

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

**ПОЛІЩУК ВАЛЕНТИНА ЮРІЇВНА**

УДК 579.66:663.16:577.164.12

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА РИБОФЛАВІНУ І ЕФІРНОЇ  
ОЛІЇ, ЩО ПРОДУКУЮТЬСЯ *EREMOTHECIUM ASHBYI* GUILL.**

03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата технічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» Міністерства освіти і науки України.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Дуган Олексій Мартем'янович**,  
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», декан факультету біотехнології і біотехніки.

**Офіційні опоненти:** доктор технічних наук, професор  
**Прибильський Віталій Леонідович**,  
Національний університет харчових технологій  
Міністерства освіти і науки України, професор  
кафедри біотехнології продуктів бродіння і виноробства;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Поєдинок Наталія Леонідівна**,  
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН  
України», старший науковий співробітник відділу  
клітинної біології і біотехнології.

Захист відбудеться “27” червня 2018 р. о 11-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258.

З дисертацією можна ознайомитись у Науково-технічній бібліотеці ім. Г. І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37.

Відгуки на автореферат просимо надсилати за адресою: 03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 1, кімната 158, відділ вченого секретаря КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Автореферат розіслано “26” травня 2018 р.

В.о. ученого секретаря спеціалізованої  
вченої ради Д 26.002.28, д.т.н., доц.



Т.С. Тодосійчук

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Останнім часом моніторинг вітамінної забезпеченості населення виявляє вкрай недостатнє споживання вітамінів та ряду мінеральних речовин. Унаслідок зменшення вживання свіжої їжі з високим вмістом вітамінів та збільшення споживання продуктів харчування з високим ступенем оброблення особливо несприятливим є стан з вітамінами С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, фолієвою кислотою та каротиноїдами. З іншого боку, збільшення кількості населення вимагає забезпечити споживання основних вітамінів у вигляді добавок (Спиричев В. Б., 2004, 2006; Survase S. A., 2006). Для боротьби з харчовим дефіцитом вітаміни додають до їжі для її збагачення.

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 затребуваних вітамінів є рибофлавін. Він міститься у всіх тваринних та рослинних клітинах, проте отримати рекомендовану для вживання норму вітаміну В<sub>2</sub> лише за рахунок продуктів харчування дуже складно, оскільки лише деякі харчові продукти є багатими джерелами даного вітаміну. Тому пошук шляхів збільшення кількості вітаміну В<sub>2</sub> для потреб людини та тварин є задачею важливою та актуальною. На сьогоднішній день найбільш дешевим способом отримання вітаміну В<sub>2</sub> є мікробний синтез (Abbas C. A., 2011; Stahmann K. P., 2000).

Світовій мікробній промисловості відомі декілька десятків мікроорганізмів-продуцентів цього вітаміну, проте найбільш відомим з них є аскоміцет *Eremothecium ashbyi*, який використовується у промисловості. Окрім 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 (Lim S. H., 2001; Kalingan A. E., 1998, 2002; Massey V., 2000).

Одночасно з синтезом рибофлавіну *E. ashbyi* здійснює синтез ефірної олії, яка за ароматом та своїми властивостями ідентична ефірній олії, отриманій з пелюсток троянди (Погорельская А. Н., 2003; Семенова Е. Ф., 2012, 2017; Шпичка А. И., 2013, 2016). 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* 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 ефірної олії робить тему дисертаційної роботи актуальною, своєчасною та 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 В<sub>2</sub> 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 КПП 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 науковому 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 посилань.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** подано загальну характеристику роботи, обґрунтовано її актуальність, сформульовано мету та завдання дослідження, визначено його об'єкт, предмет, методи, окреслено наукову новизну, практичну цінність отриманих результатів, зв'язок роботи з науковими програмами, наведено дані про апробацію результатів роботи та інформацію про публікації за темою дисертаційної роботи.

