obtained. Statistical significance of the equation coefficients was verified according to Student’s criterion, and adequacy of the obtained equation was verified according to Fisher’s criterion.

As a result of mathematical processing of experimental data, we have obtained the regression equation of relation between riboflavin concentration in cultural fluid and concentrations of GFS-10 (m), yeast extract (w) and peptone (v):

$$Y_1 = -758.483 + 41.029 \cdot m + 9.959 \cdot w + 5.777 \cdot v + 0.693 \cdot m \cdot w - 0.472 \cdot m \cdot v - 3.51 \cdot w \cdot v - 0.547 \cdot m^2 + 5.701 \cdot v^2$$

Analyzing the response surfaces, we have established the composition of modified medium: optimal GFS-10 concentration for maximum riboflavin accumulation is 40 g/dm³, and concentrations of yeast extract and peptone in the medium are 10 and 1 g/dm³, respectively. Riboflavin concentration observed during culturing on modified medium in cultural fluid is 350.4 mg/dm³, which is 17 times higher than on GPY medium and 2.5 times higher than on initial medium with GFS-10.

Testing of essential oil content in cultural medium was performed via triple extraction with hexane with further removal of the solvent. Wide range of variation of essential oil content has been shown. The highest quantity is observed in the medium containing GFS-10 (273...420 mg/dm³) as carbon source. Essential oil quantity is increased with increase of GSF concentration in the medium.

Technological flow chart for concomitant production of riboflavin and essential oil production by hydrodistillation with further separation of riboflavin and essential oil isolation flows is provided.

Scientific novelty of the obtained results:

- growth dynamics, biomass yield, riboflavin and essential oil accumulation by the selected producer strain *Eremothecium ashbyi* have been investigated in media with different nutrition sources;

- composition and acid content of media, favorable for the growth of the producer strain in submerged culture, have been determined;

- rational biotechnological parameters for achievement of maximum riboflavin and essential oil yield have been determined: culturing temperature 27-29°C, initial medium pH 7,5, stirring 180 rpm;

- nutrient medium for riboflavin and essential oil accumulation has been optimized using experiment planning methods (such medium includes GFS-10, yeast extract and peptone), and possibility of concomitant production of these products has been verified;

- biotechnology for riboflavin and essential oil production from domestic renewable raw material – glucose-fructose syrup manufactured from corn – has been scientifically justified and developed for the first time.

Key words: *Eremothecium ashbyi*, riboflavin, essential oil, inoculum, submerged culturing, carbon sources, optimization.

Список публікацій здобувача

1. Поліщук В. Ю. Морфолого-культуральні і біосинтетичні властивості *Eremothecium ashbyi* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2011. – №3. – С. 74–78.

2. Вплив температури на життєдіяльність міцелію *Eremothecium ashbyi* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. Я. Карпенко, О. М. Дуган // Вісник національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування» – 2012. – №726. – С. 158–163.

3. Поліщук В. Ю. Динаміка росту та накопичення рибофлавіну аскоміцетом *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2014. – №3. – С. 73–77.

4. Поліщук В. Ю. Сучасні можливості отримання ефірної олії з ароматом троянди / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2016. – №3. – С. 69–77.

5. Поліщук В. Ю. Вплив умов культивування на біосинтетичну здатність *Eremothecium ashbyi* Guillierm. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Технологічний аудит та резерви виробництва. – 2016. – №2/4(28). – С. 35–41.

6. Поліщук В. Ю. Вплив умов отримання посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences. – 2017. – V. 14, № 132. – P. 82–84.

7. Поліщук В. Ю. *Eremothecium ashbyi* – перспективний продуцент для біотехнології ефірних олій / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей V регіональної науково-практичної конференції викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів (26 квітня 2011р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2011. – С. 46.

8. Поліщук В. Ю. Морфолого-культуральні та біосинтетичні властивості *Eremothecium ashbyi* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей V регіональної науково-практичної конференції викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів (26 квітня 2011р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2011. – С. 61.

9. Поліщук В. Ю. Перспективи отримання ефірної олії для парфюмерії біотехнологічним способом / В. Ю. Поліщук, Ю. В. Єлісєєва, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей V регіональної науково-практичної конференції викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів (26 квітня 2011р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2011. – С. 64.

10. Маланюк М. І. Вплив температури інкубації на життєздатність міцелію гриба *Eremothecium ashbyi* Guill. / М. І. Маланюк, В. Ю. Поліщук,

О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції. (5 квітня 2012 р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2012. – С. 68–70.

11. Дослідження динаміки росту *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дяченко, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VII Всеукраїнської науково-практичної конференції (24 квітня 2013 р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2013. – С. 55–56.

12. Умови збереження *Eremothecium ashbyi* F340 у активному стані / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дяченко, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VII Всеукраїнської науково-практичної конференції (24 квітня 2013 р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2013. – С. 74-75.

13. Поліщук В. Ю. Вплив рН середовища культивування на накопичення біомаси та рибофлавіну штамом *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції. (22 квітня 2014 р.) – К.:НТУУ «КПІ», 2014. – С. 60-61.

14. Поліщук В. Ю. Поживні потреби штаму *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції присвячених 170 річниці від дня народження Іллі Мечникова (24 квітня 2015р.) – К.:НТУУ «КПІ», 2015. – С. 76.

15. Поліщук В. Ю. Вплив ультрафіолетового опромінення на біосинтетичну здатність гриба *Eremothecium ashbyi* / Поліщук В.Ю., Дуган О.М. // Біотехнологія XXI століття: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016р.) [Електронне видання] – К.: НТУУ «КПІ», 2016. – С. 72.

16. Поліщук В. Ю. Вплив фізико-хімічних параметрів на біосинтетичну здатність *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції

(21 квітня 2017р.) – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, Вид-во «Політехніка», 2017. – С. 59.

17. Поліщук В. Ю. Вплив умов отримання посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Advances in the Natural Sciences and Engineering – 2017 (25 червня 2017 р.), Будапешт, Угорщина.

18. Поліщук В. Ю. Використання глюкозо-фруктозних сиропів для культивування продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* Guillerm. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // V Наукова конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній науці». Збірка наукових праць (31 жовтня 2017 р.) – Х.: Технологічний центр, 2017. – С. 60.

19. Поліщук В. Ю. Рибофлавін – виробництво і застосування / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. – 2009. – Вип. 134, ч. 3. – С. 274–290.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ МОЖЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ РИБОФЛАВІНУ ТА ЕФІРНОЇ ОЛІЇ З АРОМАТОМ ТРОЯНДИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	24
1.1.Рибофлавін та флавінові похідні	24
1.1.1 Структура та властивості рибофлавіну	25
1.1.2 Потреба у рибофлавіні	28
1.1.3 Застосування рибофлавіну	28
1.2 Продуценти рибофлавіну	30
1.2.1 Характеристика <i>Eremothecium ashbyi</i> та перспективи його використання в біотехнологічних виробництвах	31
1.2.2 <i>Eremothecium gossypii</i> (syn. <i>Ashbya gossypii</i>)	35
1.2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	35
1.3 Біосинтез рибофлавіну	36
1.4 Біотехнологія отримання рибофлавіну за допомогою грибів роду <i>Eremothecium</i>	38
1.5 Математичні методи оптимізації складу поживних середовищ для біосинтезу рибофлавіну	44
1.6 Отримання ефірної олії з ароматом троянди	46
1.6.1 Традиційні способи отримання ефірної олії троянди та її властивості	47
1.6.2. Біотехнологічні можливості отримання ефірної олії з ароматом троянди	51
Висновки до розділу 1	57
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	59
2.1 Об'єкт дослідження	59
2.2 Умови культивування штаму	59
2.3 Показники, що визначалися в процесі культивування	63

	16
2.4 Метод оптимізації поживного середовища	65
2.5 Статистична обробка результатів досліджень	69
РОЗДІЛ 3 БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ <i>EREMOTHECIUM ASHBYI</i>	71
3.1 Морфолого-культуральні властивості <i>Eremothecium ashbyi</i> F-340	71
3.2 Вплив температури на життєздатність міцелію <i>Eremothecium ashbyi</i> F-340	76
3.3 Дослідження умов зберігання штаму <i>Eremothecium ashbyi</i> F-340	78
3.4 Динаміка росту та накопичення вторинних метаболітів аскоміцетом <i>Eremothecium ashbyi</i>	85
Висновки до розділу 3	89
РОЗДІЛ 4 ПІДТРИМКА ТА ПІДВИЩЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО СТАНУ КУЛЬТУРИ ПРОДУЦЕНТА	90
4.1 Вплив ультрафіолетового опромінення на біосинтез рибофлавіну та рівень накопичення біомаси штамом гриба <i>Eremothecium ashbyi</i>	90
4.2 Технологічні умови отримання посівного матеріалу та їх вплив на біосинтетичну здатність продуцента рибофлавіну <i>Eremothecium ashbyi</i>	93
Висновки до розділу 4	95
РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ ФАКТОРІВ СЕРЕДОВИЩА НА БІОСИНТЕТИЧНУ ЗДАТНІСТЬ ПРОДУЦЕНТУ	96
5.1 Вплив фізико-хімічних параметрів культивування на накопичення біомаси та рибофлавіну штамом <i>E. ashbyi</i> F-340	96
5.2. Поживні потреби штаму <i>E. ashbyi</i> F-340	100
Висновки до розділу 5	107
РОЗДІЛ 6 ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСИНТЕТИЧНОЇ ЗДАТНОСТІ ПРОДУЦЕНТУ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА ГЛЮКОЗО-ФРУКТОЗНИХ СИРОПАХ	108
6.1 Характеристика глюкозо-фруктозних сиропів	108
6.2 Застосування глюкозо-фруктозних сиропів в біотехнології рибофлавіну	110

6.3 Оптимізація середовища культивування на основі ГФС-10	
для максимального накопичення рибофлавіну <i>Eremothecium ashbyi</i>	113
Висновки до розділу 6	118
РОЗДІЛ 7 ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ РИБОФЛАВІНУ ТА	
ЕФІРНОЇ ОЛІЇ НА ГЛЮКОЗО-ФРУКТОЗНОМУ СИРОПІ	119
Висновки до розділу 7	137
ВИСНОВКИ	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	141
ДОДАТКИ	160
Додаток А	160
Додаток Б	163
Додаток В	175
Додаток Д	176

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГПД – глюкозо-пептонно-дріжджове середовище

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГФС – глюкозо-фруктозний сироп

ДЕ – дріжджовий екстракт

КДА – картопляно-декстрозний агар

МАФАНМ - мезофільні аеробні і факультативно анаеробні мікроорганізми

ТХО – трихлороцтова кислота

ФАД – флавінаденіндинуклеотид

ФМН – флавінмононуклеотид

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ВСТУП

Актуальність теми. Останнім часом моніторинг вітамінної забезпеченості населення виявляє вкрай недостатнє споживання вітамінів та ряду мінеральних речовин. Особливо несприятливим є стан з вітамінами С, В₁, В₂, В₆, фолієвою кислотою та каротиноїдами [1, 2]. Для боротьби з харчовим дефіцитом, вітаміни додають до їжі для її збагачення. Внаслідок зменшення вживання свіжої їжі з високим вмістом вітамінів та збільшення споживання продуктів харчування з високим ступенем оброблення та збільшення кількості населення, необхідно забезпечити споживання основних вітамінів у вигляді добавок [3].

Недостатнє вживання вітамінів завдає істотної шкоди здоров'ю: знижує фізичну та розумову працездатність, опір різноманітним захворюванням, підсилює негативний вплив на організм несприятливих екологічних умов та шкідливих факторів виробництва.

Одним з найбільш широко розповсюджених вітамінів є рибофлавін. Він міститься у всіх тваринних та рослинних клітинах, проте отримати рекомендовану для вживання норму вітаміну В₂ лише за рахунок продуктів харчування дуже складно, оскільки лише деякі харчові продукти є багатими джерелами даного вітаміну. Тому пошук шляхів збільшення кількості вітаміну В₂ для потреб людини та тварин є задачею важливою та актуальною. На сьогоднішній день найбільш дешевим способом отримання В₂ є мікробний синтез.

Світовій мікробній промисловості відомі декілька десятків мікроорганізмів-продуцентів цього вітаміну, проте найбільш відомим з них є аскоміцет *Eremothecium ashbyi*, який використовується у промисловості [5-8]. Крім надсинтезу рибофлавіну *E.ashbyi* здійснює синтез флавінаденіндинуклеотиду (ФАД).

За допомогою *E.ashbyi* можна отримувати як кормовий рибофлавін, що використовується в якості кормової добавки для тварин, так і, при застосуванні певних методів виділення та очистки, рибофлавін медичного призначення.

Одночасно із синтезом рибофлавіну *E.ashbyi* здійснює синтез ефірної олії, яка за ароматом та своїми властивостями ідентична ефірній олії, отриманій з пелюсток троянди [9-13]. У своєму складі вона містить такі ароматичні речовини, як гераніол (69,5-84,5%), нерол і лінаноол та β -фенілетанол (12,7-27,7%). Це дає можливість розглядати *E.ashbyi* також як перспективний продуцент ароматичних речовин, що є необхідними для парфюмерно-косметичної промисловості.

На даний момент в Україні не налагоджено біотехнологічне виробництво рибофлавіну, а можливість одночасного виробництва ще й ефірної олії робить тему дисертаційної роботи актуальною, своєчасною та вкрай важливою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Наукові дослідження було проведено на кафедрі промислової біотехнології КПІ ім. Ігоря Сікорського відповідно до ініціативної теми № 5/2010 «Розробка технології отримання вітаміну В₂ мікробіологічним шляхом» та НДР № 2033п «Створення лінії інноваційних біологічно активних продуктів для медицини, харчової промисловості та сільського господарства», державний реєстраційний номер 0117U002390.

Мета і задачі досліджень. Мета роботи – розробка науково-обґрунтованої біотехнології отримання рибофлавіну та ефірної олії з використанням штаму-продуценту *Eremothecium ashbyi*.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні задачі:

- вивчити біосинтетичну активність обраного штаму-продуценту рибофлавіну й ефірної олії;
- дослідити умови отримання активного посівного матеріалу;
- встановити раціональні умови культивування досліджуваного штаму;
- дослідити джерела живлення та обґрунтувати вибір поживних середовищ для культивування;
- модифікувати склад поживного середовища для максимального біосинтезу рибофлавіну;

- дослідити продукування рибофлавіну та ефірної олії на модифікованому середовищі;

- запропонувати технологію виробництва рибофлавіну та ефірної олії і розробити технологічну схему виробництва.

Об'єкт досліджень: біотехнологія рибофлавіну та ефірної олії на основі аскоміцету *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-340.

Предмет досліджень: закономірності накопичення біомаси, біосинтезу рибофлавіну та ефірної олії штамом *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-340 за різних умов культивування.

Методи досліджень: мікробіологічні (культивування аскоміцетних грибів), фізико-хімічні методи для визначення основних показників біосинтезу (вмісту рибофлавіну, рН, вуглеводів, біомаси), математичні (статистичний аналіз, методи математичного планування експерименту).

Наукова новизна одержаних результатів: У роботі вперше:

- досліджено динаміку росту, вихід біомаси, накопичення рибофлавіну та ефірної олії обраним штамом-продуцентом *Eremothecium ashbyi* на середовищах з різними джерелами живлення;

- визначено склад та кислотність середовищ, які є сприятливими для росту штаму-продуценту в глибинній культурі;

- знайдено раціональні біотехнологічні параметри для отримання максимального виходу рибофлавіну та ефірної олії: температура культивування 27-29°C, початкове рН середовища 7,5, перемішування 180 об/хв;

- за допомогою методів планування експерименту оптимізовано поживне середовище для накопичення рибофлавіну та ефірної олії, що складається з ГФС-10, дріжджового екстракту та пептону, перевірена можливість одночасного отримання цих продуктів;

- вперше науково обґрунтовано та створено біотехнологію отримання рибофлавіну з вітчизняної відновлюваної сировини – глюкозо-фруктозного сиропу, що виготовляється з кукурудзи.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що:

- для штаму-продуценту визначено найбільш сприятливі для накопичення біомаси та біосинтетичної активності умови культивування;
- створено науково обґрунтовану технологію виробництва рибофлавіну та ефірної олії методом глибинного культивування аскоміцета *Eremothecium ashbyi* на модифікованому середовищі, що в якості джерела карбону містить перспективну відновлювану сировину – глюкозо-фруктозний сироп;
- розроблено технологічну схему отримання рибофлавіну та ефірної олії, з використанням *Eremothecium ashbyi*, виділення ефірної олії запропоновано здійснювати методом гідродистиляції з подальшим розділенням потоків виділення рибофлавіну та ефірної олії;
- результати вивчення продуценту та особливостей біосинтезу рибофлавіну покладено в основу розробки лекцій та лабораторних робіт з курсів «Біотехнологія сільськогосподарських виробництв», «Технологія продуктів мікробного синтезу» та «Основи мікології» для студентів кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки КПІ ім. Ігоря Сікорського; «Біотехнологія антибіотиків та вітамінів» та «Основи фармацевтичної біотехнології» для студентів Національного університету «Львівська політехніка».

Особистий внесок здобувача. Розробку загальної методології дисертаційної роботи проведено спільно з д.б.н. О.М. Дуганом.

Особистий внесок автора у виконанні даної роботи полягає в аналітичному опрацюванні наукової літератури за розділами дисертації, проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні одержаних даних, написанні та оформленні наукових публікацій за темою дисертації.

Здобувачем у співавторстві з Маланюк М. І. проведено дослідження морфологічних і біосинтетичних властивостей та динаміки росту продуценту, у співавторстві з Карпенко О. Я. та Маланюк М. І. здійснено аналіз фізико-хімічних показників культивування. Здобувачем особисто встановлено оптимальні умови отримання активного посівного матеріалу, досліджено основні джерела живлення штаму-продуценту, запропоновано використання

ГФС в якості джерела карбону та математичними методами проведено оптимізацію поживного середовища, що у складі містить ГФС. Здобувачем описані результати досліджень, разом з керівником проведено їх обговорення та сформульовані висновки.

Апробація результатів роботи. Матеріали дисертаційної роботи доповідались на: VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (5 квітня 2012 р., м. Київ), VII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (24 квітня 2013 р., м. Київ), VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (25 квітня 2014 р., м. Київ), IX Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (24 квітня 2015 р., м. Київ), X Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченій 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016), XI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (21 квітня 2017р.), Advances in the Natural Sciences and Engineering – 2017 (25.06.2017р., м. Будапешт, Угорщина), V науковій конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній науці» (31 жовтня 2017 р., м. Харків, Україна)

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 19 наукових праць, у тому числі: 6 статей у наукових фахових виданнях, з них 1 стаття у виданні іноземної держави, 2 статті у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз даних; 12 тез доповідей в збірниках матеріалів конференцій та 1 стаття в іншому виданні.

Структура і обсяг дисертації

Дисертаційна робота містить вступ, сім розділів, висновки, список використаних джерел та додатки. Основна частина роботи складає 159 сторінок друкованого тексту, а разом з додатками 177 сторінок. В основній частині наведені 37 рисунків, 14 таблиць. Список використаних джерел містить 176 вітчизняних та зарубіжних джерел.

РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ МОЖЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ РИБОФЛАВІНУ ТА ЕФІРНОЇ ОЛІЇ З АРОМАТОМ ТРОЯНДИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Рибофлавін та флавінові похідні

Вітамінною активністю володіють багато природних та синтетичних похідних 7,8-диметилізоаллоксазина, вся група яких (включаючи і вітамін B₂) позначається загальним терміном "флавіни" [14].

Офіційно визнана назва вітаміну B₂ – рибофлавін. Раніш його також називали вітамін G, лактофлавін, овофлавін, гепатофлавін, вердофлавін та урофлавін. Більшість з цих назв вказують на джерело, з якого даний вітамін був виділений – молоко, яйця, печінка, рослини та сеча. Історія його відкриття та дослідження [3]:

1879р. – Бліт (Blyth) виділяє з сироватки лактохром – жовту, водорозчинну речовину, що має флуоресценцію.

1932р. – Варбург (Warburg) та Крістіан (Christian) виділяють жовтий пігмент з пивних дріжджів та припускають, що він відіграє важливу роль у клітинному диханні.

1933р. – Кун (Kuhn), Георгі (Gyorgy) та Вагнер-Йорег (Wagner-Jauregg) виділяють з яєчного білку та сироватки жовтий кристалічний пігмент, який стимулює ріст клітин, ідентифікують його як вітамін B₂.

1934р. – група Куна (Kuhn) в Хейдельберге та група Каррера (Karrer) в Цюріху синтезують чистий рибофлавін.

1935р. – Гільєрмон (Guilliermond) відкрив явище надсинтезу вітаміну B₂ міцеліальними дріжджеподібними грибами.

1937р. – фармацевтична рада Американської медичної асоціації присвоює вітаміну назву «рибофлавін».

1941р. – група Себреля демонструє клінічні прояви нестачі рибофлавіну в експериментах на добровольцях.

1968р. – Глатцель та його група пропонують використовувати тест з вимірювання активності глутатіон-редуктази еритроцитів для визначення статусу рибофлавіну.

1.1.1 Структура та властивості рибофлавіну

Рибофлавін відноситься до групи водорозчинних вітамінів комплексу В, за структурою це 7,8-діметил-10-(1-D-рибітил)-ізоаллоксазин.

Рибофлавін відноситься до флавінів, в основі будови яких лежить гетероциклічна ізоаллоксазинова система, яка має три конденсованих цикли: ароматичний, піразиновий та піримідиновий. До азоту піримідинового кільця приєднаний спирт рибіт. Рибофлавін функціонує в 2 коензимних формах, що являють собою його фосфорні ефіри: флавінмононуклеотид (ФМН) та флавінаденіндинуклеотид (ФАД) (рис. 1.1) [3, 15, 16].

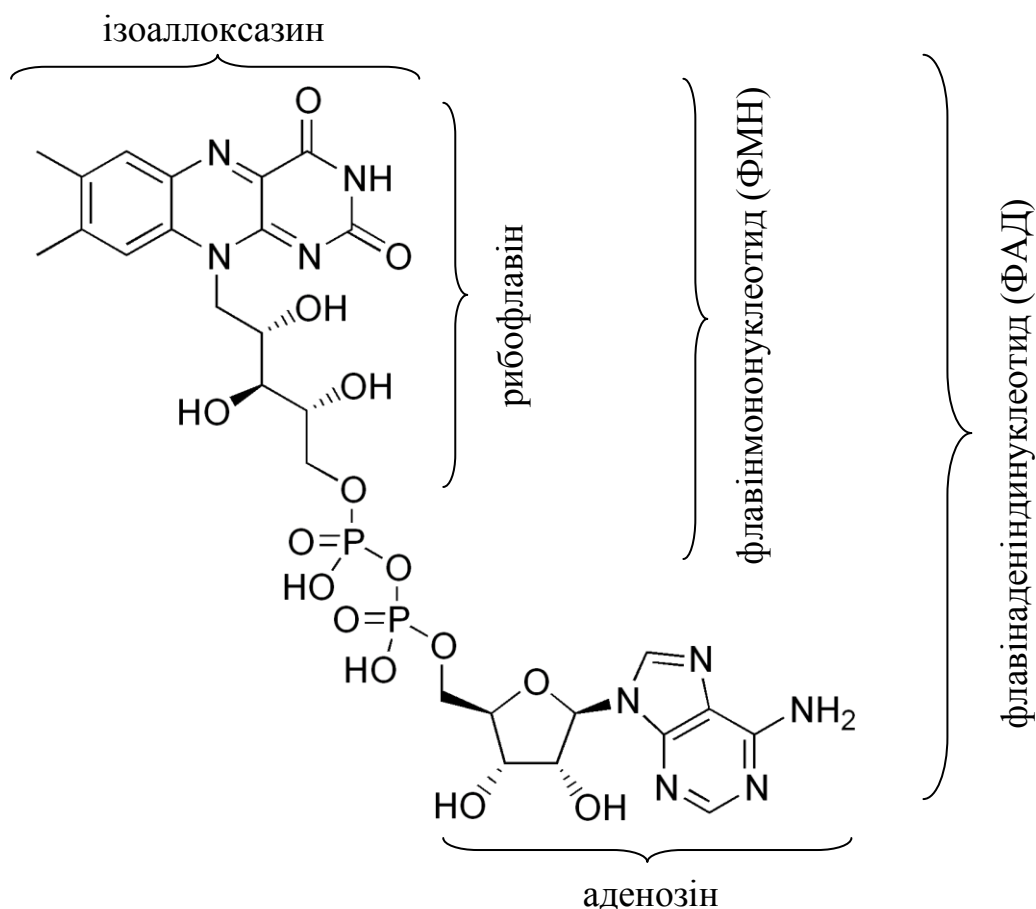


Рис. 1.1 Структура рибофлавіну та флавінових коферментів.

Рибофлавін кристалізується у вигляді помаранчево-жовтих голок з температурою плавлення 282°C з розкладанням. Рибофлавін нерозчинний в жирах та в розчинниках жирів, слабо розчинний у воді. При температурі $27,5^{\circ}\text{C}$ насичений водний розчин містить 0,012% рибофлавіну, при 40°C – 0,01944%, а при 100°C – 0,23%. У лужному середовищі рибофлавін краще розчинний ніж у нейтральному. Слабко розчинний в нормальному бутиловому, аміловому, етиловому (0,0045% при $27,5^{\circ}\text{C}$) та метиловому спиртах. Рибофлавін помірно розчинний у льодяній оцтові та мурашиній кислотах. Добре розчинний у соляній кислоті.

В нейтральних водних розчинах має зеленувато-жовте забарвлення (забарвленість вітаміну обумовлена наявністю азометинового групування $>\text{C}=\text{N}-$) з інтенсивною жовто-зеленою флуоресценцією, яка зменшується до зникнення як у кислому, так і в лужному середовищі (максимум при pH 6–7). Рибофлавін у лужному середовищі переходить в люміфлавін, який розчинний в хлороформі і не володіє біологічними властивостями вітаміну B_2 [16].

Рибофлавін – світлочутлива жовта речовина. Світлочутливість обумовлена наявністю в боковому ланцюзі в 2 положенні вільної гідроксильної групи. Під дією світла в нейтральному та кислому середовищі рибофлавін перетворюється на біологічно неактивний люміхром, який володіє сильною голубою флуоресценцією. Пряме сонячне світло швидко руйнує рибофлавін при будь-якому значенні pH. Найбільш пагубну дію на рибофлавін мають промені світла з довжиною хвилі 440 нм [17].

Спектр поглинання рибофлавіну (у воді) має один максимум у видимій частині спектру при довжині хвилі 445 нм та три максимуми в ультрафіолетовій частині спектра при довжині хвилі 372, 269, 225 нм. Спектр флуоресценції знаходиться в жовто-зеленій області (максимум 530 нм). Флуоресценція пов'язана з наявністю вільної аміногрупи у 3 положенні кільця піримідину [16].

Ні один вітамін не здійснює свої функції в обміні речовин в тому вигляді, в якому він потрапляє з їжею. Перш ніж реалізувати свої функції, кожний

вітамін повинен пройти ряд певних етапів, які проходять за допомогою спеціальних транспортних, ферментних та рецепторних білків [1].

Флавіни, що потрапляють з їжею, звільняються у шлунку під дією кислот і потім всмоктуються у верхній частині тонкого кишечника за допомогою транспортного механізму з участю жовчних солей. В клітках слизової оболонки кишечника рибофлавін перетворюється в коферментну форму флавінового мононуклеотида (ФМН). В системі транспорту він зв'язується з плазматичним альбуміном та переноситься у печінку, де перетворюється в другу коферментну форму - флавінового аденіндинуклеотида (ФАД) і зв'язується з спеціальними білками - флавіновими протеїнами [15, 18].

У тканини рибофлавін потрапляє головним чином у формі ФАД, але концентрація його в тканинах не висока і він не запасається там у великій кількості. Печінка, головний орган зберігання, містить близько третини загальної кількості рибофлавіну в організмі. Рівень вмісту рибофлавіну в плазмі крові відображає кількість рибофлавіну, що потрапив з їжею і в нормі складає 30-40 мкг/л [19]. Значна концентрація рибофлавіну спостерігається в тканинах сітківки ока, але його функція там невідома. Виділення рибофлавіну здійснюється головним чином з сечею, якій він надає жовтий колір. Невелика кількість рибофлавіну також виділяється разом з потом і жовчю. Рибофлавін, що знаходиться в калі, є головним чином результатом діяльності кишкових бактерій. У жінок в період годування груддю близько 10% отриманого рибофлавіну виділяється в молоко.

Рибофлавін діє, як посередник, при переносі електронів у різних окислювально-відновних реакціях. Він приймає участь у великій кількості реакцій метаболізму вуглеводів, жирів та білків, а також в реакціях з виробництва енергії в дихальному ланцюзі. Коферменти рибофлавіну грають важливу роль при перетворенні піридоксину (вітаміну В₆) та фолієвої кислоти в їх активні коферментні форми та в перетвореннях триптофану в ніацин [3, 16, 20].

1.1.2 Потреба у рибофлавіні

Рибофлавін синтезує більша частина вищих рослин та багато мікроорганізмів, включаючи бактерії, дріжджі та гриби. Тварини не здатні до самостійного синтезу рибофлавіну і їх потреба в ньому задовольняється мікрофлорою шлунково-кишкового тракту та їжею. В той самий час, всі організми, в тому числі тварини, здатні перетворювати рибофлавін на флавінові коферменти: ФМН і ФАД [16].

Рибофлавін є одним з найбільш широко розповсюджених вітамінів. Він міститься у всіх тваринних та рослинних клітинах, але лише деякі продукти є багатими джерелами даного вітаміну. Найбільша концентрація рибофлавіну спостерігається у дріжджах (2мг/100г) та печінці (1,6–2,2мг/100г), але найбільш розповсюдженими дієтичними джерелами рибофлавіну є молоко та молочні продукти (0,013–0,17мг/100г), м'ясо (0,14–0,23мг/100г), яйця (0,32–0,44мг/100г), овочі та зелень [14, 21, 22]. Рибофлавін з тваринних продуктів засвоюється краще, ніж з рослинних джерел. У коров'ячому, овечому та козиному молоці не менш 90% рибофлавіну знаходиться у вільній формі, в більшості інших джерел він виявляється зв'язаним з білками. Вільний рибофлавін міститься в пігментному шарі сітківки ока, в молоці, в сечі. В тканинах людини та тварини вітамін B₂ в основному зустрічається у формі ФМН та ФАД, що входять до складу різних окислювально-відновних ферментних систем.

Норми вітаміну B₂, що рекомендуються до вживання для різних груп населення, становлять 1,5–2,4 мг на добу [23, 24, 25].

1.1.3 Застосування рибофлавіну

Рибофлавін застосовують при гіпо- та арибофлавінозі екзо- та ендogenousного походження, гемералопії, кон'юнктивіті, іриті, кератиті, помутніння роговиці, катаракті, ранах та язвах, що довго не загоюються,

променевій хворобі, астенії, хейліті, кутовому стоматиті (заїди), глоситі, зудячому дерматозі, екземі, нейродерміті, фотодерматозі, себорей, красних вуграх, кандидозі, вірусному гепатиті А, хронічному гепатиті, цирозі печінки, порушеннях функції ШКТ, спру, гіпотрофії, анемії, лейкозі. З профілактичною метою – при зниженні всмоктування з ШКТ, інтенсивній елімінації та збільшенні потреби в рибофлавіні (гостра і хронічна гіпоксія, дихальна та серцева недостатність, опікова хвороба, обмороження, нестача білкового та надлишок вуглеводного харчування, гострі інфекційні захворювання, в т.ч. при лікуванні протимікробними засобами, що пригнічують грамнегативну флору кишечника, фототерапія).

В останні роки було встановлено, що вітамін В₂ є ефективним при лікуванні мігрені [26], малярії [27] та хвороби Паркінсона [28]. Встановлено, що рибофлавін має клінічно важливий вплив на зниження артеріальної гіпертензії [29].

На сьогоднішній день токсичність рибофлавіну не встановлена. Будь-який надлишок вітаміну В₂ викидається в сечу, що може ставати яскраво-жовтого кольору [18].

Рибофлавін незамінний при виробництві вже звичних бульйонних кубиків, супів швидкого приготування та інших подібних продуктів. Саме рибофлавін (Е 101) надає цим продуктам характерний «бульйонний» відтінок. Рибофлавін використовується з метою надання привабливого забарвлення таким продуктам, як морозиво, пудинги, молочні напої, сахарна глазур, сухі швидкорозчинні напої. Безсумнівною перевагою рибофлавіну в якості барвника, в порівнянні з багатьма штучними барвниками, є його безпечність та органічність для людини. Для забарвлення продуктів використовується як сам рибофлавін, так і натрієва сіль рибофлавін-5'-фосфат, оскільки вона краще розчинна у воді [30].

Інша сфера застосування рибофлавіну – збагачення продуктів харчування. Він широко використовується для вітамінізації молока, круп, дієтичних

продуктів, дитячого харчування. Найчастіше він входить до складу сухих гомогенних вітамінних сумішей (преміксів).

Рибофлавін застосовується у сільському господарстві. Використання препарату у тваринництві збільшує приріст тварин та птахів до 15%, на 30% знижує смертність, на 3% збільшує яйценосність у курей та на 6% виводимість курчат [15].

1.2 Продуценти рибофлавіну

Мікроорганізми-продуценти рибофлавіну поділяють на 3 групи:

- слабкі (*Clostridium acetobutylicum*);
- помірні (дріжджі *Pichia guilliermondii* [31, 32] та *Candida famata* [33–36]);
- сильні суперпродуценти (*Eremothecium ashbyi* [4–8, 37, 38] та *Eremothecium gossypii* (*Ashbya gossypii*) [33, 34, 39]).

Для біотехнологічного виробництва рибофлавіну використовуються організми різних таксономічних груп, в основному, дріжджі та міцеліальні гриби. У флавіногенних дріжджів *Candida famata* [33, 34, 36] (використовується американською біотехнологічною фірмою Archer Daniels Midland) та *Pichia guilliermondii* [31, 32, 40] індукція синтезу рибофлавіну відбувається при депресії по залізу. Серед міцеліальних грибів активними продуцентами рибофлавіну є аскоміцети *Eremothecium gossypii* (синонім *Ashbya gossypii*) (німецька фірма BASF) [33, 34] та *Eremothecium ashbyi* [4, 6, 38], на біосинтез вітаміну В₂ якими йони заліза не впливають, що є їх важливою перевагою. Крім того у промисловості для виробництва рибофлавіну застосовують генно-інженерні штами бактерії *Bacillus subtilis* [33, 34, 41–43]. Порівняльна характеристика мікроорганізмів, що використовуються для отримання рибофлавіну наведена в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Порівняльна характеристика продуктивності флавіногенних мікроорганізмів

Продуцент	Максимальна концентрація рибофлавіну, г/дм ³	Тривалість культивування, діб	Посилання
<i>Bacillus subtilis</i>	16	2	[41]
	11,7	3	[43]
	13,4	2	[42]
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	15,3	3	[44]
<i>Debaryomyces hansenii</i> (<i>Candida famata</i>)	10,0	6	[34]
	1,3	5	[36]
<i>Meyerozyma</i> (<i>Pichia</i> , <i>Candida</i>) <i>guilliermondii</i>	0,2	3	[34, 45]
	8 мг/г АСБ		[46]
<i>Eremothecium ashbyi</i>	3,1	4	[8]
	3,3	7	[38]
	4,5	7	[4]
	1,1	7	[7]
<i>Eremothecium gossypii</i>	2,5	4	[47]
	8,7	6	[48]
	6,4	7	[49]
	0,228		[39]

1.2.1 Характеристика *Eremothecium ashbyi* та перспективи його використання в біотехнологічних виробництвах

Систематичне положення *Eremothecium ashbyi* тривалий час дискутується [50, 51]. За Dictionary of the Fungi 2001 [52] він відносився до *Fungi*, *Ascomycota*, *Hemiascomycetes*, *Saccharomycetales*, *Spermothoraceae*, а за Dictionary of the Fungi 2008 [53] до *Fungi*, *Ascomycota*, *Saccharomycotina*, *Saccharomycetes*, *Saccharomycetidae*, *Saccharomycetales*, *Eremotheciaceae*.

У роботі С. Kurtzman [50] з аналізу рибосомальної ДНК видів родів

Ashbya, *Eremothecium*, *Holleya*, *Nematospora*, показано, що ці чотири роди тісно пов'язані і являють собою підклас геміаскоміцетів. Оскільки таксони проявляють лише незначне розходження, запропоновано об'єднати їх в рід *Eremothecium* нового сімейства *Eremotheciaceae*. На рис. 1.2 представлено філогенетичне дерево видів «комплексу *Saccharomyces*» [54]

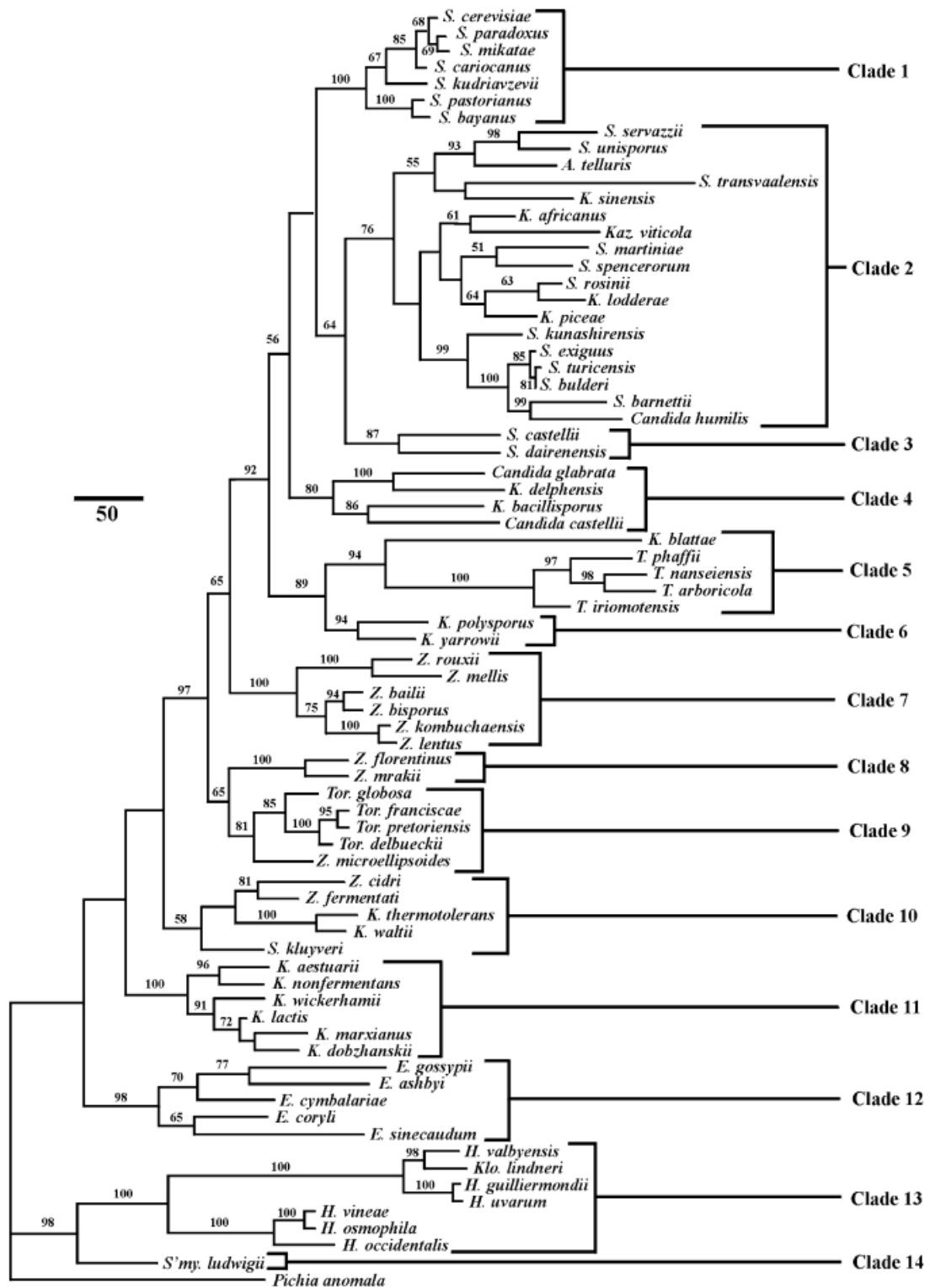


Рис. 1.2 Філогенетичне дерево видів «комплексу *Saccharomyces*» [54]

У відповідності з сучасною класифікацією рід *Eremothecium* включає в себе 5 видів і відноситься до сімейства *Eremotheciaceae* [50, 51, 55].

Царство: *Fungi*

Відділ: *Ascomycota*

Клас: *Saccharomycetes* G. Winter (1880)

Порядок: *Saccharomycetales* Kudryavtsev (1960)

Сімейство: *Eremotheciaceae* Kurtzman (1995)

Рід: *Eremothecium* Borzí (1888)

Види:

E. cymbalariae Borzi (1888);

E. ashbyi (syn. *Crebrothecium ashbyi*) Guillierm. (1935);

E. coryli (syn. *Nematospora coryli*, *Nematospora nagpuri*) (Peglion) Kurtzman (1995);

E. gossypii (syn. *Ashbya gossypii*, *Nematospora gossypii*, *Spermophthora gossypii*) (S.F. Ashby & W. Nowell) Kurtzman (1995);

E. sinicaudum (syn. *Holleya sinicauda*, *Nematospora sinicauda*) (Holley) Kurtzman (1995).

Кожний вид роду *Eremothecium* має свої культурально-морфологічні особливості, які є диференційними при їх ідентифікації.

Морфологічні ознаки *E. ashbyi*

E. ashbyi Guilliermond 1935 при культивуванні на агаризованому середовищі, що містить 4% солодового та 0,5% дріжджового екстрактів, при температурі 20–22°C утворює бліді колонії діаметром 5 мм, які поступово стають яскраво-жовтого забарвлення внаслідок виділення рибофлавіну. Колонії сухі з чітким дольчатим краєм, гладкі, пізніше на поверхні утворюються радіальні борозди [51].

E.ashbyi – це аскоміцет, який не утворює плодових тіл, аски розташовуються безпосередньо на міцелії (інтеркалярно), утворює справжній розгалужений дихотомічний міцелій завтовшки 2–6 мкм, септований, який в

процесі онтогенезу вакуолізується та потовщується [37, 57, 58]. В клітинах містяться жовті голчасті кристали рибофлавіну. Крім включень рибофлавіну всередині міцелію локалізується ефірна олія, наявна в ліпідних краплях та ліпосомах. Нестатеве розмноження здійснюється за рахунок формування латерально розташованих на міцелії конідій. Спорангії зазвичай розташовуються поодинокі, групами або у ланцюжках та мають продовгувату форму. Аски мають еліпсоїдальну або веретеноподібну форму (10–18 мкм x 50–110 мкм). В аску міститься 8–16 спор, що звільняються після автолізу сумки під час старіння. Аскоспори рівномірно розподілені в спорангії, тонкі, серповидні, закруглені з одного кінця та загострені з іншого. Розмір спори: 2–3,5 x 20–30 мкм. На агарі з дріжджовим екстрактом споруляція спостерігається на 5–7 добу при температурі 25°C [51, 59, 61, 60].

Відмінною морфологічною ознакою для видової ідентифікації *E. ashbyi* є форма та розміри спор. У *E. ashbyi* Guilliermond 1935 аскоспори помітно вигнуті, серповидні, у *E. gossypii* Kurtzman 1995 – прямі ігловидні, довжиною більше 20 мкм.

Еколого-фізіологічні особливості *E.ashbyi*

E. ashbyi належить до фітопатогенних грибів, які інфікують різні рослини, та призводять до великих втрат врожаю у всьому світі [62–64], інфікування ним рослин здійснюється шляхом проколу тканин рослин комахами. *E. ashbyi* Guilliermond 1935, *E. cymbalariae* Borzi 1888 та *E. gossypii* Kurtzman 1995 здатні вражати види бавовнику, гібіскусу, кави та цитрусів [65, 66, 67], також виявлені випадки інфікування *E. ashbyi* Guilliermond 1935 бобів сої [62]. У 2009 році вперше було виявлено ураження бобів квасолі адзукі *E. ashbyi* та *E. coryli* [63]. Є данні про виділення *E. gossypii* з томатів [68]. Крім того було показано, що інфікування рослин *E. ashbyi* було здійснено за допомогою клопа *Riptortus clavatus* та *Riptortus pedestris*, у якому грибок здатен зимувати.

Представники роду *Eremothecium* є аеробами та здатні до росту в широкому діапазоні температур 20 - 37°C [51, 61, 67].

1.2.2 *Eremothecium gossypii* (syn. *Ashbya gossypii*)

E. gossypii Kurtzman 1995 формує бліді колонії, що пізніше жовтіють, діаметром 20 мм при культивуванні на агарі з 4% солодового і 0,5% дріжджового екстрактів. Колонії гладкі, дрібнопластівчасті, вологі, зморшкуваті в центрі, з чітким краєм. Гіфи дихотомічно розгалужуються, завтовшки 2–6 мкм. У деяких клітинах містяться голчасті кристали рибофлавіну. Еліпсоїдальні бластоконідії (2,2–3 x 4,5–7 мкм) формуються латерально, поодинокі або в коротких ланцюжках. Аски булавоподібні або веретеноподібні (10–20 x 60–200 мкм), інтеркалярні, в довгих ланцюжках. У асках містяться 12–32 спори, що вивільняються при розриві сумки. Аскоспори мають голчасту або веретеноподібну форму, двоклітинні за рахунок утворення центральної перегородки. Спори (2–3,5 x 25–35 мкм) мають термінальний, ниткоподібний відросток, який може досягати довжини до 100 мкм. Відростки слизові, що зумовлюють групування аскоспор. Спороутворення спостерігається через 7 діб культивування при температурі 25°C [47, 61, 66, 67]. Встановлено, що рибофлавін, який синтезується в надмірній кількості під час спороутворення *E. gossypii*, захищає спори від ультрафіолетового випромінювання [69].

Крім застосування *E. gossypii* у виробництві рибофлавіну, запропоновано використовувати його як потенційний продуцент для промислового отримання біоліпідів на цукровмісній сировині [70]

1.2.3 *Bacillus subtilis*

Природні штами *B. subtilis* синтезують рибофлавін тільки в кількості, необхідній для підтримки власної життєдіяльності і зовсім не виділяють його в середовище. У ВНДІ генетики та селекції промислових мікроорганізмів під керівництвом Степанова А.І. створений промисловий продуцент рибофлавіну на основі рекомбінантного штаму *B. subtilis* [41, 71, 72].

Спочатку були отримані мутанти, стійкі до розеофлавіну – структурному аналогу рибофлавіну. Дані мутанти володіли здатністю виділяти у культуральне середовище до 10мг/л вітаміну. На другому етапі були отримані мутації в гені-регуляторі, що кодує регуляторний білок, здатний впливати на експресію рибофлавінового оперону. Це дозволило отримати штам, що продукував до 100мг/л вітаміну. На наступному етапі були отримані мутації стійкості до аналогу пурину, що також призвело до росту продукції рибофлавіну.

Наступним етапом було створення рекомбінантного штаму *B. subtilis*. Генно-інженерними методами була сконструйована рекомбінантна плазмід рМХ45, яка несла на собі розрегульований рибофлавіновий оперон *B. subtilis* та ген стійкості до еритроміцину. Ця плазмід була внесена в штам *B. subtilis*, що за рахунок збільшення кількості копій рибофлавінового оперона дало можливість отримувати до 3–4 г/л вітаміну на комплексних поживних середовищах. В результаті подальших селекційних робіт були отримані мутанти, ауксотрофні на аденіну, та мутанти з порушеною транскетолазою та глутаматсинтетазою.

Все це, а також підібраний склад середовища та умов культивування, дозволяє отримувати до 8–12 г/л рибофлавіну.

Проведені дослідження показали, що плазмід рМХ45 є стійкою протягом 50 генерацій на твердих поживних середовищах. Єдиною умовою елімінації плазмід є збільшення температури вище 45°C [71–73].

1.3 Біосинтез рибофлавіну

Шлях синтезу рибофлавіну (рис. 1.3) починається з двох попередників: ГТФ (одна молекула) і рибулозо-5-фосфат (дві молекули).