У **першому розділі «Сучасні можливості отримання рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди (огляд літератури)»** на основі аналізу літературних джерел обговорюються властивості та застосування рибофлавіну. Представлено сучасні дані про таксономічне положення, морфологічний опис, еколого-фізіологічні особливості *Ermothecium ashbyi* як основного продуценту рибофлавіну, та особливості біосинтезу вітаміну B<sub>2</sub>. Узагальнено інформацію про умови одержання рибофлавіну міцеліальним грибом *E. ashbyi*, проаналізовано методи підвищення виходу рибофлавіну, компонентний склад поживних середовищ, що пропонуються до застосування та методи його математичної оптимізації. Охарактеризовано традиційні способи отримання ароматутворюючих речовин та їх недоліки. Розглянуто біотехнологічні можливості отримання ефірної олії з ароматом троянди з використанням аскоміцету *E. ashbyi*. Проаналізовано перспективи практичного використання синтезованих біологічно активних речовин.

На основі аналізу літературних джерел визначено актуальність власного дослідження та сформульовано завдання дисертаційної роботи.

У **другому розділі «Матеріали і основні методи досліджень»** наведено характеристику об'єктів та методів досліджень, викладено методики проведених експериментів.

Об'єкт дослідження *Ermothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-340. Наведено склад середовищ та умови зберігання штаму-продуценту.

Умови культивування штаму. Для перевірки життєздатності культури за різних температур та встановлення верхньої граничної температури штам інкубували в чашках Петрі з глюкозо-пептонно-дріжджовим середовищем (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. За відсутності росту за досліджуваної температури, надалі інкубація відбувалася за температури 28°C для перевірки збереження життєздатності.

З метою дослідження тривалості збереження культури в активному стані *E. ashbyi* зберігався при температурі 4 та 20°C у пробірках на агаризованих ГПД і

соєвому середовищах та на рідкому ГПД протягом семи місяців. Також культура зберігалась на ГПД під шаром вазелінового масла. Через місяць, три та сім місяців культура висівалася у колби з 50 см<sup>3</sup> рідкого ГПД. Досліджувався рівень накопичення біомаси та рибофлавіну у двох послідовних пересівах.

Для глибинного культивування культуру з агаризованого середовища 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 засівалося.

Глибинне культивування проводилось на орбітальних шейкерах ЛАБ-ПУ-01 за наступних умов: без перемішування, з перемішуванням при 70 або 180 об/хв; температура 24–31°C; тривалість культивування до 7 діб.

Для дослідження динаміки росту глибинне культивування *E. ashbyi* на рідкому поживному середовищі здійснювали при 28°C протягом 7 діб у конічних колбах з 50 см<sup>3</sup> середовища в умовах постійного перемішування на орбітальній качалці зі швидкістю 180 об/хв. Середовища у колбах інокулювались попередньо отриманою глибинною культурою у кількості 5 %. Проби культуральної рідини відбирали кожну добу.

Вплив рівня рН на накопичення культурою *E. ashbyi* біомаси та рибофлавіну визначався на ГПД середовищі, у якому за допомогою 0,1 н. NaOH створювався діапазон рН від 4,0 до 8,0 з кроком 0,5.

Для визначення найсприятливіших для накопичення біомаси та рибофлавіну джерел карбону використовували середовище, що в якості «фону» містило у своєму складі 0,5% дріжджового екстракту та 0,3% пептону, до якого додавали джерело карбону у кількості, еквівалентній 10 г/дм<sup>3</sup> глюкози.

Для дослідження впливу УФ-опромінення на синтез рибофлавіну вирощену на рідкому ГПД середовищі культуру *Eremothecium ashbyi* центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. з наступним промиванням стерильною дистильованою водою. Таким чином були отримані водні суспензії міцелію *E. ashbyi*. Водна суспензія міцелію або міцелій продуценту у середовищі культивування по 3 см<sup>3</sup> розливалися в знежирені та простерилізовані чашки Петрі діаметром 9 см. Чашки Петрі поміщали на відстані 25 см від джерела УФ-променів і проводили опромінення. Через задані проміжки часу (1, 3, 5 хвилин) чашки закривали кришками й опромінену культуральну рідину та водну суспензію міцелію *E. ashbyi* засівали в колби на 250 см<sup>3</sup> з рідким ГПД.

Показники, що визначалися в процесі культивування. Концентрацію біомаси визначали ваговим методом, рН – за допомогою рН-метра, концентрацію редуруючих речовин – методом Хагедорна-Йенсена, концентрацію рибофлавіну в культуральній рідині – спектрофотометричним методом. Концентрацію внутрішньоклітинного рибофлавіну в міцелії визначали спектрофотометрично після попереднього гідролізу в присутності 0,02 н. HCl при температурі 121°C протягом 20 хвилин. Виділення ароматуючих речовин здійснювали методом екстракції гексаном з наступним видаленням розчиннику та зважуванням залишку.

Для визначення кількісного співвідношення компонентів поживного середовища з метою максимального накопичення рибофлавіну був використаний центральньо-композиційний план 2 порядку для 3 факторів.

У третьому розділі «Біологічні властивості *Eremothecium ashbyi*» досліджено морфологічні та культуральні особливості *E. ashbyi* F-340. Продукт 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, а також 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. Це збігається з літературними даними про нестабільність даної культури при зберіганні.

У дослідженнях умов зберігання штаму показано, що короткотривале зберігання *E. ashbyi* F-340 у активному стані можливе на агаризованих ГПД та соєвому середовищах за температури зберігання 5°C. Довготривале зберігання культури (протягом 7 місяців) *Eremothecium ashbyi* можливе лише за кімнатної температури.

Досліджено вплив температури на життєдіяльність міцелію *E. 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 (табл. 1).

Таблиця 1 – Життєздатність міцелію за різних температур інкубації

Температура інкубації, °C	Наявність росту на 3 добу	Відновлення росту за 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.

Динаміка росту *E. ashbyi* F-340 у глибинній культурі підкоряється відомим закономірностям для періодичних культур (рис. 1). 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.