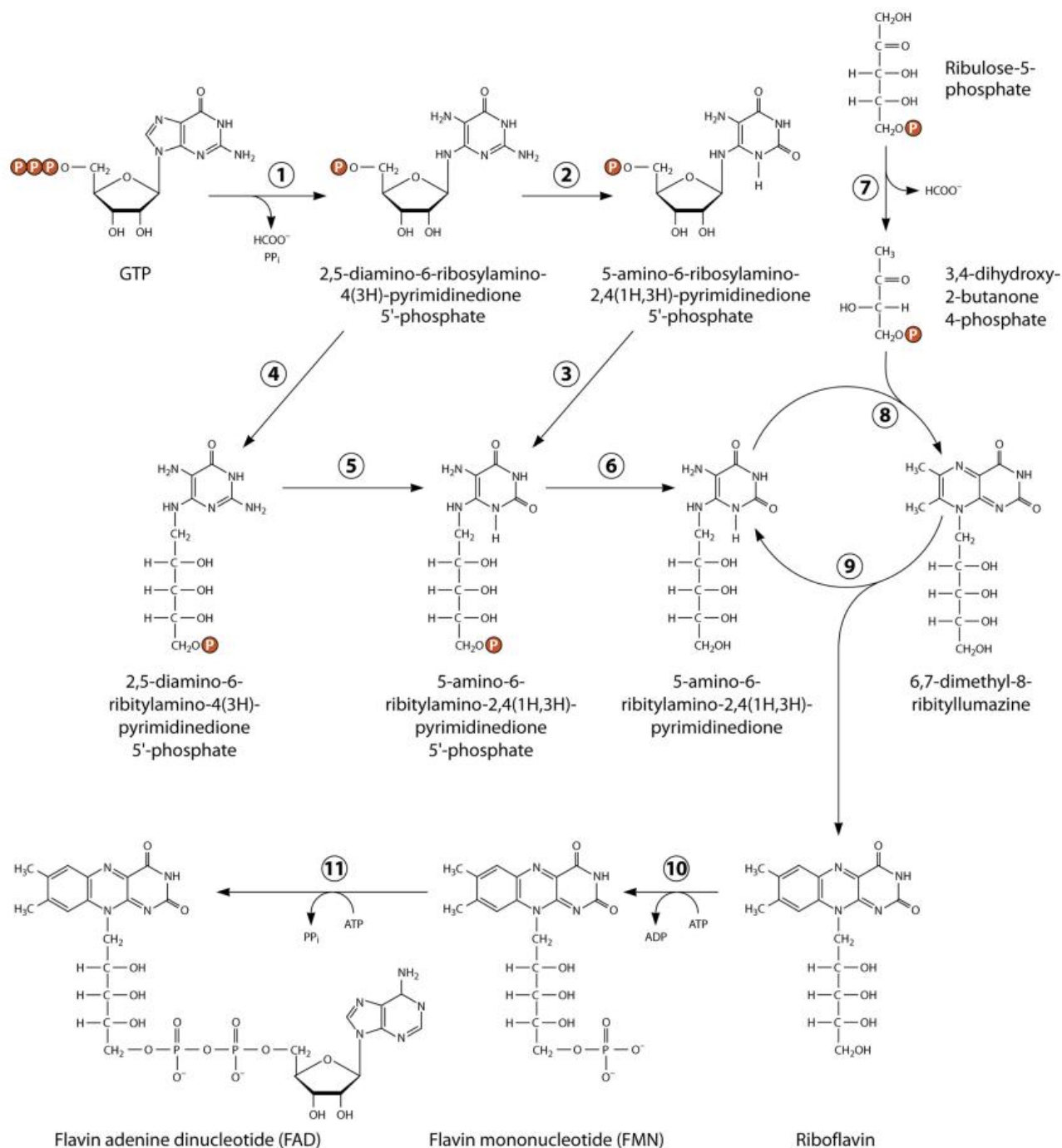


Рис. 1.3 Шлях біосинтезу рибофлавіну та флавінових нуклеотидів [16]

1 – ГТФ циклогідролаза II, 2 – бактерійна деаміназа, 3 – бактерійна редуктаза, 4 – 2,5-діаміно-6-рибозиламіно-4-(3Н)-пиримідинон-5'-фосфат редуктаза, 5 – 2,5-діаміно-6-рибітиламіно-4-(3Н)-пиримідинон-5'-фосфат деаміназа, 6 – фосфатаза, 7 – 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат синтаза, 8 – 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин синтаза, 9 – рибофлавін синтаза, 10 – рибофлавін кіназа, 11 – ФАД синтетаза.

На першому етапі під дією ГТФ циклогідролази відбувається відкриття імідазольного кільця ГТФ та відщеплення 8-го вуглецевого атому, при цьому виділяється форміат та пірофосфат. У наступних двох реакціях у дріжджів та грибів спочатку відбувається відновлення рибозного ядра до рибіту за допомогою редуктази, а потім дезамінування аміногрупи в позиції 2. У бактерій дезамінування відбувається перед відновленням рибозного ядра.

5-аміно-6-рибітиламіно-2,4 (1Н, 3Н)-піримідиндіон 5'-фосфат, який утворюється після перших трьох реакцій біосинтезу рибофлавіну, піддається дефосфорилуванню, утворюючи 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4 (1Н, 3Н)-піримідиндіон, і лише останній використовується в реакції люмазин-синтази, наступного етапу синтезу рибофлавіну.

На наступному етапі відбувається включення 4-вуглецевих атомів з утворенням 6,7-диметил-8-рибітиллюмазину. Тривалий час походження цих атомів дискутувалося, у роботах з *P. guilliermondii* було показано, що 4-вуглецевим з'єднанням слугує 3,4-дигідрокси-2-бутанон 4-фосфат, який утворюється в один крок з рибулозо-5-фосфату.

Останній етап біосинтезу рибофлавіну каталізується рибофлавін синтазою та передбачає реакцію 2 молекул 6,7-диметил-8-рибітиллюмазину, в якій відбувається обмін 4-вуглецевою одиницею, перетворюючи один з них в рибофлавін, а інший в 5-аміно-6-рибітиламіно-2,4 (1Н, 3Н)-піримідиндіон, субстрат реакції синтезу люмазину [16, 33, 34, 74].

1.4 Біотехнологія отримання рибофлавіну за допомогою грибів роду *Erremothecium*

Промислове виробництво рибофлавіну здійснюється трьома способами: хімічним синтезом, мікробіологічним синтезом та змішаним синтезом, який включає мікробний синтез рибози з наступною хімічною модифікацією її в рибофлавін [75, 76]. Оскільки в хімії немає простого та економічного синтезу рибози, цей вуглевод отримують в основному шляхом мікробної ферментації.

Так отримують рибофлавін у Японії (фірма “Takeda Yachuni Kogi”), а для отримання рибози використовують високопродуктивні штами-мутанти по транскетолазі бактерій роду *Bacillus*.

Більшість виробників, таких як BASF, Roche, ADM / Aventis, Hubei Guangji, віддають перевагу ферментативному виробництву рибофлавіну перед хімічним процесом [33].

Рибофлавін виробляється різної якості: очищений, призначений для харчування та медичних цілей, та з меншим ступенем очистки, призначений для ринку кормів для тварин. Для фармацевтичних рецептур рибофлавін синтезують хімічно, в той час як кормові концентрати для птахів та домашньої худоби отримують ферментаційно, використовуючи *Eremothecium ashbyi* або *Ashbya gossypii*. Проте додаткові етапи виділення та очистки дають можливість з рибофлавіну, отриманого ферментаційно, отримати препарат медичної якості [6].

Біотехнологічне виробництво вітамінів має багато переваг в порівнянні з хімічним синтезом. Біологічний шлях передбачає одноразову ферментацію, тоді як хімічний синтез - це багатоетапний процес. Продукти, отримані методами хімічного виробництва являють собою суміші і вимагають ретельної очистки для отримання високоочищеного вітаміну, це збільшує час, необхідний для отримання бажаної кількості вітаміну [17, 75].

Останнім часом проведена велика кількість досліджень, спрямованих на підвищення виробництва рибофлавіну та розробку кращих виробничих середовищ. Різноманітні методи були використані для підвищення продуктивності диких штамів, такі як УФ-опромінення [33, 49, 77], індукований мутагенез [48], антиметаболітний мутагенез [78, 79, 80] і метаболічні інженерні підходи [81, 82]. За допомогою УФ-опромінення отриманий мутант *Ashbya gossypii* ATCC 10895-32, що продукує на соєвій олії на 42% більше рибофлавіну, ніж дикий штам [49], мутант *Ashbya gossypii* ZP4, що при культивуванні на рапсовій олії втричі перевищує продуктивність дикого штаму [77], мутант *E. ashbyi* UV 18-57, що у 7,6 раз перевищує вихідний штам за біосинтезом

рибофлавіну [83]; обробкою дикого штаму *Ashbya gossypii* ATCC 10895 N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином був отриманий мутант 13a, що у 10 разів перевищує дикий штам за продукуванням рибофлавіну [48]. При виробництві рибофлавіну з ріпакової олії показано, що *Ashbya gossypii* з підвищеної активністю малатсинтази у 1,6 раз продукує рибофлавіну у 1,7 разів більше [82].

Досліджено, що в умовах оксидативного стресу, що створювався за допомогою 3mM H₂O₂, спостерігається збільшення виробництва рибофлавіну. Зв'язок біосинтезу рибофлавіну з реакцією на окислювальний стрес може надавати екологічні переваги флавіногенним дріжджам. *A. gossypii* може зіткнутися з таким стресом після інфікування рослини. Продукування великої кількості рибофлавіну, отже, може бути захисним механізмом проти активних форм кисню для захисту *A. gossypii* [84].

Проведено численні дослідження з метою підвищення продуктивності рибофлавіну шляхом використання різних субстратів [48, 85, 86]. Перевиробництво рибофлавіну *A.gossypii* може бути досягнуте за допомогою використання глюкози, сахарози, фруктози, мальтози, маннози або гліцерину як джерел карбону; однак олії, такі як кукурудзяна олія та соєва олія, є також гарними джерелами карбону. Крім того, важливим для стимуляції синтезу рибофлавіну у *A.gossypii* та *E. ashbyi* є дріжджовий екстракт [8]. Також можливе застосування кукурудзяного екстракту, який є задовільним замінником дріжджового екстракту, оскільки він доступний за вартістю.

При дослідженні впливу інозитулу на біосинтез рибофлавіну грибами *Ashbya gossypii* та *Eremothecium ashbyi* встановлено, що у *E. ashbyi* відбувається пригнічення синтезу рибофлавіну на 92%, а у *A. gossypii*, навпаки, спостерігається збільшення синтезу вітаміну B₂ на 39%. Показано, що міо-інозитол знижує експресію гена RIB1 (кодує гуанозинтрифосфат (ГТФ) циклогідролазу II) в адаптованій культурі *E. ashbyi*, але покращує її в адаптованій культурі *A. gossypii* [87].

Виробництво рибофлавіну *E. ashbyii* суттєво визначається типом і концентрацією джерел карбону та нітрогену, а також іншими стимуляторами флавіногенезу. *E.ashbyi* культивується на середовищах, які у своєму складі в якості джерел вуглецю містять моно- та дисахариди (переважно глюкозу та сахарозу), мелясу, гідрол або неохмелене пивне сусло, а в якості джерел азоту пептон, дріжджовий екстракт або автолізат, кукурудзяний екстракт, соєве борошно. Для збільшення виходу рибофлавіну застосовують різноманітні підходи. В якості джерела азоту запропоновано використовувати деякі недорогі відходи, які не є їстівними – це жмих кунжутного та арахісового насіння після відділення олії [4, 6, 7]. В якості стимуляторів флавіногенезу застосовують додаткові компоненти, наприклад, недорогі органічні відходи – м'ясний екстракт, кров'яне та рибне борошно [4, 6, 7, 38].

Дослідження з диким штамом *E. ashbyii* показали можливість накопичення 3,3 г/л рибофлавіну з використанням меляси та арахісового шроту, як джерел карбону та нітрогену відповідно [38]. Серед стимуляторів флавіногенезу найкращий ефект показаний для олії з рисових висівок (максимальна концентрація рибофлавіну збільшилась на 44 %), а також для гідролізату дріжджів та кукурудзяного екстракту [88].

Щоб уникнути інгібування накопичення рибофлавіну високими концентраціями глюкози та дріжджового екстракту була розроблена стратегія подачі глюкози та дріжджового екстракту у ферментер у вигляді підпитки, внаслідок чого вдалося збільшити вихід рибофлавіну на 105% [8].

Гліюксилатний цикл – це анаболічний шлях, необхідний для росту на джерелах вуглецю, що важко ферментуються, таких як рослинні олії, і важливий для виробництва рибофлавіну нитчастим грибом *Ashbya gossypii*. Оскільки встановлено, що додавання олії стимулює вироблення РФ в *A.gossypii*, активація циклу гліюксилатної кислоти має бути важливою для збільшення накопичення рибофлавіну. Мутанти, у яких активність ізоцитрат-ліази, яка є ключовим ферментом при біосинтезі рибофлавіну з олій, вища, ніж у диких штамів, виробляють більшу кількість рибофлавіну [80, 82]. Итаконат пригнічує

ключовий фермент гліоксилатного шунта, ізоцитрат-ліазу, а мутанти, стійкі до ітаконату, виробляють підвищені рівні РФ [78, 79]. Точний характер цих мутацій не з'ясований. Перенаправлення потоку карбону з циклу трикарбонових кислот через гліоксилатний цикл призводить до посилення виробництва рибофлавіну [48].

Відомо, що ідеальна колонія для виробництва рибофлавіну характеризується середньою інтенсивністю росту (розмір колонії 8–10 мм у період культивування 96 год.), інтенсивним жовтим кольором, відсутністю секторального утворення та гладкою поверхнею [89]. Популяція культури *E. ashbyi* показала високу морфологічну нестабільність, а також значну неоднорідність щодо здатності синтезувати рибофлавін.

При культивуванні *E. ashbyi* найбільша кількість рибофлавіну спостерігається при початковому рН середовища 6,5 [85]. У роботі [38] показано, що рН 6,5 та перемішування при 160 об/хв були оптимальними для виробництва рибофлавіну та біомаси. Проте результати, отримані у роботі [90] показали, що найвища продуктивність рибофлавіну була отримана при значенні рН від 4,5 до 5,5.

Технологія виробництва рибофлавіну за допомогою *E. ashbyii* коротко наведена у класичних підручниках з біотехнології [91–95].

В якості поживного середовища можна застосовувати 1–3% меляси, гідрола або глюкози, 3–8% кукурудзяного екстракту або дріжджового автолізу, додаючи N, P₂O₅, K, Mg, Zn [95].

У колишньому СРСР для отримання кормового препарату застосовували середовище, яке включало наступні компоненти: олія, соєве борошно, кукурудзяний екстракт, крейду та буряковий або яблучний порошок. В Англії застосовують середовище, яке складається з глюкози (5 г/л), соняшникової олії (15 г/л), рН 6,5–7,0 [92, 93].

Також можна застосовувати середовище, що містить 5% цукру-сирцю, 3% пептону, 1% пшеничних зародків, 0,3% м'ясного екстракту, 0,3% KН₂РO₄ та 0,25% NaCl. рН 6,0 [94].

Біосинтез рибофлавіну стимулюється додаванням ненасичених жирних кислот, насичені, навпаки, гальмують його утворення. Розвиток *E. ashbyii* стимулюється додаванням біотину, тіаміну, інозиту. Піримідинові та пуринові основи є попередниками утворення рибофлавіну і також можуть бути використані для інтенсифікації його біосинтезу. Найкращим стимулятором є ксантин [94].

Міцеліальний гриб *E. ashbyi* здійснює суперсинтез не лише рибофлавіну, але й ФАД. Особливо активно синтезується ФАД при додаванні у середовище культивування мальтози [96]. Активно досліджується синтез рибофлавінкінази [97-99], що діє на першому етапі перетворення рибофлавіну у коферментні форми – АТФ-залежний фермент, який фосфорилує рибофлавін з утворенням РФ-5'-фосфату (ФМН). Серед грибів високу питому активність РФ-кінази мають *A. gossipii* й *E. ashbyii* – відомі промислові продуценти рибофлавіну і ФАД [97, 98].

Проте *E. ashbyi* має недолік – він нестабільний при зберіганні. На щільних середовищах при кімнатній та зниженій температурі і навіть в процесі ліофілізації він легко втрачає свою здатність до суперсинтезу рибофлавіну.

E. ashbyii культивують в глибинних умовах у ферментері при температурі 28–30°C, постійному перемішуванні зі швидкістю 220 об/хв. та аерації зі швидкістю 220 см³/хв. протягом 80–84 годин. Для безперервного контролю кількості рибофлавіну безпосередньо в процесі його накопичення в субстраті розроблений іон селективний електрод [100].

Для отримання кормового препарату рибофлавіну культуральну рідину випарюють в вакуумі до 30–40% сухих речовин та сушать у розпилювальній або валково-вакуумній сушарці. Готовий продукт являє собою порошок жовто-бурого кольору, який містить не менш 10 мг/г рибофлавіну, до 20% протеїну. Кормовий препарат містить також вітаміни В₁, В₃, В₆, В₁₂ та нікотинову кислоту [93, 95].

Для отримання кристалічного препарату рибофлавіну культуральну рідину нагрівають до 95–100°C, оскільки в цих умовах весь рибофлавін

виходить з клітин. Потім розчин центрифугують, центрифугат охолоджують до 18–20°C, встановлюють рН 4,5–5,0 та осаджують рибофлавін з розчину за допомогою гідросульфїту. Після декантації розчин промивають, центрифугують, сушать та подрібнюють. Таким чином отримують технічний препарат рибофлавіну. Медичний препарат отримують перекристалізацією рибофлавіну з розчину технічного рибофлавіну в соляній кислоті [73].

Пропонують спосіб очистки та кристалізації рибофлавіну, при якому рибофлавін в стабільній модифікації розчиняють у водному розчині мінеральної кислоти при температурі не >30°C при інтенсивному перемішуванні, додають до отриманого розчину активоване вугілля, фільтрують через керамічні мембрани с розмірами пор 20–200 нм, отриманий розчин змішують при температурі не вище 30°C з 5–10-кратною кількістю води, кристали рибофлавіну, що випали, відокремлюють центрифугуванням або фільтруванням [101].

1.5 Математичні методи оптимізації складу поживних середовищ для біосинтезу рибофлавіну

Ефективним способом підвищення виходу цільових продуктів при культивуванні штамів–продуцентів, а також збільшення виходу біомаси грибних та бактеріальних клітин є оптимізація складу поживного середовища [102–105]. Існує два способи визначення оптимального складу середовища культивування: методом емпіричного підбору і з використанням методів математичного планування експерименту.

З метою оптимізації поживного середовища з використанням методів математичного планування, біотехнологами найбільш широко використовуються плани експерименту, спрямовані на пошук екстремуму, розроблені для визначення оптимальних умов протікання процесів в об'єктах, що досліджуються.

Задача основного експерименту – отримання математичної моделі процесу і використання її для статичної оптимізації об'єкта дослідження. Для цього використовуються плани факторного експерименту для отримання лінійних моделей та композиційні плани для отримання нелінійних моделей об'єкта дослідження.

Багатофакторний експеримент є дуже ефективним і сучасним способом обробки результатів наукових досліджень. Обробка результатів експериментальних даних багатофакторним експериментом дозволяє отримати точну математичну формулу залежності результуючої функції від обраних факторів. Ортогональний центрально-композиційний план другого порядку дозволяє отримати при обробці експериментальних даних рівняння другого порядку виду

$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \dots$, що в повній мірі відповідає сучасним вимогам. Побудова 3D поверхні відгуку і перерізів поверхонь відгуку дозволяє зробити детальний аналіз результатів експерименту і вирішити задачі оптимізації.

Так, оптимізуючи поживне середовище для культивування *B. subtilis* ATCC 6051, продуценту рибофлавіну, застосовували послідовну стратегію оптимізації (плани Plackett-Burman із наступним центральним композиційним планом в поєднанні з аналізом поверхні відгуку). Встановлено, що оптимальними концентраціями середовища (г/л) для найвищого виробництва рибофлавіну були фруктоза – 38,10; MgSO_4 – 0,85; K_2HPO_4 – 2,27; FeSO_4 – 0,02; дріжджовий екстракт – 4,37. Максимальне виробництво рибофлавіну на оптимізованому середовищі становило $11,73 \pm 0,68$ г/л [43].

Застосувавши плани Plackett-Burman для визначення компонентів середовища, що здійснюють значний вплив на синтез рибофлавіну продуцентом *Bacillus subtilis* RH44, глюкоза, NaNO_3 , K_2HPO_4 , ZnSO_4 та MnCl_2 були визначені як найбільш значущі фактори для виробництва рибофлавіну. Оптимальні значення цих п'яти факторів були визначені за допомогою центрального композитного плану. Оптимізація середовища призвела до максимальної

концентрації рибофлавіну 6,65 г/л, що на 76,4% вище, ніж при культивуванні на базовому середовищі [41].

Використовуючи плани Вох-Behnken для трьох факторів на трьох рівнях було оптимізоване середовище для накопичення рибофлавіну культурою *Ashbya gossypii*. На оптимізованому середовищі, що містило рапсову олію, кукурудзяний екстракт та гліцин було отримано 5 г/л рибофлавіну [80].

Поживне середовище для виробництва рибофлавіну культурою *Ashbya gossypii* було оптимізоване за допомогою трифакторного трирівневого (3^3) ортогонального плану. На оптимізованому середовищі, що містить кукурудзяний екстракт та соєву олію синтезується 6,4 г/л рибофлавіну [49].

1.6 Отримання ефірної олії з ароматом троянди

Сучасний світ неможливо уявити без косметичних та парфумерних композицій. Ароматна традиція, що прийшла до нас з давніх часів, постійно збагачується новими фарбами, поповнюючи власний запас технологій виготовлення парфумів та косметики.

Ефірні олії – це суміші запашних летких речовин, які утворюються у рослинах та відносяться до різних класів органічних сполук, переважно терпенам та терпеноїдам (кисневі сполуки терпенів), рідше до ароматичних та аліфатичних сполук [105–108]. Вони володіють характерним ароматним запахом та олієподібною консистенцією.

Традиційно трояндову ефірну олію, яка є однією з найдорожчих олій, отримують з ефіроолійних видів троянд [109–112]. Очевидно, що сировинна база промислового отримання ефірних олій досить обмежена і не може задовольнити постійно зростаючий попит. До того ж поставки даної рослинної сировини носять сезонний характер і залежні від кліматичних умов. Збір ефірної олії з плантацій залежить від великої кількості показників: олійності культури, врожайності, ґрунтово-кліматичних умов, агротехнічних прийомів оброблення, фази розвитку під час збору, часу збирання протягом доби, умов і

термінів зберігання сировини [108, 110, 112]. Ефіроолійна сировина втрачає ефірну олію після збирання і переробляється в свіжому стані [108]. Перераховані проблеми можливо вирішити біотехнологічним шляхом.

1.6.1 Традиційні способи отримання ефірної олії троянди та її властивості

Ефіроолійна флора налічує близько 3000 видів рослин, однак промислове значення мають лише 150–200 видів [108]. Особливо багато цінних ефірних олій отримують з родини розові (наприклад, трояндову ефірну олію). Троянди у порядку розоцвіті (*Rosales*) родини розові (*Rosaceae*) утворюють окремий рід, який налічує близько 400 видів та 25 тис. сортів [108]. Більшість з них є декоративними. До ефіроолійних видів відносяться троянда дамаська або казанликська (*Rosa damascena* Mill.), яка вирощується вже більше 300 років у Долині троянд біля м. Казанлик у Болгарії [109–111]. Цей же вид використовується для отримання трояндової олії у Туреччині [112]. У значно менших обсягах у Болгарії отримують ефірну олію з троянди білої (*R. alba* L.) [109, 113]. У Криму ефірну олію отримують з троянди гальської або червоної (*R. gallica* L.). Сорт кримська червона був виведений у Нікітському ботанічному саду у 30 роках XX століття. Також трояндову олію отримують з троянди столісної (*R. certifolia* L.), яку застосовують у Франції та Марокко, троянди мускатної (*R. moschata*) та ін. [107, 108].

Ефіроолійну троянду культивують протягом багатьох сотень років. Промислове виробництво трояндової олії нараховує три століття. У світі ефірну олію вищої якості виробляють такі країни, як Саудівська Аравія (місто Таїф), Болгарія (Казанлик), Туреччина (Іспарта) і Узбекистан (Ташкентська область) [111–115]. Загальний обсяг виробництва трояндової олії становить приблизно 5 тон, причому основними виробниками є Болгарія і Туреччина. Також трояндову олію виробляють Марокко, Єгипет, Китай, Росія, Іран та Індія [114–116]. Крім того Іран є основним постачальником трояндової води на світовий

ринок [114].

До 1992 року виробництво трояндової ефірної олії методом гідродистиляції в республіках СРСР (Україна, Молдова та ін.) становило близько 4 т/рік. Зараз воно різко скоротилося через економічну кризу в країнах СНД [107]. Відбулося різке і значне скорочення трояндових плантацій (з 1375 га до 173 га у 2007 р.), що пов'язано з високою собівартістю трояндової олії. У 2007 р. в Криму було вироблено лише 600 кг ефірної олії (екстракту) троянди, що в 2 рази менше можливостей ефіроолійної галуззі цього регіону [117, 118].

В якості сировини для отримання ефірної олії використовують квіти троянди. У квітках ефіроолійної троянди вміст ефірної олії коливається від 0,06 до 0,2% в залежності від виду сировини [106, 108]. Вміст ефірної олії в квітках в значній мірі залежить від їх розвитку і часу збору.

Компонентний склад трояндової олії та її якість регламентуються ДСТУ 4652:2006 «Олія ефірна трояндова. Технічні умови». Відповідно з цим стандартом загальна масова доля спиртів у перерахунку на β -фенілетиловий спирт має становити 75–88%, масова доля монотерпенових спиртів у перерахунку на гераніол – не менше 8%. Проте слід приймати до уваги показники, які регламентуються міжнародним стандартом ISO 9842:2003 «Rose Oil», тим більше, що вони відрізняються від наведених у ДСТУ. На відміну від українських стандартів ISO регламентує значно менший вміст β -фенілетилового спирту (<3,5%) та значно більший вміст монотерпенових спиртів: цитронеллолу 20–34%, неролу 5–12% та гераніолу 15–22%. Ефірна олія, що відповідає міжнародним стандартам, відрізняється більш високою якістю за рахунок зниженого вмісту фенілетанолу та відносного збільшення доли монотерпенових спиртів. Саме такої якості є трояндова ефірна олія, що виробляється у Болгарії методом подвійної гідродистиляції [107, 109, 113, 114, 116]. Кримська гідродистиляційна олія та олія, отримана методом екстракції (абсолю) містять значну кількість фенілетилового спирту [107, 119].

Головними компонентами ефірної олії троянди є фенілетиловий спирт,

гераніол, цитронеллол, нерол, а також в ній міститься велика кількість міnorних компонентів (більше 200). Крім того, в квітках троянди містяться жирна олія, стерини, воски, органічні кислоти, вуглеводи та інші органічні та неорганічні речовини [108]. Парфумерні властивості болгарської олії визначають не тільки і не стільки такі основні її компоненти, як цитронеллол, гераніол і нерол, а міnorні складові, які мають дуже малі пороги нюху і тому сильно впливають на запах суміші. До них в першу чергу відносяться розеноксид, β -дамасценон, β -іонон і β -дамаскон [107].

Ефірну олію троянди отримують з рослинних матеріалів паровою дистиляцією (гідродистиляцією) та екстракцією. При цьому отримують різні за фізико-хімічними властивостями і парфумерними якостями продукти самостійного значення - дистиляційну та екстракційну ефірні олії.

Способом парової дистиляції вилучають із сировини тільки сполуки, що летять з водяною парою. Суміш парів ефірної олії та води конденсують та відділяють невелику кількість первинної ефірної олії, а дистиляційні води переганяють повторно (когобують). При цьому отримують основну частину ефірної олії, яку купажують з первинною. Вихід ефірної олії троянди становить в середньому 0,025%, так що для отримання 1 кг олії доводиться зібрати вручну і переробити близько 4 тонн пелюсток [107, 112]. Після перегонки олії залишається трояндова вода. У ній частка олії становить близько 0,2% [114, 115]. Метод подвійної перегонки традиційно застосовується у Болгарії та Туреччині.

Технологія отримання дистиляційної трояндової олії в Криму сильно відрізняється від прийомів отримання трояндової олії в Болгарії та Туреччині. Дистиляційні води після гідродистиляції та відділення первинної олії піддають екстракції з метою практично повного вилучення всіх компонентів масла, включаючи β -фенілетиловий спирт, для подальшого його додавання в первинну олію. В результаті цього вихід ефірної олії збільшується, але вміст фенілетилового спирту в кримській олії може становити 60–80%, у той час як у болгарській або турецькій - всього 2–4%. Загальний вихід олії коливається від

0,06 до 0,1% в залежності від якості сировини. Застосовування процесу ферментації троянди дозволяє збільшити вихід ефірної олії, але проведення ферментації різко збільшує вміст фенілетилового спирту і зменшує вміст терпенових спиртів [106–108, 120].

Більш ефективним способом переробки ефіроолійних рослин є екстракційний. Його застосування дає можливість отримувати високоякісні продукти з великим виходом олії за рахунок вилучення нелетких речовин.

Квітки троянди, ферментовані або свіжі, екстрагують органічним розчинником, розчинник відганяють і отримують екстракт, так званий конкрет. Для отримання абсолютного ефірного масла, або абсолю, конкрет обробляють етиловим спиртом і при охолодженні осаджують основну частину нелетких баластних речовин - жирів, восків, смол, пігментів, переважно зберігаючи летючі ароматні речовини, характерні для рослини-продуцента. Вихід абсолютної трояндової олії становить 0,1–0,13% [106–108].

Трояндова ефірна олія, ціна якої на світовому ринку сягає 5000 EUR за 1 кг, користується надзвичайним попитом [111]. Вона відіграє особливу роль у парфумерії, де використовується в якості базового компонента. Більше 50% світових парфумерних брендів виготовляється на основі трояндової олії. Особливо високо цінується парфумерами болгарська трояндова олія [111, 119]. Завдяки своїм ароматичним властивостям трояндова олія широко застосовується у косметичній промисловості, а також у харчовій промисловості в якості ароматизаторів. Трояндова вода і олія широко застосовуються в кондитерському і лікєро-горілчаному виробництві.

Трояндова олія також використовується в медицині і фармацевтиці. Вона має помірну антибактеріальну та противірусну дію [106, 119, 121–124]. Монотерпенові спирти, що входять до складу олії, є гарними антисептиками, діючи проти вірусних, бактеріальних та грибкових інфекцій [106]. Трояндова олія володіє аналгетичною, жарознижувальною, протизапальною, протинабряковою, жовчогінною, гепатопротекторною дією, проявляє антиоксидантну активність. Застосовується в лікуванні стоматиту, пародонтозу,

герпесу, шкіряних та інших захворювань, трояндова вода застосовується в очних примочках [106, 111, 114, 119, 123, 124]. Ефірна олія надає також стимулюючу або заспокійливу дію на центральну нервову систему, проявляє імуномодулюючий ефект [114, 115]. Олію застосовують у якості кориганта фармацевтичних препаратів з метою поліпшення їх смаку і запаху.

1.6.2 Біотехнологічні можливості отримання ефірної олії з ароматом троянди

З незапам'ятних часів людина використовує мікроорганізми, здатні продукувати аромати, особливо при отриманні ферментованих харчових продуктів та напоїв. Проте лише у першій половині XX-го сторіччя почалося дослідження мікроорганізмів, як природних джерел різних ароматів. Одним з перших огляд з цієї тематики написав відомий російський мікробіолог В.Л. Омелянський [125].

Багато ароматизаторів на ринку виробляються шляхом хімічного синтезу. Хімічні виробництва є екологічно несприятливими, а отримані продукти містять небажані рацемічні суміші. Споживач більше не хоче використовувати продукти «ідентичні натуральним», тому в останні 30 років значно інтенсифікувалося вивчення ароматутворюючих мікроорганізмів та нових шляхів отримання натуральних запашних речовин [126, 127]. Отримувати нові ароматичні сполуки можливо методами біотрансформації з менш цінних компонентів, використовуючи мікроорганізми або ізольовані ферменти, та за допомогою *de novo* синтезу цих сполук мікроорганізмами [12, 126–130].

Особливий інтерес, як нетрадиційних джерел ефірних олій, представляють мікроорганізми (бактерії, актиноміцети, гриби, дріжджі, водорості), здатні синтезувати ці субстанції *de novo*. За кордоном впроваджені у виробництво способи отримання 4-декалактона з персиковим запахом (BASF), макроциклічних компонентів мускусу (Nippon Mining Co., Quest International), ваніліну (Evolva) та інших ароматизаторів [130, 131]. Найбільш

перспективними з метою отримання ефірних олій і летючих запашних з'єднань з різноманітними напрямками запаху є грибні культури, які відносяться до базидіоміцетів і аскоміцетів, в тому числі дріжджі. У таблицях 1.2, 1.3 наведені мікроорганізми, які здатні синтезувати *de novo* речовини з ароматом троянди (в основному це фенілетиловий спирт, цитронеллол, гераніол та нерол).

Таблиця 1.2

Міцеліальні гриби, які *de novo* синтезують речовини з ароматом троянди

Вид мікро-організму	Таксономічне положення [55]	Запашні речовини, що синтезуються	Запах	Посилання
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Trichocomaceae</i>	метилкетони; 2-фенілетанол	неприємний подібний троянді	[127, 129, 132]
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, incertae sedis</i>	ліналоол, цитронеллол, гераніол, α -терпінеол	солодкий, фруктовий	[127, 130, 133]
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, incertae sedis</i>	3-метилбутил-ацетат, гераніол, цитронеллол, нерол, ліналоол, α -терпінеол, гераніаль, нераль, цитронеллілацетат, геранілацетат	запахи банану, груші, троянди, персика	[127, 130]
<i>Ceratocystis variospora</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, incertae sedis</i>	цитронеллол, цитронеллілацетат, гераніаль, нераль, гераніол, ліналоол, геранілацетат, нерол, α -терпінеол	ароматний, подібний герані	[127, 130]
<i>Ceratocystis virescens</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, incertae sedis</i>	цитронеллол, гераніол, ліналоол, геранілацетат, нерол, α -терпінеол, гераніаль, нераль, цитронеллілацетат, нерілацет	фруктовий, подібний троянді	[126, 130]
<i>Mycena pura</i>	<i>Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetes, Mycenaceae</i>	цитронеллол	запах троянди	[129]

Продовження табл. 1.2

<i>Penicillium decumbens</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Trichocomaceae</i>	туйопсен, 3-октанон, неролідол, 1-октен-3-ол, β -фенілетанол	подібний сосні, троянді, яблуку, грибам	[130]
<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, incertae sedis</i>	нерол, ліналоол, цитронеллол, терпінеол, неролідол, ліналілацетат, цитронеллілацетат, геранілацетат, 1-октен-3-ол, 3-октанол, 1,5-октадиен-3-ол, октан-1-ол, 2-октен-1-ол	квітковий, грибний	[130]

Таблиця 1.3

Дріжджі і дріжджеподібні гриби,
які *de novo* синтезують речовини з ароматом троянди

Вид мікро-організму	Таксономічне положення [55]	Запахні речовини, що синтезуються	Запах	Посилання
<i>Ascoidea hylecoeti</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Saccharomycetes, Ascoideaceae</i>	β -фенілетанол, фуран-2-карбонова кислота, цитронеллол, нерол, ліналоол, α -терпінеол, цитронеллаль, лімонен, мірцен, цитронеллілацетат	фруктовий, квітковий, подібний троянді	[129, 130]
<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Saccharomycetes, Saccharomycopsidaceae</i>	гераніол, цитронеллол, ліналоол, нерол, β -фенілетанол, α -терпінеол, цитраль	подібний троянді	[130]
<i>Ambrosiozyma monospora</i>	<i>Fungi, Ascomycota, Saccharomycetes, Saccharomycopsidaceae</i>	гераніол, цитронеллол, ліналоол, нерол, β -фенілетанол, α -терпінеол, цитраль	подібний троянді	[130]

Продовження табл. 1.3

<i>Cyberlindnera jadinii</i> (syn. <i>Torulopsis utilis</i> , <i>Candida utilis</i>)	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>incertae sedis</i>	2-фенілетанол, етилацетат	подібний троянді	[132, 133]
<i>Cyberlindnera saturnus</i> (syn. <i>Hansenula saturnus</i>)	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>incertae sedis</i>	етилацетат, 3- метилбутанол, 3- метилбутилацетат, 2-фенілетанол, 2-фенілетилацетат	подібний троянді	[130]
<i>Eremothecium ashbyi</i>	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Eremotheciaceae</i>	гераніол, цитронеллол, нерол, ліналоол, β -фенілетанол, цитраль, фарнезол	подібний троянді	[9-11, 130, 134– 137]
<i>Eremothecium gossypii</i> (syn. <i>Ashbya gossypii</i>)	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Eremotheciaceae</i>	гераніол, цитронеллол, нерол, ліналоол, β -фенілетанол, цитраль, фарнезол	подібний троянді	[10, 11, 134, 136, 137]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Saccharomycetaceae</i>	цитронеллол, гераніол, ліналоол, β -фенілетанол, ефіри, ізоаміловий спирт, ацетоїн, 2-фенілацетат, ізобутанол, ізовалеріанова кислота	фруктовий, подібний троянді, квітковий	[126, 129, 130, 139, 140]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Saccharomycetaceae</i>	2-фенілетанол, 2- фенілетилацетат	подібний троянді	[127, 128, 130, 133, 140]
<i>Millerozyma farinosa</i> (syn. <i>Pichia farinosa</i>)	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Debaryomycetaceae</i>	етилацетат, 3- метилбутанол, 3-метилбутилаце- тат, 2-фенілетанол, 2-фенілетилацетат	подібний троянді	[130]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Saccharomycetaceae</i>	2-фенілетанол, ліналоол, гераніол, цитронеллол, α -терпеніол	подібний троянді; квітково- фруктовий	[126– 128, 130, 132, 140, 141]

Продовження табл. 1.3

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (syn. <i>Saccharomyces vini</i>)	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Saccharomycetaceae</i>	2-фенілетанол	подібний троянді	[132]
<i>Wickerhamomyces anomala</i> (syn. <i>Hansenula anomala</i> , <i>Pichia anomala</i>)	<i>Fungi</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Saccharomycetes</i> , <i>Wickerhamomycetaceae</i>	етилацетат, ізобутилацетат, 3-метилбутилацетат, фенілетанол, фенілетилацетат	квітковий-фруктовий	[127, 130, 132]

Серед наведених у табл. 1.2, 1.3 мікроорганізмів більшість створюють квітковий, переважно трояндовий аромат, лише за рахунок синтезу вищого ароматичного спирту 2-фенілетанолу, який міститься у ефірній олії троянди у великій кількості [129, 130, 132]. Проте найбільш цінною та затребуваною ефірною олією троянди є олія болгарського виробництва, яка містить незначну кількість фенілетилового спирту (менше 3,5 %), за рахунок цього в ній збільшується кількість монотерпенових спиртів. У зв'язку з цим найбільший інтерес представляють види родів *Ambrosiozyma*, *Ceratocystis*, *Eremothecium*, *Kluveromyces*, *Mycena* та *Saccharomyces*, оскільки вони здатні синтезувати монотерпенові спирти (гераніол, цитронеллол, нерол, ліналоол та ін.), які є головними компонентами трояндової ефірної олії [9–11, 127, 129, 130, 134–139, 141]. Проте рівень накопичення з'єднань, що створюють аромат, у наведених грибів варіює від сотень мкг до сотень міліграмів (*C. moniliformis*, *Eremothecium ashbyi*, *E. gossypii*) на літр культуральної рідини [10, 56, 126, 130, 135–137, 141].

Найвищі показники були відмічені у *E. ashbyi*, який здатен синтезувати до 180 мг ефірної олії на літр культуральної рідини протягом перших діб росту, що можна порівняти із вмістом ефірної олії в 500–600 г квіток троянди [9–11, 134–138]. Ефірна олія *Eremothecium* являє собою суміш летючих ароматних речовин, в основному, монотерпенових спиртів (МТС): гераніола, нерола, цитронеллола та ароматичного спирту – β -фенілетанолу (ФЕС) [142]. Необхідно зазначити, що геранілпірофосфат є попередником усіх МТС, що

містяться у трояндовій та еремотецієвій оліях (рис. 1.4) [143]. Склад ефірної олії з грибів роду *Eremothecium*: β -фенілетанол (20–57 %), гераніол (31–81 %), цитронеллол (2,5–11 %), нерол (1,1–6,8 %) [9, 10, 56, 136, 137].

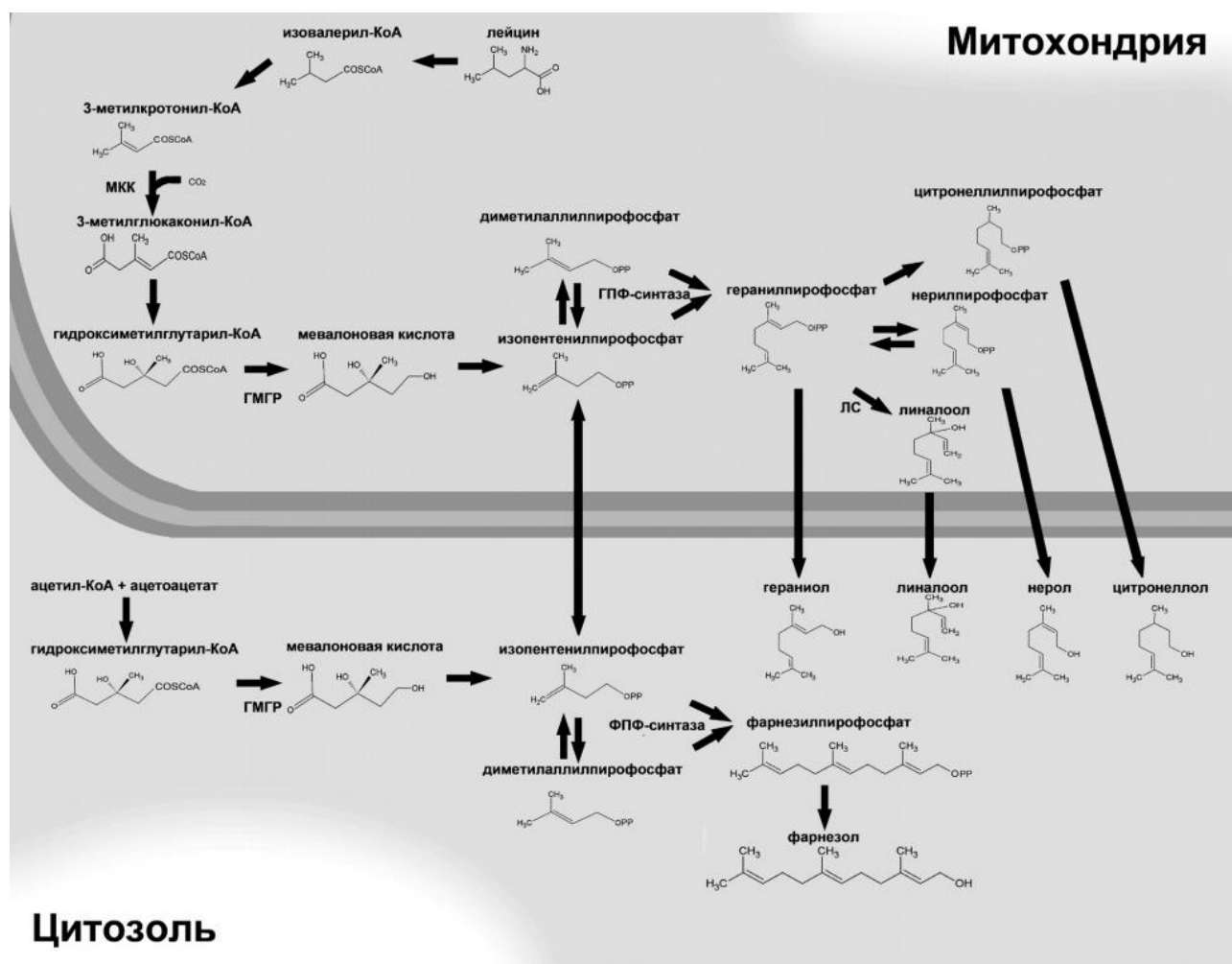


Рис. 1.4 Біосинтез монотерпенових спиртів *E. ashbyi* та *E. gossypii* (ГМГР – гідрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктаза; ФПФ-синтаза – фарнезилпірофосфатсинтаза; МКК – 3-метилкротоніл-КоА-карбоксилаза; ГПФ-синтаза – геранілпірофосфатсинтаза; ЛС – ліналоолсинтаза) [143].

При дослідженні процесів накопичення фенілетанолу, гераніолу, цитронеллолу та неролу у штамів *Eremothecium ashbyi* Guillermond 1935, що різняться рівнем синтезу рибофлавіну показано, що процеси біосинтезу рибофлавіну і монотерпенових спиртів є залежними. Накопичення вітаміну В₂ та ароматуючих речовин супроводжувалось збільшенням числа ліпідних крапель та заповненням вакуолей ліпофільними з'єднаннями [13]. Для

прискореного експрес-аналізу вмісту ефірних олій в дослідних зразках та ароматних водах запропоновано використовувати спектрофотометричний метод [144].

Проводились дослідження біосинтезу монотерпенів у глибинній культурі аскоміцета *Eremothecium ashbyi* [145]. Встановлено, що накопичення терпенів відбувається у фазі стаціонарного росту і не здійснюється при низькому вмісті неорганічного фосфору в поживному середовищі. Синтез монотерпенів супроводжується підвищенням активності внутріклітинної лужної фосфатази.

Встановлено наявність антимікробної активності ефірної олії з *E. ashbyi* [61], яка відповідає межах активності ефірної олії з пелюсток троянди. Склад, співвідношення компонентів, а також фізико-хімічні та спектральні показники ефірного масла з *E. ashbyi* подібні ефірній олії з пелюстків троянди.

Сировиною для отримання ефірної олії мікробним синтезом є доступні речовини та компоненти: глюкоза, меляса, сусло, дріжджовий екстракт, пептон. Умови біосинтезу: температура 28–30°C, перемішування 200 об/хв, аерація зі швидкістю 220 см³/хв, тривалість культивування 80–84 години.

Наведені дані є передумовою для застосування ефірної олії з гриба *Eremothecium ashbyi* в медицині та косметології.

Висновки до розділу 1

Таким чином, представники роду *Eremothecium* є перспективними продуцентами як рибофлавіну, так і ефірної олії, що обумовлює необхідність в подальшій розробці біотехнології їх отримання. Економічні вигоди виробництва ефірної олії на основі *Eremothecium* можуть бути збільшені за рахунок застосування технології комплексного отримання біологічно активних речовин для задоволення потреби в них хіміко-фармацевтичної, парфумерно-косметичної, харчової промисловості.

Аналізуючи літературні джерела виявлена суперечлива інформація стосовно технологічних умов культивування аскоміцету *Eremothecium ashbyi*, а саме: рН та інтенсивності перемішування, що застосовуються з метою

максимального накопичення рибофлавіну; віку та обґрунтованої кількості посівного матеріалу, що вноситься у середовище культивування. Широкий спектр компонентів середовищ, що застосовуються для культивування даного роду грибів, дає можливість вибрати та оптимізувати склад поживного середовища саме для обраного для дослідження штама.

Питання утворення мікроорганізмами та грибами ароматутворюючих компонентів розглядалося багатьма дослідниками, проте реальна перспектива отримання ефірної олії з ароматом троянди, що є затребуваною та однією з найдорожчих олій, була показана Мироновим В. А., Семеновою Є. Ф. та Шпичкою А. І. Необхідно показати рівень продуктивності обраного штаму та дослідити можливість одночасного отримання рибофлавіну та ефірної олії.

На основі проведененого аналітичного огляду літератури були сформульовані мета та задачі дослідження.

Мета роботи – розробка науково-обґрунтованої біотехнології отримання рибофлавіну та ефірної олії з використанням штаму-продуценту *Eremothecium ashbyi*.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні задачі:

- вивчити біосинтетичну активність обраного штаму-продуценту рибофлавіну й ефірної олії;
- дослідити умови отримання активного посівного матеріалу;
- встановити раціональні умови культивування досліджуваного штаму;
- дослідити джерела живлення та обґрунтувати вибір поживних середовищ для культивування;
- модифікувати склад поживного середовища для максимального біосинтезу рибофлавіну;
- дослідити продукування рибофлавіну та ефірної олії на модифікованому середовищі;
- запропонувати технологію виробництва рибофлавіну та ефірної олії і розробити технологічну схему виробництва.

Основні результати розділу опубліковані у працях [146, 147].

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження був *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-340, отриманий з Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів (раніше таксономічне положення визначалося як: царство *Fungi*, відділ *Ascomycota*, клас *Hemiascomycetes*, порядок *Saccharomycetales*, родина *Spermothoraceae* [52, 59]). За сучасними даними, відповідно до міжнародної бази систематики грибів CABI Bioscience та бази даних CBS Database of Fungal Names, даний гриб віднесений до *Eremotheciaceae*, *Saccharomycetales*, *Saccharomycetidae*, *Saccharomycetes*, *Saccharomycotina*, *Ascomycota*, *Fungi* [55].