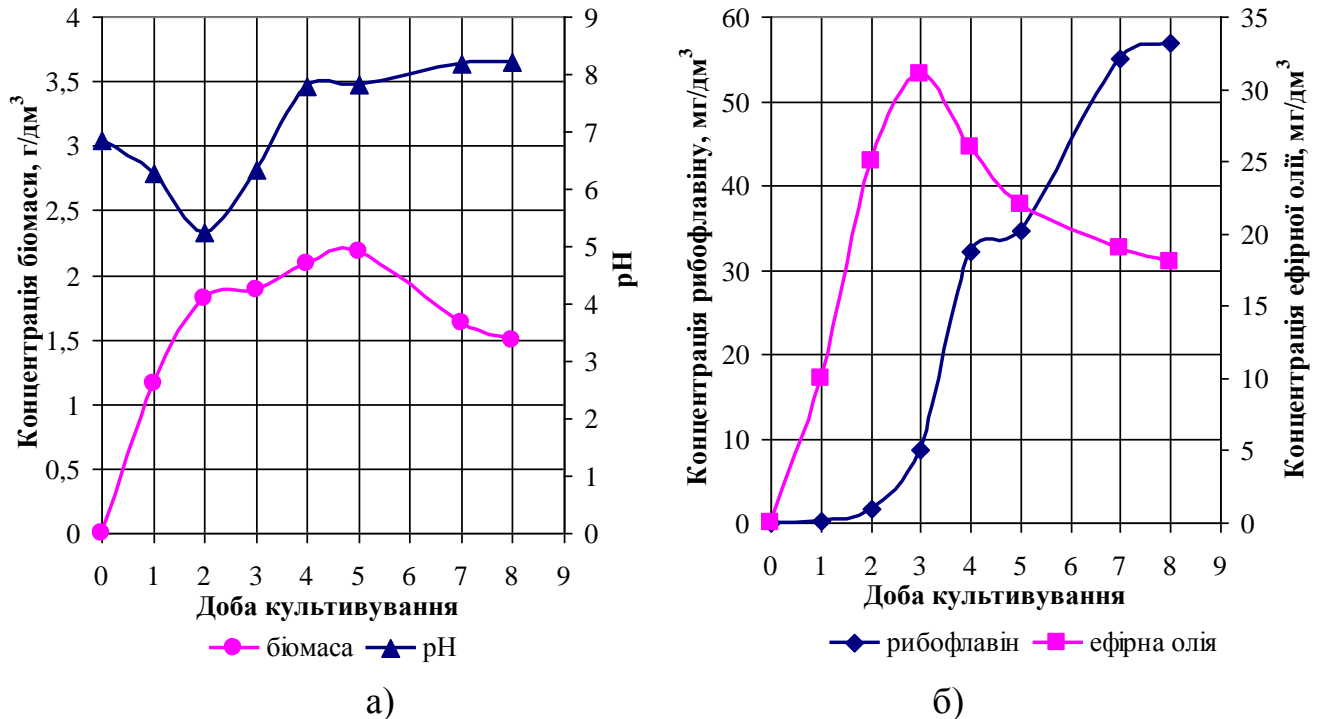


Рисунок 1 – Динаміка накопичення біомаси, зміни рН культуральної рідини в процесі культивування (а) та накопичення вторинних метаболітів (б) *E.ashbyi* F-340 ( $p < 0,05$ )

Встановлено, що під час інтенсивного росту штаму спостерігається зниження рН до 5,2, а от інтенсивне накопичення рибофлавіну у культуральній рідині та у біомасі пов'язане з підвищенням рН до 7,8. Найбільш інтенсивно накопичення рибофлавіну відбувається у стаціонарній фазі росту на 3–4 добу культивування, коли його концентрація досягає  $34,1 \pm 1,6$  мг/дм<sup>3</sup>. Другий етап накопичення рибофлавіну відбувається на 5–7 добу та пов'язаний з автолізом культури, вміст рибофлавіну зростає до  $55,2 \pm 2,7$  мг/дм<sup>3</sup>. 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, після чого рівень рибофлавіну у міцелії починає знижуватись (у фазі відмирання). Сумарний рівень накопичення рибофлавіну одночасно у культуральній рідині та у міцелії у стаціонарній фазі росту становив 25,8–26,6 мг/г сухої біомаси, а у фазі відмирання на 39 % більше:  $43,6 \pm 2,18$  мг/г сухої біомаси. Максимальна кількість ефірної олії накопичується на 3 добу культивування в експоненціальній фазі росту та становить  $31 \pm 2$  мг/дм<sup>3</sup>.

У четвертому розділі «Підтримка та підвищення фізіологічно активного стану культури продуцента» розглянуто умови отримання активного посівного матеріалу продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi*. Незважаючи на постійну підтримуючу селекцію під час культивування штаму у лабораторних умовах, протягом 3 років спостерігалось поступове значне зниження рівня накопичення рибофлавіну та відповідне збільшення рівня накопичення біомаси (рис. 2). Зниження кількості рибофлавіну із збільшенням кількості біомаси може пояснюватись тісним зв'язком біосинтезу флавінів з обміном пуринів.