Штам гриба *Eremothecium ashbyi* зберігався в активному стані 8-10 місяців шляхом систематичного пересіву на тверді поживні середовища та відбору найбільш інтенсивно забарвлених в жовтогарячий колір колоній. З метою запобігання пересихання культури пересіви здійснюють у великі пробірки ($d=20$ мм), заповнені на 1/3 поживним середовищем.

Робочі культури зберігалися при кімнатній температурі на скошеному агаризованому глюкозо-пептонно-дріжджовому середовищі (ГПД) складу (у %): глюкоза – 1,0; дріжджовий екстракт – 0,5; пептон – 0,3; агар – 2,0 та на соєвому середовищі складу (у %): соєве борошно – 4,0, сахароза – 1,0, агар – 2,0.

Eremothecium ashbyi у відповідності до класифікації патогенних для людини мікроорганізмів [148] не є патогенним для людини.

2.2 Умови культивування штаму

З метою дослідження росту на щільних поживних середовищах культивування штаму *Eremothecium ashbyi* F-340 здійснювали на агаризованих

глюкозо-пептонно-дріжджовому (ГПД), соєвому середовищі, середовищі Чапека-Докса, картопляно-декстрозному середовищі (КДА) та сусло-агарі.

Культивування на рідких середовищах здійснювали при 28°C протягом 7 діб у конічних колбах з 50 см³ рідкого поживного середовища на качалці при 180 об/хв. Для цього використовували глюкозо-пептонно-дріжджове середовище (ГПД), середовище Чапека-Докса [149], соєве середовище [150], середовище Городкової [151] та сусло (330 см³ неохмеленого пивного сусла на 1 дм³ води). Посівний матеріал отримували на ГПД та вносили у кількості 5 %.

2.2.1. Спосіб отримання посівного матеріалу. Для глибинного культивування культуру з агаризованого середовища переводили в рідке поживне середовище, для цього гриб пересівали в конічні колби об'ємом 250 мл (заповнення 20%) з глюкозо-пептонно-дріжджовим середовищем. Отримували посівний матеріал різного віку. Об'єм інокуляту – 1–10 % від об'єму середовища, що засівається.

2.2.2. Умови проведення глибинного культивування. Глибинне культивування проводилось на орбітальних шейкерах ЛАБ-ПУ-01 за наступних умов: без перемішування, з перемішуванням при 70 або 180 об/хв; температура 28°C; тривалість культивування 7 діб.

2.2.3. Дослідження динаміки росту. Для дослідження динаміки росту глибинне культивування *Eremothecium ashbyi* на рідкому поживному середовищі здійснювали при 28°C протягом 7 діб у конічних колбах з 50 см³ середовища в умовах постійного перемішування на орбітальній качалці зі швидкістю 180 обертів/хв. Середовища у колбах інокулювались попередньо отриманою глибинною культурою у кількості 5 %. Проби культуральної рідини відбирали кожну добу та досліджували зміну рН, рівень накопичення біомаси та рибофлавіну у культуральній рідині (позаклітинний рибофлавін) та у висушеній біомасі (внутрішньоклітинний рибофлавін).

2.2.4. Перевірки життєздатності культури за різних температур. Для перевірки життєздатності культури за різних температур та встановлення верхньої граничної температури штам інкубували в чашках Петрі з ГПД при

таких значеннях температури: 4, 15, 20, 35, 36, 37, 38, 39, 45°C. Після третьої доби інкубації враховувалась наявність чи відсутність росту культури. При відсутності росту за досліджуваної температури, надалі інкубація відбувалася за температури 28°C для перевірки збереження життєздатності.

Для виявлення діапазону температур, за яких посівний матеріал зберігає життєдіяльність, колби з *E. ashbyi*, отриманому на рідкому поживному ГПД середовищі, розташовувалися у термостаті при 35, 36, 37, 39, 45 та 60°C та витримувалися там протягом 1, 3, 4, 6 та 24 годин. Також посівний матеріал піддавався заморожуванню при -20°C. Для перевірки життєздатності витримані культури висівалися газоном в чашки Петрі з агаризованим ГПС та культивувалися при 28°C. Ріст культури враховувався на 3 та 6 добу культивування.

2.2.5. Дослідження тривалого збереження культури в активному стані. З метою встановлення впливу температури та складу поживних середовищ на зберігання активності культури, *E. ashbyi* зберігався при температурі 4 та 20°C у пробірках на агаризованих глюкозо-пептонному і соєвому середовищах та на рідкому ГПД протягом семи місяців. Частина пробірок з ГПД зберігалася під шаром вазелінового масла. Через місяць, три та сім місяців культура висівалася у колби з 50 см³ рідкого ГПС, культивування здійснювалося на качалці протягом 7 діб при 28°C та 180 об/хв. Досліджувався рівень накопичення біомаси та рибофлавіну у двох послідовних пересівах.

2.2.6. Вплив рівня pH на накопичення культурою E. ashbyi біомаси та рибофлавіну визначався на глюкозо-пептонно-дріжджовому середовищі, у якому за допомогою 0,1 н NaOH створювався діапазон pH від 4,0 до 8,0 з кроком 0,5. Протягом культивування один раз на добу здійснювався відбір проб культуральної рідини для визначення рівня pH, вмісту біомаси, рівня накопичення рибофлавіну.

2.2.7. Для визначення найсприятливіших для накопичення біомаси та рибофлавіну джерел вуглецю використовували середовище, що в якості «фону» містило у своєму складі 0,5% дріжджового екстракту та 0,3% пептону, до якого

як єдине джерело карбону, у кількості еквівалентній 10 г/дм^3 глюкози, додавали фруктозу, галактозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, сорбіт, маніт, дульцин, гліцерин, інозит, крохмаль картопляний, крохмаль розчинний, глюкозний сироп, глюкозно-фруктозні сиропи ГФС-10 та ГФС-42.

2.2.8. Визначення сприятливих джерел азоту здійснювали на середовищі наступного складу: глюкоза – 10 г/дм^3 , K_2HPO_4 – 1 г/дм^3 , KH_2PO_4 – 1 г/дм^3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,5 \text{ г/дм}^3$, KCl – $0,5 \text{ г/дм}^3$, до якого у якості джерела азоту (в еквіваленті $3 \text{ г/дм}^3 \text{ NH}_4\text{Cl}$) додавали наступні амінокислоти: аспарагінову, глутамінову, метіонін, цистеїн, треонін, аргінін, аспарагін, фенілаланін, аланін, триптофан та неорганічні сполуки: хлорид амонію, нітрат та нітрит натрію, нітрат амонію, сечовину. Натуральні компоненти середовищ, що слугують джерелами азоту: пептон, дріжджовий екстракт, соєве борошно.

2.2.9. Для дослідження впливу УФ-опромінення на синтез рибофлавіну вирощену на щільному поживному середовищі культуру *Eremothecium ashbyi* засівали в колби на 250 мл з рідким глюкозо-пептонно-дріжджовим середовищем, культивували 3 доби на качалці при 180 об/хв при 28°C . Після чого посівний матеріал переносили в центрифужні пробірки і центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. з наступним промиванням стерильною дистильованою водою, таким чином були отримані водні суспензії культури *Eremothecium ashbyi* [151].

Водна суспензія продуценту або культура продуценту у середовищі культивування по 3 см^3 розливалися в знежирені, ретельно вимиті і простерилізовані чашки Петрі діаметром 9 см з ідеально рівною поверхнею. При дотриманні цих умов суспензія розподіляється по дну чашки тонким шаром товщиною 0,1 мм. Потім чашки Петрі поміщали на певній відстані (25 см) від джерела УФ-променів (лампа бактерицидная 15W Electrum G13 A-FG-0495) і знімали кришки в момент включення секундоміра. Через задані проміжки часу (1, 3, 5 хвилин) чашки закривали кришками і опромінену культуральну рідину і водну суспензію культури *E. ashbyi* засівали в колби на 250 см^3 з рідким ГПД, доза опромінення: 30, 90 та 150 Дж/м^2 відповідно.

2.3 Показники, що визначалися в процесі культивування

2.3.1. *Морфологію культури E. ashbyi* вивчали під мікроскопом ULAB[®] XY-B2 при 1000-кратному збільшенні.

2.3.2. *Визначення концентрації біомаси ваговим методом*

Кількість біомаси визначали ваговим методом після її відділення від культуральної рідини фільтруванням через знезолений фільтр «ФС белая лента» та висушування у сушильній шафі до сталої ваги при 105°C [151]. Взважування проводили на аналітичних вагах.

2.3.3. *Визначення рН*

Активну кислотність (рН) визначали за допомогою рН-метра 150МА (рН-метр-мілівольтметр).

2.3.4. *Визначення концентрації редукуючих цукрів* здійснювали за допомогою модифікованого методу Хагедорна-Йенсена.

В пробірку вносили 1 см³ досліджуваного розчину, за необхідності розведеного, 3 см³ розчину ферицианіду калію. Після кип'ятіння протягом 15 хвилин пробірки охолоджували під проточною водою та вимірювали оптичну густину розчину при $\lambda=400$ нм в кюветі 10мм. Концентрацію редукуючих цукрів визначали за калібрувальним графіком, використовуючи в якості стандарту глюкозу в діапазоні концентрацій 20–150 мкг/см³ [152].

2.3.5. *Визначення концентрації рибофлавіну в культуральній рідині*

Дослідження рівня накопичення рибофлавіну проводилось спектрофотометричним методом [14, 153]. Точність визначення залежить від наявності в культуральній рідині інших гетероциклічних з'єднань. Досліджувані проби повинні бути абсолютно прозорі, тому обов'язкове повне осадження білків трихлороцтовою кислотою (ТХО) так само, як і попереднє видалення жовтих пігментів. З цією метою дослідні розчини обробляли перманганатом калію. Оскільки коефіцієнт молярної екстинкції флавінаденіндинуклеотида (ФАД) відрізняється від такого для флавінаденінмононуклеотида (ФМН) та рибофлавіну, проби витримували

протягом 12 годин у 10% ТХО для гідролізу ФАД до ФМН. Критерієм готовності розчину до спектрофотометричного визначення вмісту флавінів слугує інтенсивність поглинання світла при 450 нм.

Культуральний фільтрат у кількості 1 мл вносили у мірну пробірку на 5 мл, додавали рівний об'єм (1 см^3) 20% ТХО та інкубували у темноті при $+38^\circ\text{C}$ протягом 12 годин.

Через наявність заважаючих пігментів до трихлороцтового екстракту додавали по краплям насичений розчин перманганату калію до фіолетового забарвлення (1–2 краплі), що не зникає. Надлишок перманганату видаляли додаванням по краплям 3% перекису водню до повного зникнення фіолетового забарвлення, після цього пробу доводили 0,1 М фосфатним буфером до мітки 5 см^3 .

Визначення проводили спектрофотометрично при 450 нм в кюветі 1 см.

Вміст флавінів визначали за калібрувальним графіком, представленим на рис. 2.1, з урахуванням розведення дослідної проби.

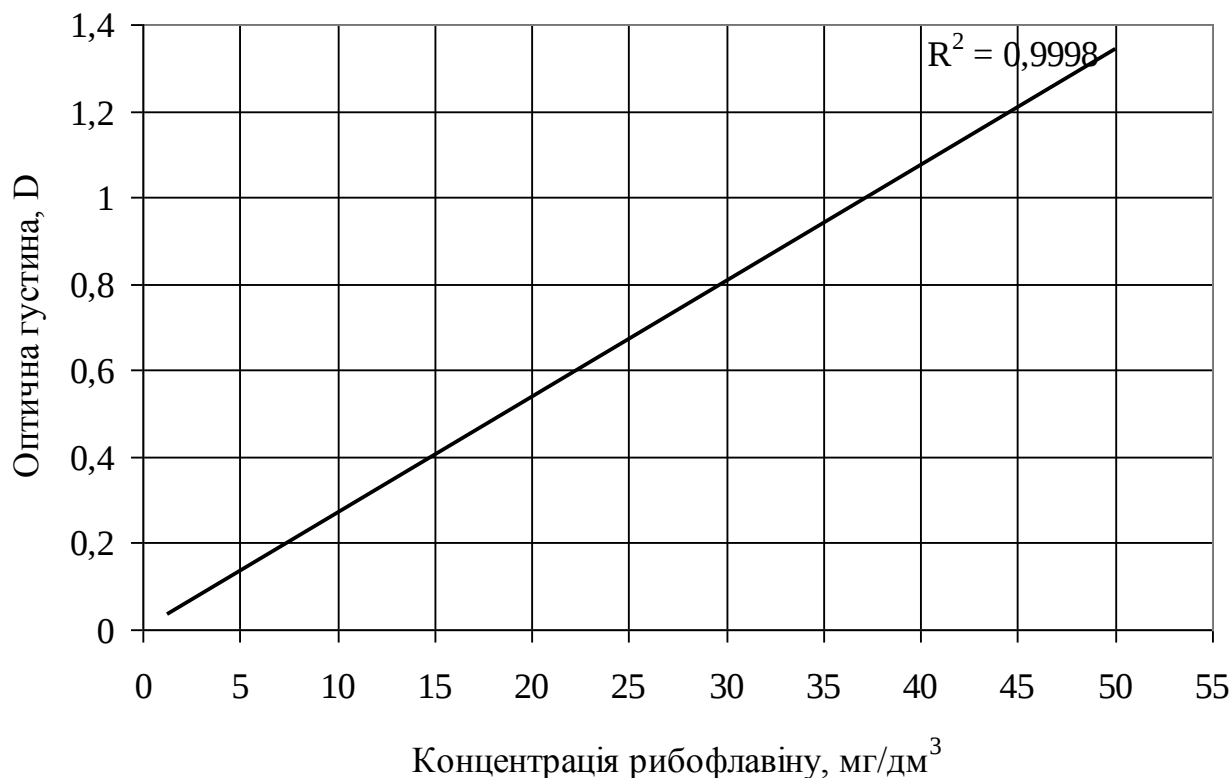


Рис. 2.1 Калібрувальний графік для визначення вмісту флавіну

Крім того, вміст загальних флавінів (в мкг/см³) розраховували за формулою

$$C = E b / 0,0325 a, \quad (2.1)$$

де E – екстинкція дослідного розчину при 450 нм; a – вихідний об'єм дослідного розчину, см³ (1 см³); b – кінцевий об'єм дослідного розчину, см³ (10 см³).

2.3.6. Визначення концентрації рибофлавіну у біомасі

Для визначення кількості внутрішньоклітинного рибофлавіну висушений міцелій разом з фільтрувальним папером подрібнювали на дрібні шматки та поміщали у колби з 0,02 н HCl, автоклавували при 121°C протягом 20 хвилин та центрифугували при 3000 об/хв. Вміст рибофлавіну визначали як описано вище [83].

2.3.7. Визначення вмісту ефірної олії

Виділення аромат утворюючих з'єднань з культуральної рідини здійснювали методом трьохкратної екстракції органічним розчинником гексаном у співвідношенні 3:1 з наступним його видаленням за допомогою роторного випарювача під вакуумом. Кількість ароматутворюючих з'єднань визначали зважуванням залишку на аналітичних вагах [9, 13, 142, 143].

2.4. Метод оптимізації складу поживного середовища

При трьох факторах функція відгуку $y = f(x_1, x_2, x_3)$ другого порядку описується рівнянням

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + b_{123} x_1 x_2 x_3 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2 \dots \quad (2.2)$$

Для знаходження математичної моделі було застосовано ортогональний центрально-композиційний план 2 порядку для 3 факторів [102–104, 154]. Матрицю планування експерименту наведено в табл. 2.1. До повного багатofакторного експерименту 2³ були додані «зоряні» точки, що

розташовуються на осях x_1 , x_2 та x_3 з координатами $(\pm\alpha; 0; 0)$, $(0; \pm\alpha; 0)$ та $(0; 0; \pm\alpha)$ та дослід у центрі плану.

Таблиця 2.1

Матриця планування центрального композиційного ортогонального плану для постановки експерименту

Досліди	Фактори		
	x_1	x_2	x_3
1	1	1	1
2	-1	1	1
3	1	-1	1
4	-1	-1	1
5	1	1	-1
6	-1	1	-1
7	1	-1	-1
8	-1	-1	-1
9	1,2154	0	0
10	-1,2154	0	0
11	0	1,2154	0
12	0	-1,2154	0
13	0	0	1,2154
14	0	0	-1,2154
15	0	0	0

План експерименту, що використовували в розрахунках наведено в табл. 2.2.

Оцінку значущості коефіцієнтів регресії проводили за коефіцієнтом Стюдента за формулою:

$$t_{bi} = \frac{|b_i|}{S_{bi}} \quad (2.3)$$

і умові $t_{bi} > t_m$

де $|b_i|$ - абсолютне значення i -го коефіцієнта регресії;

t_{bi} - розраховане значення критерію Стюдента для кожного коефіцієнту регресії;

t_m - табличне значення критерію Стюдента, при рівні значущості 5% та числу ступенів свободи $f_0 = n_0 - 1$;

S_{bi} – середньоквадратичне відхилення коефіцієнтів рівняння регресії.

Адекватність отриманого рівняння регресії перевіряли за критерієм Фішера як відношення дисперсії адекватності і дисперсії відтворюваності:

$$F = \frac{S_{ад}^2}{S_{відтв}^2} \quad (2.4)$$

і порівнювали з табличним F_T для ступенів свободи f_1 дисперсії адекватності та ступенів свободи f_2 дисперсії відтворюваності. При $F < F_T$ рівняння регресії адекватно описує експериментальні дані [105].

Таблиця 2.2

Матриця центрального композиційного ортогонального плану для розрахунку проведених експериментів

Дослід	Фактори										Результат
	x_1	x_2	x_3	$x_1 \cdot x_2$	$x_1 \cdot x_3$	$x_2 \cdot x_3$	$x_1 \cdot x_2 \cdot x_3$	$x_1' = x_{11} - d$	$x_2' = x_{22} - d$	$x_3' = x_{33} - d$	
1	1	1	1	1	1	1	1	0,2697	0,2697	0,2697	
2	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0,2697	0,2697	0,2697	
3	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0,2697	0,2697	0,2697	
4	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,2697	0,2697	0,2697	
5	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,2697	0,2697	0,2697	
6	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0,2697	0,2697	0,2697	
7	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0,2697	0,2697	0,2697	
8	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,2697	0,2697	0,2697	
9	1,2154	0	0	0	0	0	0	0,74689716	-0,7303	-0,7303	
10	-1,2154	0	0	0	0	0	0	0,74689716	-0,7303	-0,7303	
11	0	1,2154	0	0	0	0	0	-0,7303	0,74689716	-0,7303	
12	0	-1,2154	0	0	0	0	0	-0,7303	0,74689716	-0,7303	
13	0	0	1,2154	0	0	0	0	-0,7303	-0,7303	0,74689716	
14	0	0	-1,2154	0	0	0	0	-0,7303	-0,7303	0,74689716	
15	0	0	0	0	0	0	0	-0,7303	-0,7303	-0,7303	

2.5. Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку проводили з застосуванням t-критерію Ст'юдента на 0,05 рівні значущості [154, 155]. Отримані значення t-критерію оцінювалися за таблицями значень величини t-критерію для малих вибірок при k ступенях свободи, тобто встановлювали рівень достовірності виявлених розбіжностей.

Розраховували наступні показники:

- середнє арифметичне вибірки,

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (2.5)$$

- стандартне відхилення окремого визначення у виборці,

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.6)$$

Стандартне відхилення – це оцінка можливого ступеня відхилення отриманих експериментальних даних від справжнього значення, воно обумовлене наявністю випадкової похибки.

- довірчий інтервал, у якому з довірчою ймовірністю (надійністю) 95% міститься справжнє значення досліджуваної величини:

$$\bar{x} + \Delta x > X > \bar{x} - \Delta x \quad (2.7)$$

$$\Delta x = t_{\alpha,k} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (2.8)$$

де σ – стандартне відхилення, n – об'єм вибірки, $t_{\alpha,k}$ - табличне значення критерію Ст'юдента при рівні значущості $\alpha = 0,05$, та $k = n-1$ ступенях свободи.

Для оцінки достовірності розбіжностей розраховували t-критерій Ст'юдента за формулою:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (2.9)$$

Встановлювали число ступенів свободи $k=n_1+n_2-2$ та довірчий інтервал, у якому з надійністю 95% знаходиться середнє значення величини. Два середні

достовірно відрізняються, якщо значення t більше табличного значення коефіцієнта Стюдента при k ступенях свободи і довірчій ймовірності 95%.

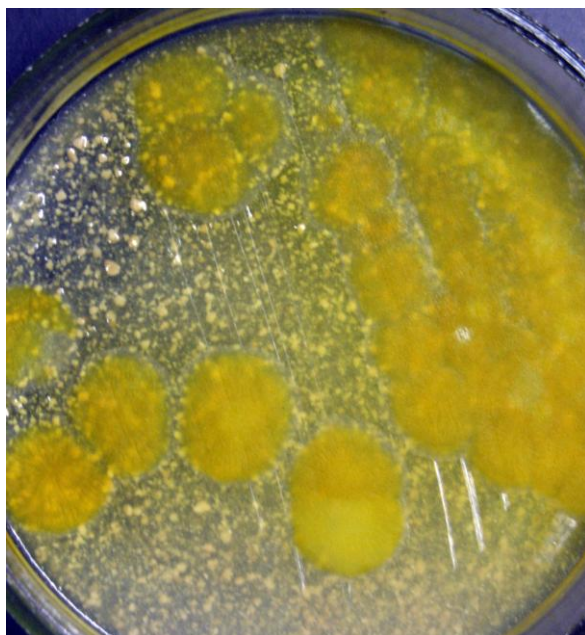
Кінцеві результати вимірювань подавали у вигляді $\bar{x} \pm \Delta x$.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2007 [155].

РОЗДІЛ 3 БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *EREMOTHECIUM ASHBYI*

3.1 Морфолого-культуральні властивості *Eremothecium ashbyi* F-340

Макроморфологія. На агаризованих середовищах КДА, ГПД та сусло-агарі *E.ashbyi* F-340 утворював пласкі, матові (пізніше глянцеві) колонії яскраво жовтого кольору, на соєвому середовищі жовтогарячі, які легко (як плівка) знімалися з агару (рис. 3.1).



а)



б)



в)



г)

Рис. 3.1 Колонії *E.ashbyi* F-340 на різних середовищах:

а) соєве середовище; б) сусло-агар; в, г) ГПД

Після тривалого зберігання на агаризованих середовищах колонії штаму *E. ashbyi* F-340 знімалися з середовища у вигляді легкого нальоту.

Форма колоній *E. ashbyi* F-340 округла діаметром 8-16 мм, поверхня великих колоній радіально покреслена, край колоній бахромчастий. Починаючи з 3 дня культивування спостерігалось забарвлення субстрату у яскраво жовтий колір. На 5 добу культивування ставало забарвленим все середовище у чашці Петрі [156].

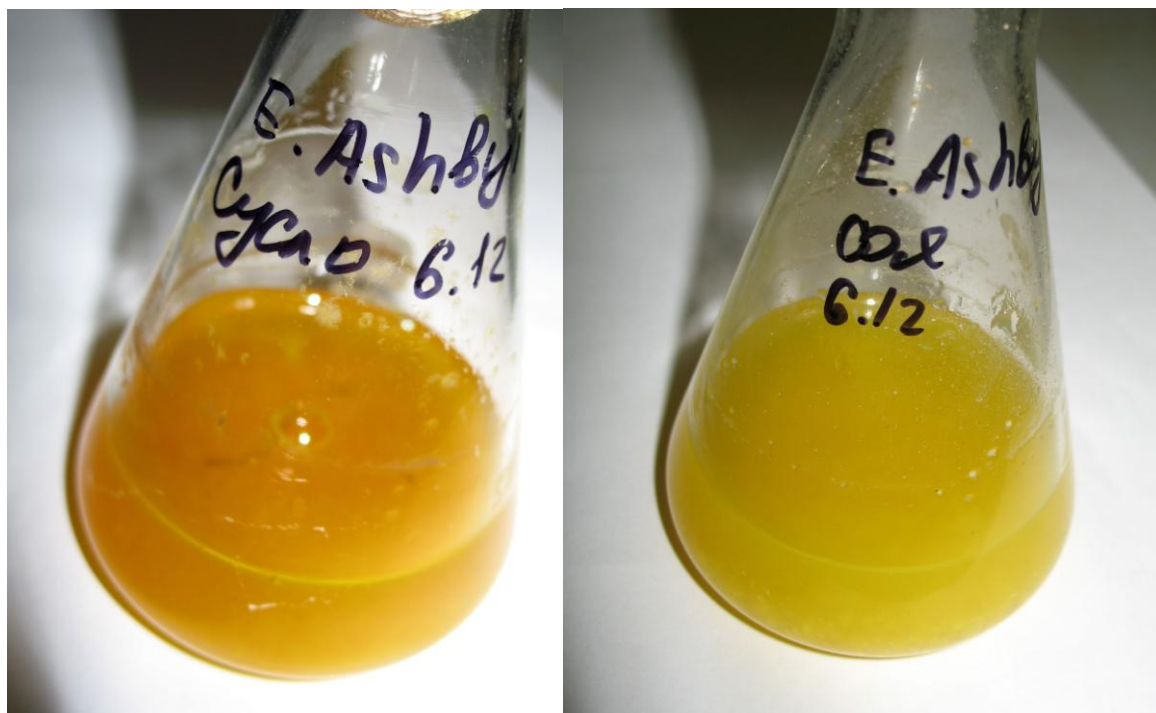
Необхідно відмітити, що популяція штаму *E. ashbyi* F-340 є гетерогенною за деякими характеристиками окремих колоній (діаметром, пігментацією). Іноді на чашках Петрі з'являлися колонії білого кольору, забарвлення субстрату навколо цих колоній не відбувалося. Найчастіше (до 30 % колоній білого кольору) це траплялося при відновленні музейної культури і майже не траплялося при регулярних пересівах культури та чергуванні рідких та агаризованих поживних середовищ. Це збігається з літературними даними [157, 158] про нестабільність даної культури при зберіганні.

На підтвердження літературних даних [157], проведеними дослідженнями показано, що штам *E. ashbyi* можна зберігати в активному стані тривалий час, шляхом систематичного розсіву на тверді поживні середовища та відбору найбільш інтенсивно забарвлених в жовто-гарячий колір колоній. Пігментовані, помаранчеві колонії володіли найбільшою здатністю до біосинтезу рибофлавіну.

Лише на середовищі Чапека-Докса спостерігався дуже незначний ріст колоній, які не мали жовтого забарвлення, середовище також не забарвлювалось. Колонії мали ниткоподібну форму та незначний діаметр – 2-3 мм [156].

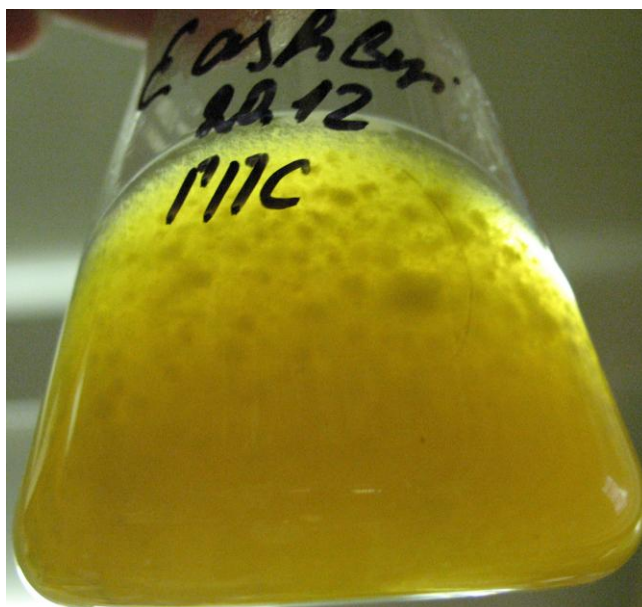
При дослідженні росту на рідких поживних середовищах встановлено, що культура на всіх середовищах росте у вигляді ниткоподібних структур у товщі поживного середовища, при цьому культуральна рідина залишається прозорою та забарвлюється у жовтий колір, інтенсивність якого залежить від кількості

синтезованого вітаміну B₂ (рис. 3.2). Інтенсивна жовто-зелена флюорисценція в ультрафіолетовому світлі свідчить про накопичення рибофлавіну.



а)

б)



в)

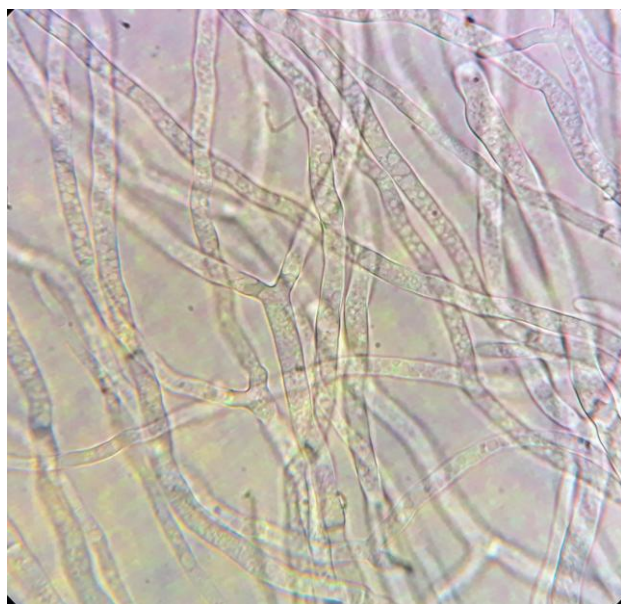
Рис. 3.2 Культура *E. ashbyi* F-340 на рідкому поживному середовищі:

а) сусло-агар; б) соєве середовище; в) ГПД

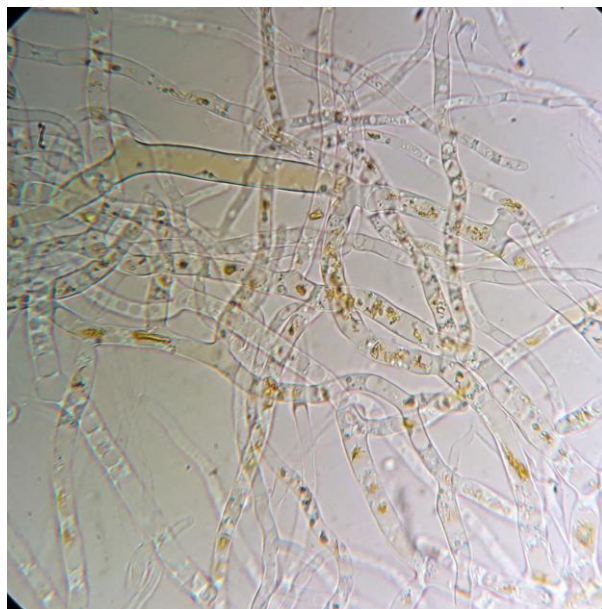
Слід зауважити, що під час культивування на агаризованих середовищах та при глибинному культивуванні культуральна рідина мала інтенсивний стійкий приємний запах, що нагадував запах ефірної олії троянди, за рахунок

виділення ефірних олій, що збігається з літературними даними [135, 150, 159].

Мікроморфологія. Морфологічні дослідження штаму *E. ashbyi* F-340 на різних поживних середовищах виявили його відмінні ознаки (рис. 3.3). *E. ashbyi* має дихотомічний розгалужений міцелій, який складається з багатоядерних клітин (рис. 3.3).



а)



б)



в)



г)

Рис. 3.3 Мікроморфологічні особливості міцелію *E.ashbyi*:

- а) дихотомічне розгалуження гіф; б) потовщення та вакуолізація гіф;
в) внутрішньоклітинні включення: кристали рибофлавіну; г) латерально розташовані на гіфі конідії; x1000

Вегетативне розмноження відбувається за рахунок відділення та подальшого розростання та дихотомічного розгалуження фрагментів міцелію (рис. 3.3 а). Нестатеве розмноження відбувається за рахунок термінального та латерального формування на міцелії конідій, що мають продовгувату форму, що співпадає з дослідженнями інших авторів [61]

На середовищі Городкової, суслі та ГПД майже половина міцелію має яскраво жовте забарвлення. Колір міцелію обумовлений присутністю рибофлавіну, який накопичується в такій кількості, що випадає у вигляді кристалів в вакуолях (рис. 3.3 в). На міцелії інтеркалярно (вставочно по ходу гіфи) утворюються подовжені спорангії.

Міцелій на середовищі Чапека-Докса не забарвлений, представлений вегетативними гіфами та не утворює потовщень та не має спорангіїв. Міцелій на глюкозо-пептонному середовищі особливо відрізняється своєю підвищеною вакуолізацією (рис. 3.4). Подібне явище описане в [160].

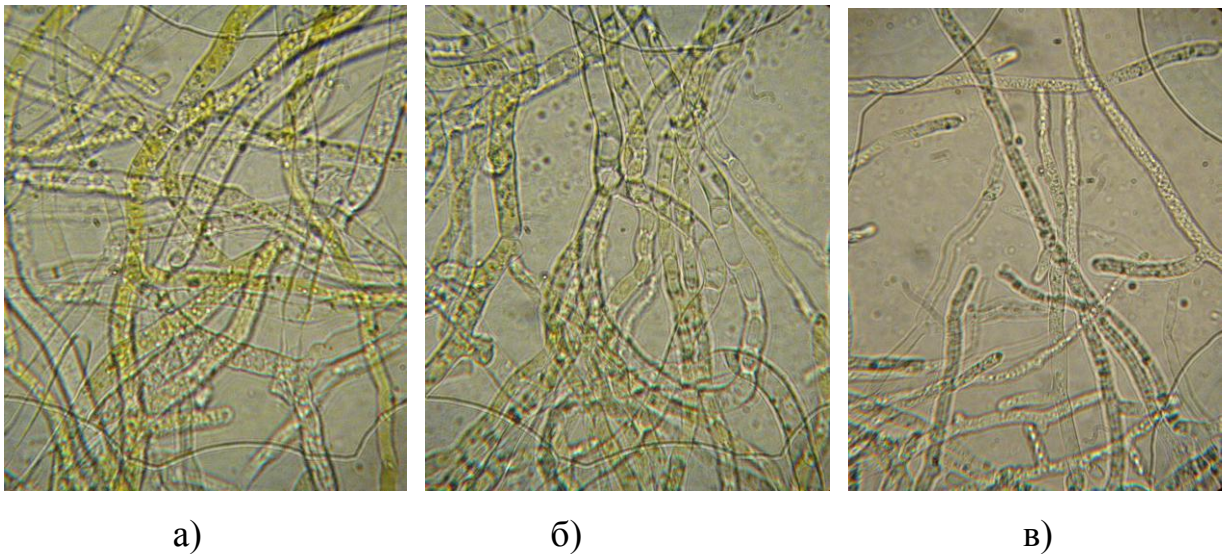


Рис. 3.4 Морфологічні особливості міцелію *E.ashbyi* F-340 на різних середовищах культивування (7 доба): а) середовище Городкової; б) ГПД; в) середовище Чапека-Докса; x1000 [156]

3.2 Вплив температури на життєздатність міцелію *Eremothecium ashbyi* F-340

Під час зберігання та культивування штаму-продуценту температура є одним з найважливіших факторів, від яких залежить біосинтетична здатність культури. Верхня і нижня граничні температури інкубації для культур грибів – це температури, при яких ріст міцелію не спостерігався, але зберігалась його життєздатність і при перенесенні міцелію в більш сприятливі температурні умови його ріст відновлювався.

При дослідженні росту та життєздатності штаму *E. ashbyi* при температурах 4°C, 20°C, 28°C (контроль), 37°C, 45°C на агаризованому ГПД показано відсутність росту культури при температурі 4°C і нижче та при 39°C і вище (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Життєздатність міцелію при різних температурах інкубації [161]

Температура інкубації, °C	Наявність росту на 3 добу	Відновлення росту при 28°C
4	—	+++
15	—	+++
20	+	+++
28	++	+++
35	++	+++
36	++	+++
37	+	+++
38	+	++
39	—	—
45	—	—

Примітка:

— відсутність росту;

+ незначний ріст, колонії дрібні білого кольору;

++ гарний ріст, колонії блідо жовті, незначна пігментація середовища у жовтий колір навколо колоній;

+++ інтенсивний ріст, колонії яскраво жовтого кольору, середовище забарвлене у жовтий колір.

При 28°C на 3 добу інкубації спостерігався ріст культури – з'являлися жовті колонії округлої форми, незначне забарвлення субстрату у жовтий колір. При 20, 36 та 37°C на 3 добу інкубації спостерігалися дрібні білі колонії у вигляді незначного нальоту. Для дослідних зразків, що інкубувалися при 4°C спостерігається відновлення життєдіяльності культури при перенесенні міцелію в сприятливі умови (підвищення температури інкубації до 28°C). А от для дослідних зразків, що інкубувалися при 39°C відновлення життєдіяльності не відбувалося.

Отже, значення нижньої граничної температури для *E. ashbyi* становить 4°C. Верхня гранична температура дорівнювала 38°C. Треба відзначити, що при цій температурі ще спостерігався незначний ріст гриба, а вже при 39°C ріст міцелію не спостерігався та відновлення росту не відбувалося.

Відомо, що відсутність росту при високих температурах може бути зумовлена руйнуванням діяльності ферментів, зниженням коефіцієнту дихання, посиленням гідролітичних процесів у клітинах, отруєнням протоплазми шкідливими продуктами розпаду, зокрема аміаком [162].

При дослідженні впливу температур на посівний матеріал *E. ashbyi*, отриманий глибинним способом, встановлено, що культура не витримувала заморожування при -20°C з наступним розморожуванням та тривале нагрівання до 45°C (табл. 3.2). Експериментальні данні, отримані при 28, 35 та 37°C повністю співпадали з попереднім дослідом.

Цікаво було дослідити, як вплинуть на виживаємість посівного матеріалу температури, які знаходяться вище верхньої граничної температури росту. Встановлено, що при нагріванні посівного матеріалу до 39°C та витримуванні за цієї температури протягом 1–6 годин та при нагріванні до 45 °C протягом 1–3 годин та наступному посіві на агаризоване ГПД життєдіяльність культури зберігалася. При більш тривалому витримуванні культури при високих температурах життєдіяльність культури зменшувалась, а при витримуванні протягом 24 годин культура повністю втрачала життєдіяльність [161].

Таблиця 3.2

Вживаємість культури *E. ashbyi* після витримування посівного матеріалу при різних температурах [161]

Температура прогрівання, °C	Час витримування, год.	Наявність росту на 3 добу	Наявність росту на 6 добу
-20	24	—	—
28 (контроль)	24	++	+++
35	24	++	+++
37	24	+	+++
39	1	++	+++
	3	+	+++
	4	+	++
	6	+	++
	24	—	—
45	1	++	+++
	3	+	+++
	4	—	+
	6	—	+
	24	—	—

Примітка:

- відсутність росту;
- + незначний ріст, колонії дрібні білого кольору;
- ++ гарний ріст, колонії блідо жовті;
- +++ інтенсивний ріст, колонії яскраво жовтого кольору, середовище забарвлене у жовтий колір.

3.3 Дослідження умов зберігання штаму *Eremothecium ashbyi* F-340

Збереження мікроорганізмів без втрати їх цінних властивостей має дуже велике значення для регулярного постачання промисловості активними культурами. Найбільш поширеним способом підтримки активності мікроорганізмів є періодичні пересівання на свіже поживне середовище. Однак пересівання великої кількості штамів вимагає багато посуду та часу. Крім того, при частих пересівах підвищується можливість зараження поживного середовища сторонніми видами мікроорганізмів, а також змінення деяких

фізіологічних властивостей продуцентів. У зв'язку з цим розроблені спеціальні методи тривалого зберігання мікроорганізмів, наприклад, під шаром вазелінової олії.

Практичне втілення біотехнології отримання рибофлавіну потребує розширення фундаментальних знань про біологічні властивості продуцента. Збереження штаму *Eremothecium ashbyi* F-340 є вагомим фізіологічним характеристикою культури, яка має велике значення для реалізації процесу культивування.

Наступним етапом дослідження було встановлення впливу температури на збереження культури *E. ashbyi* в активному стані, який оцінювали за рівнем накопичення рибофлавіну та біомаси при пересіві з середовищ, на яких зберігалася культура, на рідке глюкозо-пептонно-дріжджове середовище (ГПД).

Eremothecium ashbyi F-340 зберігали протягом 7 місяців на рідкому та агаризованому ГПД та агаризованому соєвому середовищі при кімнатній температурі та у холодильнику при 5°C. Також культура зберігалась на ГПД під шаром вазелінового масла.

З попередніх досліджень відомо, що культура *E.ashbyi*, при регулярних пересівах, здатна накопичувати до 40-45 мг/дм³ рибофлавіну та 1,6 г/дм³ біомаси [156]. Встановлено, що найкращими умовами для короткотривалого збереження штаму в активному стані було зберігання його під шаром вазелінового масла, як при кімнатній температурі, так і у холодильнику. За цих умов рівень накопичення рибофлавіну залишався майже стабільним. Також спостерігалось значне накопичення біомаси. Отримані результати представлені на рис. 3.5. Рівень накопичення рибофлавіну у цих варіантах становив $42,2 \pm 2,0$ та $45,42 \pm 2,3$ мг/дм³ відповідно. За рівнем накопичення біомаси також високі показники були при зберіганні культури під вазеліновим маслом: $3,74 \pm 0,14$ та $3,28 \pm 0,13$ г/дм³. Проте короткотривале зберігання під шаром масла є недоцільним, тому найкращим варіантом є зберігання на агаризованому ГПД у холодильнику.

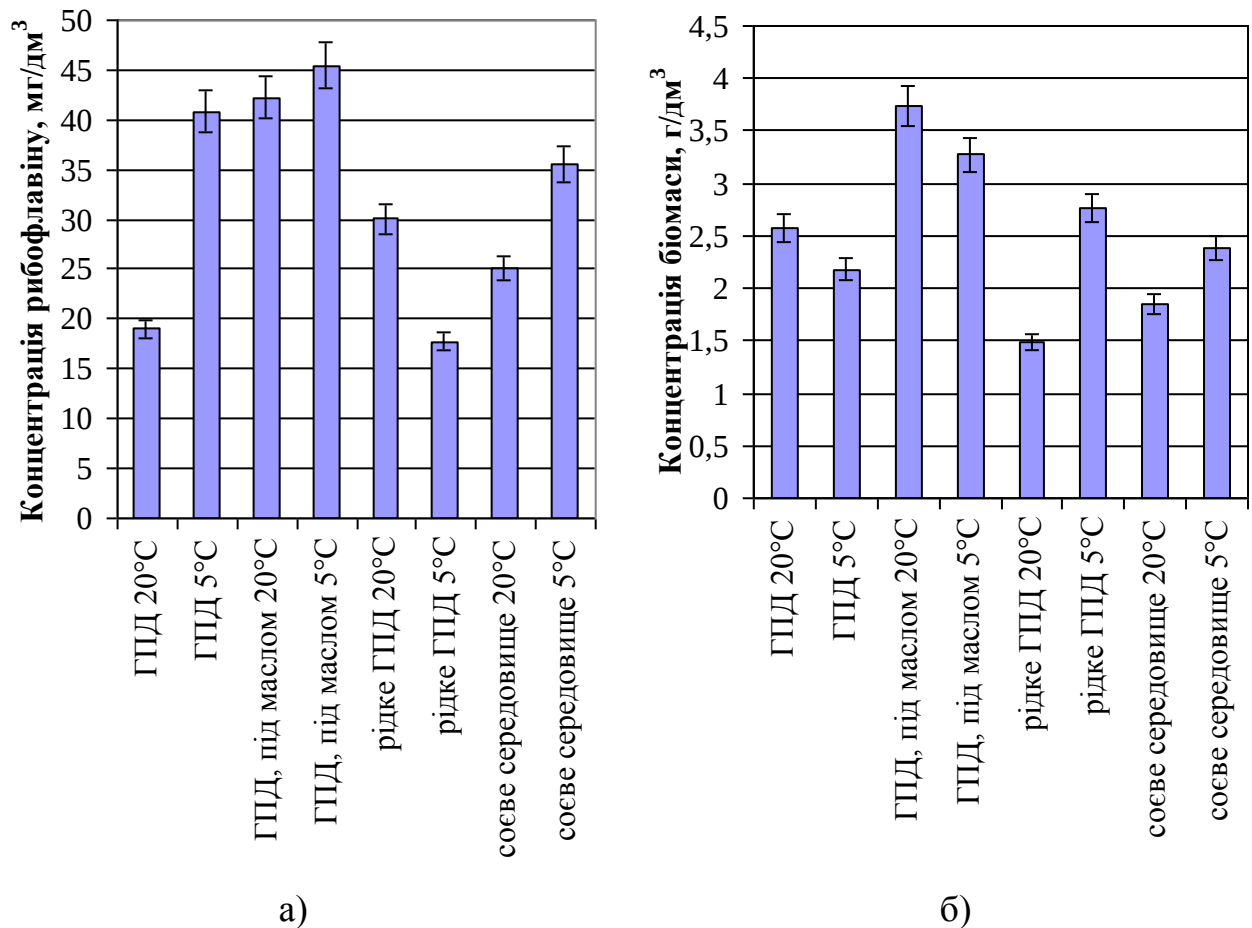


Рис. 3.5 Накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E.ashbyi* F-340, що зберігався протягом місяця за різних умов (1-ий пересів) ($p < 0,05$)

Рівень накопичення рибофлавіну на агаризованих середовищах (ГПД та соєвому) вищий при зберіганні культури при 5°C, а от при 20°C краще накопичення рибофлавіну відбувається при зберіганні культури на рідкому поживному середовищі.

Цікаво було встановити, чи буде спостерігатися така сама тенденція при наступному (другому) пересіві культури. У колби з рідким ГПД було внесено 5% посівного матеріалу, яким слугувала культура першого пасажу. Отримані результати значно відрізнялися від попередніх. Рівень накопичення рибофлавіну практично вирівнявся і становив від 11 до 18 мг/дм³, що на 58–74% нижче звичайного рівня. Проте значно зріс рівень накопичення біомаси, в середньому на 20–30% (рис. 3.6).

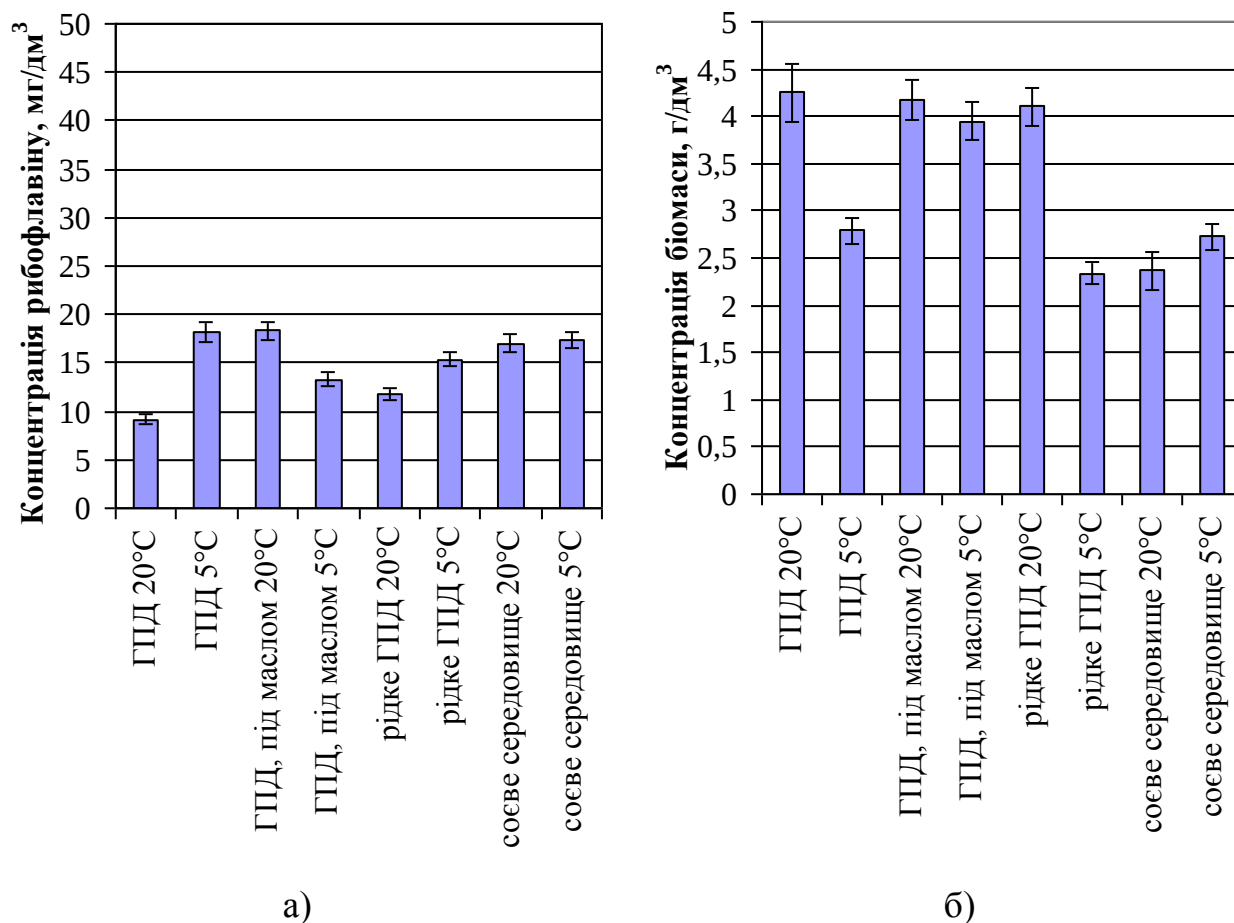


Рис. 3.6 Накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340, що зберігався протягом місяця за різних умов (2-ий пересів) ($p < 0,05$)

Зниження кількості рибофлавіну при збільшенні кількості біомаси можна пояснити тісним зв'язком біосинтезу флавінів з обміном пуринів [163]. Активізація ростових процесів, пов'язаних з підсиленням синтезу нуклеїнових кислот призводить до послаблення флавіногенезу. Можливо, для стабільного рівня накопичення рибофлавіну не вистачило проміжного етапу вирощування культури *E. ashbyi* на агаризованому поживному середовищі, як це описано у [157].

Після 3-ох місяців зберігання найкращі результати за синтезом рибофлавіну та біомаси були виявлені для варіантів, які зберігалися на агаризованому ГПД під шаром олії – $38 \pm 1,9$ мг/дм³ та $1,8 \pm 0,09$ г/дм³, відповідно та на агаризованому ГПД – $35,9 \pm 1,8$ мг/дм³ та $2,23 \pm 0,11$ г/дм³, відповідно при кімнатній температурі (рис. 3.7).

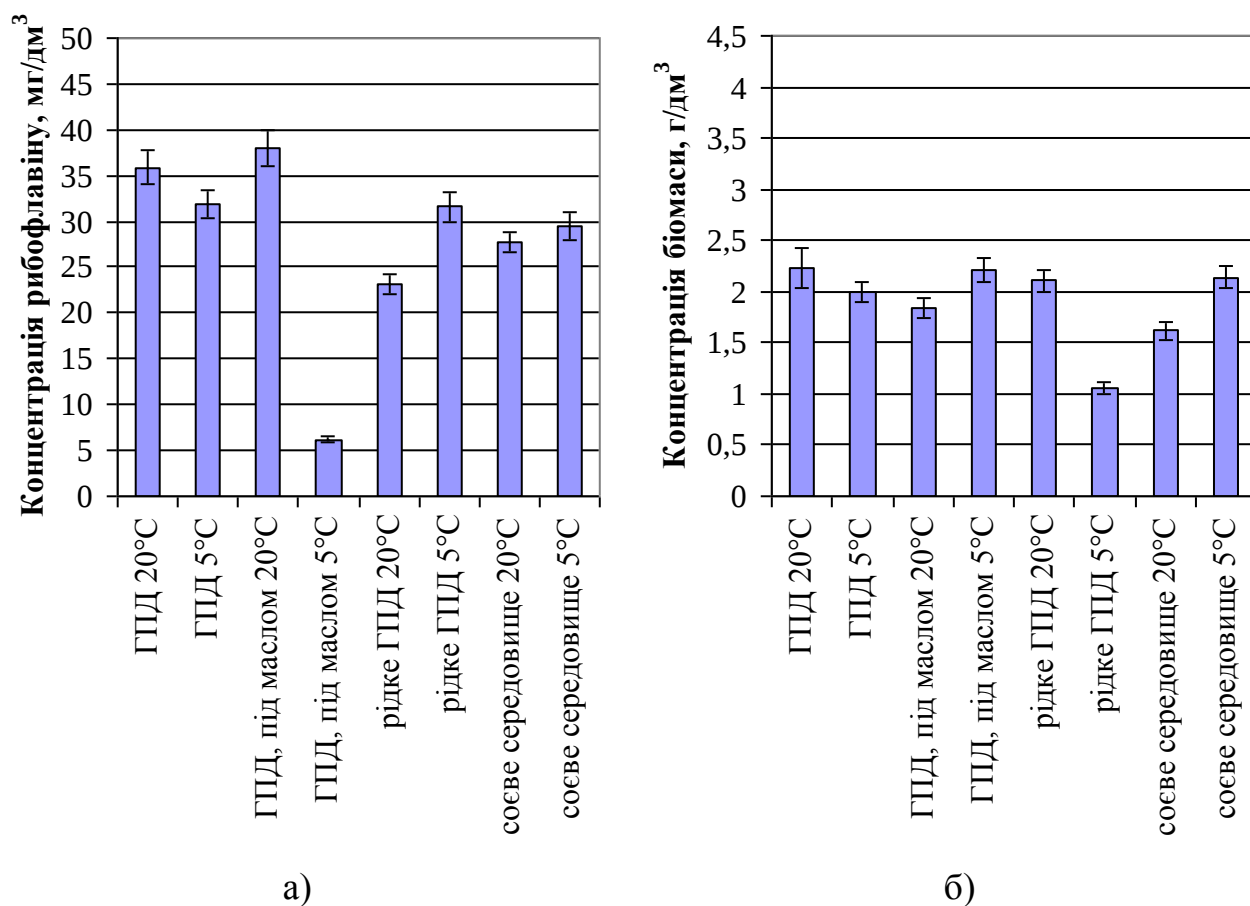


Рис. 3.7 Накопичення рибофлавіну (а) та накопичення біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340, що зберігався протягом 3-ох місяців за різних умов ($p < 0,05$)

При зберіганні штаму протягом 7-ми місяців встановлено, що усі варіанти, які зберігалися за температури 5°C, втратили життєздатність; здійснити посіви з цих пробірок не вдалося, ріст культури був відсутній. Тоді як для варіантів, що зберігалися за кімнатної температури, найкращі результати показані на агаризованому ГПД під шаром олії та на агаризованому ГПД. Наявний синтез рибофлавіну на рівні $30,9 \pm 1,23$ та $30,77 \pm 1,1$ мг/дм³ й накопичення біомаси на рівні $2,38 \pm 0,07$ та $2,1 \pm 0,06$ г/дм³ відповідно (рис. 3.8).

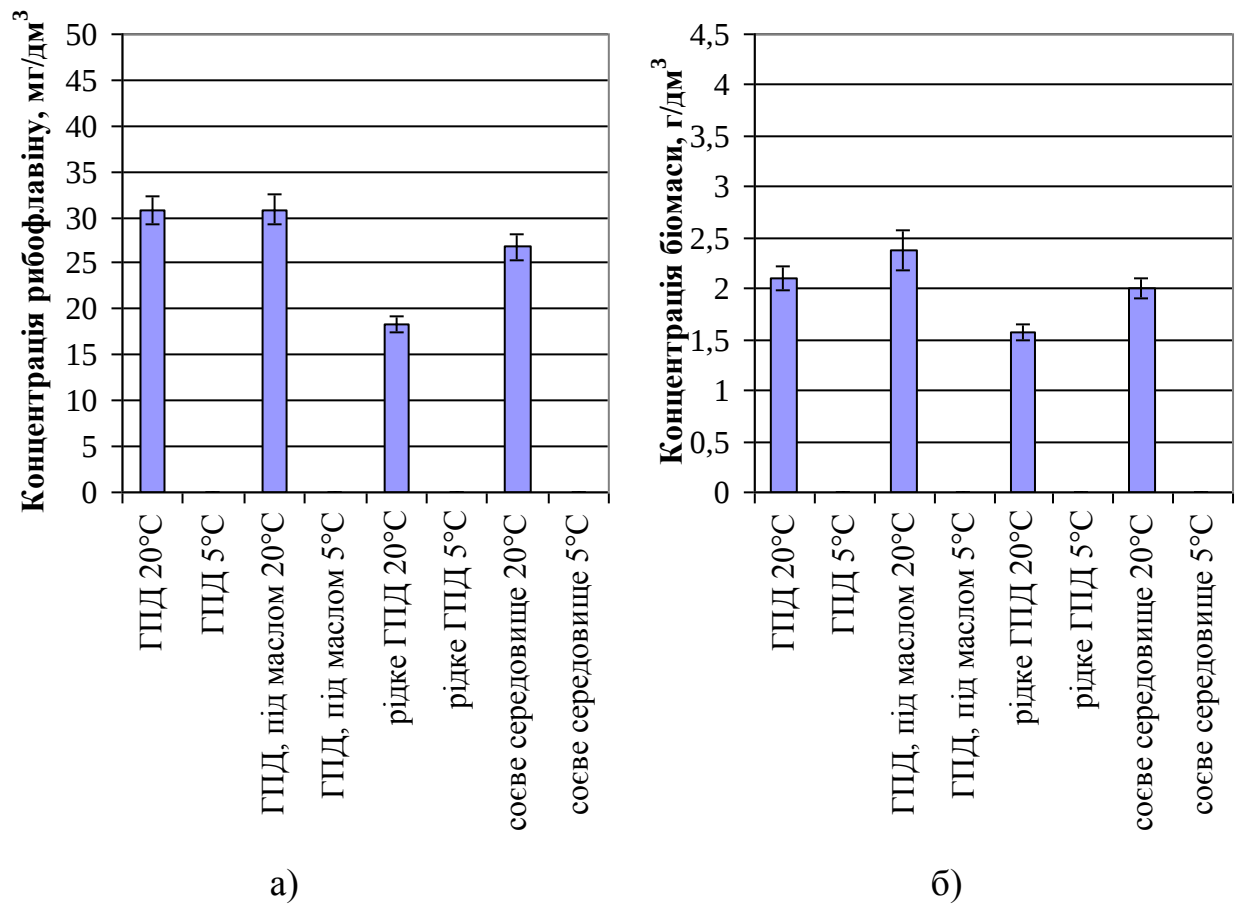


Рис. 3.8 Накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340, що зберігався протягом 7-ми місяців за різних умов (1-ий пересів) ($p < 0,05$)

При другому пересіві культури після 7-ми місяців зберігання отримані результати співпадали з попередніми. Рівень накопичення рибофлавіну культурою, що зберігалася на агаризованому ГПД збільшився до 37,15 мг/дм³, що на 17% вище, ніж при 1-му пересіві, а рівень накопичення біомаси майже не змінився (рис. 3.9).

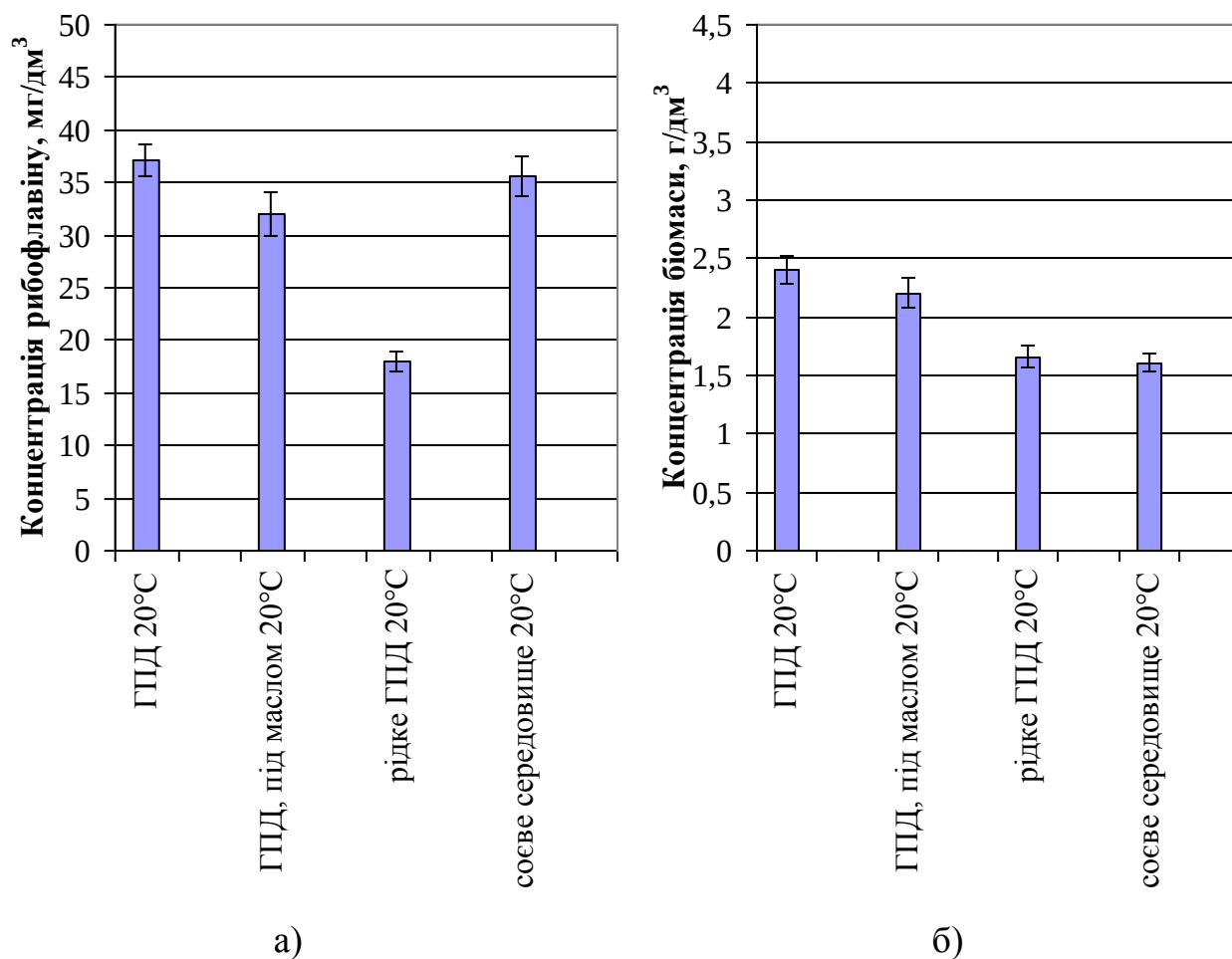


Рис. 3.9 Накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340, що зберігався протягом 7-ми місяців за різних умов (2-ий пересів) ($p < 0,05$)

Таким чином, встановлено, що короткотривале зберігання *Eremothecium ashbyi* F-340 у активному стані можливе на агаризованих ГПД та соєвому середовищах та на ГПД під шаром вазелінової олії за температури зберігання 5°C. Для довготривалого зберігання культури *Eremothecium ashbyi* рекомендоване зберігання лише за кімнатної температури. В якості поживного середовища найкраще підходить агаризоване глюкозо-пептонно-дріжджове середовище. Показана можливість зберігання життєздатного міцелію протягом 7 місяців на рідкому ГПД.

3.4 Динаміка росту та накопичення метаболітів аскоміцетом *Eremothecium ashbyi*

Однією з найважливіших характеристик культури є динаміка накопичення біомаси та певних цільових метаболітів. Для культури *E.ashbyi* це динаміка накопичення рибофлавіну у культуральній рідині та міцелії. Фото міцелію представлено на рис. 3.10.

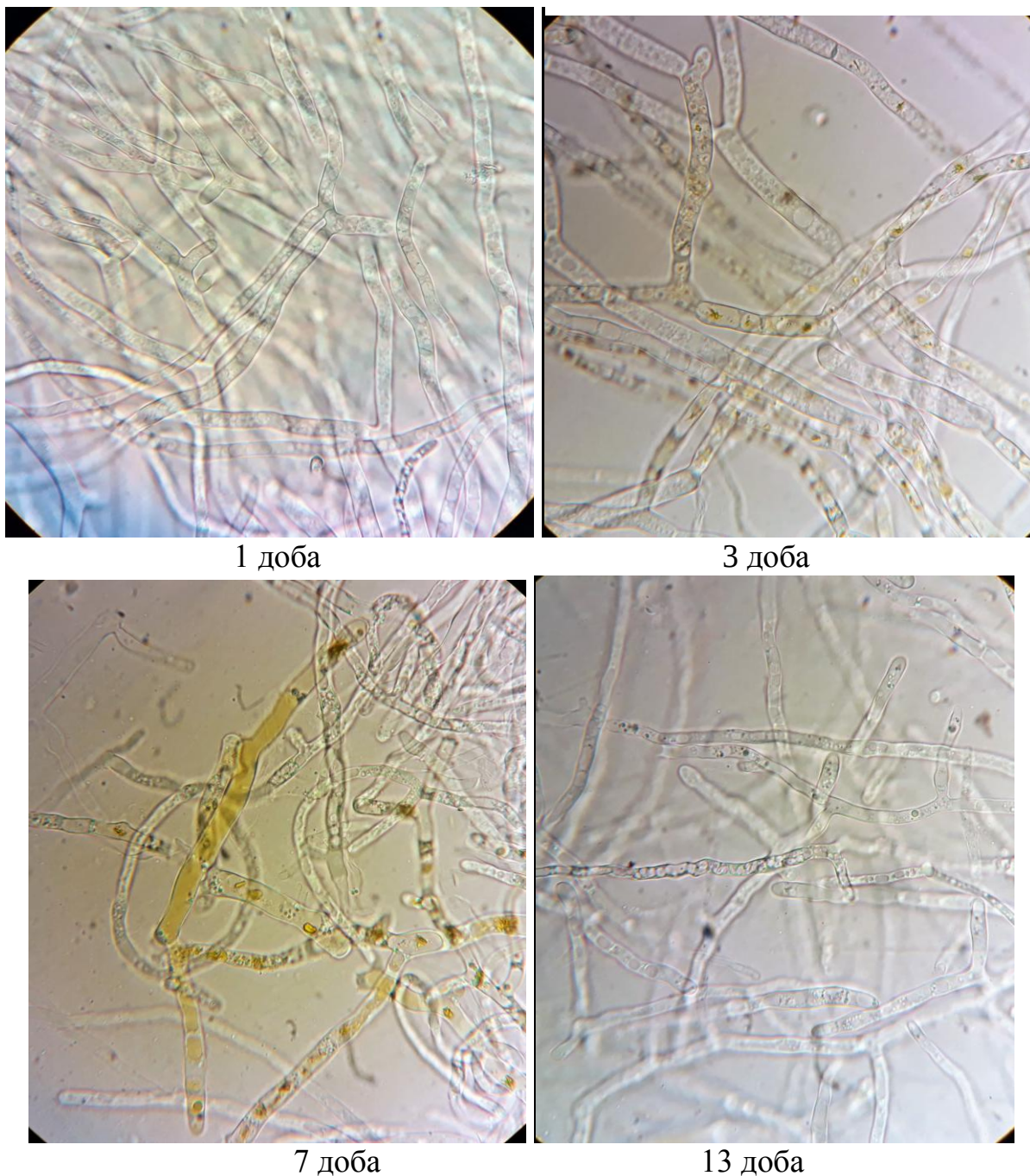


Рис. 3.10 Накопичення рибофлавіну в міцелії *E. ashbyi*, x1000

На 1 добу культивування на рідкому ГПД середовищі у міцелії накопичення рибофлавіну ще не було помітно, починаючи з 2 доби міцелій набував жовтого забарвлення, особливо інтенсивно забарвленим він був на 5-7 добу культивування. У цей час рибофлавін у міцелії містився як у розчинному стані, такі у вигляді кристалів. Починаючи з 8 доби кількість рибофлавіну у гіфах зменшувалась і на 13 добу культивування жовте забарвлення міцелію майже не спостерігалось, внаслідок переходу рибофлавіну в культуральну рідину.

Динаміка накопичення біомаси культурою *E. ashbyi* при культивуванні в рідкому поживному середовищі (рис. 3.11) підкорялася відомим закономірностям для періодичних культур.

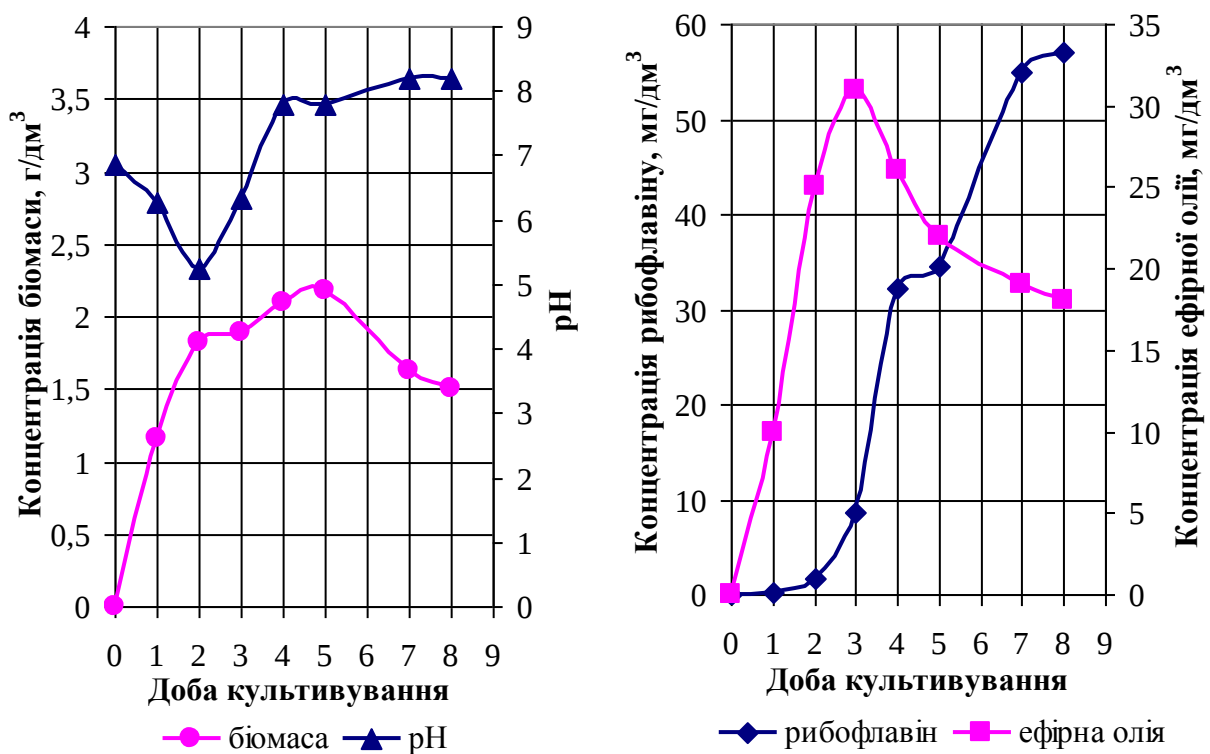


Рис. 3.11 Динаміка росту, накопичення рибофлавіну та ефірної олії штамом *E.ashbyi* F-340 та зміна pH культуральної рідини в процесі культивування [164]

Штам розвивався експоненціально (логарифмічна фаза росту) до 2 доби та досягав 1,8 г сухої біомаси на 1 дм³ культуральної рідини, протягом наступної доби спостерігалось уповільнення швидкості росту, яке характерне

для переходу до стаціонарної фази росту. Максимальне накопичення біомаси становило 2,19 г на 1 дм³ культуральної рідини, після 5 доби культивування починалась фаза відмирання – початок автолізу культури.

У період інтенсивного росту спостерігалось закислення культуральної рідини з початкового рН 6,86 до рН 5,2. Під час переходу у стаціонарну фазу росту та під час цієї фази рН збільшувалось до 7,8. У фазі автолізу рН досягло значення 8,1.

Синтез рибофлавіну починався у фазі стаціонарного росту з 2 доби культивування та кількість вітаміну інтенсивно збільшувалась до 32-34 мг/дм³. Це накопичення рибофлавіну корелює зі збільшенням рН культуральної рідини.

Накопичення рибофлавіну припинилося з зупинкою зміни рН. На 4–5 добу культивування збільшення кількості рибофлавіну майже не спостерігалось. Подальше накопичення рибофлавіну у культуральній рідині пов'язане з синтезом рибофлавіну та переходом культури у фазу автолізу. Кількість рибофлавіну у культуральній рідині збільшувалась на 36 % і досягала 55±2,75 мг/дм³. Отримані дані підтверджуються даними інших авторів [56, 150]. Максимальна кількість ефірної олії накопичувалась на 3 добу культивування в експоненціальній фазі росту та становила 31±2 мг/дм³.

При дослідженні динаміки накопичення рибофлавіну важливим є не тільки кількість рибофлавіну, що знаходилась у культуральній рідині, а й та кількість рибофлавіну, що залишалась у клітинах міцелію продуценту. Результати дослідження приведені на рисунку 3.12.

У експоненціальній фазі росту рибофлавін починав накопичуватися у клітинах міцелію і протягом перших двох діб майже не виділявся у культуральну рідину. Рівень накопичення рибофлавіну становив 6,3±0,25–8,1±0,32 мг/г сухої біомаси. Надалі рівень рибофлавіну у міцелії збільшувався до 10,4±0,41-10,7 ±0,42 мг/г сухої біомаси і залишався на такому рівні протягом 4 та 5 доби культивування, після чого рівень рибофлавіну у міцелії починав знижуватись (у фазі відмирання).

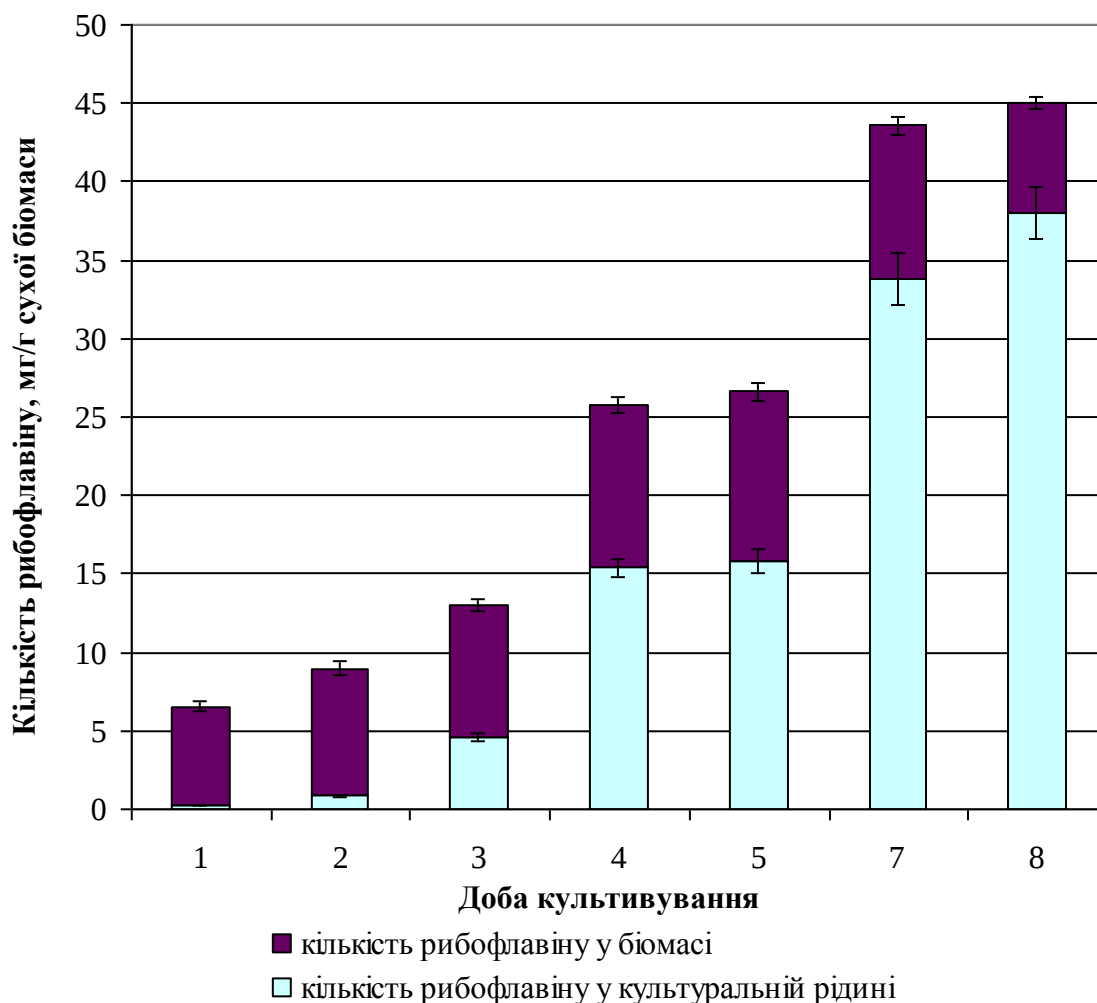


Рис. 3.12 Динаміка накопичення рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 у культуральній рідині та у біомасі ($p < 0,05$)

Динаміка накопичення рибофлавіну у культуральній рідині у перерахунку на висушену біомасу не відрізнялася від даних, наведених на рисунку 3.10. У стаціонарній фазі рівень накопичення рибофлавіну становив $15,4 \pm 0,61$ – $15,8 \pm 0,63$ мг/г сухої біомаси. На 7 добу культивування, коли культура знаходилась у фазі автолізу, кількість рибофлавіну збільшилась на 53 % і становила $33,8 \pm 1,69$ мг/г сухої біомаси.

Сумарний рівень накопичення рибофлавіну одночасно у культуральній рідині та у міцелії у стаціонарній фазі росту становив $25,8 \pm 1,29$ – $26,6 \pm 1,33$ мг/г сухої біомаси, а у фазі відмирання на 39 % більше: $43,6 \pm 2,18$ мг/г сухої біомаси. Проте характерною особливістю вирощування штаму *E.ashbyi* F-340 є накопичення певного рівня рибофлавіну у міцелії культури, який залишається на незмінному рівні протягом усього процесу культивування [164].

Відомо, що продуцент рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* Guillerm. 1935 також здатен до синтезу ФАД у кількості до 30 % [96, 165]. Оскільки методика визначення рибофлавіну передбачала попередній гідроліз ФАД до ФМН за допомогою 10% ТХО, порівнявши результати визначення вмісту флавінів до гідролізу та після нього, можна встановити, чи відбувалося накопичення штамом-продуцентом ФАД. При культивуванні продуценту на ГПД середовищі у культуральній рідині після гідролізу визначалося флавінів на 15-18 % більше, ніж без гідролізу, що свідчить про синтез даним продуцентом ФАД.

Протягом останніх років гриби роду *Eremothecium* привернули до себе увагу як потенційні продуценти ефірної олії, яка за складом та ароматом нагадує ефірну олію троянди [9, 13, 61, 142, 145]. Оскільки культуральна рідина під час культивування мала інтенсивний трояндовий аромат, на 7 добу культивування було досліджено рівень накопичення ароматутворюючих компонентів ліпідної природи за допомогою трьохкратної екстракції гексаном. Їх рівень становив 20...30 мг/дм³.

Висновки до розділу 3

Експериментально доведена втрата життєдіяльності культурою *E. ashbyi* під час довготривалого зберігання за температури 5°C, рекомендовано зберігання за кімнатної температури.

Досліджуючи морфолого-культуральні властивості *Eremothecium ashbyi*, показана його здатність синтезувати рибофлавін, накопичувати його у вакуолях у вигляді кристалів та виділяти в середовище культивування. Динаміка росту відповідає відомим закономірностям для періодичних культур. Показано, що накопиченню рибофлавіну передують зниження рН середовища. Максимальний рівень рибофлавіну спостерігається у фазі відмирання. Найбільша кількість ефірної олії синтезується на 3 добу культивування. Розглянуті біологічні властивості *E. ashbyi* показали його перспективність, як продуценту рибофлавіну, та є передумовою для подальших досліджень з можливості одночасного виробництва двох цільових продуктів: рибофлавіну та ефірної олії.

Основні результати розділу опубліковані у працях [156, 161, 164].

РОЗДІЛ 4 ПІДТРИМКА ТА ПІДВИЩЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО СТАНУ КУЛЬТУРИ ПРОДУЦЕНТА

4.1 Вплив ультрафіолетового опромінення на біосинтез рибофлавіну та рівень накопичення біомаси штамом гриба *Eremothecium ashbyi*

За літературними даними відомо, що культура *Eremothecium ashbyi* є нестабільною при зберіганні [157].

Незважаючи на постійну підтримуючу селекцію при культивуванні штаму у лабораторних умовах протягом 3 років досліджень спостерігалось поступове значне зниження рівня накопичення рибофлавіну та відповідне збільшення рівня накопичення біомаси (рис. 4.1). Зниження кількості рибофлавіну при збільшенні кількості біомаси можна пояснити тісним зв'язком біосинтезу флавінів з обміном пуринів.

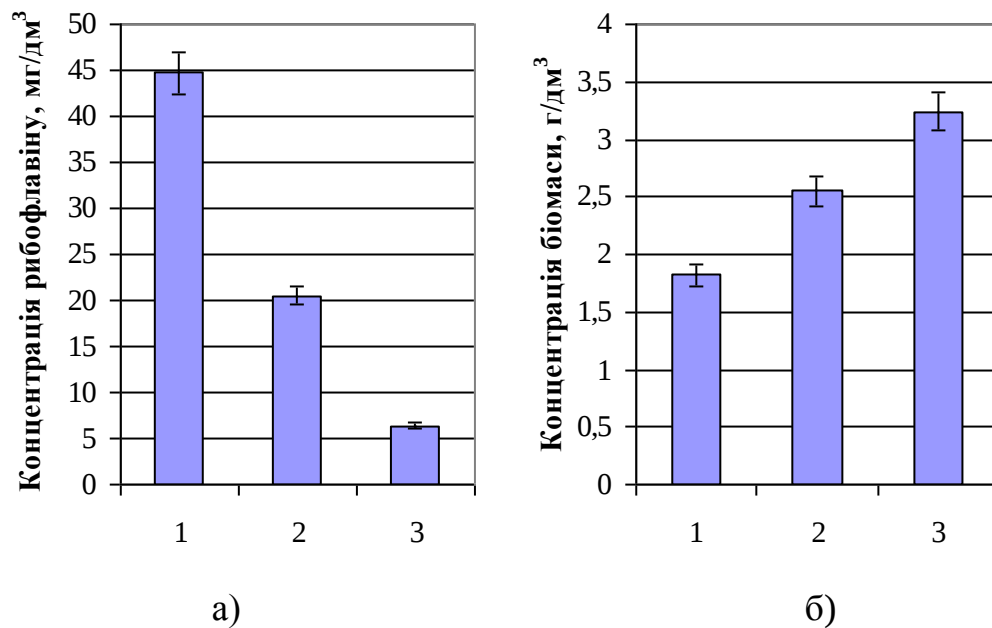


Рис. 4.1 Накопичення рибофлавіну (а) та рівень накопичення біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340 протягом 3 років ($p < 0,05$)

Значна втрата штамом здатності до синтезу рибофлавіну (більше ніж на 90%) призвела до необхідності пошуку способів підвищення рівня синтезу

рибофлавіну штамом-продуцентом. З літературних джерел [69] відомо, що надсинтез рибофлавіну грибом *E. ashbyi* у природних умовах здійснюється як захисна реакція на дію сонячних ультрафіолетових променів. Тому нами було запропоновано здійснювати УФ-опромінення міцелію продуценту для підвищення синтезу ним рибофлавіну. Результати проведених досліджень наведені на рис. 4.2 та 4.3.

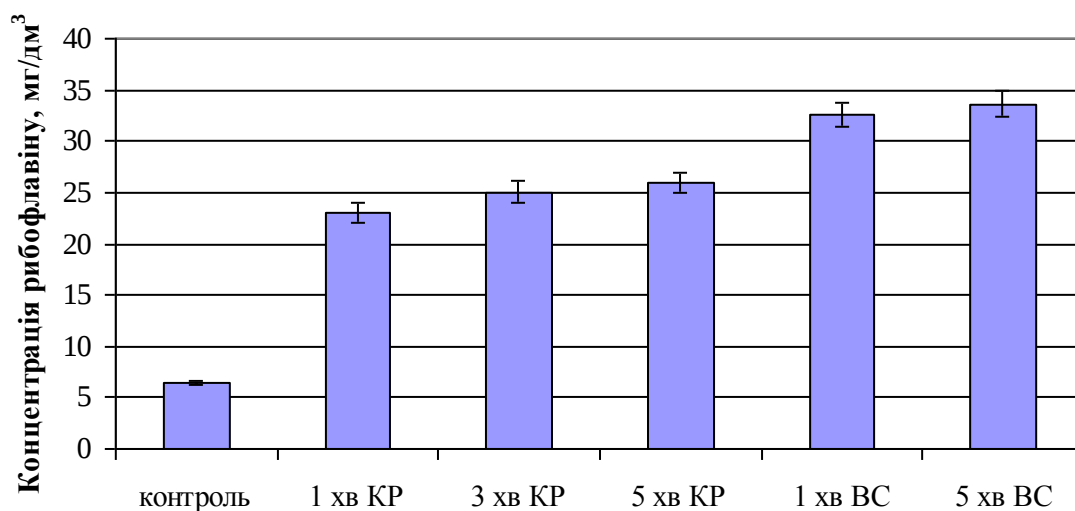


Рис. 4.2 Накопичення рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 після УФ-опромінення (КР – культуральна рідина, ВС – водна суспензія міцелію) ($p < 0,05$, порівняно з показниками контролю)

Опромінення культуральної рідини продуценту призводило до збільшення синтезу рибофлавіну на 72-74%, опромінення водної суспензії міцелію штаму-продуценту - до збільшення синтезу на 80%.

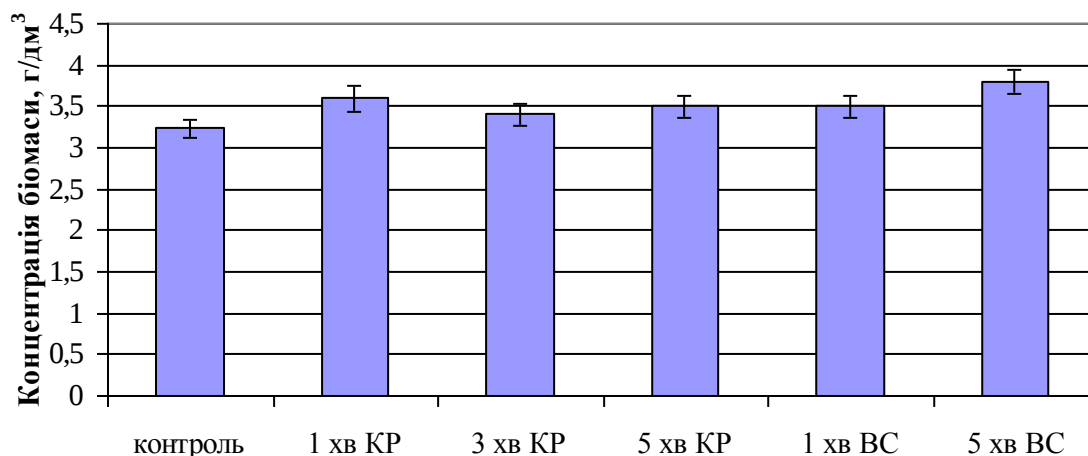


Рис. 4.3 Накопичення біомаси штамом *E. ashbyi* F-340 після УФ-опромінення

На накопичення біомаси УФ-опромінення впливу майже не здійснювало. Відмінності між показниками накопичення біомаси не є статистично значимими.

При дослідженні кількості рибофлавіну, що накопичувався у міцелії та виділявся у зовнішнє середовище встановлено, що рівень біосинтезу рибофлавіну після УФ-опромінення становив $6,4 \pm 0,25$ - $9,33 \pm 0,4$ мг/г сухої біомаси у культуральній рідині, що на 79% більше порівняно з контролем - $1,96 \pm 0,08$ мг/г рибофлавіну, та 3,2-4,8 мг/г у біомасі, що в середньому на 33% більше ніж у контролі без опромінення $3,24 \pm 0,16$ (рис. 4.4). Хоча у культуральній рідині накопичувалася велика кількість рибофлавіну, сумарна кількість рибофлавіну у перерахунку на суху біомасу незначна у порівнянні з попередніми дослідженнями ($43,6 \pm 2,18$ мг/г сухої біомаси), це пов'язано з тим, що після опромінення зберігався високий рівень синтезу біомаси.

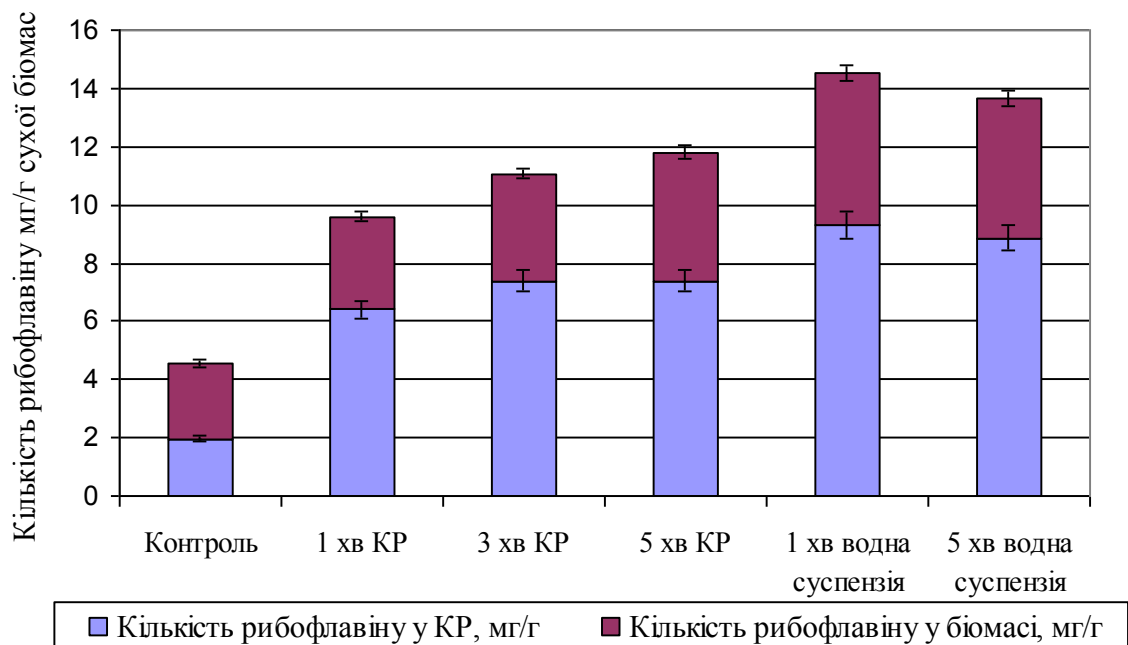


Рис. 4.4 Кількість рибофлавіну у культуральній рідині та у біомасі *E. ashbyi* F-340 у перерахунку на суху біомасу після УФ-опромінення штаму ($p < 0,05$, порівняно з показниками контролю))

За результатами проведених досліджень запропоновано додати до технологічної схеми отримання рибофлавіну стадію ультрафіолетового опромінення посівного матеріалу на етапі відновлення музейної культури протягом 1 хвилини для збільшення виходу рибофлавіну.

4.2 Технологічні умови отримання посівного матеріалу та їх вплив на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi*

При здійсненні глибинного культивування стан інокуляту має велике значення для синтезу і накопичення біологічно-активних речовин. Зазвичай для засіву виробничого середовища при глибинному способі культивування посівний матеріал готують також глибинним способом. Технологія отримання посівної культури наступна:

- 1) оновлення вихідної культури на агаризованому середовищі;
- 2) вирощування культури на рідкому середовищі в колбах на качалці;
- 3) культивування продуцента в інокуляторі.

Посівна доза при засіві глибинною культурою зазвичай порівняно велика - від 1 до 25%. Для продуценту *E. ashbyi* у публікаціях наводяться суперечливі дані.

Так, у роботі [166] було показано, що для досягнення максимальної продуктивності *E. ashbyi* Guilliermond 1935 по рибофлавіну засів ферментаційного поживного середовища повинен проводитися свіжепророслими спорами гриба. У роботі [157] зазначається, що біосинтез рибофлавіну однаково протікає на ферментаційному середовищі, засіяному 1-3 добовою культурою продуценту. Рекомендована кількість посівного матеріалу, що вноситься у поживне середовище, становить 0,75 – 2% [92]. Проте сучасні автори у своїх дослідженнях використовують великі об'єми посівного матеріалу: найчастіше 5 [6] та 10 % [8]. Крім дослідження впливу якості посівного матеріалу на біосинтез рибофлавіну, досліджувався вплив стану

посівного матеріалу на утворення компонентів ефірної олії, що продукується *E. ashbyi* [61].

На першому етапі підготовки посівного матеріалу здійснюють оновлення вихідної культури на агаризованих середовищах. Оскільки штам-продуцент є досить нестабільним при зберіганні, основною вимогою є розсів культури на щільні середовища, та відбір колоній, забарвлених у яскраво жовтий колір, які і використовуються для подальшого отримання посівного матеріалу.

Результати ферментації, отримані при використанні посівного матеріалу різного віку, наведені в табл. 4.1. З наведених даних видно, що сприятливим для накопичення рибофлавіну виявилось вирощування посівного матеріалу протягом 3-4 діб. Мікроскопічний аналіз показав, що у цей момент міцелій гриба представлений гіфами, що сильно розрослися, з великим числом вакуолей та численними включеннями, що відповідає стаціонарній фазі росту культури. Проте найбільша кількість біомаси отримується при засіві середовища інокулятом віком 6 діб [167].

Таблиця 4.1

Вплив тривалості культивування посівного матеріалу
на біосинтетичну активність продуценту рибофлавіну ($p < 0,05$)

Тривалість вирощування посівного матеріалу, діб	Концентрація рибофлавіну на 6 добу культивування, мг/дм ³	Концентрація біомаси на 6 добу культивування, г/дм ³	Концентрація ефірної олії на 3 добу культивування, мг/дм ³
1	11±0,44	2,02±0,078	—
2	11,1±0,36	1,46±0,038	—
3	21,05±0,97	1,92±0,087	60±3
4	21,73±0,43	1,93±0,085	74±4
5	16,45±0,77	2,55±0,077	53±2
6	18,46±0,89	2,68±0,111	31±2

Найбільший рівень накопичення рибофлавіну був досягнутий у тих варіантах, де вносили в ферментаційне середовище посівний матеріал у

кількості 1% від його об'єму (табл. 4.2), що співпадає з літературними даними про необхідність використання невеликого інокуляту, а от для накопичення великої кількості біомаси краще використовувати 5% посівного матеріалу.

Таблиця 4.2

Вплив кількості посівного матеріалу на біосинтетичну здатність
продуценту рибофлавіну ($p < 0,05$)

Кількість внесеного посівного матеріалу	Концентрація рибофлавіну на 6 добу культивування, мг/дм ³	Концентрація біомаси на 6 добу культивування, г/дм ³
1 %	21,87±0,7	1,92±0,079
5 %	18,46±0,57	2,68±0,124
10 %	17,74±0,97	1,91±0,078

Встановлено, що найбільшому виходу рибофлавіну сприяє використання посівного матеріалу у віці 3-4 діб та у кількості 1% [167].

Висновки до розділу 4

Встановлено, що для підтримки культури *Eremothecium ashbyi* в активному стані, на першому етапі підготовки посівного матеріалу, необхідно здійснювати підтримуючу селекцію, відбираючи для подальших досліджень найбільш пігментовані колонії продуценту.

З метою збільшення біосинтетичної здатності штаму-продуценту запропоновано здійснювати ультрафіолетове опромінення посівного міцелію гриба у разі втрати ним біосинтетичної здатності. Це призвело до збільшення синтезу рибофлавіну на 70-80% порівняно з контролем.

Встановлено, що найбільшому виходу рибофлавіну сприяє використання посівного матеріалу у віці 3-4 діб та у кількості 1%. Для максимального виходу ефірної олії сприятливою є 4-добова посівна культура.

Основні результати розділу опубліковані у працях [167].

РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ ФАКТОРІВ СЕРЕДОВИЩА НА БІОСИНТЕТИЧНУ ЗДАТНІСТЬ ПРОДУЦЕНТУ

5.1 Вплив фізико-хімічних параметрів культивування на накопичення біомаси та рибофлавіну штамом *E.ashbyi* F-340

Одним із фактором, який впливає на рівень продукування рибофлавіну і біомаси *E. ashbyi*, є рН середовища культивування. Дослідження впливу кислотності на накопичення біомаси та рибофлавіну для штаму *E. ashbyi* F-340 проводилися на рідкому ГПД при різних вихідних значеннях рН. Отримані результати наведені на рис. 5.1.