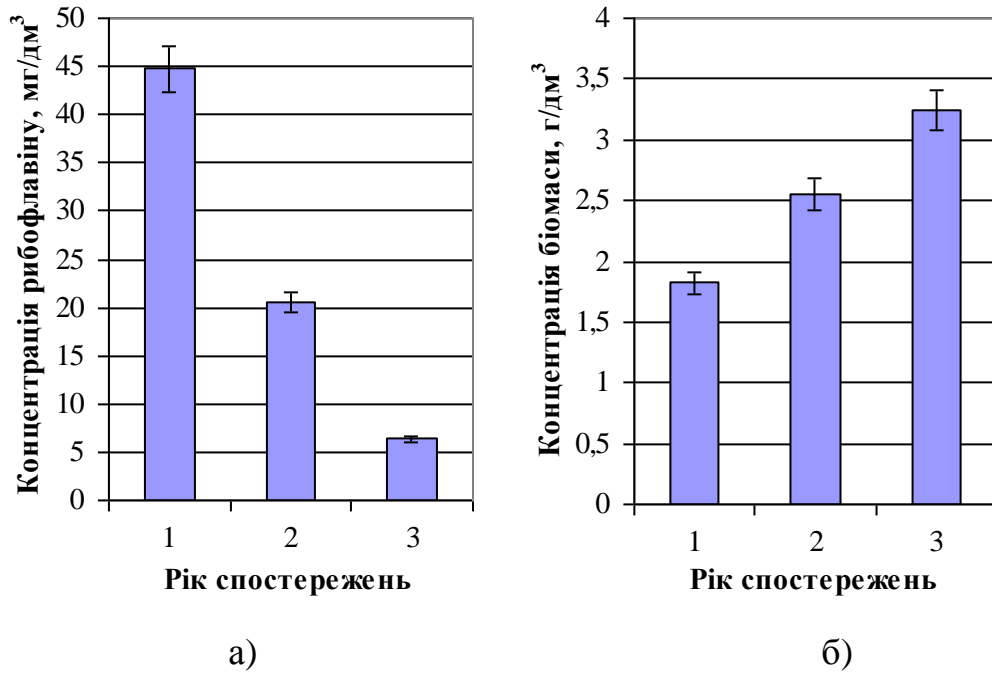


Рисунок 2 – Зміна рівня накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340 протягом 3 років ( $p < 0,05$ )

З літературних джерел відомо, що надсинтез рибофлавіну грибом *E. ashbyi* у природних умовах здійснюється як захисна реакція на дію сонячних ультрафіолетових променів, тому запропоновано здійснювати УФ-опромінення продуценту для підвищення синтезу рибофлавіну (рис. 3).

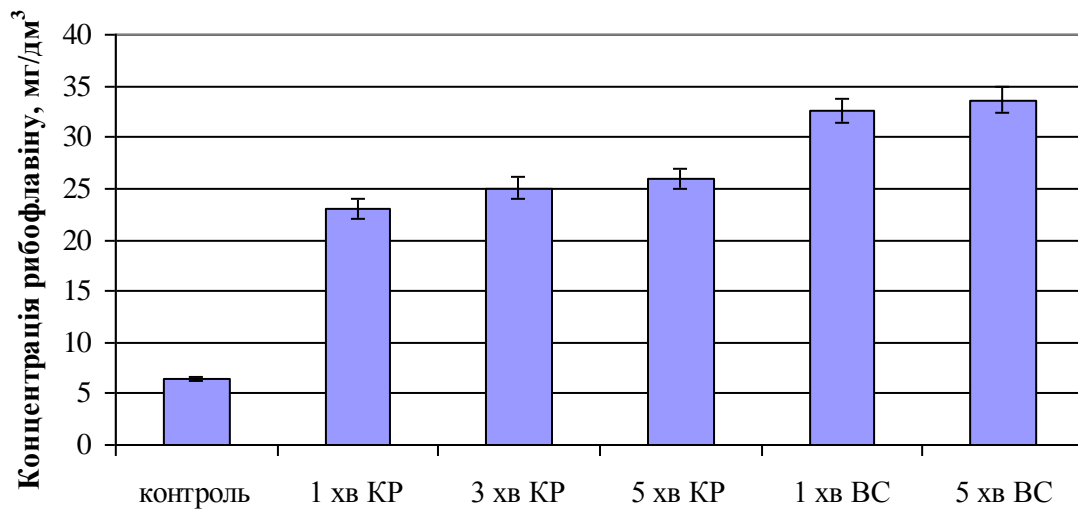


Рисунок 3 – Рівень накопичення рибофлавіну штамом *E. ashbyi* F-340 після УФ-опромінення (КР – культуральна рідина, ВС – водна суспензія міцелію) ( $p < 0,05$ , порівняно з показниками контролю)

Опромінення культуральної рідини продуценту призвело до збільшення синтезу рибофлавіну на 72-74 %, опромінення водної суспензії міцелію штаму-продуценту – до збільшення синтезу на 80 %. Показано, що економічно доцільно здійснювати опромінення УФ-променями протягом 1 хвилини.

Встановлено, що найбільший вихід рибофлавіну спостерігається при використанні посівного матеріалу у віці 3–4 діб (табл. 2) та у кількості 1% (табл. 3).

Таблиця 2 – Вплив тривалості культивування посівного матеріалу на біосинтетичну активність і накопичення біомаси продуцентом рибофлавіну ( $p < 0,05$ )

Тривалість вирощування посівного матеріалу, діб	Концентрація рибофлавіну на 6 добу культивування, мг/дм <sup>3</sup>	Концентрація біомаси на 6 добу культивування, г/дм <sup>3</sup>
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
4	<b>21,73±0,43</b>	1,93±0,085
5	16,45±0,77	2,55±0,077
6	18,46±0,89	<b>2,68±0,111</b>

Таблиця 3 – Вплив кількості посівного матеріалу на біосинтетичну здатність продуценту рибофлавіну ( $p < 0,05$ )

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

У розділі п'ять «Вплив факторів середовища на біосинтетичну здатність продуценту» наведено результати впливу значень початкового рН вихідного середовища (рис. 4), перемішування, джерел карбону, нітрогену та складу комплексних середовищ на здатність до накопичення рибофлавіну та біомаси.