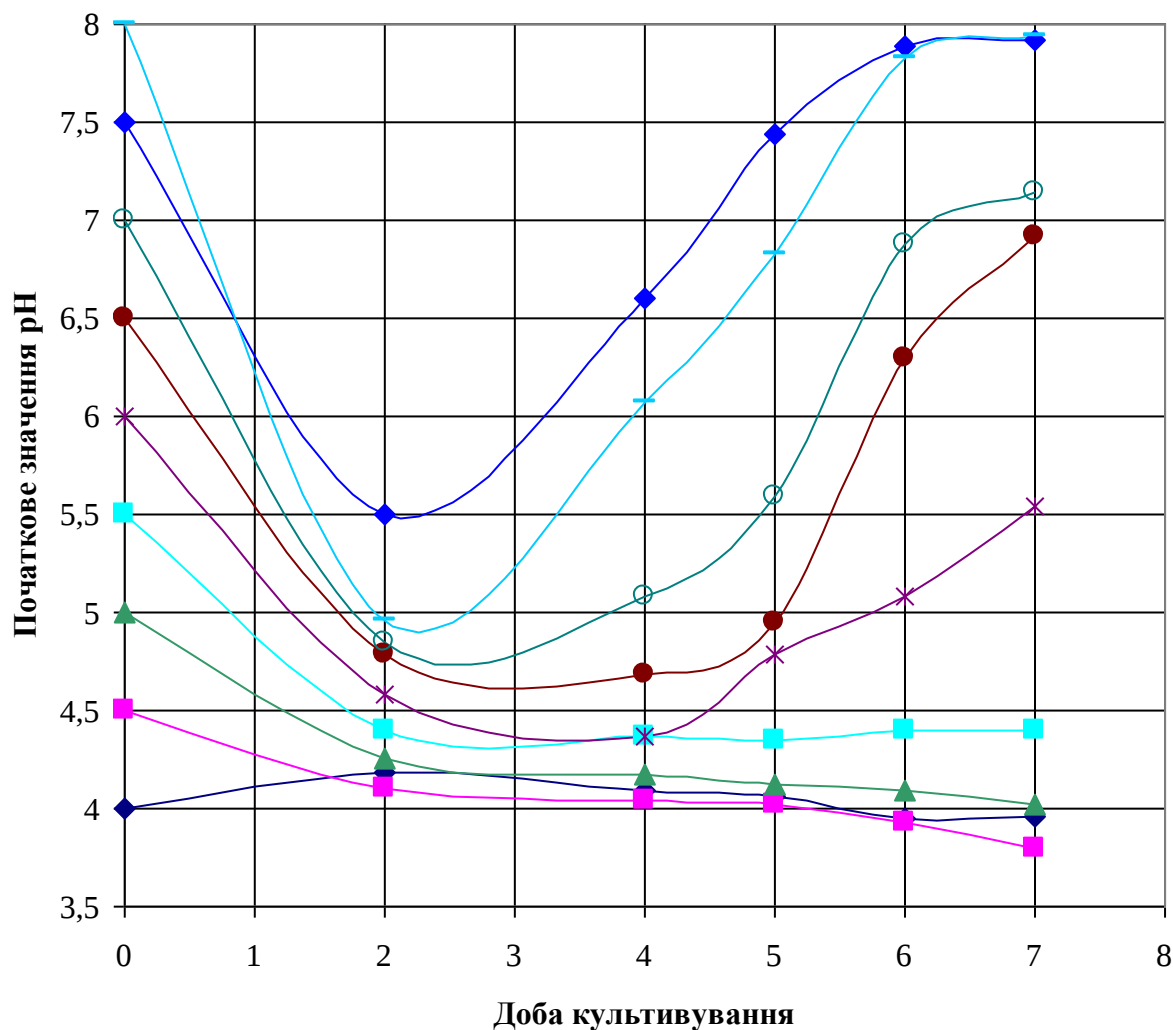


Рис. 5.1 Динаміка рН середовища в процесі культивування штаму *E. ashbyi* F-340

В процесі культивування штаму спостерігався зсув рН культуральної рідини, який залежав від початкового значення рН середовища. При культивуванні на середовищі, початкове значення рН якого становило 4,0, зміни рН майже не відбувалося. При культивуванні на середовищах, початкове значення рН яких становило 4,5 – 5,5, спостерігалось поступове зниження рН. При культивуванні на середовищах, початкове значення рН яких становило 6,0 - 8,0, в період інтенсивного росту культури (до 3 доби) відбувалося інтенсивне зниження рН до 4,5 – 5,0, а починаючи з 5 доби (стаціонарна фаза росту та фаза автолізу) рН підвищувалося до 7,0-8,0.

В результаті культивування *E. ashbyi* F-340 на середовищі з різними початковими значеннями рН було встановлено, що більшому виходу біомаси сприяв початковий рівень рН 5,5 - 6,0 (рис. 5.2). При цих значеннях рН концентрація біомаси на 7 добу культивування становила $5,1 \pm 0,24$ та $5,4 \pm 0,2$ г/дм³ відповідно.

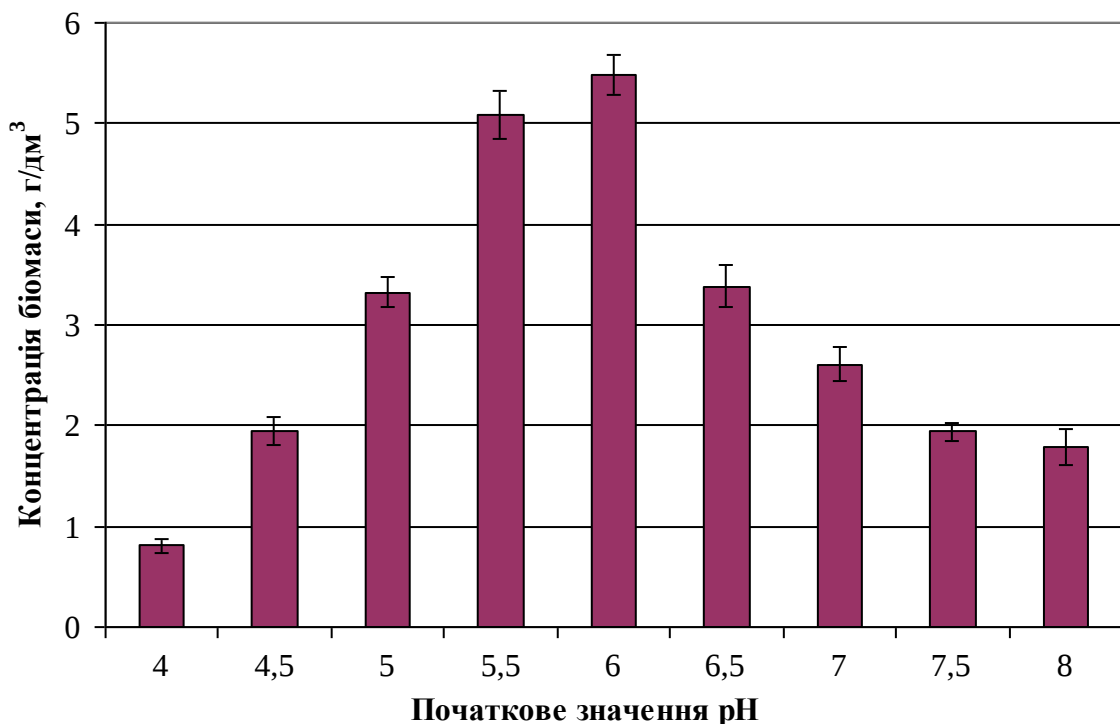


Рис. 5.2 Накопичення біомаси штамом *E. ashbyi* F-340 за різних початкових значень рН (на 7 добу культивування) ($p < 0,05$)

Більшому виходу рибофлавіну сприяє початкове рН 7,5 – кількість

рибофлавіну у культуральній рідині на 7 добу культивування становить $45,7 \pm 1,8$ мкг/см³ (рис. 5.3), що на 30 % більше, ніж при рН 6,5; 7,0 та 8,0, і на 58 % більше, ніж при рН 6, що зазвичай створюється у поживному середовищі при культивуванні.

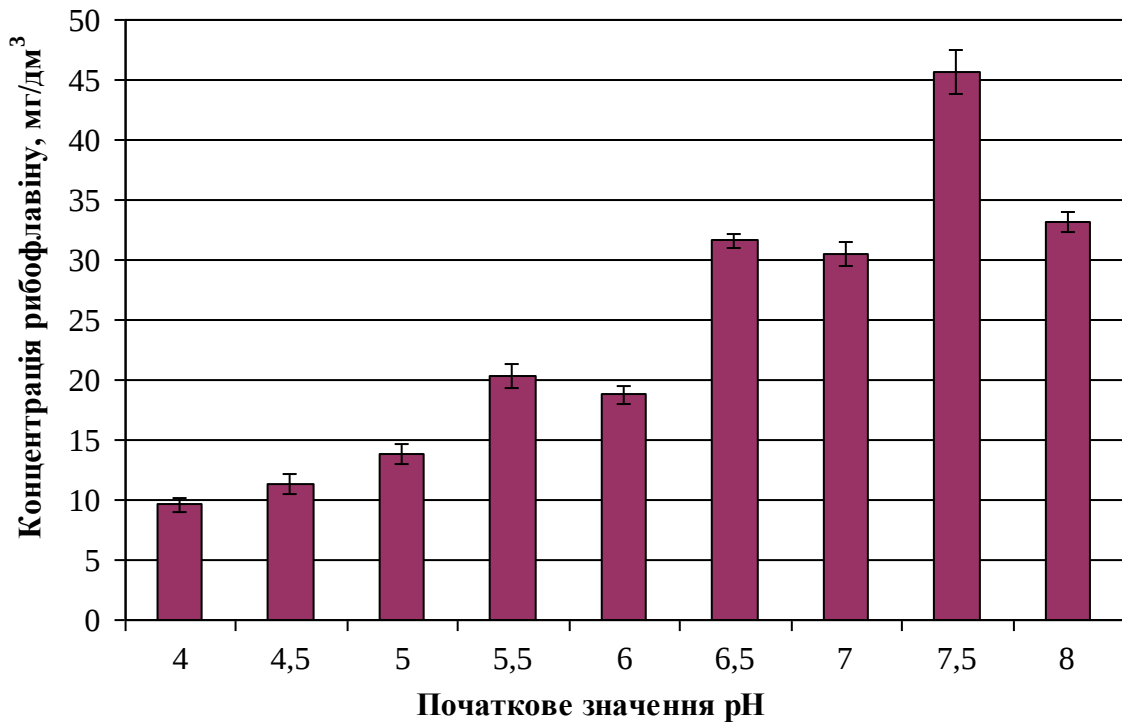


Рис. 5.3 Накопичення рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 за різних початкових значень рН (на 7 добу культивування) ($p < 0,05$)

Таким чином, початковий рівень рН середовищ, призначених для отримання біомаси та рибофлавіну, має бути різним. Для отримання максимальної кількості біомаси, а також посівного матеріалу, доцільно створювати у середовищі рН на рівні 5,5 - 6,0, а от для максимального накопичення рибофлавіну початкове рН середовища має становити 7,5 [168].

Одним з важливих чинників процесу глибинного культивування мікроорганізмів є перемішування культуральної рідини, що сприяє вирівнюванню розчинених компонентів поживного середовища, кисню і продуктів метаболізму по всьому об'єму. У результаті оптимізації цього процесу може бути сильно підвищена його продуктивність і знижені енергетичні витрати.

Дослідження впливу перемішування на накопичення біомаси та рибофлавіну для штаму *E. ashbyi* F340 проводилися на рідкому ГПД на роторних качалках, що здійснювали 70 об/хв та 180 об/хв та без перемішування (б/п) у стаціонарних умовах (рис. 5.4).

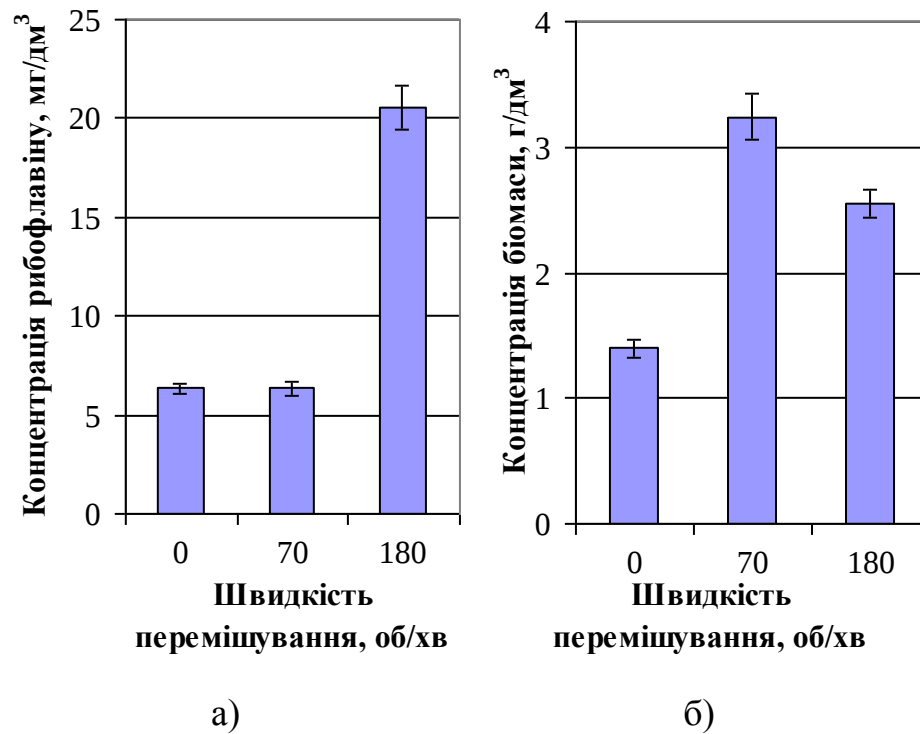


Рис. 5.4 Накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340 за різних значень перемішування (7 доба культивування) ($p < 0,05$)

Встановлено, що максимальна кількість рибофлавіну синтезувалася при перемішуванні 180 об/хв – $20,51 \pm 1$ мг/дм³, що на 70 % більше ніж при перемішуванні 70 об/хв. Отримання максимальної кількості біомаси відбувається при незначному рівні перемішування (70 об/хв). Незначні оберти перемішуючого пристрою сприяють накопиченню біомаси, при цьому рибофлавін синтезується у незначній кількості. Більш інтенсивне перемішування призводить до посилення флавіногенезу [168].

Зниження кількості рибофлавіну при збільшенні кількості біомаси, як відмічалось нами раніше, пояснюється тісним зв'язком біосинтезу флавінів з обміном пуринів. Активізація ростових процесів, пов'язаних з підсиленням синтезу нуклеїнових кислот призводить до послаблення флавіногенезу.

Температура є одним з ключових факторів, що визначають біосинтетичну здатність продуцента. *E. ashbyi* здатен рости в широкому діапазоні температур від 20 до 38°C [161], тому необхідно було дослідити, як температура впливає на рівень накопичення рибофлавіну (рис. 3.5).

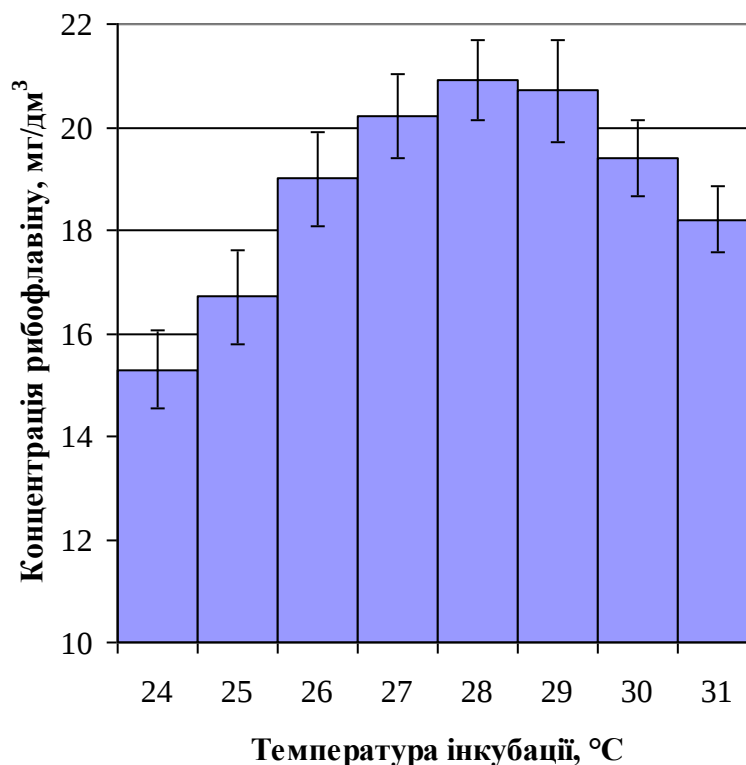


Рис. 3.5 Вплив температури інкубації на накопичення рибофлавіну ($p < 0,05$)

Наведені дані свідчать, що оптимальною температурою для максимального виходу цільового продукту є 27-29°C. Вплив температури на кількість рибофлавіну в зазначеному діапазоні виявився не статистично значимим.

5.2. Поживні потреби штаму *E. ashbyi* F-340

Правильно підібрані джерела вуглецевого та азотного живлення мають значний вплив на накопичення біомаси, фізіологічну активність культури, а саме характер метаболізму та синтез біологічно активних сполук. Інформації щодо особливостей глибинного культивування *E.ashbyi* в літературі наведено недостатньо. Найчастіше для культивування *E.ashbyi* в якості джерел карбону

використовують моно- та дисахариди (переважно глюкозу та сахарозу), мелясу, гідрол, а в якості джерел нітрогену - пептон, дріжджовий екстракт або автолізат, кукурудзяний екстракт, соєве борошно [4, 6-8, 38, 88].

Проведено пошук перспективних джерел карбону та нітрогену, що позитивно впливають на накопичення біомаси та синтез рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340. В якості базового середовища використовувалось середовище, що містило дріжджовий екстракт та пептон.

Джерела карбону

Нами встановлено, що *Eremothecium ashbyi* здатен утилізувати вуглецеві сполуки різної природи (рис. 5.5, 5.6).

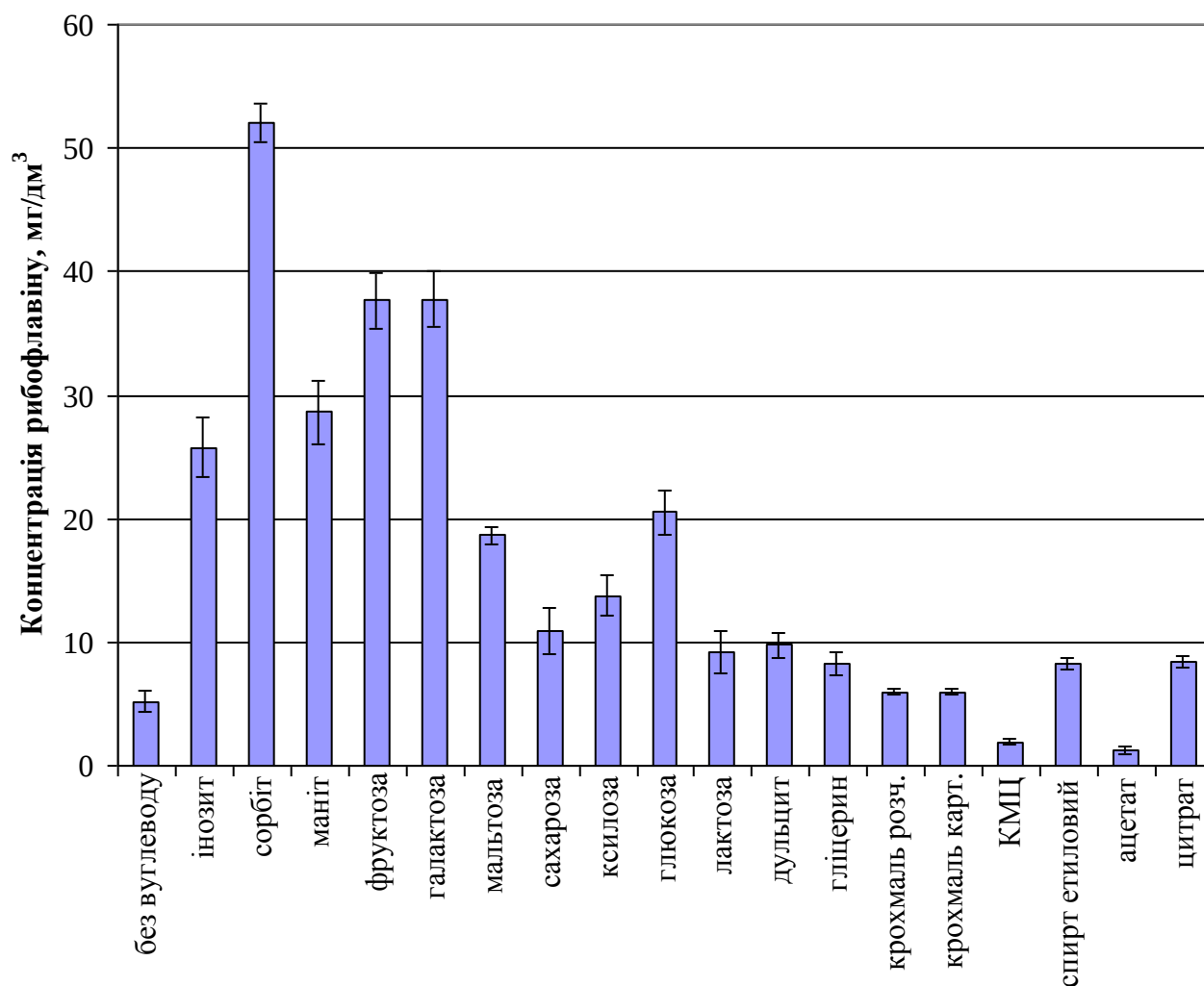


Рис. 5.5 Рівень біосинтезу рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 на середовищах з різними джерелами карбону ($p < 0,05$)

E. ashbyi F-340 утилізує моносахариди (глюкоза, галактоза, фруктоза, ксилоза), дисахариди (мальтоза, лактоза, сахароза), полісахарид крохмаль, карбоксиметилцелюлозу, шестиатомні спирти (інозит, сорбіт, маніт), триатомний спирт гліцерин, похідне фенілсечовини - дульцит.

Для синтезу рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 кращим джерелом карбону виявився сорбіт - максимальна концентрація рибофлавіну на середовищі з сорбітом становить $52 \pm 1,56$ мг/дм³, також високі показники продуктивності показані на середовищі з фруктозою та галактозою. Максимальна кількість біомаси спостерігалася на середовищі з фруктозою – $9,27 \pm 0,37$ г/дм³. Встановлено, що для синтезу рибофлавіну краще підходять моносахариди (фруктоза, галактоза) та шестиатомні спирт сорбіт.

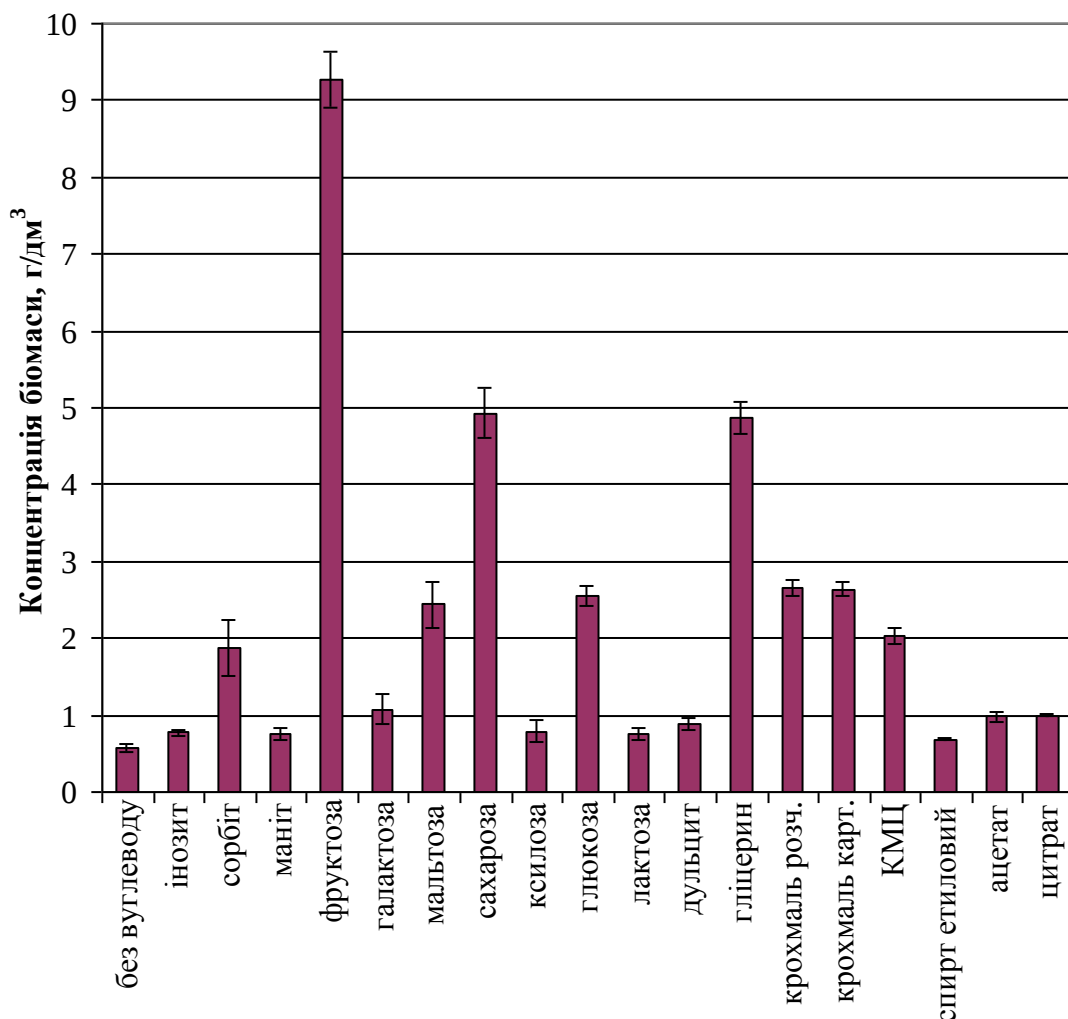


Рис. 5.6 Накопичення міцеліальної біомаси штамом *E. ashbyi* F-340 на середовищах з різними джерелами карбону ($p < 0,05$)

Джерела нітрогену

Ріст культури *Eremothecium ashbyi* спостерігали на середовищах, які в якості джерел нітрогену містили: амінокислоти (аспарагінова, глутамінова, метіонін, цистеїн, треонін, аргінін, аспарагін), неорганічні сполуки (хлорид та нітрат амонію, нітрат та нітрит натрію, сечовина) та органічні джерела азоту (дріжджовий екстракт (ДЕ), кукурудзяний екстракт (КЕ) та пептон) (рис. 5.7, 5.8). Ріст не спостерігався на таких джерелах нітрогену, як фенілаланін, аланін, триптофан, нітрат та нітрит натрію.

Як показали наші досліді, кращим джерелом нітрогену для *E. ashbyi* F-340 виявився дріжджовий екстракт. Кількість рибофлавіну, що синтезовано на середовищі з дріжджовим екстрактом на 54% більша, ніж на середовищі з метіоніном. Позитивний вплив дріжджового екстракту на ріст продуцента зумовлений його комплексним складом, оскільки ДЕ є концентратом водорозчинної частини автолізованих клітин дріжджів. Він багатий на вітаміни, особливо групи В, продукти розпаду білків (пептиди та амінокислоти) та інші поживні речовини. ДЕ використовується в багатьох поживних середовищах для вирощування мікроорганізмів як чудове джерело поживних речовин. Крім того, до складу ДЕ входять фактори росту, внаслідок чого він становить значний інтерес як джерело азотного живлення.

Серед амінокислот найкращими виявились метіонін та аргінін. Концентрація рибофлавіну при цьому становила – $9,74 \pm 0,29$ мг/дм³ та $8,54 \pm 0,25$ мг/дм³ відповідно. Використання неорганічних джерел нітрогену призвело до незначного накопичення рибофлавіну на середовищі з сечовиною та нітратом амонію – $5,9 \pm 0,39$ та $5,67 \pm 0,17$ мг/дм³ відповідно.

Сприятливими для накопичення міцеліальної біомаси були дріжджовий екстракт, аспарагін та сечовина. Найкращим джерелом азоту для накопичення біомаси виявився пептон. Так, біомаса штаму *E. ashbyi* на живильному середовищі з пептоном була у 1,5 рази вища, ніж на середовищі з аспарагіном.

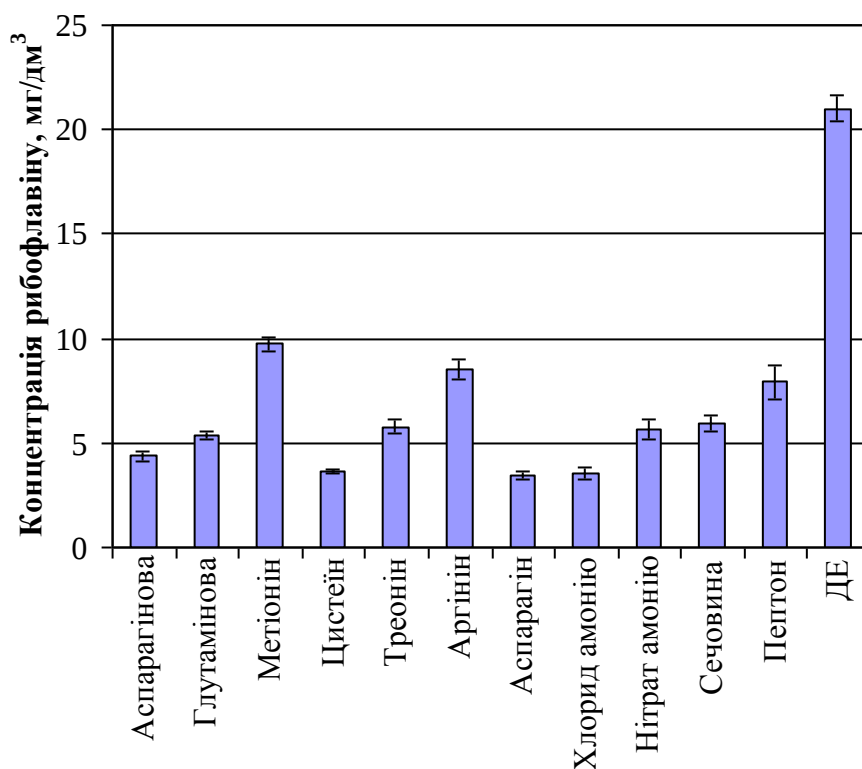


Рис. 5.7 Рівень біосинтезу рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 на середовищах з різними джерелами нітрогену (7 доба) ($p < 0,05$)

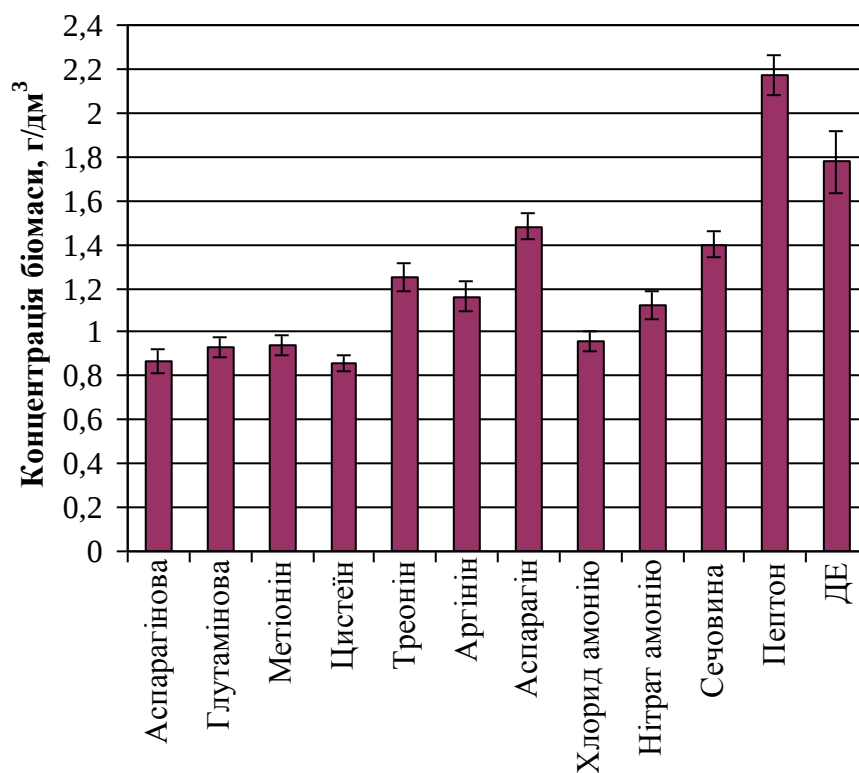


Рис. 5.8 Накопичення міцеліальної біомаси штамом *E. ashbyi* F-340 на середовищах з різними джерелами азоту (7 доба) ($p < 0,05$)

Комплексні поживні середовища

Оскільки комплексні середовища, з одного боку, є більш сприятливими для росту та отримання біологічно активних метаболітів з грибів, ніж синтетичні, а з іншого – є відносно дешевими, то на наступному етапі досліджень визначалися особливості біосинтетичної активності і накопичення біомаси для штаму *E. ashbyi* F-340 на комплексних рідких поживних середовищах, що найчастіше зустрічаються у літературі (рис. 5.9 та 5.10): середовища, зазначені у паспорті штаму: ГПД, пивне сусло; Чапек-Докс [61, 150], середовища з глюкозою та дріжджовим екстрактом [9, 83], середовища на основі м'яся [6, 38, 88].

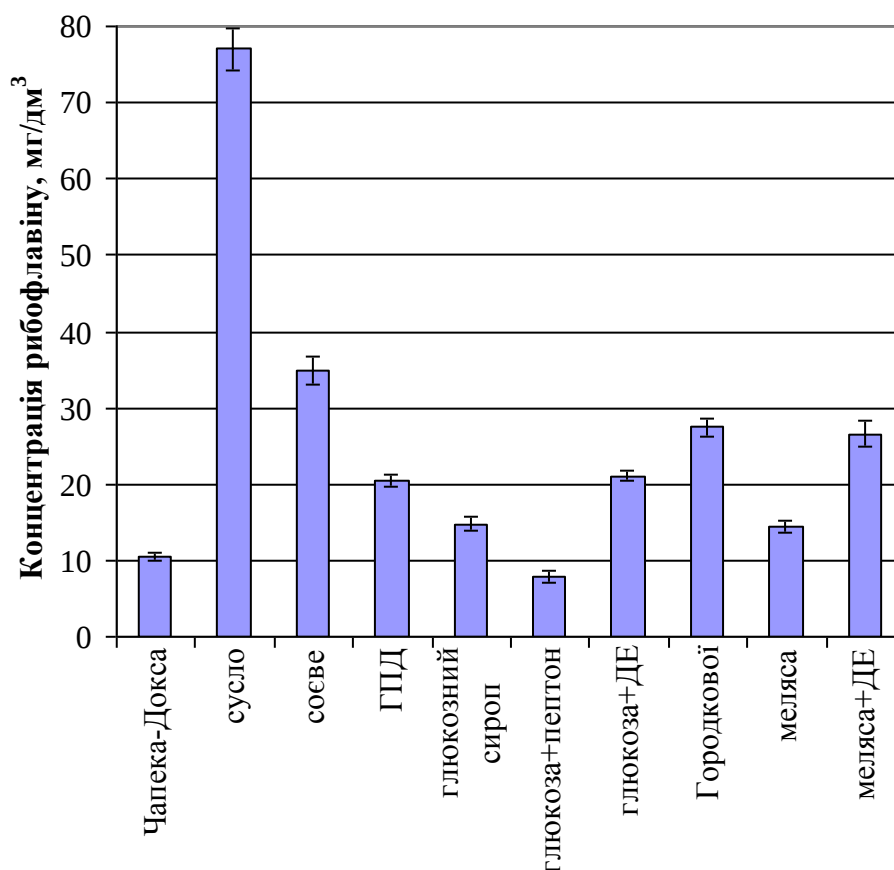


Рис. 5.9 Біосинтез рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 на комплексних поживних середовищах (7 доба) ($p < 0,05$)

При дослідженні накопичення рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 на різних поживних середовищах (рис. 5.9), найкращий результат було отримано на середовищі, що містило у своєму складі сусло. Грибом синтезовано рибофлавіну $77,0 \pm 3,85$ мг/дм³ культуральної рідини, що у 2,8 рази більше ніж

на ГПД та соєвому середовищі. Приріст біомаси становить $4,16 \pm 0,17$ г/дм³ культуральної рідини, що у 2 рази більше, ніж на ГПД. Основним вуглеводним компонентом сусла є мальтоза, а вона, як відомо, стимулює накопичення культурою *E. ashbyi* у середовищі ФАД. Також сусло у своєму складі містить багато цінних ростових факторів, які позитивно впливають на біосинтетичну здатність гриба.

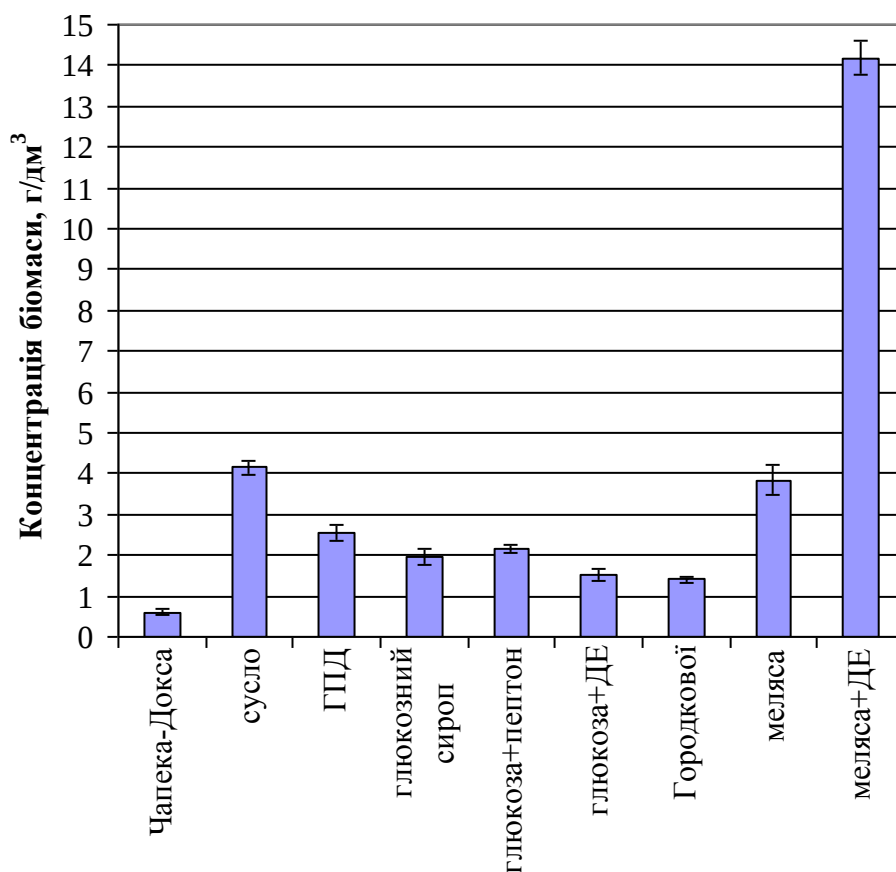


Рис. 5.10 Накопичення міцеліальної біомаси штамом *E. ashbyi* F-340 на комплексних поживних середовищах (7 доба) ($p < 0,05$)

На соєвому середовищі накопичилось рибофлавіну на 41 % більше, ніж на середовищі ГПД, що використовувалось у якості порівняння. Жодне з інших запропонованих середовищ не призвело до збільшення біосинтезу рибофлавіну, заміна у ГПД глюкози на глюкозний сироп (у перерахунку на глюкозу), що виробляється з кукурудзяного крохмалю, також не призвело до збільшення виходу вітаміну В₂.

Було встановлено, що найбільша кількість біомаси спостерігається при

використанні середовища з мелясою, збагаченою дріжджовим екстрактом – $14,19 \pm 0,4$ г/дм³ (рис. 5.10).

Однак на середовищі Чапека-Докса мав місце лише дуже незначний ріст гриба. Приріст біомаси становив $0,61 \pm 0,02$ г/дм³ культуральної рідини, а кількість накопиченого у середовищі рибофлавіну становить $10,46 \pm 0,5$ мг/дм³. Такий незначний ріст напевно пов'язаний з тим, що використане середовище є синтетичним та не містить достатніх ростових факторів.

Кількість рибофлавіну, отриманого на соєвому та глюкозо-пептонному середовищі, що найчастіше пропонуються для даного гриба у літературі, становить $34,93 \pm 1,75$ мг/дм³ та $20,51 \pm 0,8$ мг/дм³ відповідно.

Була досліджена можливість застосування молочної сироватки у якості поживного середовища. Результати наведені на рис. 5.11.

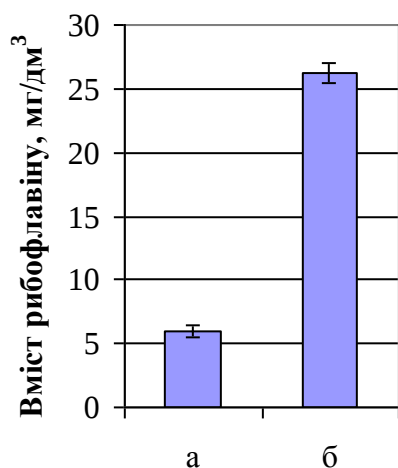


Рис. 5.11 Накопичення рибофлавіну на середовищі з молочною сироваткою:

- а) молочна сироватка, рН 6,0;
- б) молочна сироватка + дріжджовий екстракт, рН 6,0

До складу молочної сироватки входять (на 100 мл): вуглеводи – 4 г, білки – 0,6 г, жири – 0,1 г. Оскільки кислотність сироватки досить велика та становила 4,2, рН було встановлено на рівні 6,0 за допомогою 1 н NaOH. З метою збільшення кількості джерела нітрогену та для додавання факторів росту, до другого варіанту середовища був доданий дріжджовий екстракт.

Додавання ДЕ призвело до збільшення виходу рибофлавіну на 77 %, приблизно стільки рибофлавіну було отримано на ГПД, проте молочна сироватка містить недостатню кількість вуглеводів, щоб використовувати її для подальших досліджень.

Висновки до розділу 5

Встановлено значення рН середовища, найбільш сприятливі для накопичення біомаси та рибофлавіну культурою *E. ashbyi*. Для отримання максимальної кількості біомаси, а також посівного матеріалу, рекомендовано створювати у поживному середовищі початкове рН 5,5-6,0, а от для максимального накопичення рибофлавіну початкове рН середовища -7,5.

Збільшення інтенсивності перемішування в процесі культивування продуценту з 70 до 180 об/хв призводить до збільшення рівня накопичення рибофлавіну на 70 %. При цьому приріст біомаси зменшується на 20 %.

При дослідженні росту *E. ashbyi* на середовищах з різними джерелами вуглецевого живлення встановлено, що для біосинтезу рибофлавіну культурою *E.ashbyi* краще підходять моносахариди (фруктоза, галактоза) та шестиатомний спирт сорбіт, біомаса краще накопичується при наявності в середовищі фруктози, сахарози та гліцерину.

Досліджено ріст *E. ashbyi* на різних джерелах нітрогену. Серед амінокислот найкращий рівень синтезу рибофлавіну спостерігався при додаванні в середовище метіоніну та аргініну. Встановлено, що дріжджовий екстракт забезпечує високий рівень синтезу як рибофлавіну, так і біомаси.

При культивуванні *E. ashbyi* на комплексних середовищах встановлено, що найвища біосинтетична здатність за рибофлавіном спостерігалася на середовищі, що містило у своєму складі сусло. Грибом синтезовано рибофлавіну $77,0 \pm 3,85$ мг/дм³, що значно більше ніж на інших середовищах.

Серед досліджених комплексних середовищ промислове значення мають лише середовища, до складу яких входить м'яса, відход цукрової промисловості, що часто використовується на підприємствах мікробіологічної галузі. Проте її використання призвело лише до значного збільшення накопичення міцеліальної біомаси, рівень накопичення рибофлавіну при цьому суттєво не змінився. У жодному з використаних середовищ не містяться ті компоненти, які сприяють збільшенню виходу рибофлавіну.

Основні результати розділу опубліковані у праці [168].

РОЗДІЛ 6 ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСИНТЕТИЧНОЇ ЗДАТНОСТІ ПРОДУЦЕНТУ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА ГЛЮКОЗО-ФРУКТОЗНИХ СИРОПАХ

Традиційно в біотехнології вітамінів в якості джерела карбону та енергії в поживних середовищах застосовуються моно- та дисахариди, а також відходи різноманітних виробництв, що містять у своєму складі вуглеводи різного складу. Проте використання перших є досить дорогим, а других - не завжди задовольняє всі потреби продуценту та не призводить до накопичення цільового продукту у великій кількості. Продуцент рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* Guillerm. F-340, в якості джерела карбону здатен засвоювати великий спектр вуглеводів, проте найкраще здійснює накопичення рибофлавіну за наявності в середовищі фруктози, галактози, глюкози та мальтози. Однак досі не було запропоновано жодного середовища для культивування *Eremothecium ashbyi*, яке б містило у складі наведені вуглеводи та було досить дешевим та технологічним.

Для вирішення даної проблеми використали таке перспективне натуральне джерело карбону, як глюкозо-фруктозний сироп (ГФС) [169-171]. Нами була здійснена спроба встановити рівень накопичення рибофлавіну на поживних середовищах з різними глюкозо-фруктозними сиропами (ГФС-10 та ГФС-42) в якості джерела карбону, а також пошук джерела нітрогену, що буде максимально сприяти синтезу вітаміну B₂ та ефірної олії.

6.1 Характеристика глюкозо-фруктозних сиропів

На сьогоднішній день в Україні крохмалопродукти, що містять цукри, а саме патоки, глюкозні та глюкозо-фруктозні сиропи, є багатотоннажним виробництвом харчової промисловості. Глюкозо-фруктозні сиропи (ГФС) за своїми органолептичними, фізико-хімічними та технологічними показниками конкурують з тростинним та буряковим цукром та вважаються найбільш

перспективним цукрозамінником [169].

Для України основною крохмалевмісною сировиною є кукурудза та продукти її переробки. Глюкозо-фруктозний сироп виробляють з кукурудзяного крохмалю ферментативним гідролізом його до високоглюкозного сиропу з наступною ізомеризацією частини глюкози у фруктозу та подальшим очищенням активованим вугіллям та йоннобмінними смолами, знезараженням на бактерицидних фільтрах з розміром пор 0,45 мкм та концентруванням [170].

Глюкозно-фруктозні сиропи виробляються на підприємстві ЗАТ «Інтеркорн Корн Просесінг Індастрі» у Дніпрі, яке почало свою роботу у 2005 році. При виробництві сиропів для розрідження крохмалю не використовується кислота, а застосовуються ферментні препарати, що дає можливість отримати стабільний продукт з необхідним вуглеводним складом. Сиропи виробляються за ТУ У 15.6-32616426-009:2005 «Сироп глюкозо-фруктозний» [171]

Таблиця 6.1

Якісні показники глюкозо-фруктозних сиропів.

Фізико-хімічні властивості	ГФС-10	ГФС-42
Декстрозний еквівалент	65	97
Показник заломлення (20°C)	1,4823...1,4876	1,4632...1,4656
Густина, кг/дм ³ (20°C)	1,3878...1,3996	1,3454...1,3515
В'язкість, спз (40°C)	770...800	95...105
ольоровість (од. RBU), не більше	25	25
Сухі речовини	75,0...77,0	70,5...71,5
Масова частка SO ₂ , мг/кг	< 2	0,6
pH	4,0...6,0	4,0...6,0
Масова частка золи, %, не більше	0,1	0,1
Калорійність/100 г	307	287
Органолептичні характеристики		
Зовнішній вигляд	в'язка рідина	в'язка рідина
Смак	солодкий, без присмаку	солодкий, без присмаку

Продовження табл. 6.1

Запах	без запаху	без запаху
Солодкість (сахароза – 100%)	58...64%	89-99 %
Характерний вуглеводний склад (% на суху речовину)		
Фруктоза	8...12	40...44
Глюкоза	22...26	50...54
Мальтоза	37...45	2...3
Мальтотріоза	6...10	2
Вищі цукри	10...15	1
Мікробіологічні показники		
МАФАМ в 1 г, не більше	1×10^3	1×10^3
Пліснява в 1 г, не більше	100	10
Дріжджі в 1 г, не більше	100	10

На даний момент існують широкі можливості для застосування ГФС у біотехнології, проте відомо лише про застосування глюкозо-фруктозного сиропу для виробництва етилового спирту [172]. Тому, нами була проведена серія експериментів зі встановлення можливості використання глюкозо-фруктозних сиропів у промисловому виробництві рибофлавіну та дослідження впливу глюкозо-фруктозних сиропів з різною концентрацією фруктози на рівень накопичення цільового продукту.

6.2 Застосування глюкозо-фруктозних сиропів в біотехнології рибофлавіну

Результати досліджень з накопичення рибофлавіну та біомаси штамом *E. ashbyi* F-340 при культивуванні на середовищі з глюкозою та ГФС представлені на рис. 6.1.

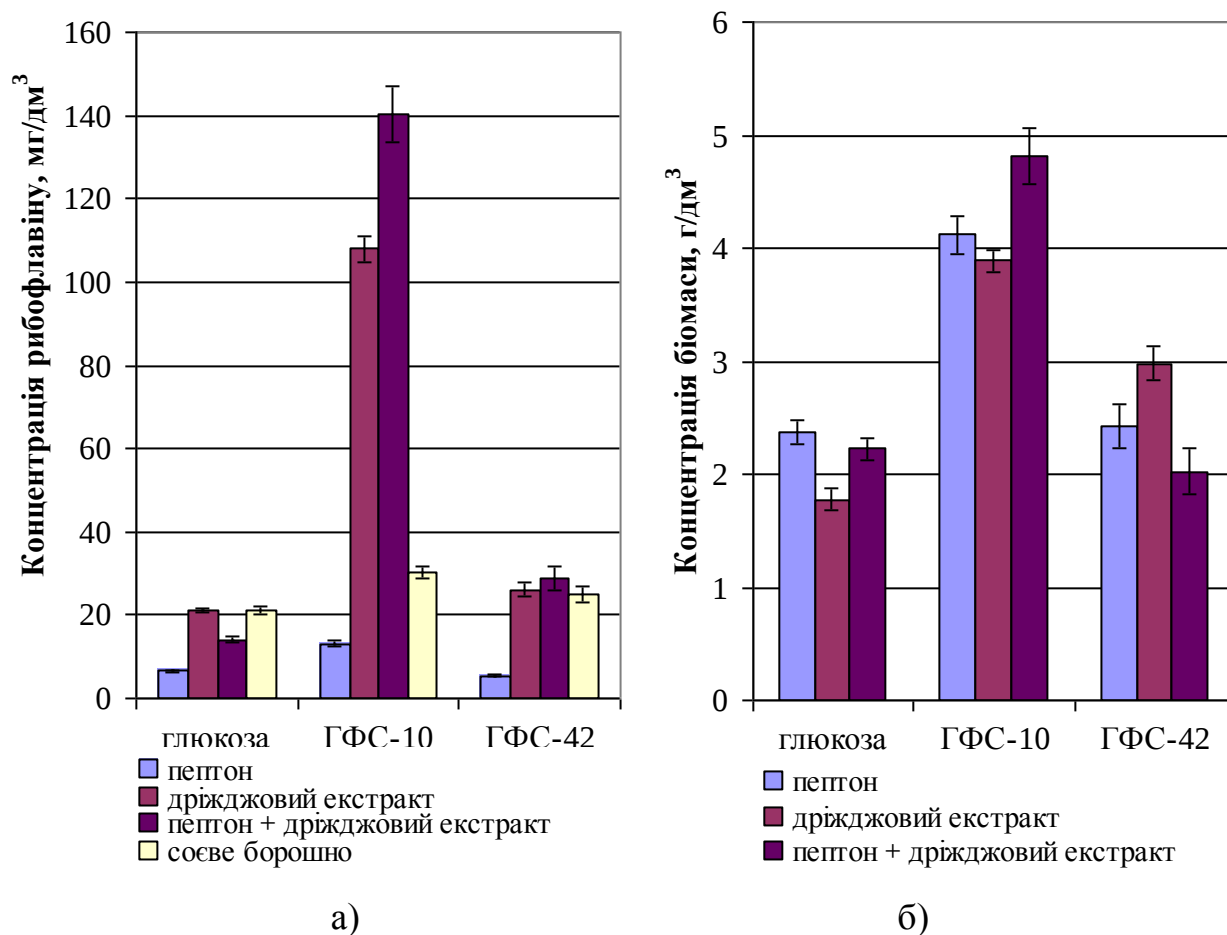


Рис. 6.1 Накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340 при культивуванні на середовищі з глюкозою та ГФС ($p < 0,05$)

У якості порівняння використані аналогічні поживні середовища, що у своєму складі, як джерело карбону, містять глюкозу або фруктозу. Виявилось, що найбільша кількість вітаміну синтезується при використанні ГФС-10 (140 мг/дм³), що у 7 разів більше, ніж на середовищі з глюкозою, та у 3,8 разів більше, ніж на середовищі з фруктозою. При використанні ГФС-42 не показано суттєвих відмінностей в синтезі цільового продукту від середовищ порівняння [173].

При встановленні впливу концентрації ГФС на біосинтетичну здатність штаму-продуценту *Eremothecium ashbyi*, показано, що найбільша кількість рибофлавіну синтезується продуцентом при найменшій концентрації ГФС-10 у дослідженому діапазоні 10-50 г/дм³ у перерахунку на глюкозу (рис. 6.2). Отримані результати можуть бути пояснені катаболітною репресією.

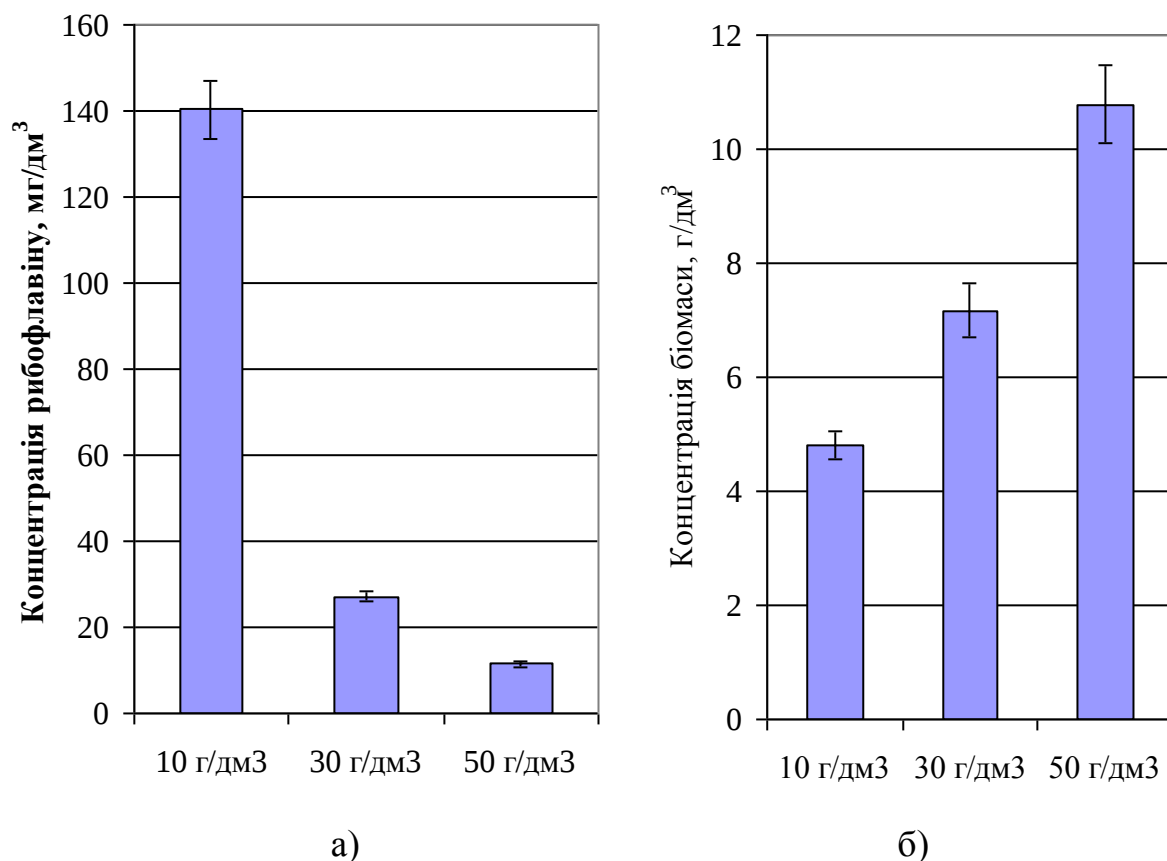


Рис. 6.2 Накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340 при культивуванні на середовищі з ГФС-10 різних концентрацій (у перерахунку на глюкозу) ($p < 0,05$)

З метою порівняння рівня накопичення рибофлавіну на середовищі з глюкозою та ГФС-10, в якості джерел карбону, був проведений однофакторний експеримент для встановлення оптимальної концентрації глюкози (рис. 6.3). Отримана залежність описується рівнянням другого порядку, оптимальна концентрація глюкози становить 24 г/дм³, при цьому концентрація B_2 – 67 мг/дм³.

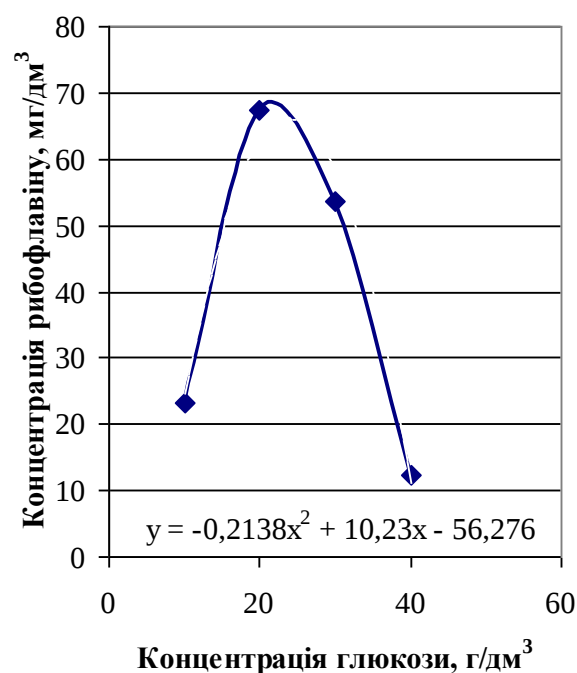


Рис. 6.3 Визначення оптимальної концентрації глюкози у середовищі.

Серед досліджених компонентів поживного середовища, що є відомими джерелами нітрогену (пептон, дріжджовий екстракт, соєве борошно та одночасне застосування дріжджового екстракту та пептону), при застосуванні з ГФС, показано найбільший вихід рибофлавіну в присутності дріжджового екстракту та пептону. Отриманий результат, ймовірно, пов'язаний з тим, що ці компоненти середовища у своєму складі одночасно містять велику кількість вітамінів та факторів росту, що необхідні продуценту для накопичення цільового продукту у максимальній кількості.

Таблиця 6.2

Рівень накопичення ефірної олії *E. ashbyi* в залежності від середовища культивування

Поживні середовища	Вміст ефірної олії, мг/дм ³
Глюкоза+пептон+дріжджовий екстракт	31±2
ГФС-10+пептон+дріжджовий екстракт	160±11
ГФС-42+пептон+дріжджовий екстракт	80±6
Глюкоза+дріжджовий екстракт	73±5
ГФС-10+дріжджовий екстракт	252±12
Глюкоза+пептон	60±2
ГФС-10+пептон	140±7
ГФС-10 (10г/л у перерахунку на глюкозу)	160±11
ГФС-10 (30г/л у перерахунку на глюкозу)	273±13
ГФС-10 (50г/л у перерахунку на глюкозу)	420±18

Результати проведених досліджень стали передумовою для здійснення оптимізації складу поживного середовища з метою максимального накопичення рибофлавіну продуцентом *Eremothecium ashbyi* за трьома компонентами: ГФС, дріжджовим екстрактом та пептоном.

6.3 Оптимізація середовища культивування на основі ГФС-10 для максимального накопичення рибофлавіну *Eremothecium ashbyi*

Після вивчення об'єкта дослідження виникає ряд уявлень про дію різних факторів і необхідність отримати експериментальні дані про їх сукупний вплив на певний показник (відгук), що характеризує об'єкт дослідження.

Застосування сучасних статистичних методів планування багатофакторних експериментів дозволяє виділити найбільш активні фактори і не досліджувати фактори, що мають незначний вплив на об'єкт дослідження. Багатофакторне планування дає можливість активно брати участь в досліджуваному процесі і в значній мірі спрощує завдання відшукування оптимальних умов його протікання. Внаслідок спеціально розроблених планів експерименту знаходження математичної моделі досліджуваного процесу не вимагає складних математичних розрахунків.

Для обробки результатів експериментальних досліджень використовувалася методика повного факторного експерименту.

В ході досліджень було проведено два повних факторних експерименти. Факторами були обрані концентрація ГФС-10, концентрація дріжджового екстракту і концентрація пептону. Результуючою функцією обрана концентрація рибофлавіну в культуральній рідині (Y_1) і загальна концентрація рибофлавіну в культуральній рідині та біомасі (Y_2) при культивуванні на перемішуючому пристрої зі швидкістю обертання 180 об/хв.

Оскільки згідно з попередніми дослідженнями функції відгуку повинні бути нелінійними, то чинники мали три рівня варіювання (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Фактори і рівні їх варіювання

Фактори	Концентрація ГФС-10, г/дм ³ (m)	Концентрація дріжджового екстракту, г/дм ³ (W)	Концентрація пептону, г/дм ³ (v)
Позначення	x_1	x_2	x_3
Верхній рівень (+1)	50	10	5
Основний рівень (0)	40	6	3
Нижній рівень (-1)	30	2	1

Для знаходження коефіцієнтів полінома використовувався ортогональний центрально-композиційний план другого порядку (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

Матриця ортогонального центрально-композиційного плану другого порядку і результати експериментів

№ досліджу	x_1	x_2	x_3	$x_1' = x_1^2 - d$	$x_2' = x_2^2 - d$	$x_3' = x_3^2 - d$	Концентрація рибофлавіну в культуральній рідині, мкг/дм ³	Загальна концентрація рибофлавіну, мкг/дм ³
							Y_1	Y_2
1	+	+	+	0,2697	0,2697	0,2697	268,41	462,31
2	-	+	+	0,2697	0,2697	0,2697	242,05	284,31
3	+	-	+	0,2697	0,2697	0,2697	44,62	143,08
4	-	-	+	0,2697	0,2697	0,2697	152,41	337,69
5	+	+	-	0,2697	0,2697	0,2697	338,56	529,23
6	-	+	-	0,2697	0,2697	0,2697	297,64	503,85
7	+	-	-	0,2697	0,2697	0,2697	25,54	100,00
8	-	-	-	0,2697	0,2697	0,2697	72,31	158,46
9	1,2154	0	0	0,7469	-0,7303	-0,7303	128,31	253,08
10	-1,2154	0	0	0,7469	-0,7303	-0,7303	84,41	263,08
11	0	1,2154	0	-0,7303	0,7469	-0,7303	321,33	545,38
12	0	-1,2154	0	-0,7303	0,7469	-0,7303	43,49	114,62
13	0	0	1,2154	-0,7303	-0,7303	0,7469	252,51	483,85
14	0	0	-1,2154	-0,7303	-0,7303	0,7469	189,23	393,85
15	0	0	0	-0,7303	-0,7303	-0,7303	270,05	504,63

Ортогональне планування дозволяє отримати незалежні оцінки коефіцієнтів регресії з мінімальною дисперсією. Ортогональність центрально-композиційного плану забезпечується відповідним підбором зоряного плеча α (для трьох факторів $\alpha = 1,2154$ [174]) і спеціальним перетворенням квадратичних змінних x_i^2 за виразом:

$$x_i' = x_i^2 - d \quad (6.1)$$

де d - поправка, що залежить від числа факторів [175], для трьох факторів $d = 0,7303$.

Значимість коефіцієнтів регресії перевірялася за критерієм Стюдента. У нашому випадку для 3-х ступенів свободи і 95% -му рівні значущості $t = 1,44$ [174-176].

Загальний вигляд функції для матриці ортогонального центрально-композиційного плану другого порядку матиме такий вигляд:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (6.2)$$

Таблиця 6.4

Перевірка значущості коефіцієнтів регресії за факторної обробки
концентрації рибофлавіну в культуральній рідині (Y_1)

Коефіцієнти регресії	Перевірка коефіцієнтів регресії за критерієм Стюдента		
	Числове значення	$S^2\{b_i\}$	$\frac{ b_i }{\sqrt{S^2\{b_i\}}}$
b_0	182,077	21,361207	39,39
b_1	-3,097	29,250189	-0,57
b_2	108,584	29,250189	20,8
b_3	4,596	29,250189	0,85
b_{12}	27,73	40,052263	4,38
b_{13}	-9,448	40,052263	-1,49
b_{23}	-28,115	40,052263	-4,44
b_{123}	5,808	40,052263	0,92
b_{11}	-54,714	73,417883	-6,39
b_{22}	-3,233	73,417883	-0,38
b_{33}	22,803	73,417883	2,66

З таблиці 6.4 видно, що значущими коефіцієнтами є b_0 , b_2 , b_{13} , b_{12} , b_{23} , b_{11} та b_{33} . Рівняння регресії в кодованому вигляді буде виглядати наступним чином:

$$Y_1 = 182,077 + 108,584 \cdot x_2 + 27,73 \cdot x_1 \cdot x_2 - 9,448 \cdot x_1 \cdot x_3 - 28,115 \cdot x_2 \cdot x_3 - 54,714 \cdot x_1^2 + 22,803 \cdot x_3^2 \quad (6.3)$$

Адекватність отриманого рівняння перевірялась за критерієм Фішера [174, 176].

Для зручності розрахунків запишемо рівняння регресії в розкодованому вигляді:

$$Y_1 = -758,483 + 41,029 \cdot m + 9,959 \cdot w + 5,777 \cdot v + 0,693 \cdot m \cdot w - 0,472 \cdot m \cdot v - 3,51 \cdot w \cdot v - 0,547 \cdot m^2 + 5,701 \cdot v^2 \quad (6.4)$$

При побудові поверхонь відгуків та перетинів поверхонь (програма SigmaPlot v.11.0) варіювалися два фактори (Додаток Б).

Паралельно проводилось визначення загальної концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та в біомасі та знаходилося рівняння регресії.

Таблиця 6.5

Перевірка значущості коефіцієнтів регресії за факторної обробки концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та в біомасі (Y_2)

Коефіцієнти регресії	Перевірка коефіцієнтів регресії за критерієм Стьюдента		
	Числове значення	$S^2\{b_i\}$	$\frac{ b_i }{\sqrt{S^2\{b_i\}}}$
b_0	338,194	69,244297	22,42
b_1	-5,646	94,81715	-0,58
b_2	142,775	94,81715	14,66
b_3	4,129	94,81715	0,42
b_{12}	57,056	129,833056	5,01
b_{13}	2,059	129,833056	0,18
b_{23}	-63,596	129,833056	-5,58
b_{123}	36,096	129,833056	3,17
b_{11}	-97,002	237,990753	-6,29
b_{22}	-48,316	237,990753	-3,13
b_{33}	25,369	237,990753	1,64

З таблиці 6.5 видно, що значущими коефіцієнтами є b_0 , b_2 , b_{12} , b_{23} , b_{123} , b_{11} , b_{22} та b_{33} . Рівняння регресії в кодованому вигляді буде виглядати наступним чином:

$$Y_2 = 338,194 + 142,775 \cdot x_2 + 57,057 \cdot x_1 \cdot x_2 - 63,596 \cdot x_2 \cdot x_3 + 36,096 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 - 97 \cdot x_1^2 - 48,316 \cdot x_2^2 + 25,369 \cdot x_3^2 \quad (6.5)$$

Рівняння регресії в розкодованому вигляді:

$$Y_2 = -1605,25 + 77,165 \cdot m + 92,868 \cdot w + 117,932 \cdot v + 0,073 \cdot m \cdot w - 2,707 \cdot m \cdot v - 25,999 \cdot w \cdot v + 0,451 \cdot m \cdot w \cdot v - 0,97 \cdot m^2 - 3,0197 \cdot w^2 + 5,701 \cdot v^2 \quad (6.6)$$

Аналізуючи поверхні відгуку (додаток Б) встановлено склад модифікованого середовища для максимального накопичення рибофлавіну:

оптимальна концентрація ГФС-10 становить 40 г/дм³, концентрації дріжджового екстракту та пептону у середовищі становлять відповідно 10 та 1 г/дм³. Концентрація рибофлавіну, що спостерігалася при культивуванні на модифікованому середовищі у культуральній рідині становила 350,4 мг/дм³, що у 17 раз більше, ніж на ГПД середовищі, та у 2,5 рази більше, ніж на початковому середовищі з ГФС-10. Кількість ефірної олії, що синтезується на модифікованому середовищі – 373 ± 19 мг/дм³, що у 12 разів більше, ніж на ГПД середовищі, та у 2,3 рази більше, ніж на початковому середовищі з ГФС-10.

Висновки до розділу 6

Встановлено можливість використання ГФС-10 у біотехнології рибофлавіну та ефірної олії.

Здійснена оптимізації складу поживного середовища з метою максимального накопичення рибофлавіну продуцентом *Eremothecium ashbyi* за трьома компонентами: ГФС, дріжджовим екстрактом та пептоном. Максимальному накопиченню рибофлавіну сприяють концентрації ГФС-10 40 г/дм³, дріжджового екстракту 10 г/дм³ та пептону 1 г/дм³.

Концентрація рибофлавіну та ефірної олії на модифікованому середовищі у культуральній рідині у 17 та 12 раз, відповідно, більше, ніж на ГПД середовищі, та у 2,5 та 2,3 рази, відповідно, більше, ніж на початковому середовищі з ГФС-10.

Отримані нами результати дозволяють запропонувати технологію виробництва рибофлавіна заснована на глибинному культивуванні аскоміцетного гриба *E. ashbyi* F-340.

Основні результати розділу опубліковані у праці [173].

РОЗДІЛ 7 ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ РИБОФЛАВІНУ ТА ЕФІРНОЇ ОЛІЇ НА ГЛЮКОЗО-ФРУКТОЗНОМУ СИРОПІ

У наведеній технології, дотримуючись принципу безвідходного виробництва, пропонується одночасне виробництво двох цільових продуктів: технічного рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди.

Отриманий рибофлавін може бути використаний у сільському господарстві для збагачення кормів вітаміном В₂ у складі преміксів та комбікормів. Після подальшої очистки може бути застосований у харчовій промисловості для вітамінізації молока, круп, дієтичних продуктів, дитячого харчування та в якості харчового барвника, оскільки він є безпечним та органічним для людини, також може бути застосований у медицині.

Ароматична олія, отримана за даною технологією, може бути використана у харчовій промисловості для надання аромату кондитерським виробам та напоям, у парфюмерно-косметичній промисловості для створення парфумованих виробів, різноманітних косметичних засобів та для надання аромату побутовій хімії, у хіміко-фармацевтичній промисловості при створенні лікарських засобів, продуктів ароматерапії та ін.

Технологічний процес одержання рибофлавіну складається із допоміжних робіт і стадій основного технологічного процесу. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: санітарна підготовка виробництва, що включає підготовку персоналу, приміщень, обладнання, приготування миючих і дезинфікуючих розчинів; підготовку стерильного технологічного повітря, поживного середовища, приготування посівного матеріалу у колбах та інокуляторі.

Стадії допоміжних робіт, стадії пакування, маркування, відвантаження готової продукції, знешкодження відходів, вентиляційних та технологічних викидів, знешкодження відходів, що використовуються є стандартними для біотехнологічних виробництв.

До основного технологічного процесу відноситься культивування продуцента у ферментері, стадії виділення цільового продукту, сушіння.

ДР 1 САНІТАРНА ПІДГОТОВКА ВИРОБНИЦТВА

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Персонал, який працює на біотехнологічному виробництві у відповідності з встановленою програмою проходить навчання для кваліфікованого виконання своїх обов'язків та заходів з охорони праці. Інструктаж проводиться 1 раз на рік. Під час навчання детально обговорюється концепція забезпечення якості продукції, підготовка та проведення технологічного процесу.

До виробництва допускаються особи, які досягли 18 років, пройшли медкомісію, інструктаж з техніки безпеки.

Працівники в процесі виробництва використовують спецодяг, засоби індивідуального захисту (халати, захисні окуляри, гумові рукавички, респіратори). Без спецодягу, а також в забрудненому чи неконденційному спецодязі працівники до роботи не допускаються. Забороняється у виробничі приміщення вносити верхній одяг, а також продукти харчування та інші сторонні предмети.

ДР 1.2 Підготовка приміщень

Підготовка виробничих приміщень включає комплекс заходів, що складаються з вологого прибирання і дезінфекції поверхонь приміщень і обладнання. Прибирання приміщень проводиться після закінчення технологічного процесу або наприкінці зміни вологим способом з використанням дезрозчинів.

Для унеможливлення контамінації процесу біосинтезу у приміщеннях необхідно проводити щоденне та генеральне (раз на тиждень) прибирання. При щоденному прибиранні виробничих приміщень (миття підлоги та поверхонь обладнання) обробку проводять розчином перекису водню (масова частка 3%) з

0,5% миючого засобу. Кожен тиждень проводять генеральне прибирання виробничих приміщень з використанням дезінфікуючих і миючих засобів.

Підготовка приміщень мікробіологічної лабораторії. Для зниження обнасіненості повітря та поверхонь обладнання кожен зміну проводять вологе прибирання приміщень з застосуванням миючих засобів. Кожен зміну проводять обробку поверхонь (столів, підлоги, обладнання) з застосуванням перекису водню з масовою часткою 3%. Знезараження приміщень мікробіологічної лабораторії проводять бактерицидними лампами щодня упродовж 2-3 год. Перед початком та після закінчення роботи столи обробляють етиловим спиртом.

ДР 1.3 Підготовка обладнання та комунікацій

Миття та дезінфекція обладнання. На підприємстві, після закінчення чергового технологічного циклу, здійснюють миття обладнання. Для цього в усьому обладнанні яке працює під тиском чи вакуумом доводять тиск до 0, відкривають кришки та люки апаратів і ретельно промивають їх розчином миючого засобу та водою водопровідною.

Частини обладнання, що безпосередньо торкаються поживного середовища та культуральної рідини, необхідно мити в розчині миючого засобу разом з дезінфікуючими розчинами (етиловий спирт, H_2O_2), при температурі 50-60°C. Дезінфікуючі розчини періодично чергують, для попередження появи стійких форм мікроорганізмів.

З'ємні частини обладнання, які взаємодіють з препаратом, знімають, розбирають, ретельно миють в розчині миючого засобу з дезінфікуючими засобами (етиловий спирт, H_2O_2), при температурі 50-60°C.

Після миття внутрішні поверхні обладнання та комунікації ополіскують кілька разів водою очищеною з обов'язковим контролем якості відмивки. З'ємні частини обладнання після дезінфекції теж ополіскують кілька разів водою очищеною.

Зовнішні поверхні обладнання обробляють як і виробничі приміщення.

Перевірка обладнання на герметичність. Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,05-0,06 МПа. Якщо упродовж 30 хв тиск (по манометру) не знижується більш ніж на 0,005 МПа обладнання вважають герметичним. Фланцеві з'єднання та зварні шви головного фільтру, посівного апарату, ферментеру перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,05 до 0,06 МПа.

Обов'язково раз на тиждень на герметичність перевіряють посівну лінію з усуненням усіх можливих пропусків. Під паровим тиском перевіряють всі матеріальні, посівні і конденсатні вентилі та трубопроводи.

Стерилізація. *Стерилізація головного фільтру та комунікацій.* Головний фільтр стерилізують гострою парою, яка подається під тиском 0,18-0,20 МПа, при температурі $130\pm 2^{\circ}\text{C}$ упродовж 2 год. Після стерилізації знижують тиск до 0,04 МПа та продувають фільтр повітрям до повного видалення вологи. Повітря після головного фільтру контролюють на стерильність.

Стерилізація індивідуального фільтру та комунікацій. Стерилізацію індивідуального фільтру, приєднаних до фільтру арматури та трубопроводів здійснюють разом, за допомогою гострої пари, при температурі 126-132°C упродовж години. Стерилізацію індивідуальних фільтрів проводять перед кожною ферментацією. Повітря після індивідуального фільтру контролюють на стерильність.

Стерилізація посівного апарату та виробничого ферментеру. Після перевірки інокулятора, ферментера, комунікацій на герметичність стерилізацію проводять гострою парою під тиском 0,18-0,20 МПа при температурі 125-130 °C упродовж години. В апарати подається пара на всі вузли та через всі вентилі пов'язані з стерильною зоною. Початком стерилізації вважають момент досягнення температури 125-130 °C та тиску 0,2 МПа.

ДР 1.4 Приготування дезінфікуючих розчинів

Приготування дезінфікуючих розчинів здійснюють дотримуючись правил техніки безпеки. Дезінфікуючі розчини після приготування повинні зберігатися обмежений час у спеціальних попередньо вимитих ємностях, у яких передбачені прилади для відбору проб. Забороняється доливати свіжоприготовлений розчин в частково порожні ємності.

Для приготування 0,5% розчину миючого засобу для ручного миття технологічного устаткування та інвентарю через дозатор у змішувач наливають 5 мл миючого засобу та доливають 995 мл води очищеної температурою $(40 \pm 5)^{\circ}\text{C}$, старанно перемішують.

Робочі розчини перекису водню готують в скляному посуді шляхом розведення перекису водню водою очищеною. Використовують 30% розчин перекису водню. Для приготування розчину заданої концентрації в збірник подають воду очищену і через дозатор додають необхідну кількість перекису водню.

Розчин етилового спирту готують в чистій ємності, розводячи 96% спирт очищеною водою. Для приготування 1 л розчину етилового спирту з об'ємною часткою спирту 76% потрібно відміряти 792 мл 96% спирту та 208 мл очищеної води, перемішати.

ДР 2 ПІДГОТОВКА СТЕРИЛЬНОГО ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПОВІТРЯ

Повітря, яке використовується для аерації середовища у процесі отримання посівного матеріалу в інокуляторі та у процесі виробничого культивування в ферментері, повинно бути стерильним та мати температуру 28-30°C.

Забір атмосферного повітря

Забір зовнішнього повітря здійснюється через повітрязбірник, який розташований на 2 м вище даху будинку.

Попередня очистка повітря

Механічні частки розміром більше 5 мкм з повітря вилучають за допомогою фільтра періодичної дії сухого типу, у якому в якості фільтруючого матеріалу використовують пінополіуретан. Цей фільтр запобігає забрудненню вентилятора та знижує кількість контамінантів. Ефективність очистки складає не менш ніж 70%.

Транспортування повітря

Транспортування повітря здійснюється за допомогою поршневого компресора простої дії. При стисканні повітря у компресорі його температура підвищується з 15-25 °С на вході до 90-100 °С на виході.

Стабілізація термодинамічних показників

При виході з компресора встановлено теплообмінник трубчастого типу, куди повітря поступає для охолодження до 30°С. В якості холодоносія використовується оборотна вода. Далі повітря потрапляє до ресивера для згладжування пульсацій у тиску при роботі компресійного обладнання та видалення вологи. Повітря з ресиверу виходить під тиском 0,3 МПа. Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують. Для охолодження повітря запропоновано використовувати кожухотрубчастий теплообмінник з нерухомими трубними решітками.

Очистка повітря у головному фільтрі

Очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється в головному фільтрі. Використовують глибинні набивні фільтри періодичної дії. Заміна фільтруючого матеріалу проводиться 2 рази на рік. Як правило в якості фільтруючого матеріалу використовують скловолокно з діаметром 7 – 21мкм. Ефективність очистки 90 – 99%.

Стерилізація повітря в індивідуальному фільтрі

Заключна стадія стерилізації повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах Ф-4 та Ф-9, розташованих безпосередньо перед інокулятором та ферментером. Очищення повітря від мікроорганізмів проводиться в фільтрах тонкої очистки, як фільтрувальний елемент

використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном.

ДР 3. ПРИГОТУВАННЯ ТА СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПІНОГАСНИКА

В якості піногасника використовується соєва олія, яка стерилізується за температури 120 – 122 °С та тиску 0,12 МПа протягом 2 годин.

ДР 4. ПІДГОТОВКА СТЕРИЛЬНОГО ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА

Приготування розчинів для титрування

Для доведення рН розчинів поживних середовищ до необхідного значення готують 6 %-ий розчин NaOH. У реактор вносять 3 кг сухого гідроксиду натрію і доводять водопровідною водою до загального об'єму 50 л.

Для доведення рН розчинів поживних середовищ до необхідного значення та культуральної рідини після ферментації до 4,5-5,0 готують 6 %-ий розчин HCl. У реактор вносять 3 л соляної кислоти концентрованої і доводять водопровідною водою до загального об'єму 50 л.

Приготування і стерилізація середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Для вирощування штаму-продуцента *E. ashbyi* F-340 у колбах на качалках використовують поживне середовище на основі ГФС-10 такого складу (г/дм³): ГФС-10 – 40; пептон – 1,0; дріжджовий екстракт – 10,0.

Для приготування 100 см³ поживного середовища у колбах у водопровідну воду визначеного об'єму вносять компоненти в такій кількості (г):

ГФС-10 – 4 г;

дріжджовий екстракт – 0,1 г;

пептон – 1 г.

Стерилізують в автоклаві при температурі 120°C протягом 60 хв. Доводять рН до 6,0 стерильним розчином NaOH.

Приготування і стерилізація середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Склад середовища для культивування штаму продуцента рибофлавіну в посівному апараті аналогічний середовищу культивування в колбах на качалці.

В простерилізований та охолоджений апарат заливають 6,5 дм³ водопровідної води (з врахуванням 10 % утворюваного конденсату і внесення компонентів середовища, об'єм поживного середовища складає 7,5 дм³) і при постійно працюючій мішалці зважують складові в такій кількості:

ГФС-10 – 300 г;

дріжджовий екстракт – 75 г;

пептон – 7,5 г.

Стерилізують гострою парою за температури 120°C упродовж години безпосередньо в апараті. Після охолодження до 30°C доводять рН середовища до 6,0 стерильним розчином NaOH.

Приготування і стерилізація середовища для виробничого біосинтезу

Для вирощування *E. ashbyi* F-340 у виробничому ферментері використовують модифіковане поживне середовище на основі ГФС-10 наведеного вище складу.

Поживне середовище для культивування готують безпосередньо у ферментері, загальний об'єм якого - 1 м³. У стерильний апарат заливають 0,41 м³ водопровідної води (з врахуванням 10% утворюваного конденсату і внесення добавок, об'єм поживного середовища збільшується до 0,5 м³) і вносять складові в такій кількості:

ГФС-10 – 20 кг;

дріжджовий екстракт – 5 кг;

пептон – 0,5 кг.

Стерилізують у ферментері при температурі 120°C протягом години. Стерильним розчином NaOH доводять рН отриманого середовища до 7,5, що є оптимальним для культивування штаму-продуцента *E. ashbyi* F-340 з метою максимального накопичення рибофлавіну.

ДР 5 ПІДГОТОВКА ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ

Культура виробничого штаму *E. ashbyi* F-340 протягом 3 місяців може зберігатися на агаризованому середовищі ГПД в пробірках у холодильнику при 5°C. Музейна культура, що буде зберігатись протягом тривалого часу (більше 7 місяців), повинна знаходитись при кімнатній температурі.

ДР 5.1 Відновлення музейної культури

На першому етапі отримання посівного матеріалу здійснюють перевірку культури на рівень накопичення рибофлавіну та, за необхідності, здійснюють підтримуючу селекцію. Для цього перед запуском чергового виробничого циклу з музейної культури штам пересівають у колби на 250 см³ з 50 см³ рідкого середовища ГПД та культивують 7 діб при 28°C на роторному шейкері при перемішуванні 180 об/хв. Культура висівається на чашки Петрі з ГПД середовищем так, щоб отримати одиничні колонії, та для подальшої роботи відбираються колонії, які мають інтенсивне яскраво-жовте забарвлення та інтенсивно забарвлюють поживне середовище. Відібрані колонії переносяться у колби з рідким середовищем на основі ГФС-10 (середовище, що використовується у посівному апараті), умови культивування наведені вище. Вміст рибофлавіну в культуральній рідині має становити не менше 200 мг/дм³. У випадку, якщо накопичення рибофлавіну значно зменшується, необхідно провести опромінення культури УФ-променями, як описано в підрозділі 4.1.

Всі роботи з музейною культурою проводяться в строго асептичних умовах відповідальною особою.

ДР 5.2 Отримання посівного матеріалу в колбах

Активну музейну культуру пересівають в дві колби на 250 см^3 з 50 см^3 поживного середовища, що використовується в посівному апараті. Колби з середовищем попередньо стерилізують в автоклаві 40 хвилин при надлишковому тиску 0,12 МПа. Після охолодження вмісту колби до $28 - 30^\circ\text{C}$ в колбу стерильно здійснюють засів 1 см^3 активної музейної культури і ставлять колбу на качалку, яка робить 180 об/хв. Вирощування посівного матеріалу в колбах ведеться при температурі 28°C протягом 72 годин. Одержаний посівний матеріал перевіряють на відсутність контамінуючої мікрофлори розсівом на МПА і мікроскопіюванням.

ДР 5.3 Отримання посівного матеріалу в інокуляторі

Вирощування посівного матеріалу проводять в лабораторному інокуляторі Р-2 на 15 дм^3 з заповненням 0,5 через значне піноутворення. Технологічний режим вирощування посівного матеріалу: при ввімкненій мішалці та барботері заливається $7,5\text{ дм}^3$ стерильного поживного середовища. Після чого інокулятор засівають культурою з колб у кількості 75 см^3 через посівний штуцер. Перед засівом подачу повітря в інокулятор припиняють і тиск знижують повністю. Після цього закривають і вихідний вентиль. Перед внесенням культури навколо посівного штуцера створюють зону полум'я за допомогою спиртівки. Потім обережно викручують пробку. Краї посівної колби обпалюють в полум'ї факела і вміст її переносять в інокулятор. Після цього в посівний апарат знову пускають повітря, відкривши повністю вхідний вентиль, і підтримують надлишковий тиск в межах 10^4 Па , регулюючи вихід повітря. Одразу після засіву (1 % посівного) проводять мікробіологічний контроль.

Вирощування посівного матеріалу здійснюється при постійній аерації і перемішуванні з підтриманням температури $28-30^\circ\text{C}$. Температурний режим підтримується за допомогою подачі в сорочку гарячої води. Витрати повітря на вирощування – $1-1,2\text{ м}^3/\text{м}^3\cdot\text{хв}$. Вирощування культури проводять протягом 72 годин.

Для контролю за процесом вирощування кожні 12 годин із апарату відбирають проби, які перевіряють на відсутність контамінуючої мікрофлори розсівом на МПА і мікроскопіюванням.

Після закінчення процесу інокулюм передається у ферментер по стерильним комунікаціям, які попередньо повинні бути простерилізовані протягом години паром з надлишковим тиском 0,1 МПа.

ТП 6 КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТА У ФЕРМЕНТЕРІ

Виробничу культуру отримують глибинним способом в ферментері Р-8 об'ємом 1 м³, коефіцієнт заповнення 0,6. Після охолодження простерилізованого поживного середовища до температури 30°C, вноситься отриманий посівний матеріал з інокулятора у кількості 1% від кількості поживного середовища.

Виробничий біосинтез ведеться при температурі 28-30°C, при безперервному перемішуванні та аерації. Режим аерації 1,5-2 м³/м³·хв. За необхідністю в ході процесу стерильно додають піногасник - соєву олію. Протягом усього процесу ферментації через кожні 12 годин відбирають пробу культурної рідини в асептичних умовах для дослідження морфологічного стану міцелію, відсутності сторонньої мікрофлори, вмісту вуглеводів, кількості синтезованого рибофлавіну і визначення рН культуральної рідини. Штуцер для відбору проб пропарюють до і після відбору проб. Інший час штуцер щільно закритий.

Тривалість біосинтезу від 120 до 125 годин.

Одержана культуральна рідина повинна відповідати наступним параметрам: вміст рибофлавіну – 350 мг/дм³; концентрація біомаси – 4,5–6,7 г/дм³.

Культуральну рідину передають у збірник, рН доводять розчином HCl до 4,5-5,0, оскільки за такого значення рН рибофлавін є стабільним.

ТП 7 ГІДРОДИСТИЛЯЦІЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ

Культуральна рідина подається по лінії з відділення ферментації в завантажувальний люк апарату для гідродистляції ГД-12. Завантажений апарат закривають та подають в сорочку апарату пару з тиском не менше 0,29 МПа та нагрівають вміст апарату до кипіння. З появою дистиляту з холодильника ТО-20, що приєднаний до апарату, починають подавати гостру пару через барботер та зменшують подачу пари в сорочку. Подачу пари в сорочку та гострої пари регулюють таким чином, щоб не допустити збільшення об'єму в апараті. Відганяють 150-180 % дистиляту від маси сировини зі швидкістю відгону 10-12 %. Процес триває 4-5 годин.

По закінченню процесу гідродистилляції зупиняють подачу пари, відкривають завантажувальний люк, беруть проби на аналіз відходів. Залишок, що залишився в апараті гідродистилляції, передається на стадію ТП 10 для виділення рибофлавіну.

Дистилят, охолоджений у холодильнику до температури 28-32°C, поступає у олієвіддільник-флорентину Фл-21, де відділяється первинна олія у кількості 5-10 % від загального виходу. Дистилят передається до стадії ТП 8.

ТП 8 ЕКСТРАКЦІЯ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ ОРГАНІЧНИМ РОЗЧИННИКОМ

Вторинна ефірна олія, що складає 90-95 % всієї маси, виділяється методом трьохкратної екстракції за допомогою гексану. Дистилят подається в екстрактор, куди зі збірника при перемішуванні завантажуються гексан у співвідношенні 3:1.

ТП 9 ВІДГІН ОРГАНІЧНОГО РОЗЧИННИКА

Після вилучення ефірної олії гексаном та розділення рідин, отриману місцелу об'єднують та відганяють розчинник. Відгонка відбувається в дві стадії. На першій стадії під атмосферним тиском в апаратах концентрація місцели збільшується до 50-80 %, на другій стадії під вакуумом відганяють розчинник, що залишився. Апарати обігрівають гарячою водою температурою 80°C. Пари розчинника, що утворюються у випарнику, охолоджують у холодильнику, після чого розчинник повертається у виробництво. Отримана вторинна ефірна олія об'єднується з первинною та передається на стадію ПМВ.

ТП 10 ВІДДІЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ БІОМАСИ

Залишок після гідродистиляції зі стадії ТП 7 містить рештки продуцента та рибофлавін у розчинному стані. Залишок з апарату для гідродистиляції вивантажують через нижній штуцер та подають на центрифугу Ц-15 зі швидкістю обертання 3000 об/хв. Отриманий в результаті центрифугування фугат передають на стадію виділення рибофлавіну ТП 11, а осад на стадію знешкодження відходів.

ТП 11 ВИДІЛЕННЯ ОСАДУ РИБОФЛАВІНУ

До фугату, що містить рибофлавін у розчинному стані, при безперервному перемішуванні у Р-17 без доступу повітря додають гідросульфід натрію (який є відновником) у співвідношенні 1:1 по відношенню до рибофлавіну. При цьому випадає осад зеленого кольору, що властивий лейкофлавіну. Осад відділяють центрифугуванням на Ц-19 при 10-15°C. Фугат зливають в каналізацію. Осад передають на стадію сушіння ТП 12.

ТП 12 СУШІННЯ РИБОФЛАВІНУ

Осад рибофлавіну висушують на розпилюючій сушарці, попередньо розбавивши водою до вмісту сухих речовин 10-13%. Розчин зі збірника насосом подається на розпилювальну сушарку, туди ж надходить нагріте до 190°C атмосферне повітря. Розпилений продукт проходить через потік гарячого повітря, висушується, падає на дно камери і виводиться з сушарки по транспортуючій магістралі.

Відпрацьований сушильний агент перед видаленням в атмосферу проходить через систему циклонів та надходить на подальшу доочистку, де з нього відокремлюються частинки висушеного рибофлавіну.

Порошок рибофлавіну подається на пакування.

ПМВ 13 ПАКУВАННЯ, МАРКУВАННЯ, ВІДВАНТАЖЕННЯ ПРОДУКТУ

Ефірна олія пакується у скляні флакони по 50 мл. Рибофлавін у скляні флакони по 100 г.

Маркування виконується державною мовою і мовою, що обумовлена в контракті на поставку. На кожен пакувальну одиницю наносять маркування або наклеюють етикетку, що містить наступні дані: назва підприємства-виробника, його адреса, товарний знак, номер партії, маса нетто, дата виготовлення, строк придатності до використання.

ЗВ 8. ЗНЕШКОДЖЕННЯ ВІДХОДІВ

Останньою стадією технологічного процесу є регенерація і знешкодження відходів, а саме некондиційного посівного матеріалу та промивних вод і вентиляційного та технологічного повітря при їх викидах в атмосферу, партій бракованого препарату, залишків пакувальних матеріалів тощо. Дана стадія забезпечує екологічну чистоту виробництва отримання цільових препаратів.

ЗВ 8.1. Нейтралізація та каналізування стоків

Схема очистки стічних вод включає первинну і вторинну очистку. Первинна включає механічне відділення забруднень (вловлювання крупних домішок), а вторинна – очистка стічних вод в системі очисних споруд.

ЗВ 8.2. Очистка повітряних викидів

Очистка повітря від механічних домішок здійснюється в циклонах. Очищене повітря йде в атмосферу, а твердий осад – змішується зі стоками (ЗВ 8.1) і подається на біологічну очистку.

Технологічна схема одержання рибофлавіну та ефірної олії представлена на рис. 7.1, апаратурно-технологічна схема – на рис. 7.2.