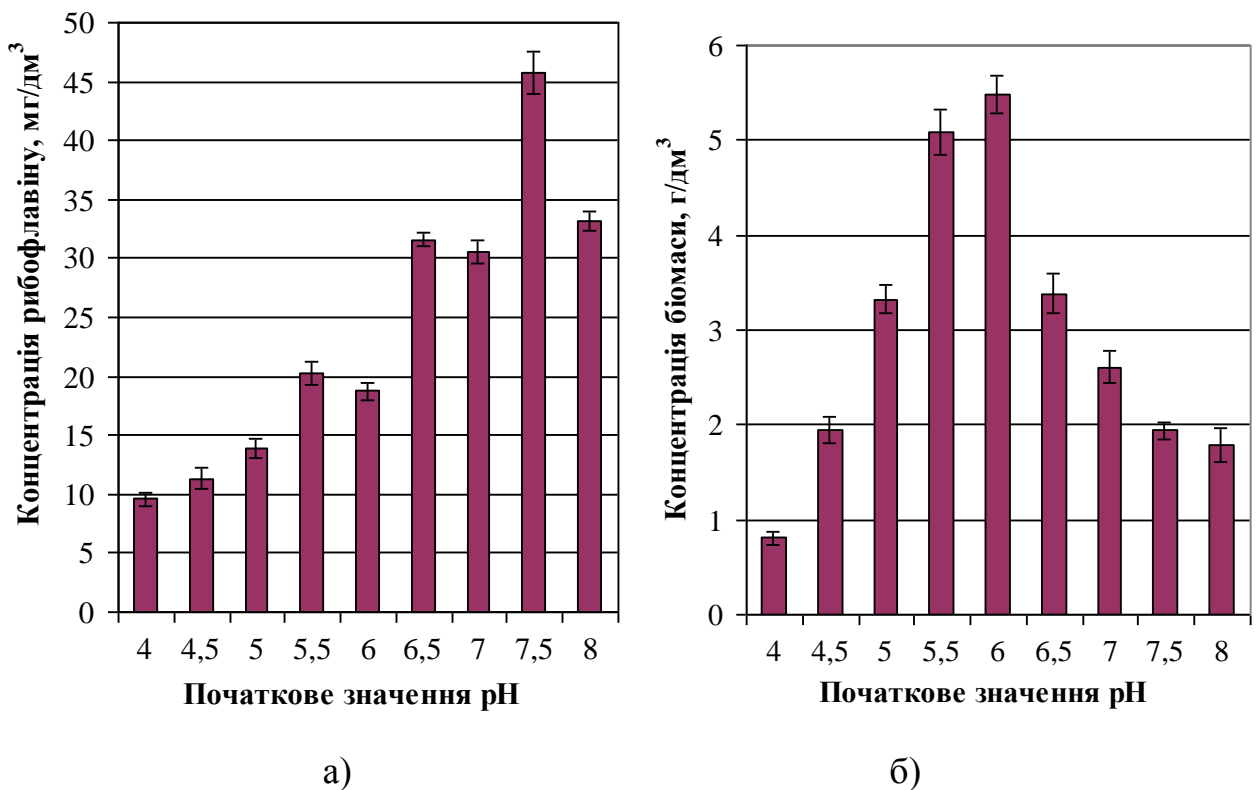


Рисунок 4 – Накопичення рибофлавіну та біомаси *E. ashbyi* F-340 за різних початкових значень рН (на 7 добу культивування) ( $p < 0,05$ )

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 (рис. 4).

Встановлено, що при перемішуванні 180 об/хв синтезується на 70 % більше рибофлавіну, ніж при 70 об/хв та без перемішування (рис. 5 а, б). Оптимальною температурою для максимального виходу цільового продукту є 27–29°C (рис. 5 в).