Рис. 7.1 Технологічна схема отримання рибофлавіну та ефірної олії з використанням *E. ashbyi* F-340

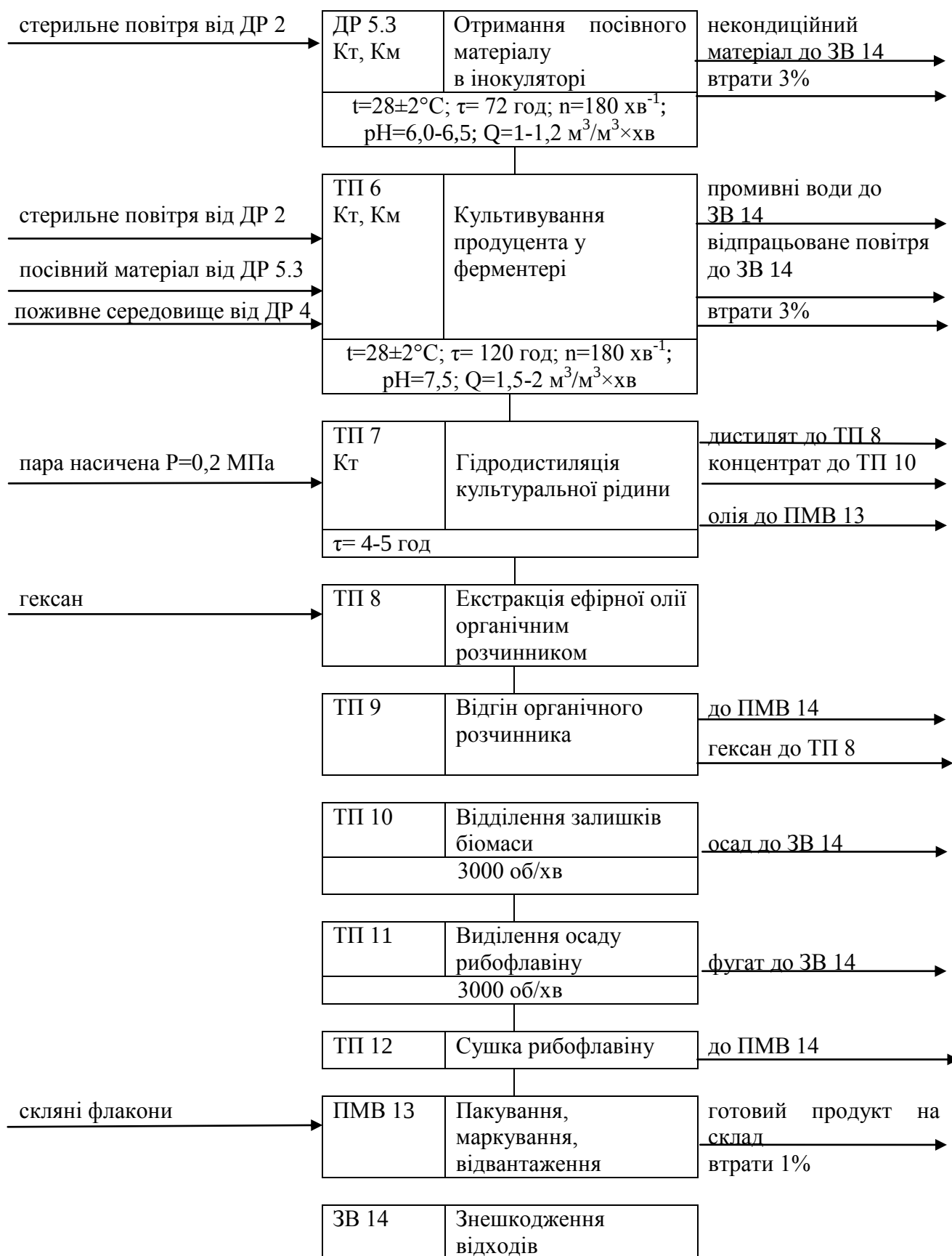


Рис. 7.1. Аркуш 2

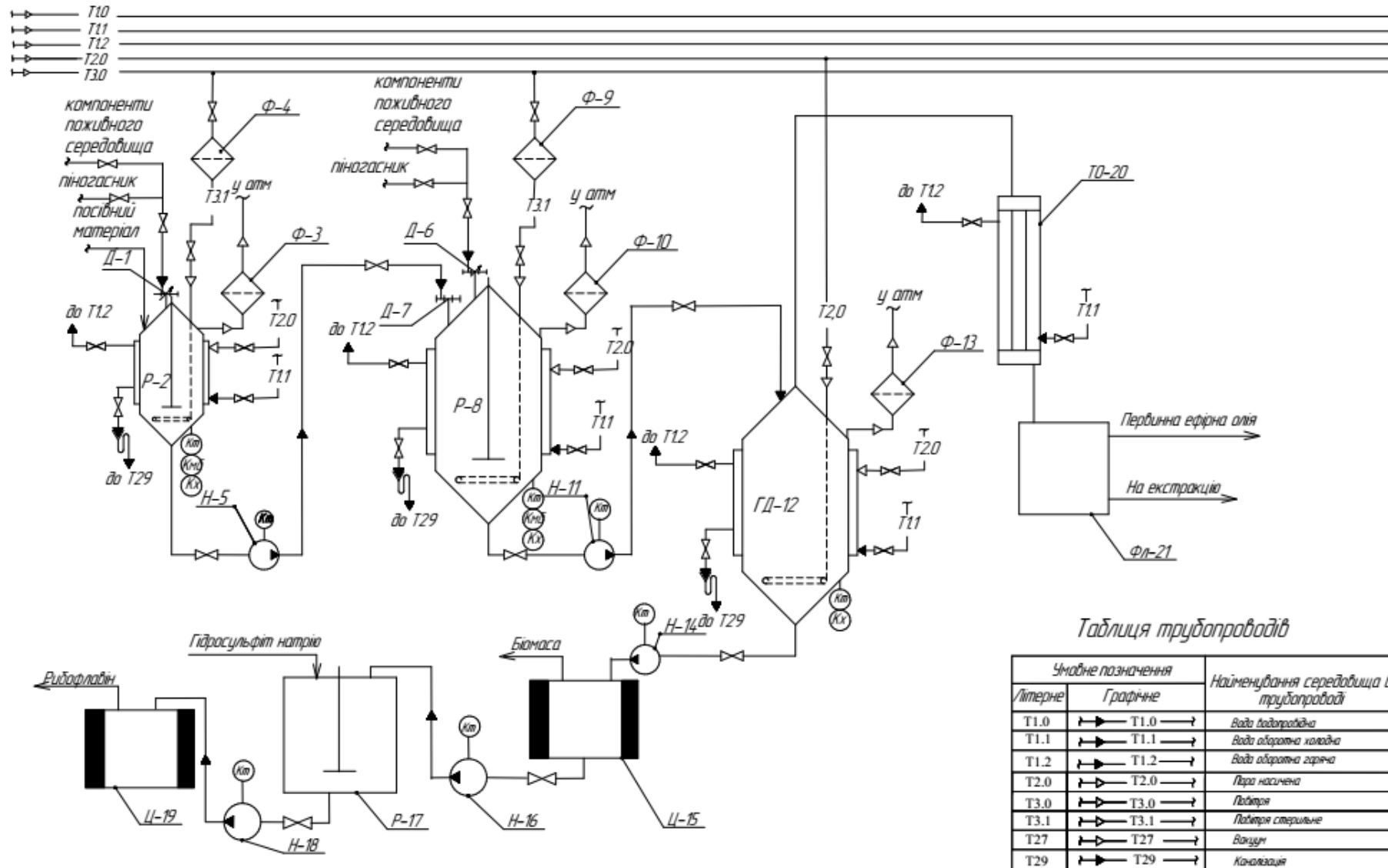


Рис. 7.2 Апаратурно-технологічна схема виробництва рибофлавіну та ефірної олії

Р – реактор, Ф – фільтр, Д – дозатор, Н – насос, ГД – гідродистильатор, ТО – теплообмінник, Фл - флорентина

Висновки до розділу 7

Запропоновано технологію, у якій пропонується одночасне виробництво двох цільових продуктів: технічного рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди. Вдосконалення технології досягнуто за рахунок застосування оптимальних параметрів культивування (рН, температура, перемішування) та модифікованого середовища на основі ГФС-10.

Технологічний процес складається із допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, що включає підготовку персоналу, приміщень, обладнання, приготування миючих і дезинфікуючих розчинів; підготовку стерильного технологічного повітря, поживного середовища, приготування посівного матеріалу у колбах та інокуляторії) та стадій основного технологічного процесу.

На першому етапі виділення цільових продуктів запропоновано використовувати метод гідродистиляції, що дозволить відділити компоненти ефірної олії у вигляді дистиляту від концентрату, що містить залишки біомаси та рибофлавін. Для подальшого виділення ефірної олії запропоновано використовувати метод екстракції, а виділення рибофлавіну здійснюється осадженням відновником.

Основні результати розділу опубліковані у працях [168, 169, 173].

ВИСНОВКИ

На основі експериментальних досліджень розроблено науково обґрунтовану технологію отримання рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди з використанням *E. ashbyi* F-340 з вітчизняної відновлюваної сировини – глюкозо-фруктозного сиропу, що виготовляється з кукурудзи. Використання таких шляхів вдосконалення технології, як оптимізація поживних середовищ та умов культивування, дало змогу підвищити вихід рибофлавіну у 17 разів, ефірної олії – у 12 разів.

1. Встановлено, що найбільш інтенсивно накопичення рибофлавіну відбувається у стаціонарній фазі росту на 3–4 добу культивування, коли його концентрація досягає $34,1 \pm 1,6$ мг/дм³. Другий етап накопичення рибофлавіну відбувається на 5–7 добу, що пов'язано з автолізом культури (вміст рибофлавіну становить $55,2 \pm 2,7$ мг/дм³). Під час інтенсивного росту штаму спостерігається зниження рН до 5,2, інтенсивне накопичення рибофлавіну у культуральній рідині та у біомасі пов'язане з підвищенням рН до 7,8. Встановлено, що рибофлавін спочатку накопичується у міцелії *E. ashbyi*, де досягає рівня 8,1-10,7 мг/г сухої, починаючи з 5 доби кількість рибофлавіну у міцелії зменшується. Максимальна кількість ефірної олії накопичується в експоненціальній фазі росту та становить 31 ± 2 мг/дм³.

2. Запропоновано методи збільшення біосинтетичної здатності штаму-продуценту за допомогою підтримуючої селекції та ультрафіолетового опромінення міцелію гриба, що підвищують синтез рибофлавіну на 70–80 %. За результатами проведених досліджень рекомендовано додати до технологічної схеми отримання рибофлавіну стадію ультрафіолетового опромінення посівного матеріалу у разі зниження продуцентом рівня біосинтетичної здатності.

3. Встановлено, що найбільшому виходу рибофлавіну сприяє використання посівного матеріалу у віці 3-4 діб та у кількості 1%.

4. Максимальний приріст біомаси спостерігається за вирощування на поживних середовищах з рН 5,5–6,0, максимальне накопичення рибофлавіну – при рН 7,5. Зниження рівня перемішування в процесі глибинного культивування штаму-продуценту зі 180 об/хв до 70 об/хв призводить до зменшення рівня накопичення рибофлавіну на 70 %. При цьому приріст біомаси збільшується на 20 %.

5. Доведено, що для процесів біосинтезу рибофлавіну та накопичення біомаси культурою *E. ashbyi* необхідні різні джерела карбону. Для біосинтезу рибофлавіну краще підходять моносахариди (фруктоза, галактоза) та шестиатомний спирт сорбіт, біомаса краще накопичується при наявності в середовищі фруктози, сахарози та гліцерину. Кращим джерелом нітрогену для *E. ashbyi* F-340 виявився дріжджовий екстракт, кількість рибофлавіну, синтезованого на середовищі з дріжджовим екстрактом виявилась на 54–60% більшою, ніж на інших джерелах нітрогену.

6. Для рибофлавіну серед комплексних поживних середовищ найкращий результат було отримано на середовищі, що містило у своєму складі пивне сусло. Продуцентом синтезовано рибофлавіну $77,0 \pm 3,85$ мг/дм³, що у 2,8 рази більше ніж на глюкозо-пептонно-дріжджовому середовищі та соєвому середовищі. Приріст біомаси становить $4,16 \pm 0,17$ г/дм³, що у 2 рази більше, ніж на ГПД.

7. Вперше показана можливість культивування продуценту на середовищі, що в якості джерела карбону містить глюкозо-фруктозний сироп (ГФС-10). Застосування ГФС-10 призвело до збільшення виходу рибофлавіну в 7 разів, ефірної олії у 5 разів у порівнянні з глюкозо-пептонно-дріжджовим середовищем.

8. Доведено здатність *Eremothecium ashbyi* синтезувати ефірну олію з ароматом троянди у великому варіаційному діапазоні. Найбільша кількість ароматутворюючих речовин синтезується на середовищі з ГФС-10 (273...420 мг/дм³).

9. За допомогою методів математичного планування визначено склад модифікованого середовища для продукування рибофлавіну (склад: ГФС-10 40 г/дм³, дріжджовий екстракт 10 г/дм³, пептон 1 г/дм³), що забезпечило збільшення його виходу в 2,5 рази та збільшення виходу ефірної олії в 2,3 рази.

10. На основі результатів досліджень розроблено технологічну схему одночасного промислового отримання рибофлавіну та ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Спиричев В. Б. Теоретические и практические аспекты современной витаминологии / В. Б. Спиричев // Український біохімічний журнал. – 2004. – Т. 76. – №4. – С. 32–53.
2. До 20-річчя Чорнобильської аварії. Вивчення вітамінного статусу та забезпеченості мікро- та макроелементами окремих груп людей в різні періоди часу після аварії на ЧАЕС / В. Б. Спірічев, Г. В. Донченко, Н. В. Блажеєвич та ін. // Український біохімічний журнал. – 2006. – Т. 78. – №2. – С. 5–26.
3. Massey V. The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin / V. Massey // Biochemical Society Transactions. – 2000. – V. 28. – P. 283–296.
4. Kalingan A. E. The kinetics of riboflavin secretion by *Eremothecium ashbyi* nr1363 / A. E. Kalingan // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 1998. – V. 18. – № 6. – P. 445–449.
5. Guilliermond A., Fontaine M., Raffy A. Sur l'existence dans l'*Eremothecium ashbyii* d'un pigment jaune se rapportant au groupe des flavines. / A. Guilliermond, M. Fontaine, A. Raffy // C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. – 1935. – V. 201. – P. 1077–1080.
6. Kalingan A. E. Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Eremothecium ashbyi* NRRL 1363 / A. E. Kalingan, Liao Chung-Min // Bioresource Technology. – 2002. – V. 82. – P. 219–224.
7. Pujari V. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyi* / V. Pujari, T. S. Chandra // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2000. – V. 23 – № 3. – P. 303–307.
8. Improved riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* using glucose and yeast extract / X. Cheng, J. Zhou, L. Huang, K. Li // African Journal of Biotechnology. – 2011. – №10. – С. 15777–15782.
9. О биосинтезе компонентов эфирного масла грибом *Eremothecium ashbyi* (структурно-функциональные особенности) / А. Н. Погорельская, П. С. Бугорский, Е. Ф. Семенова, Н. П. Бузулукова, Е. И. Горнунг // Вестник

Российской академии с.-х. наук. – 2003. – № 1. – С. 83–85.

10. Semenova E. F. About essential oils biotechnology on the base of microbial synthesis / E. F. Semenova, A. I. Shpichka, I. Ya. Moiseeva // European Journal Of Natural History. – 2012. – № 4. – P. 29–31.

11. Шпичка А. И. Современное состояние и перспективы развития биотехнологии на основе эремотеция – продуцента рибофлавина и эфирного масла / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 11. – С. 87–98.

12. Шпичка А. И. Маркетинговый анализ разработки биотехнологии эремотецевого масла как инновационной технологии современного эфиромасличного производства / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова // Научное обозрение. Биологические науки. – 2016. – № 5. – С. 28–49.

13. Семенова Е. Ф. Накопление ароматического и монотерпеновых спиртов штаммами *Eremothecium ashbyi* с различным уровнем рибофлавиногенеза / Е. Ф. Семенова, А. И. Шпичка, Е. В. Преснякова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 3. – С. 333–340.

14. Экспериментальная витаминология (справочное руководство) / Под ред. Ю. М. Островского. – Минск: «Наука и техника», 1979. – 552 с.

15. Березовский В. М. Химия витаминов / В. М. Березовский. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 632 с.

16. Abbas C. A. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers / C. A. Abbas, A. A. Sibirny // Microbiology and molecular biology reviews. – 2011. – V. 75. – № 2. – P. 321–360.

17. Шнайдман Л. О. Производство витаминов / Л. О. Шнайдман. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 443 с.

18. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline / Institute of Medicine. – Washington, DC: National Academy Press, 1998. – 592 p.

19. Методы оценки и контроля витаминной обеспеченности населения / Под ред. В. Б.Спиричева. – М.: Изд-во «Наука», 1984. – с. 72–78.
20. Коферменты / Под ред. В. А. Яковлева. – М.: Медицина, 1973. – 375 с.
21. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник / Под ред. И. М. Скурихина, В. А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 236 с.
22. Федоров А. О. Споживча характеристика мікрокомпонентів харчових продуктів / А. О. Федоров, Т. Л. Шкабара, В. О. Федорова // Вісник Чернівецького торговельно-економічного інституту. Економічні науки. – 2013. – № 2. – С. 367–374.
23. Норми фізіологічних потреб населення України в основних речовинах та енергії: Додаток до наказу Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України від 18.11.99 № 272.
24. Павлоцька Л. Ф. Основи фізіології, гігієни харчування та проблеми безпеки харчових продуктів: навчальний посібник / Л. Ф. Павлоцька, Н. В. Дуденко, Л. Р. Димитрієвич. – Суми: ВТД «Університетська книга», 2007. – 441 с.
25. Григоренко О. М. Роль вітамінів у харчуванні людини / О. М. Григоренко // Харчова наука і технологія. – 2010. – № 3 (12). – С. 33–36.
26. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre. / C. Boehnke, U. Reuter, U. Flach, S. Schuh-Hofer, K. M. Einhaupl, G. Arnold // European Journal of Neurology. – 2004. – V. 11. – P. 475–477.
27. Akompong T. In vitro activity of riboflavin against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* / T. Akompong, N. Ghori, K. Halder // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2000. – V. 44. – P. 88–96.
28. Coimbra C. G. High doses of riboflavin and the elimination of dietary red meat promote the recovery of some motor functions in Parkinson's disease patients / C. G. Coimbra, V. B. Junqueira // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2003. – V. 36. – P. 1409–1417.

29. Riboflavin, MTHFR genotype and blood pressure: A personalized approach to prevention and treatment of hypertension / H. McNulty, J. J. Strain, C. F. Hughes, M. Ward // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2017. – V. 53. – P. 2–9.

30. Про затвердження переліку харчових добавок, дозволених для використання у харчових продуктах. Кабінет Міністрів України; Постанова, Перелік від 04.01.1999 № 12.

31. Капустяк К. Спільний вплив мутацій *red2* і *red3* на біосинтез рибофлавіну та фериредуктазну активність у дріжджів *Pichia guilliermondii* / К. Капустяк, М. Стенчук // Вісник Львівського національного університету. Серія біологічна. – 2001. – № 27. – с.

32. Плейотропный характер мутаций *rib80*, *hit1* и *red6*, нарушающих регуляцию биосинтеза рибофлавина у дрожжей *Pichia guilliermondii* / Л. Р. Фаюра, Д. В. Федорович, Т. М. Прокопів, Ю. Р. Борецкий, А. А. Сибирный // *Микробиология*. – 2007. – Т. 76. – №1. – С. 66–71.

33. Stahmann K. P. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production / K. P. Stahmann, J. L. Revuelta, H. Seulberger // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2000. – V. 53. – № 5. – P. 509–516.

34. Lim S. H. Microbial Production of Riboflavin Using Riboflavin Overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famata*: An Overview / S. H. Lim, J. S. Choi, E. Y. Park // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2001. – V. 6. – P. 75–88.

35. Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази / О. П. Іщук, В. Ю. Яцишин, К. В. Дмитрук, А. Я. Воронський, Д. В. Федорович, А. А. Сибірний // *Український біохімічний журнал*. – 2006. – Т. 78. – №5. – С. 63–64.

36. Конструювання надпродуцентів рибофлавіну (вітаміну B₂) дріжджів *Candida famata* / К. В. Дмитрук, В. Ю. Яцишин, А. Я. Вороновський,

Д. В. Федорович, А. А. Сибірний // Наука та інновації. – 2009. – Т. 5. – №6. – С. 70–74.

37. Кондратьева В. И. Итоги изучения жизненного цикла гриба *Eremothecium ashbyi* (Routine) Batra / В. И. Кондратьева, Г. И. Наумов // Микология и фитопатология. – 1990. – Т. 24. – вып.3. – С. 271–275.

38. Kalingan A. E. Application of agro-industrial by-products for riboflavin production by *Eremothecium ashbyi* NRRL 1363 / A. E. Kalingan, M. R. V. Krishnan // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1997. – V. 47. – № 3. – P. 226–230.

39. Metabolic Engineering of the Purine Pathway for Riboflavin Production in *Ashbya gossypii* / A. Jimenez, M. A. Santos, M. Pompejus, J. L. Revuelta // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – V. 71. – №10. – P. 5743–5751.

40. Шавловский Г. М. Сверхсинтез флавинов у дрожжей / Г. М. Шавловский, Е. М. Логвиненко // Украинский биохимический журнал. – 1985. – Т. 57. – № 4. – С. 98–112.

41. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs / Q.-L. Wu, T. Chen, Y. Gan, X. Chen, X.-M. Zhao // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 76. – № 4. – P. 783–794.

42. Enhancement of riboflavin production by deregulating gluconeogenesis in *Bacillus subtilis* / G. Wang, L. Bai, Z. Wang, T. Shi, T. Chen, X. Zhao // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 2014. – V. 30. – P. 1893–1900.

43. Oraei M. Optimization of Effective Minerals on Riboflavin Production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051 Using Statistical Designs / M. Oraei, S. H. Razavi, F. Khodaiyan // Avicenna Journal of Medical Biotechnology. – 2018. – V. 10. – № 1. – P. 49–55.

44. Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes* / S. Koizumi, Y. Yonetani, A. Maruyama, S. Teshiba // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2000. – V. 53. – P. 674–679.

45. Contasti V. Riboflavin production by *Candida guilliermondii* from liquid brewery waste / V. Contasti, S. Bahar // Acta Cientifica Venezolana. – 1988. – V. 39. – P. 69–74.

46. Mutations affecting regulation of riboflavin synthesis and iron assimilation also cause oxidative stress in the yeast *Pichia guilliermondii* / Y. R. Boretsky, O. V. Protchenko, T. M. Prokopiv, I. O. Mukalov, D. V. Fedorovych, A. A. Sibirny // Journal of Basic Microbiology. – 2007. – V. 47. – № 5. – P. 371–377.

47. Improvement of riboflavin production using mineral support in the culture of *Ashbya gossypii* / S. H. Lim, H. Ming, E. Y. Park, J. S. Choi // Food Technology and Biotechnology. – 2003. – V. 41. – № 2. – P. 137–144.

48. Increased Riboflavin Production from Activated Bleaching Earth by a Mutant Strain of *Ashbya gossypii* / S. Tajima, Y. Itoh, T. Sugimoto, T. Kato, E. Y. Park // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2009. – V. 108. – № 4. – P. 325–329.

49. Isolation and characterization of an *Ashbya gossypii* from improved riboflavin production / S. Wei, H. James, J. Zhenglong, W. Siwen, W. Yuanyuan // Brazilian Journal of Microbiology. – 2012. – V. 43. – № 2. – P. 441–448.

50. Kurtzman C. P. Relationships among the genera *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya* and *Nematospora* determined from rDNA sequence divergence / C. P. Kurtzman // Journal of Industrial Microbiology. – 1995. – V. 14. – P. 523–530.

51. Kurtzman C. P. The yeasts: a taxonomic study / C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout. – Fifth edition Elsevier, 2011. – 2354 p.

52. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi / Ed. by P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. David, J. A. Stalpers. – 9th ed. – CABI Bioscience, 2001. – 624 p.

53. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi / P. M. Kirk, P. F. Cannon, D. W. Minter, J. A. Stalpers. – 10th edition. – CABI Europe, UK, 2008. – 771 p.

54. Kurtzman C. P. Phylogenetic relationships among yeasts of 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analysis / C. P. Kurtzman, C. J. Robnett // FEMS Yeast Research. – 2003. – V. 3. – P. 417–432.

55. The CABI Bioscience and CBS Database of Fungal Names [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.indexfungorum.org> (дата обращения: 10.01.2018).

56. Семенова Е. Ф. Культурально-морфологические и физиолого-

биохимические особенности видов рода *Eremotecium* S.F.Ashby et W.Nowell / Е. Ф. Семенова, А. И. Шпичка, И. Я. Моисеева // Фундаментальные исследования. – 2011. – №6. – С. 210–214.

57. Шпичка А. И. Структурно-функциональные аспекты онтогенеза фитопатогенных грибов *Eremothecium ashbyi* и *Eremothecium gossypii* / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова // Микология и фитопатология. – 2016. – Т. 50. – вып.1. – С. 53–61.

58. Шпичка А. И. Цитоморфологическое исследование представителей рода *Eremothecium* / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова, Е. В. Преснякова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Медицинские науки». – 2013. – №4. – С. 53–60.

59. Гарибова Л. В. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. Учебное пособие / Л. В. Гарибова, С. Н. Лекомцева. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 220 с.

60. Семенова Е. Ф. Морфологическое исследование некоторых представителей семейства *Eremotheciaceae* / Е. Ф. Семенова, А. И. Шпичка // Научные ведомости. Серия Естественные науки. – 2011. – №9. – С. 29–33.

61. Шпичка А. И. Биология микромицетов рода *Eremothecium* – продуцентов эфирного масла и рибофлавина: Дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.06. – М., 2013. – 163 с.

62. Kimura S. Mode of transmission and morphological structures of two *Eremothecium* species between *Riptortus pedestris* and soybean / S. Kimura, S. Tokumaru, K. Kuge // Journal of General Plant Pathology. – 2008. – V. 74. – №5. – P. 390–394.

63. Kimura S. *Eremothecium coryli* and *E.ashbyi* cause yeast spot of azuki bean / S. Kimura, S. Tokumaru, K. Kuge // Journal of General Plant Pathology. – 2009. – V. 75. – № 4. – P. 322–324.

64. Sengupta S. Sequence Analysis and Structural Characterization of a Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene from the Phytopathogenic Fungus

Eremothecium ashbyi / S. Sengupta, T. S. Chandra // Mycopathologia. – 2011. – V. 171. – № 2. – P. 123–131.

65. Билай В. И. Справочник. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / В. И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1988. – 550 с.

66. Batra L. R. *Nematosporaceae (Hemiascomycetidae): taxonomy, pathogenicity, distribution, and vector relations* / L. R. Batra // Technical Bulletin № 1469. – USDA, Washington, 1973. – 71 p.

67. The yeast, a taxonomic study / Ed. by C. P. Kurtzman, J. W. Fell– Fourth Edition. – Elsevier Science, 1998. – 1055 p.

68. Shami E. A. Bakhiet Production and Molecular Characterization of riboflavingenic Strain of *Aashbya gossypii* / Shami E. A. Bakhiet, Engaz Mustafa Ibrahim Mohamed // Journal of Biotechnology and Biochemistry. – 2016. – V. 2. – №3. – P. 1–6.

69. Riboflavin overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light / K. P. Stahmann, H. N. Arst Jr., H. Althöfer, J. L. Revuelta, N. Monschau, C. Schlüpen, C. Gätgens, A. Wiesenburg, T. Schlösser // Environmental Microbiology. – 2001. – V. 3. – №9. – P. 545 – 550.

70. Engineering *Ashbya gossypii* strains for de novo lipid production using industrial by-products / P. Lozano-Martinez, R. M. Buey, R. Ledesma-Amaro, A. Jimenez, J. L. Revuelta // Microb Biotechnol. – 2017. – V. 10. – №2. – P. 425–433.

71. Мутация по транскетолазе у рибофлавинсинтезирующих штаммов *Bacillus subtilis* / В. Н. Гершанович, А. Я. Куканова, З. М. Галушкина, А. И. Степанов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2000. – №3. – С. 3–7.

72. Гершанович В. Н. Ферменты ассимиляции азота у мутантов *Bacillus subtilis* с гиперпродукцией рибофлавина / В. Н. Гершанович, З. М. Галушкина, Т. Н. Большакова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2005. – №2. – С.

73. Биотехнология биологически активных веществ. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений./ Под ред. И. М. Грачевой, Л. А. Ивановой. – М.: Издательство НПО «Элевар», 2006. – 453с.

74. Marx H. Over expression of the riboflavin biosynthetic pathway in *Pichia pastoris* / H. Marx, D. Mattanovich, M. Sauer // Microbial Cell Factories. – 2008. – V. 7. – №23. –Режим доступа <http://www.microbialcellfactories.com/content/7/1/23>

75. Survase S. A. Biotechnological Production of Vitamins / S. A. Survase, I. B. Bajaj, R. S. Singhal. // Food Technology and Biotechnology. – 2006. – №44. – С. 381–396.

76. Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants / ed. E. Vandamme, J. Revuelta. –New York: Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016. – 581 p.

77. Isolation of *Ashbya gossypii* mutant for an improved riboflavin production targeting for biorefinery technology / E. Y. Park, J. H. Zhang, S. Tajima, L. Dwiarti // Journal of Applied Microbiology. – 2007. – V. 103. – №2. – P. 468–476.

78. Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii* / G. Schmidt, K. P. Stahmann, B. Kaesler, H. Sahm // Microbiology. – 1996. – V. 142. – P. 419–426.

79. Schmidt G. Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii* / G. Schmidt, K. P. Stahmann, H. Sahm // Microbiology. – 1996. – V. 142. – P. 411–417.

80. Isolation of an oxalate-resistant *Ashbya gossypii* strain and its improved riboflavin production / T. Sugimoto, A. Morimoto, M. Nariyama, T. Kato, E. Y. Park // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V. 37. –P. 57–64.

81. Metabolic Engineering of the Purine Pathway for Riboflavin Production in *Ashbya gossypii* / A. Jiménez, M. A. Santos, M. Pompejus, J. L. Revuelta // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – V. 71. – №10. – P. 5743–5751.

82. Importance of malate synthase in the glyoxylate cycle of *Ashbya gossypii* for the efficient production of riboflavin / T. Sugimoto, S. Kanamasa, T. Kato,

E. Y. Park // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – V. 83. – №3. – P. 529–539.

83. Pujari V. Physio-morphological changes in a riboflavin producer *Eremothecium ashbyii* DT1 and UV mutants in submerged fermentation / V. Pujari, T. S. Chandra // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – V. 11. – №4. – P. 552–557.

84. Walther A. Yap1-dependent oxidative stress response provides a link to riboflavin production in *Ashbya gossypii* / A. Walther, J. Wendland // *Fungal Genetics and Biology*. – 2012. – V. 49. – P. 697–707.

85. Özbas T. Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: *Eremothecium ashbyii* and *Ashbya gossypii* / T. Özbas, T. Kutsal // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1986. – V. 8. – №10. – P. 593–596.

86. Özbas T. Effects of growth factors on riboflavin production by *Ashbya gossypii* / T. Özbas, T. Kutsal // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1991. – V. 13. – №7. – P. 594–596.

87. Sengupta S. Antagonistic effect of myo-inositol on riboflavin production in two riboflavinogenic fungi *Ashbya gossypii* and *Eremothecium ashbyi* / S. Sengupta, S. Kiruthiga, T. S. Chandra // *Mycoscience*. – 2013. – V. 54. – P. 429–432.

88. Kalingan A. E. Agro industrial by-products as flavinogenic stimulators for riboflavin production / A. E. Kalingan, M. R. V. Krishnan // *Bioprocess Engineering*. – 1997. – V. 17. – P. 87–91.

89. Vaghy T. Correlation between the morphological variability and riboflavin producing capacity of *Eremothecium ashbyii* / T. Vaghy // *Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. – 1971. – V. 18. – P. 75–80.

90. Kolonne S. Effect of pH on exocellular riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* / S. Kolonne, R. J. Seviour, B. M. McDougall // *Biotechnology Letters*. – 1994. – V. 16. – P. 79–84.

91. Воробьева Л. И. Микробиологический синтез витаминов / Л. И. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 1982. – 168 с.

92. Воробьева Л. И. Промышленная микробиология: Учеб. пособие / Л. И. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
93. Мосичев М. С. Общая технология микробных производств / М. С. Мосичев, А. А. Складнев, В. Б. Котов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 264 с.
94. Никитин Г. А. Биохимические основы микробных производств: Учебное пособие / Г. А. Никитин. – К.: Вища школа, 1992. – 319 с.
95. Бекер М. Е. Введение в биотехнологию. Пер. с латышского / М. Е. Бекер. – Рига, 1978. –
96. Поморцева Н. В. Перспективы получения витаминов и коферментов с помощью микроорганизмов (обзор) / Н. В. Поморцева // Химико-фармацевтический журнал. – 1986. – №8. – С. 965–974.
97. Білінська І. Дослідження активності рибофлавінкінази – першого ферменту біосинтезу флавінових нуклеотидів у мікроорганізмів / І. Білінська, З. Гавриленко, В. Кащенко // Вісник Львівського національного університету. Серія біологічна. – 2000. – вип. 25. – С. 81–86.
98. Мочевинський Л. Електрофоретичне дослідження АТФ:рибофлавін-5'-фосфотрансферази деяких мікроорганізмів / Л. Мочевинський, І. Білінська, В. Кащенко // Вісник Львівського національного університету. Серія біологічна. – 2004. – вип. 37. – С. 37–44.
99. Шавловский Г. М. Сверхсинтез флавинов у дрожжей / Г. М. Шавловский, Е. М. Логвиненко // Украинский биохимический журнал. – 1985. – Т. 57. – № 4. – С. 98–112.
100. Карандеев К. Г. Использование мембранного ионоселективного электрода при технологическом контроле микробиологического продуцирования рибофлавина (витамина В₂) / К. Г. Карандеев, Н. И. Карандеева, О. В. Твердоступ // Всероссийская конференция "Актуальные проблемы аналитической химии": Тезисы докладов. – 2002. – Т. 2. – С. 155–156.
101. Способ очистки и кристаллизации рибофлавина Reinigungs- und Kristallisationsverfahren fur Riboflavin. Патент 0995749 ЕПВ, МПК⁷ С 07 D

475/14. Roche F. Hoffmann-la. № 99120364.7; Заявл. 13.10.1999; Оpubл. 26.04.2000

102. Бирюков В. В. Оптимизация микробиологических процессов микробиологического синтеза / В. В. Бирюков, В. М. Кантере. – М.: Наука, 1985. – 296 с.

103. Ахназарова С. Л. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии: Учеб. пособие для хим.-технол. спец. вузов / С. Л. Ахназарова, В. В. Кафаров. – М.: Высш. шк., 1985. – 327 с.

104. Максимов В. Н. Многофакторный эксперимент в биологии / В. Н. Максимов. – М., Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 280 с.

105. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с.

106. Гуринович Л. К. Эфирные масла: химия, технология, анализ и применение / Л. К. Гуринович, Т. В. Пучкова. – М.:Школа косметических химиков, 2005. – 192 с.

107. Войткевич С. А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии / С. А. Войткевич. – М.: Пищевая промышленность, 1999. – 284 с.

108. Технология натуральных эфирных масел и синтетических душистых веществ / И. И.Сидоров, Н. А. Турышева, Л. П. Фалеева, Е. И. Ясюкевич. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. – 368 с.

109. Chemical composition of different genotypes oil – bearing roses / A. Dobрева, A. Velcheva, V. Bardarov, K. Bardarov // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2013. – V. 19, № 6. – P. 1213–1218.

110. Kovacheva N. Industrial cultivation of oil bearing rose and rose oil production in Bulgaria during 21st century, directions and challenges / N. Kovacheva, K. Rusanov, I. Atanassov // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2010. – V. 24, №2. – P. 1793–1798.

111. Rosa damascena – genetic resources and capacity building for molecular breeding / K. Rusanov, N. Kovacheva, K. Stefanova, A. Atanassov, I. Atanassov // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2009. – V. 23, №4. – P. 1436–1439.

112. Gunes E. Turkey rose oil production and marketing: a review on problem and opportunities / E. Gunes // Journal of Applied Sciences. – 2005. – V. 5, № 10. – P. 1871–1875.

113. Bulgarian rose oil of white oil-bearing rose / N. Nedkov, A. Dobрева, N. Kovacheva, V. Bardarov, A. Velcheva // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2009. – V. 15, № 4. – P. 318–322.

114. Chemical composition and antioxidant activity of the extract and essential oil of *Rosa damascena* from Iran, population of Guilan / N. Yassa, F. Masoomi, Rohani S.E. Rankouhi, A. Hajaiakhoondi // DARU. – 2009. – V. 17, № 3. – P. 175–180.

115. Research and current profile of Iranian production of damask rose (*Rosa damascena* Mill.) / M. Haghighi, A. Tehranifar, A. Nikbakht, M. Kafi // Acta horticulturae. – 2008. – V. 769. – P. 449–455.

116. Shawl A. S. Rose oil in Kashmiri India / A. S. Shawl // Perfumer and Flavorist. – 2009. – V. 34. – P. 2–5.

117. Караман М.М. Направления роста и эффективности производства эфиромасличной продукции Крыма // Экономика и управление. – 2005. – № 1. – С. 44–46.

118. Концепция развития эфиромасличной отрасли Автономной Республики Крым // Сборник нормативно-правовых актов Автономной Республики Крым. – 2008. – № 6. – с. 195, статья 455.

119. Ulusoy S. Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute / S. Ulusoy, G. Bosgelmez-Tinaz, H. Secilmis-Canbay // Current Microbiology. – 2009. – V. 59. – P. 554–558.

120. Baser K. H. C. Oil Rose (*Rosa damascena*) / K. H. C. Baser, N. Arslan // Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East, Medicinal and Aromatic Plants of the World. – 2014. – V. 2. – P. 281–304.

121. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils / B. C. Aridoğan, H. Baydar, S. Kaya, M. Demirci, D. Ozbaşar, E. Mumcu // Archives of Pharmacal Research. – 2002. – V. 25, № 6. – P. 860–864.

122. Basim E. Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil / E. Basim, H. Basim // *Fitoterapia*. – 2003. – V. 74, № 4. – P. 394–396.
123. Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascena* flower extracts / G. Özkan, O. Sagdic, N. G. Baydar, H. Baydar // *Food Science and Technology International*. – 2004. – V. 10. – P. 277–281.
124. Comparative evaluation of antimicrobial activity and composition of rose oils from various geographic origins, in particular Bulgarian rose oil / V. Gochev, K. Wlcek, G. Buchbauer, A. Stoyanova, A. Dobрева, E. Schmidt, L. Jirovetz // *Natural Product Communications*. – 2008. – V. 3. – P. 1063–1068.
125. Omeliansky V. L. Aroma-producing microorganisms / V. L. Omeliansky // *Journal of Bacteriology*. – 1923. – V. 8. – P. 393–419.
126. Vandamme E. J. Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes / E. J. Vandamme // *Fungal Diversity*. – 2003. – V. 13. – P. 153–166.
127. Longo M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies / M. A. Longo, M. A. Sanroman // *Food Technology and Biotechnology*. – 2006. – V. 44, № 3. – P. 335–353.
128. Haeusler A. Microbial production of natural flavors / A. Haeusler, T. Muench // *ASM News*. – 1998. – V. 63, № 10. – P. 551–559.
129. Krings U. Biotechnological production of flavours and fragrances / U. Krings, R. G. Berger // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1998. – V. 49. – P. 1–8.
130. Production of flavours by microorganisms / L. Janssens, H. L. De Pooter, N. M. Schamp, E. J. Vandamme // *Process Biochemistry*. – 1992. – V. 27. – P. 195–215.
131. Bomgardner M. M. The sweet smell of microbes / M. M. Bomgardner // *Chemical & Engineering News*. – 2012. – V. 90, №29. – P. 25–29.
132. Biotechnological production of 2-phenylethanol / M. M. W. Etschmann, W. Bluemke, D. Sell, J. Schrader // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – V. 59. – P. 1–8.
133. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars / J.

Lemos Bicas, J. Cota Silva, A. P. Dionisio, G. M. Pastore // *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. – 2010. – V. 30, № 1. – P. 7–18.

134. Шпичка А.И. Сравнительная характеристика микроорганизмов, синтезирующих *de novo* летучие душистые вещества / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 8. – С. 1113–1124.

135. Бугорский П. С. Влияние ионов водорода, калия и натрия на продуктивность гриба *Ermothecium ashbyi* / П. С. Бугорский, Е. Ф. Семенова, В. С. Родов // *Микробиологический журнал*. – 1990. – Т. 52, № 3. – С. 44–47.

136. Semenova E. F. About explanation of elaboration of essential *Ermothecium* oil biotechnology / E. F. Semenova, A. I. Shpichka, I. Ya. Moiseeva // *International journal of experimental education*. – 2012. – № 3. – P. 35–36.

137. Semenova E. F. Some pharmbiotechnological characteristics of *Ermothecium*, producer of riboflavin and essential oil / E. F. Semenova, A. I. Shpichka // *International journal of applied and fundamental research*. – 2012. – № 1. – P. 170–172.

138. Бугорский П. С. Душистые вещества мицелиального гриба *Ashbya gossypii* / П. С. Бугорский, Е. Ф. Семенова // *Химия природных соединений*. – 1991. – № 3. – С. 428.

139. Jiang J. Identification of volatile compounds produced by *Kluyveromyces lactis* / J. Jiang // *Biotechnology techniques*. – 1993. – V. 7, № 12. – P. 863–866.

140. Мамеева О. Г. Скрининг продуцентов 2-фенилэтанола среди дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* / О. Г. Мамеева, С. С. Нагорная, В. С. Подгорский // *Микология и фитопатология*. – 2008. – Т. 42, вып. 2. – С. 185–190.

141. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts / F. M. Carrau, K. Medina, E. Boido, L. Farina, C. Caggero, E. Dellacassa, G. Versini, P. A. Henschke // *FEMS Microbiology Letters*. – 2005. – V. 243. – P. 107–115.

142. Шпичка А. И. Характеристика аромапродуктов *Eremothecium* и перспективы их использования / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2014. – № 2. – С. 103–106.

143. Семенова Е. Ф. О методических аспектах селекции продуцентов эфирного масла розового направления запаха / Е. Ф. Семенова, А. И. Шпичка // Вестник Воронежского госуниверситета. Серия «Химия. Биология. Фармация». – 2014. – № 2. – С. 91–95.

144. Spectrophotometric method for quantitative measuring essential oil in aromatic water and distillate with rose smell / E. Semenova, V. Presnyakova, D. Goncharov, M. Goncharov, E. Presnyakova, S. Presnyakov, I. Moiseeva, S. Kolesnikova // Journal of Physics: Conference Series. – 2017. – V.784, №1. – 012053.

145. Миронов В. А. Образование монотерпенов аскомицетом *Eremotecium ashbyii* / В. А. Миронов, М. И. Цибульская, М. Ц. Янотовский // Прикладная биохимия и микробиология. – 1982. – Т. 18, №3. – С. 343–345.

146. Поліщук В. Ю. Рибофлавін – виробництво і застосування / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. – 2009. – Вип. 134, ч. 3. – С. 274–290.

147. Поліщук В. Ю. Сучасні можливості отримання ефірної олії з ароматом троянди / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2016. – №3. – С. 69–77.

148. Державні санітарні правила ДСП 9.9.5.035-99 Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності. Державні санітарні правила. Міністерство охорони здоров'я України. – 92 с.

149. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш.учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. – М.:Академия. 2005. – 608 с.

150. Семенова Е. Ф. Биосинтетическая активность и антимикробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill. / Е. Ф. Семенова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. – 2007. - №4. – с. 44–50.
151. Методы экспериментальной микологии: Справочник / И. А. Дудка, С. П. Вассер, И. А. Элланская и др. – К.: Наук. думка, 1982. – 562 с.
152. Фармакопея СССР XI издание, выпуск 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: «Медицина», 1990. – 385с.
153. Шпичка А. И. К вопросу определения рибофлавина в биотехнологическом сырье / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова, А. В. Кузнецова // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – №1. – С. 30–32.
154. Спирин Н. А. Методы планирования и обработки результатов инженерного эксперимента / Н. А. Спирин, В. В. Лавров. – Екатеринбург: ГОУ ВПО УГТИ–УПИ, 2004. – 257 с.
155. Шеламова М. А. Статистический анализ медико-биологических данных с использованием программы Excel: учеб.-метод. пособие / М. А. Шеламова, Н. И. Инсарова, В. Г. Лещенко. – Минск: БГМУ, 2010. – 96 с.
156. Поліщук В. Ю. Морфолого-культуральні і біосинтетичні властивості *Eremotecium ashbyii* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2011. – №3. – С.74–78.
157. О сохранении *Eremothecium ashbyii* в активном состоянии / М. Г. Голышева, Е. В. Гришанкова, В. Э. Успенская и др. // Микробиология. – 1965. – Т. 34, №4. – С. 661–665.
158. Polichenco M. Influencia de diversos factores sobre *Eremothecium ashbyi* / M. Polichenco// Mycopathologia. – 1966. – V. 30, № 3–4. – P. 323–336.
159. Бугорский П. С. Состав эфирного масла мицелиального гриба *Eremothecium ashbyi* / П. С. Бугорский, В. С. Родов, А. М. Носов // Химия природных соединений. – 1986. – №6. – С. 790–791.
160. Krneta-Jordi M. Cytologische und physiologische Untersuchungen an *Eremothecium ashbyii* Guill. / M. Krneta-Jordi // Archives of Microbiology. – 1962. – V. 43, № 1. – P. 76–108

161. Вплив температури на життєдіяльність міцелію *Eremothecium ashbyi* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. Я. Карпенко, О. М. Дуган // Вісник національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2012. – №726. – С. 158–163.

162. Краткий справочник по физиологии растений / А. М. Гродзинский, Д. М. Гродзинский. – К.: Наук. думка, 1973. – 592 с.

163. Миронов В. А. Влияние фосфата на рост гриба *Eremotecium ashbyii* и биосинтез флавинов / В. А. Миронов, М. И. Цибульская, Л. И. Либер // Микробиологическая промышленность. – 1970. – №1. – С. 33–35.

164. Поліщук В. Ю. Динаміка росту та накопичення рибофлавіну аскоміцетом *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2014. – №3. – С. 73–77.

165. Яцишин В. Ю. Микробный синтез флавиновых нуклеотидов (обзор) / В. Ю. Яцишин, Д. В. Федорович, А. А. Сибирный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 2. – С. 133–142.

166. Оптимальные условия для прорастания спор гриба *Eremothecium ashbyi*, продуцента рибофлавина / Л. А. Минеева, С. М. Розенфельд, А. И. Степанов, В. Г. Жданов // Прикл. биохимия и микробиология. – 1973. – Т. 9, №2. – С. 219–223.

167. Поліщук В. Ю. Вплив умов отримання посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences. – 2017. – V. 14, № 132. – Р. 82–84.

168. Поліщук В. Ю. Вплив умов культивування на біосинтетичну здатність *Eremothecium ashbyi* Guilliern. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Технологічний аудит та резерви виробництва. – 2016. – №2/4(28). – С. 35–41.

169. Глюкозно-фруктозний сироп – перспективний натуральний замінник цукру // В. І. Дробот, Т. А. Сильчук, Л. І. Удворгелі та ін. // Хранение и переработка зерна. – 2006. – №9 (87). – С. 38–39.

170. Богданов Е. С. Глюкозно-фруктозный сироп – новый продукт на пищевом рынке Украины / Е. С. Богданов // Продукты & ингредиенты. – 2007. – №2. – С. 83–87.

171. Сироп глюкозо-фруктозный: ТУ У 15.6–32616426–009:2005 [Чинний від 2005–09].

172. Горшунов Ю. В. Біотехнологія спиртового зброджування глюкозо-фруктозних сиропів: Дисс. ... канд. техн. наук: 03.00.20. – К., 2012. – 140с.

173. Поліщук В. Ю. Використання глюкозо-фруктозних сиропів для культивування продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* Guillierm. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // V Наукова конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній науці». Збірка наукових праць (31 жовтня 2017 р.) – Х.: Технологічний центр, 2017. – С. 60.

174. Адлер Ю. П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Ю. П. Адлер, Е. В. Маркова, Ю. В. Грановский. – М.: Наука, 1976. – 279 с.

175. Адлер Ю. П. Введение в планирование эксперимента / Ю. П. Адлер. – М., «Металлургия», 1969. – с.

176. Маслов Г. Г. Оптимизация параметров и режимов работы машин методами планирования эксперимента: Учебн. пособие для сельскохозяйственных вузов / Г. Г. Маслов, О. Н. Дидманидзе, В. В. Цибулевский. – М.: УМЦ «Триада», 2007. – 292 с.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача за темою дисертації та
відомості про апробацію результатів дисертації

За результатами досліджень опубліковано 19 наукових робіт, у тому числі 6 статей у наукових фахових виданнях, з них 2 у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз даних, 1 стаття у закордонному виданні, 1 стаття в іншому виданні та 12 тез доповідей у збірниках конференцій.

1. Поліщук В. Ю. Морфолого-культуральні і біосинтетичні властивості *Eremothecium ashbyi* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2011. – №3. – С. 74–78.

2. Вплив температури на життєдіяльність міцелію *Eremothecium ashbyi* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. Я. Карпенко, О. М. Дуган // Вісник національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2012. – №726. – С. 158–163.

3. Поліщук В. Ю. Динаміка росту та накопичення рибофлавіну аскоміцетом *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2014. – №3. – С. 73–77.

4. Поліщук В. Ю. Сучасні можливості отримання ефірної олії з ароматом троянди / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2016. – №3. – С. 69–77.

5. Поліщук В. Ю. Вплив умов культивування на біосинтетичну здатність *Eremothecium ashbyi* Guillierm. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Технологічний аудит та резерви виробництва. – 2016. – №2/4(28). – С. 35–41.

6. Поліщук В. Ю. Вплив умов отримання посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences. – 2017. – V. 14, № 132. – P. 82–84.

7. Поліщук В. Ю. *Eremothecium ashbyi* – перспективний продуцент для біотехнології ефірних олій / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган //

Біотехнологія XXI століття: тези доповідей V регіональної науково-практичної конференції викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів (26 квітня 2011р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2011. – С. 46.

8. Поліщук В. Ю. Морфолого-культуральні та біосинтетичні властивості *Eremothecium ashbyi* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей V регіональної науково-практичної конференції викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів (26 квітня 2011р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2011. – С. 61.

9. Поліщук В. Ю. Перспективи отримання ефірної олії для парфюмерії біотехнологічним способом / В. Ю. Поліщук, Ю. В. Єлісєєва, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей V регіональної науково-практичної конференції викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів (26 квітня 2011р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2011. – С. 64.

10. Маланюк М. І. Вплив температури інкубації на життєздатність міцелію гриба *Eremothecium ashbyi* Guill. / М. І. Маланюк, В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції. (5 квітня 2012 р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2012. – С. 68–70.

11. Дослідження динаміки росту *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дяченко, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VII Всеукраїнської науково-практичної конференції (24 квітня 2013 р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2013. – С. 55–56.

12. Умови збереження *Eremothecium ashbyi* F340 у активному стані / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дяченко, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VII Всеукраїнської науково-практичної конференції (24 квітня 2013 р.). – К.:НТУУ «КПІ», 2013. – С. 74-75.

13. Поліщук В. Ю. Вплив рН середовища культивування на накопичення біомаси та рибофлавіну штамом *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції. (22 квітня 2014 р.) – К.:НТУУ «КПІ», 2014. –

С. 60-61.

14. Поліщук В. Ю. Поживні потреби штаму *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченій 170 річниці від дня народження Іллі Мечникова (24 квітня 2015р.) – К.:НТУУ «КПІ», 2015. – С. 76.

15. Поліщук В. Ю. Вплив ультрафіолетового опромінення на біосинтетичну здатність гриба *Eremothecium ashbyi* / Поліщук В.Ю., Дуган О.М. // Біотехнологія XXI століття: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016р.) [Електронне видання] – К.: НТУУ «КПІ», 2016. – С. 72.

16. Поліщук В. Ю. Вплив фізико-хімічних параметрів на біосинтетичну здатність *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Біотехнологія XXI століття: матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (21 квітня 2017р.) – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, Вид-во «Політехніка», 2017. – С. 59.

17. Поліщук В. Ю. Вплив умов отримання посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Advances in the Natural Sciences and Engineering – 2017 (25 червня 2017 р.), Будапешт, Угорщина.

18. Поліщук В. Ю. Використання глюкозо-фруктозних сиропів для культивування продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* Guillierm. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // V Наукова конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній науці». Збірка наукових праць (31 жовтня 2017 р.) – Х.: Технологічний центр, 2017. – С. 60.

19. Поліщук В. Ю. Рибофлавін – виробництво і застосування / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. – 2009. – Вип. 134, ч. 3. – С. 274–290.

Додаток Б

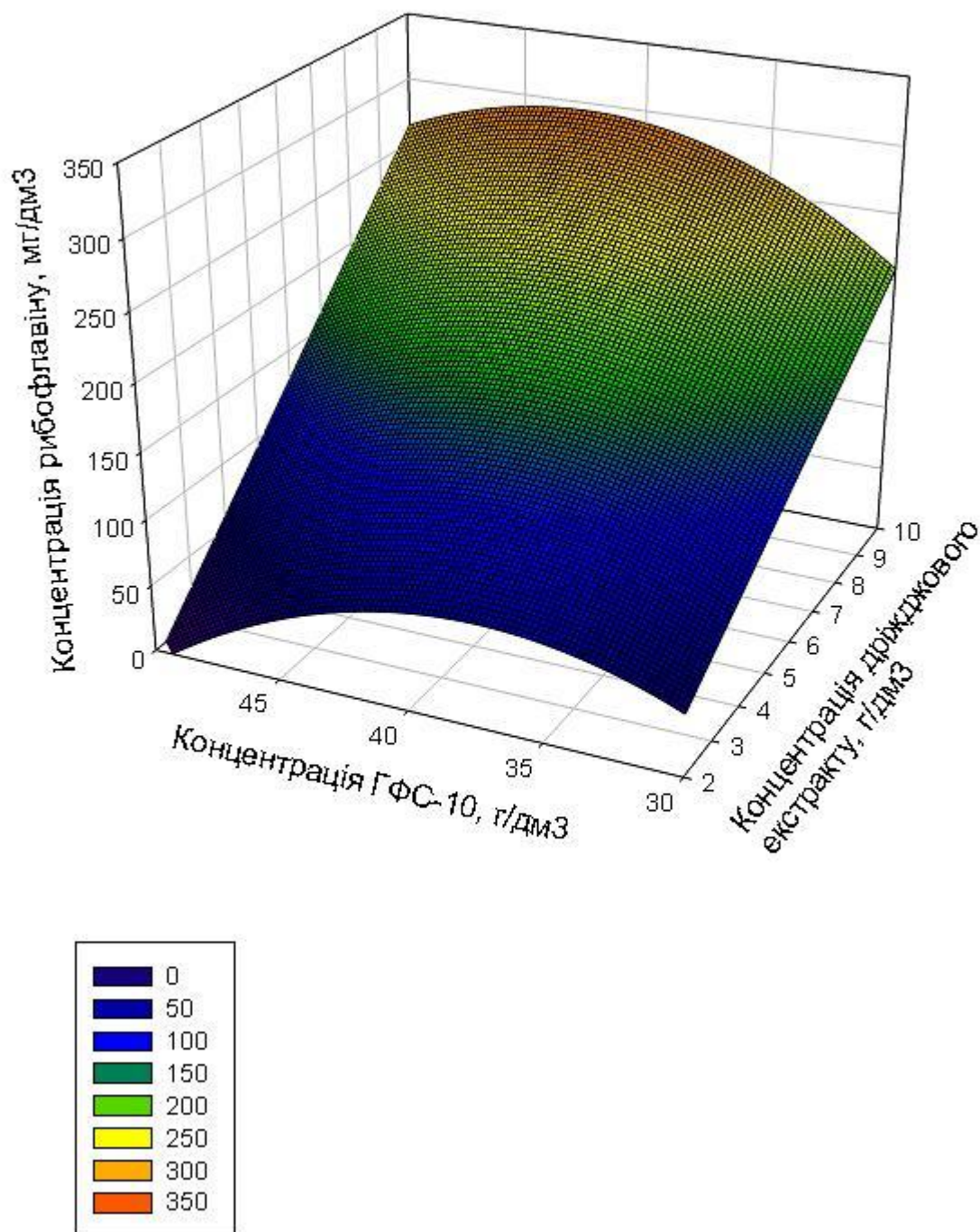


Рис. 1 Поверхня відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині в залежності від концентрації ГФС-10 та концентрації дріжджового екстракту (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації пептону $v=3 \text{ г/дм}^3$)

$$Y_1 = -689,846 + 39,612 \cdot m - 0,584 \cdot W + 0,693 \cdot m \cdot W - 0,547 \cdot m^2$$

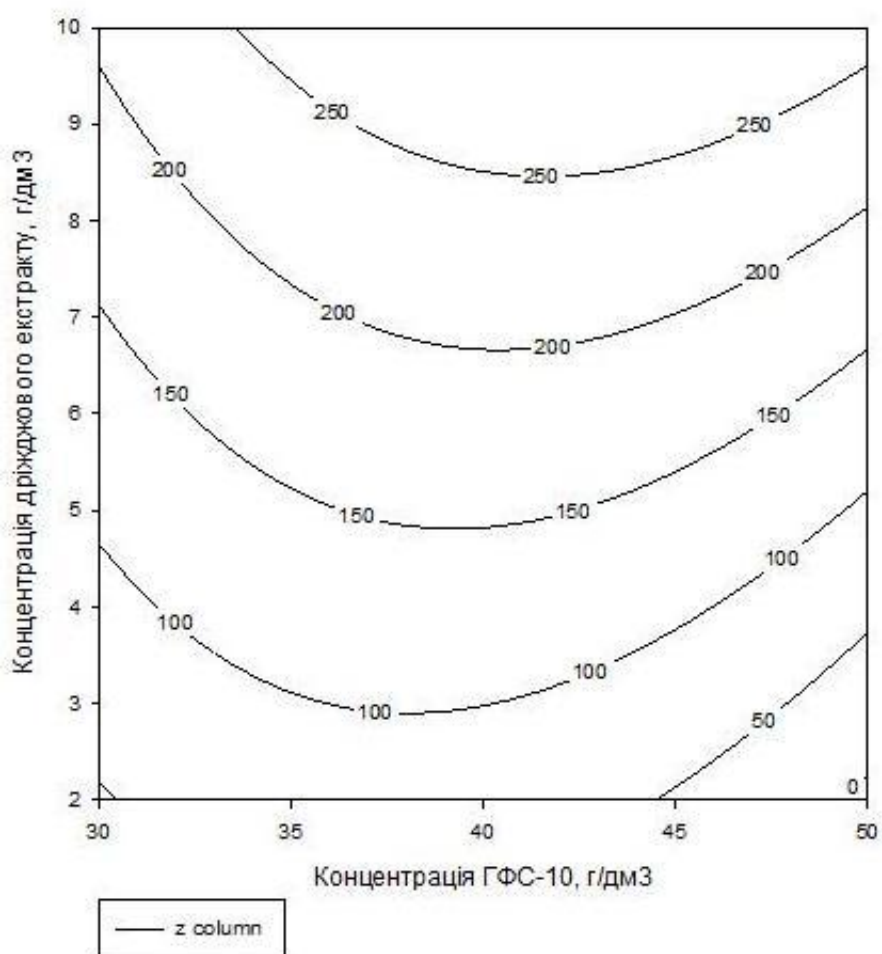


Рис. 2 Перетин поверхні відгуку концентрації рибіфлавіну в культуральній рідині в залежності від концентрації ГФС-10 та концентрації дріжджового екстракту (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації пептону $v=3 \text{ г/дм}^3$)

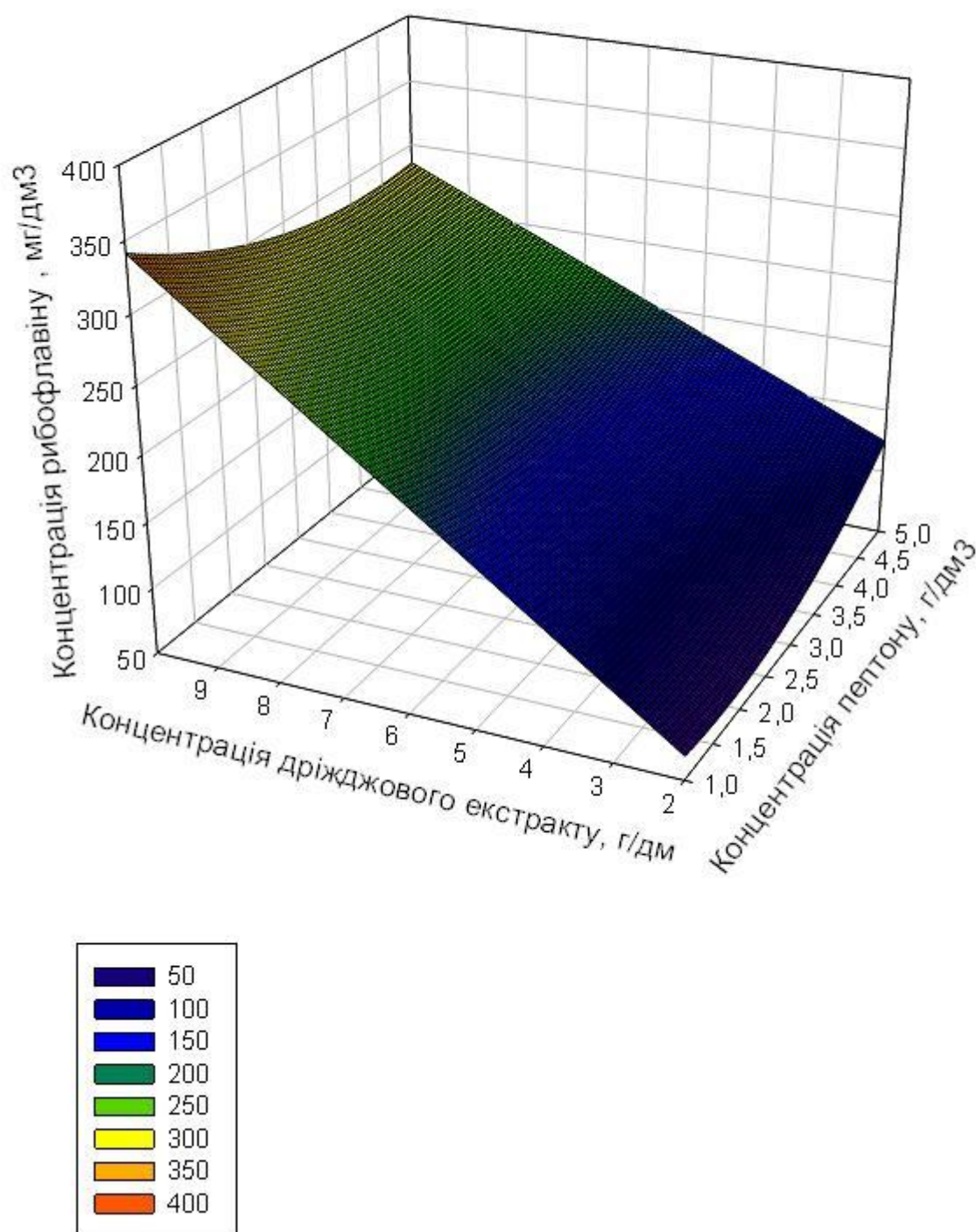


Рис. 3 Поверхня відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині в залежності від концентрації дріжджового екстракту та концентрації пептону (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації ГФС-10 $m=40$ г/дм³)

$$Y_1 = 7,249 + 37,689 \cdot W - 13,118 \cdot v - 3,5144 \cdot W \cdot v + 5,701 \cdot v^2$$

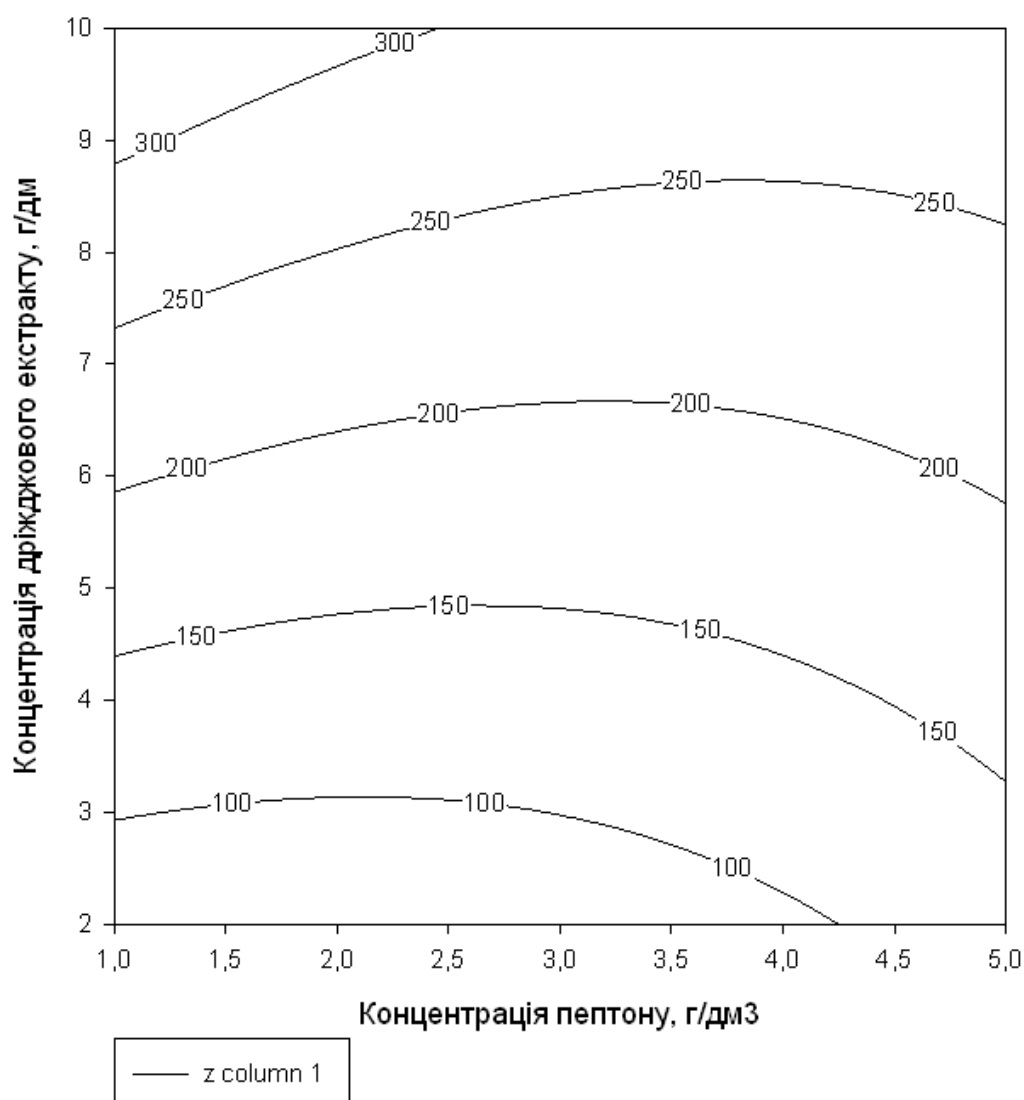


Рис. 4 Перетин поверхності відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині в залежності від концентрації дріжджового екстракту та концентрації пептону (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації ГФС-10 $m=40$ г/дм³)

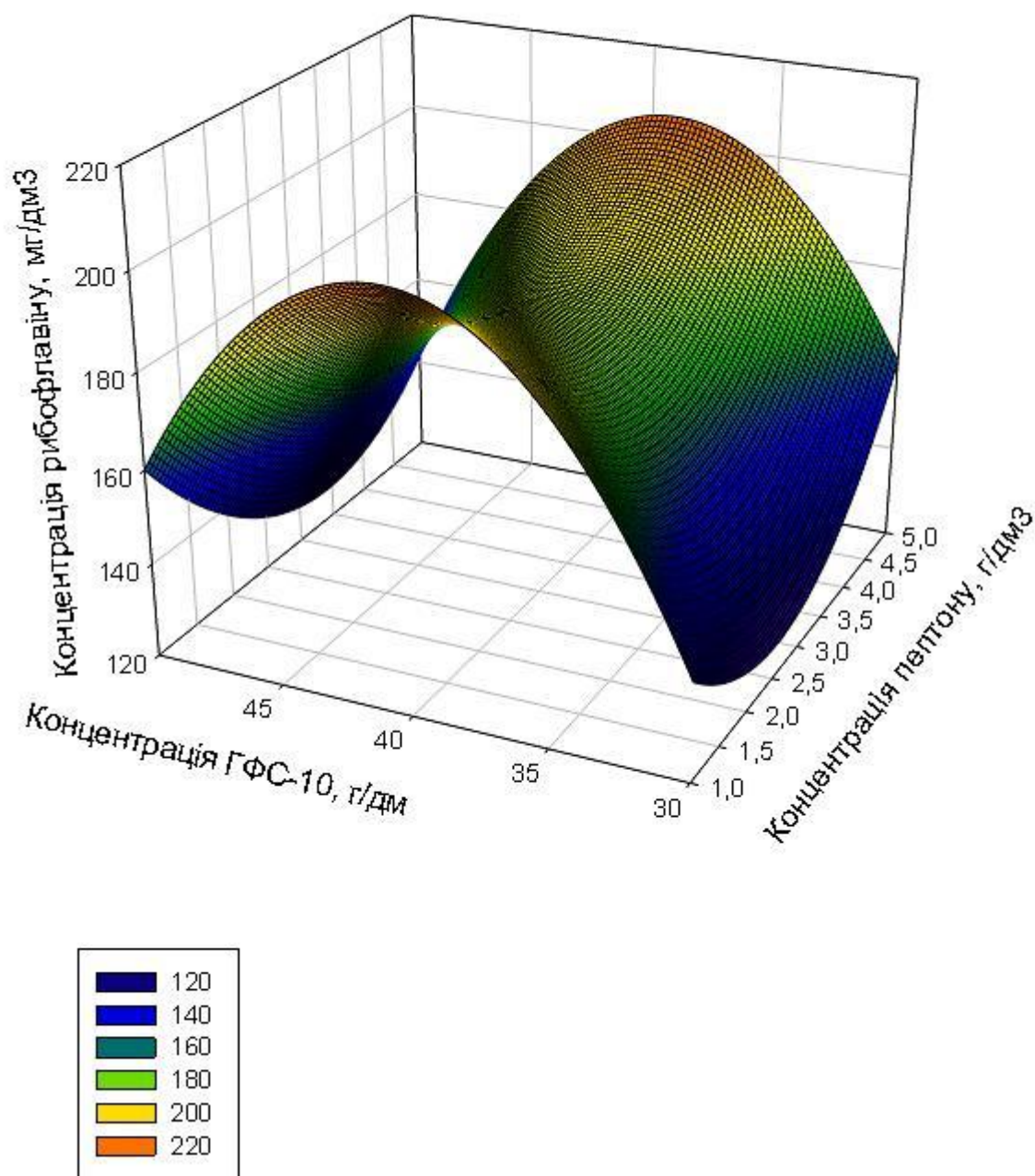


Рис. 5 Поверхня відгіку концентрації рибофлавіну в культуральній ріліні в залежності від концентрації ГФС-10 та концентрації пептону (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації дріжджового екстракту $W=6$ г/дм³)

$$Y_1 = -758,483 + 45,19 \cdot m - 15,309 \cdot v - 0,472 \cdot m \cdot v - 0,547 \cdot m^2 + 5,701 \cdot v^2$$

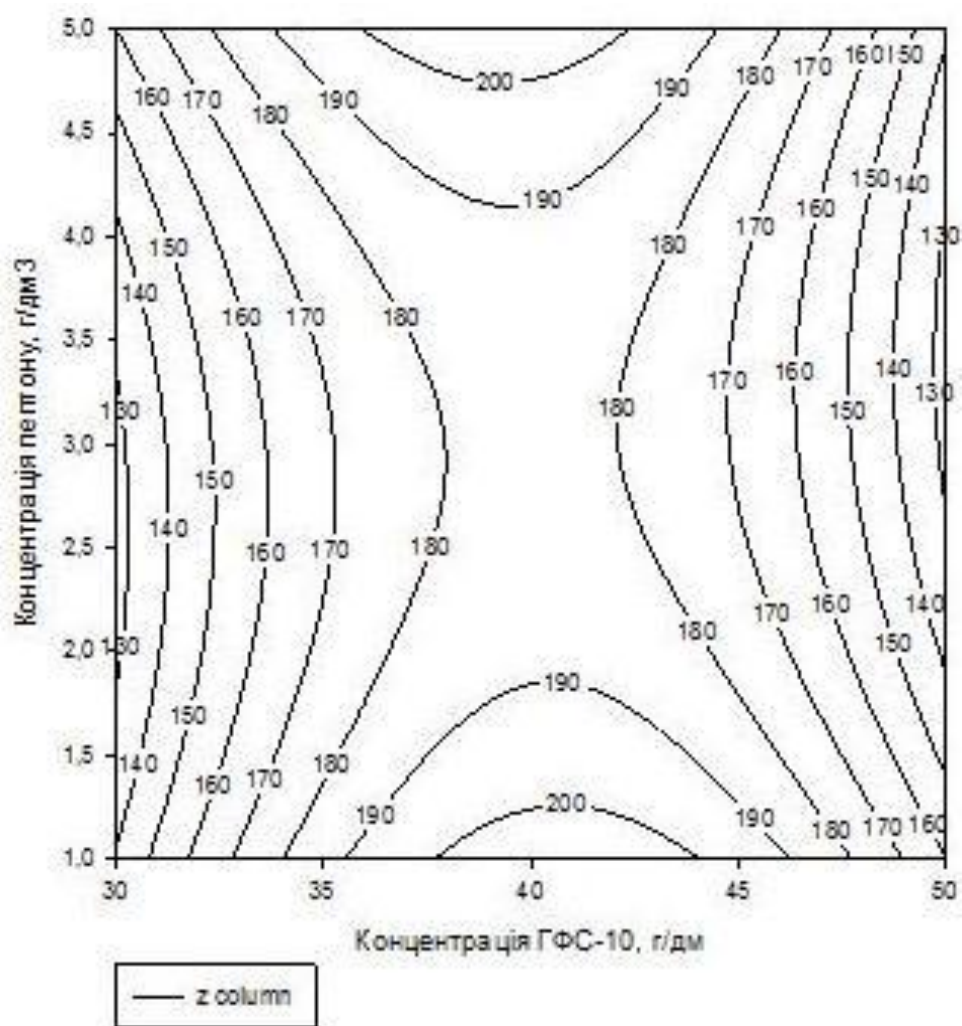


Рис. 6 Перетин поверхні відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині в залежності від концентрації ГФС-10 та концентрації пептону (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації дріжджового екстракту $W=6 \text{ г/дм}^3$)

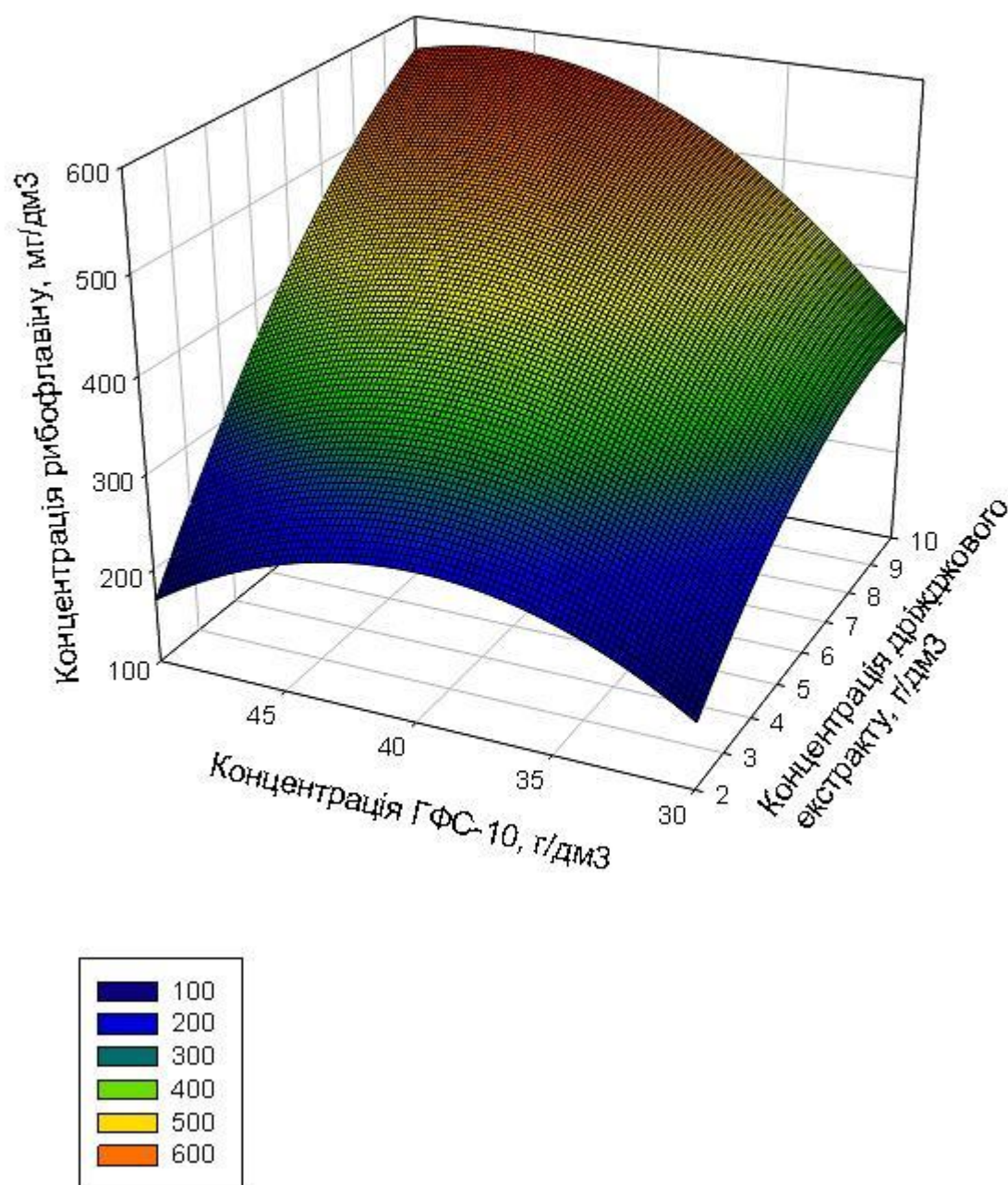


Рис. 7 Поверхня відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та в біомасі в залежності від концентрації ГФС-10 та концентрації дріжджового екстракту (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації пептону $v=3 \text{ г/дм}^3$)

$$Y_2 = -1194,373 + 69,043 \cdot m + 14,875 \cdot W + 1,426 \cdot m \cdot W - 0,97 \cdot m^2 - 3,02 \cdot W^2$$

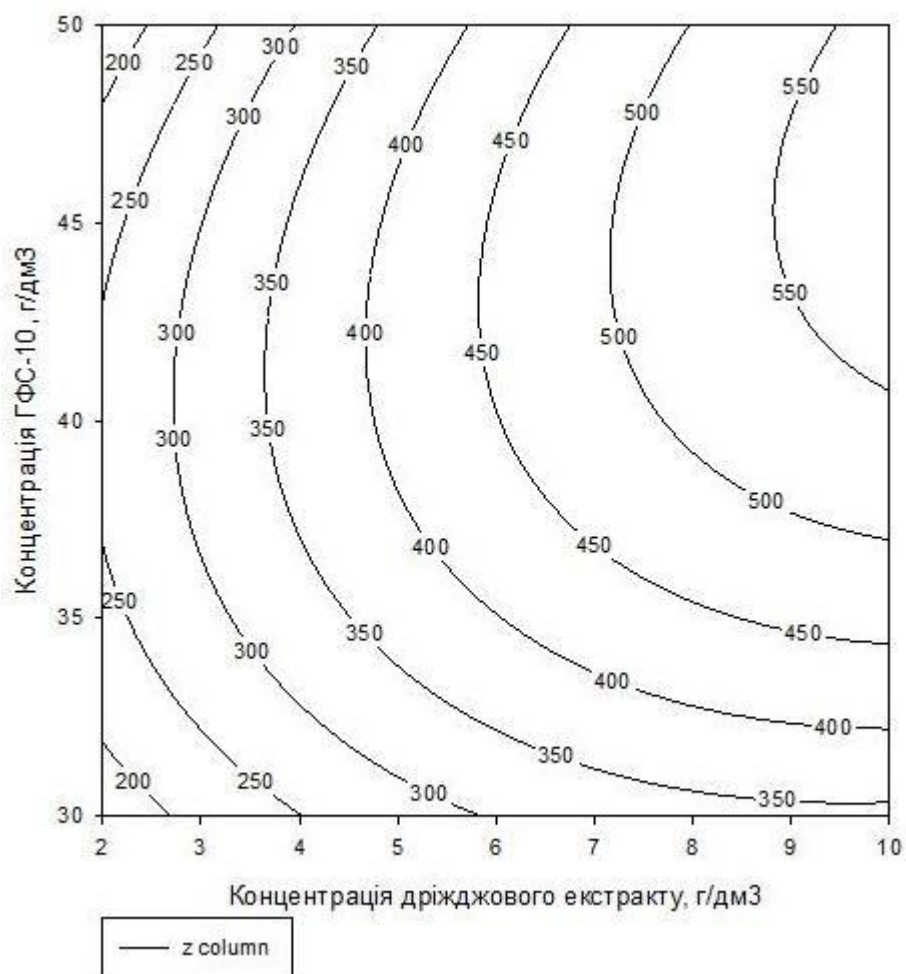


Рис. 8 Перетин поверхні відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та в біомасі в залежності від концентрації ГФС-10 та концентрації дріжджового екстракту (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації пептону $v=3$ г/дм³)

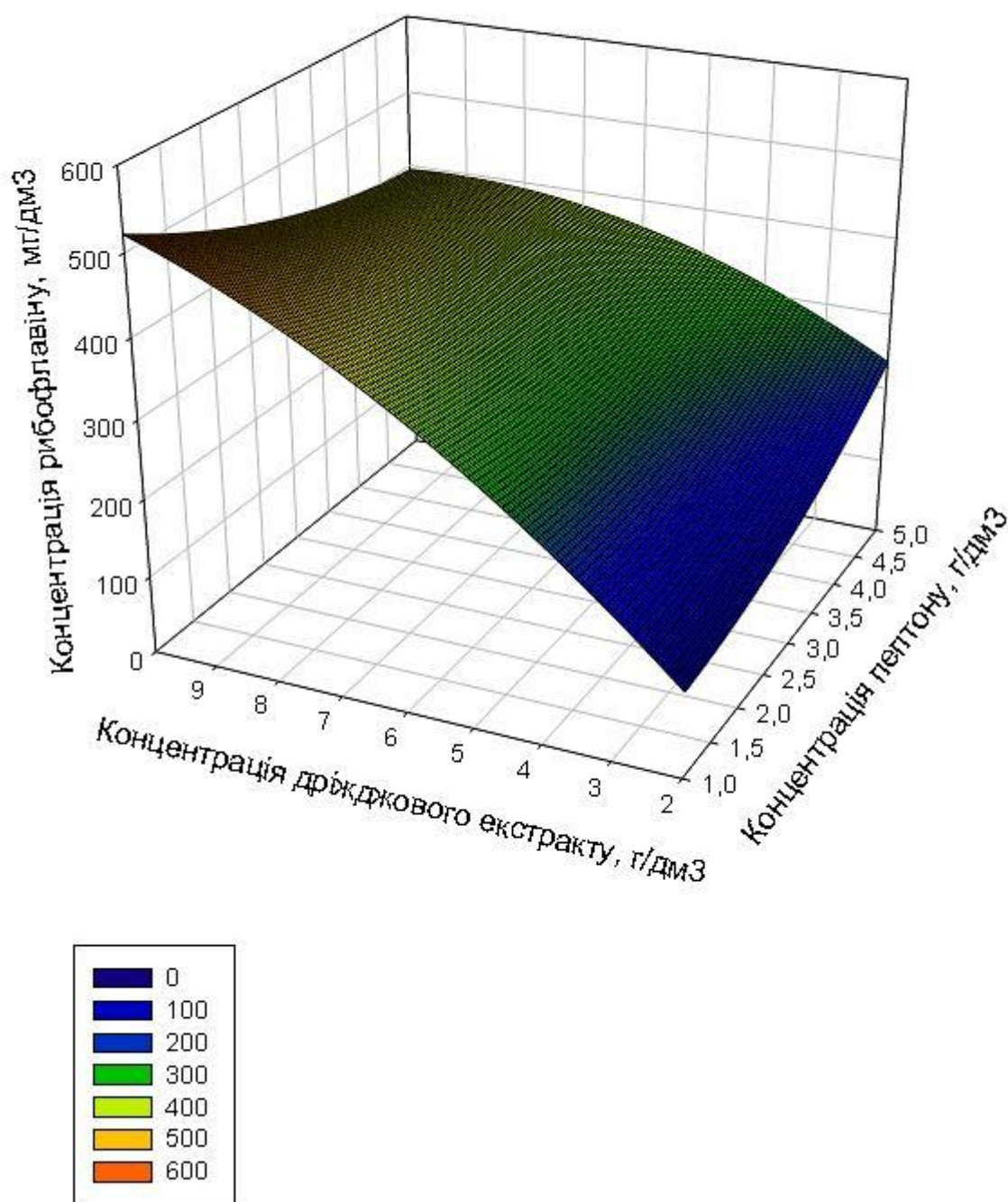


Рис.9 Поверхня відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та в біомасі в залежності від концентрації дріжджового екстракту та концентрації пептону (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації ГФС-10 $m=40$ г/дм³)

$$Y_2 = -70,69 + 95,779 \cdot W + 9,643 \cdot v - 7,95 \cdot W \cdot v - 3,02 \cdot W^2 + 6,342 \cdot v^2$$

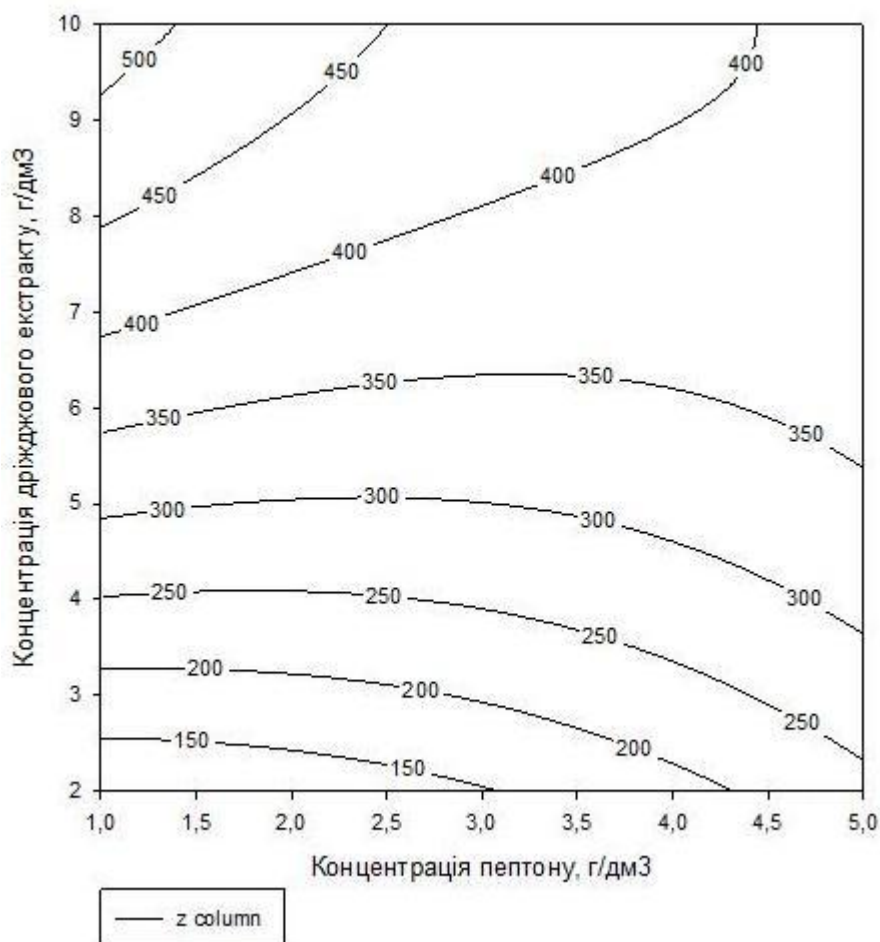


Рис.10 Перетин поверхні відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та в біомасі в залежності від концентрації дріжджового екстракту та концентрації пептону (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації ГФС-10 $m=40$ г/дм³)

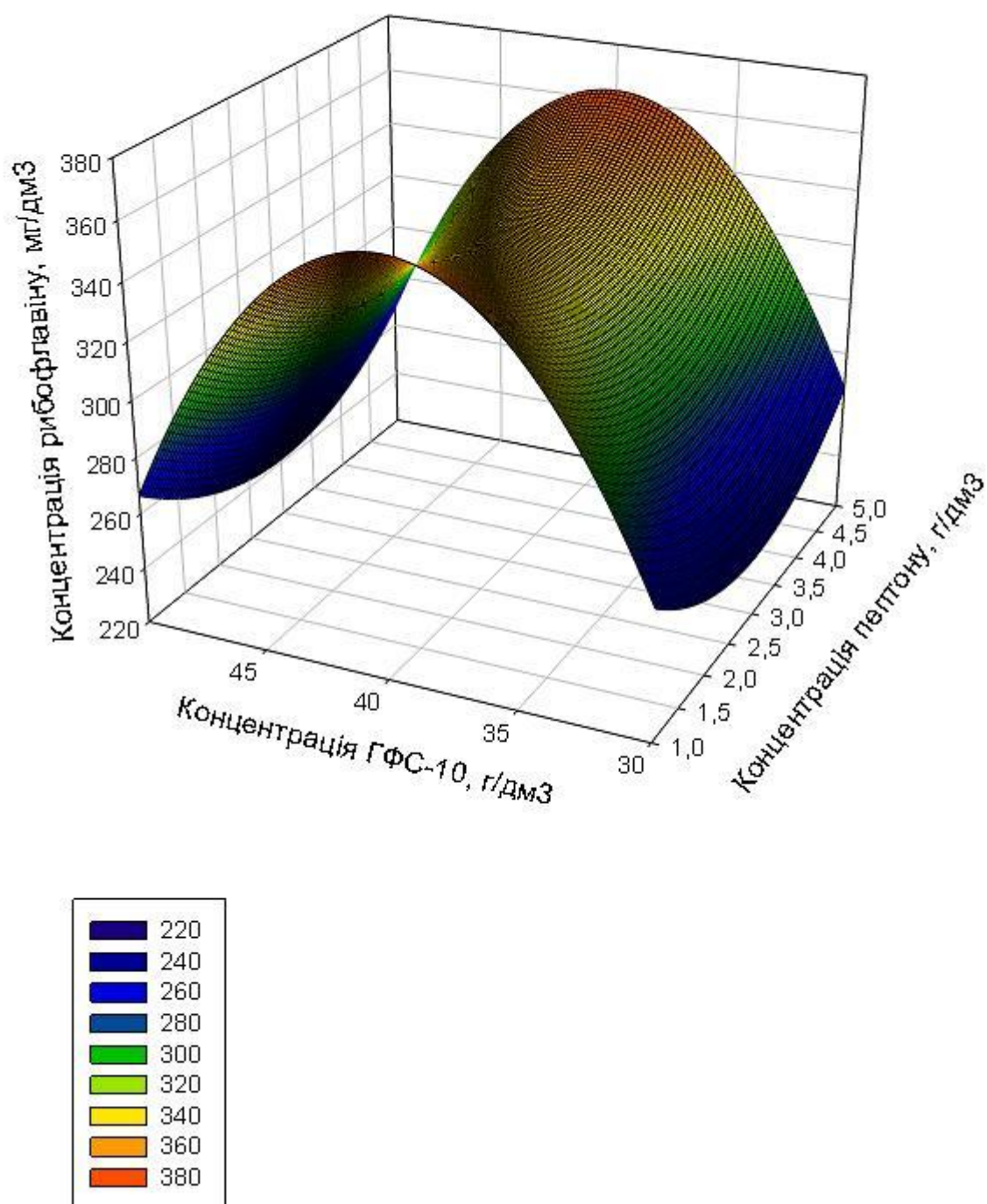


Рис. 11 Поверхня відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та в біомасі в залежності від концентрації ГФС-10 та концентрації пептону (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації дріжджового екстракту

$$W=6 \text{ г/дм}^3)$$

$$Y_2 = -1156,7557 + 77,6 \cdot m - 38,054 \cdot v - 0,97 \cdot m^2 + 6,342 \cdot v^2$$

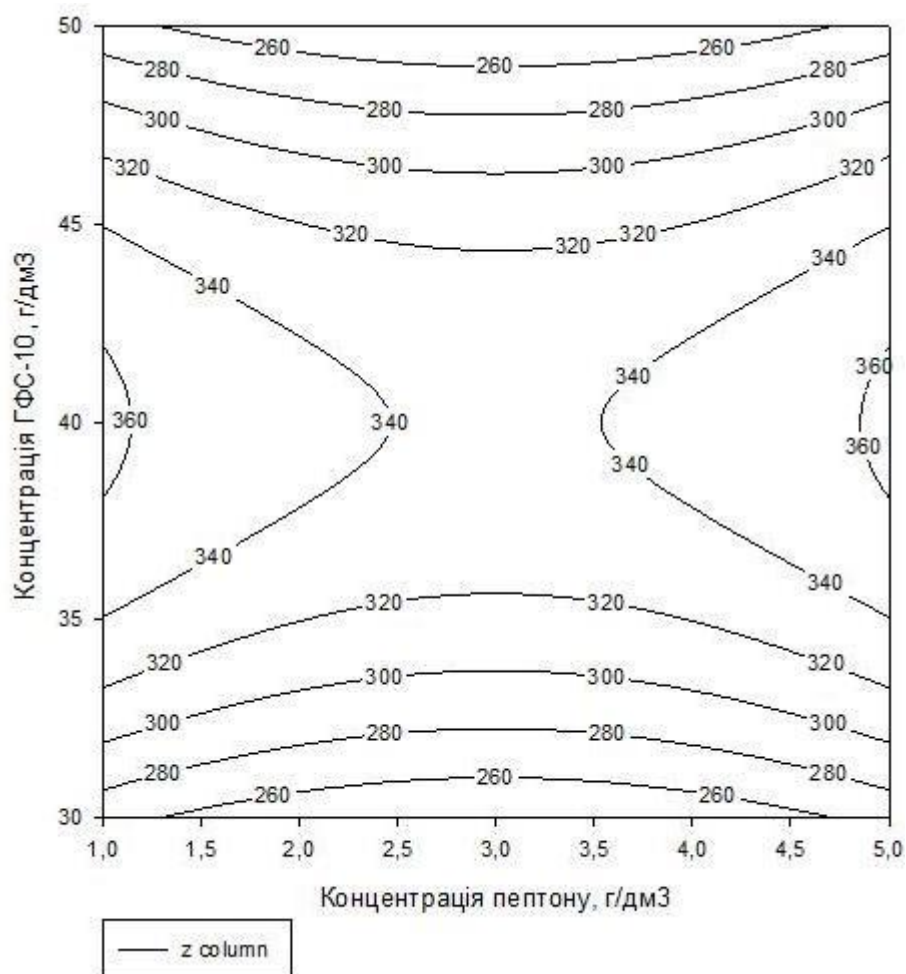


Рис. 12 Перетин поверхні відгуку концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та в біомасі в залежності від концентрації ГФС-10 та концентрації пептону (при зафіксованій на нульовому рівні концентрації дріжджового екстракту $W=6$ г/дм³)

Додаток В



ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор

з науково-педагогічної роботи
Національного університету
«Львівська політехніка»

О.Р. Давидчак

«2» березня 2018 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

в учбовий процес результатів кандидатської дисертації

Поліщук Валентини Юріївни

**«Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що
продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill.»**

На кафедрі промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» в рамках виконання кандидатської дисертації ас. Поліщук В.Ю. були проведені дослідження щодо розробки біотехнології отримання рибофлавіну та ефірної олії з використанням штаму-продуценту *Eremothecium ashbyi*. Окремі результати досліджень використовуються в учбовому процесі на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».

Зокрема, результати досліджень були використані в лекційних курсах «Біотехнологія антибіотиків та вітамінів» та «Основи фармацевтичної біотехнології» та лабораторних практикумах з цих дисциплін.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри

технології біологічно активних сполук,

фармації та біотехнології Інституту

хімії та хімічних технологій

д. х. н., професор

Новіков В. П.



УКРАЇНА

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЙ І БІОТЕХНІКИ

03056, м. Київ, пр-т Перемоги, 37: тел. (+38 044) 204-94-52 тел./факс (+38 044) 204-83-12
<http://biotech.kpi.ua> e-mail: biotech@kpi.ua ЄДРПОУ 0207092112.03.18 № 3300/1-44
на № _____ від _____

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Декан факультету біотехнологій і
біотехніки Національного технічного
університету України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»
д.б.н., проф.

О.М. Дуган

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

Об'єкт впровадження: наукові та науково-методичні розробки щодо біотехнології одержання препаратів рибофлавіну та ефірної олії з використанням штаму-продуценту *Eremothecium ashbyi*.

Автор розробки: Поліщук В.Ю., асистент кафедри промислової біотехнології КПІ ім. Ігоря Сікорського

Джерела інформації:

- Поліщук В. Ю. Морфолого-культуральні і біосинтетичні властивості *Eremothecium ashbyi* Guill. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2011. – №3. – С. 74–78.
- Поліщук В. Ю. Динаміка росту та накопичення рибофлавіну аскоміцетом *Eremothecium ashbyi* Guillier. / В. Ю. Поліщук, М. І. Маланюк, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2014. – №3. – С. 73–77.
- Поліщук В. Ю. Сучасні можливості отримання ефірної олії з ароматом троянди / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2016. – №3. – С. 69–77.

- Поліщук В. Ю. Вплив умов культивування на біосинтетичну здатність *Eremothecium ashbyi* Guillerm. / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Технологічний аудит та резерви виробництва. – 2016. – №2/4(28). – С. 35–41.
- Поліщук В. Ю. Вплив умов отримання посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Science and Education a New Dimension. Natural and Technical Sciences. – 2017. – V(14), Issue: 132. – P. 82–84.
- Поліщук В. Ю. Рибофлавін – виробництво і застосування / В. Ю. Поліщук, О. М. Дуган // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. – 2009. – Вип. 134, ч. 3. – С. 274–290
- Технологія продуктів мікробного синтезу: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / Уклад. Л.Б. Орябінська, Л.П. Дзигун, В.Ю. Поліщук. - К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 40 с.
- Біотехнологія сільськогосподарських виробництв: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія», денної форми навчання / В.М. Ліновицька, Л.П. Дзигун, Л.О. Антоненко, В.Ю. Поліщук, О.М. Дуган. - К.: НТУУ «КПІ», 2011. – 32с.
- Основи мікології: методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» / Л.П. Дзигун, В.М. Ліновицька Л.О. Антоненко, В.Ю. Поліщук, О.М. Дуган. - К.: НТУУ «КПІ», 2011. – 28 с.

Результати впровадження: наукові та науково-методичні розробки щодо біотехнології отримання препаратів рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди з використанням аскоміцету *Eremothecium ashbyi* впроваджено у навчальний процес студентів, що навчаються за програмами підготовки бакалавра та магістра спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» в рамках лекційних та лабораторних занять з дисциплін «Технологія продуктів мікробного синтезу», «Основи мікології» та «Біотехнологія сільськогосподарських виробництв». Впровадження вищезазначених розробок дозволило вдосконалити викладання наступних розділів (тем): «Біотехнологія виробництва рибофлавіну», «Біотехнологія отримання ароматизаторів», «Характеристика основних груп грибів та грибоподібних організмів», розроблено лабораторну роботу «Отримання кормового рибофлавіну».

Відповідальні за впровадження:

Завідувач кафедри промислової біотехнології, д.т.н., доц.



Т.С. Тодосійчук