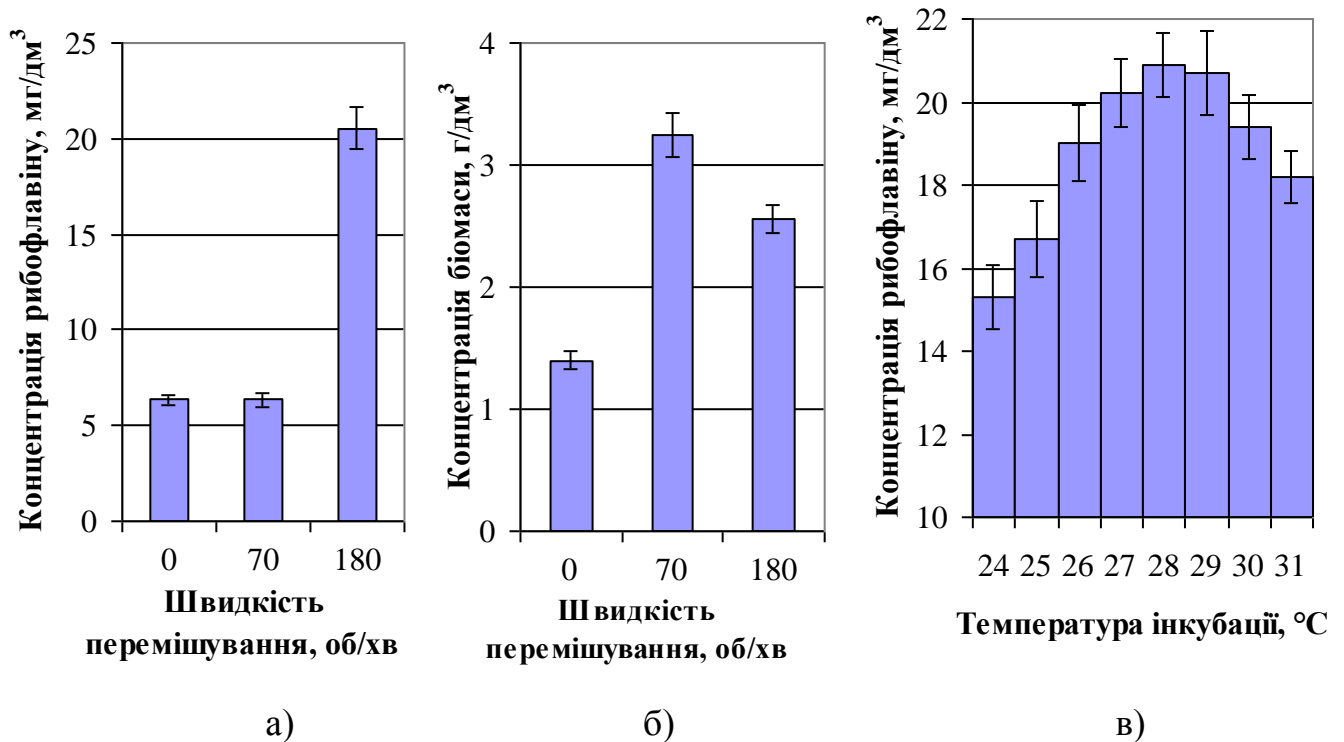


Рисунок 5 – Накопичення рибофлавіну (а, в) та біомаси (б) *E. ashbyi* F-340 за різних значень перемішування та температури культивування ( $p < 0,05$ )

Суттєвий вплив на накопичення біомаси та синтез рибофлавіну *E. ashbyi* F-340 чинять джерела вуглецевого та азотного живлення. Для синтезу рибофлавіну краще підходять моносахариди (фруктоза, галактоза) та шестиатомний спирт сорбіт (рис. 6), а біомаса краще накопичується при наявності в середовищі фруктози, сахарози та гліцерину.

Кращим джерелом нітрогену для *E. ashbyi* F-340 виявився дріжджовий екстракт (рис. 7): кількість рибофлавіну, що синтезована 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.

Однак досі не було запропоновано жодного середовища для культивування *Eremothecium ashbyi*, яке б містило у складі наведені вуглеводи та було б досить дешевим та технологічним.

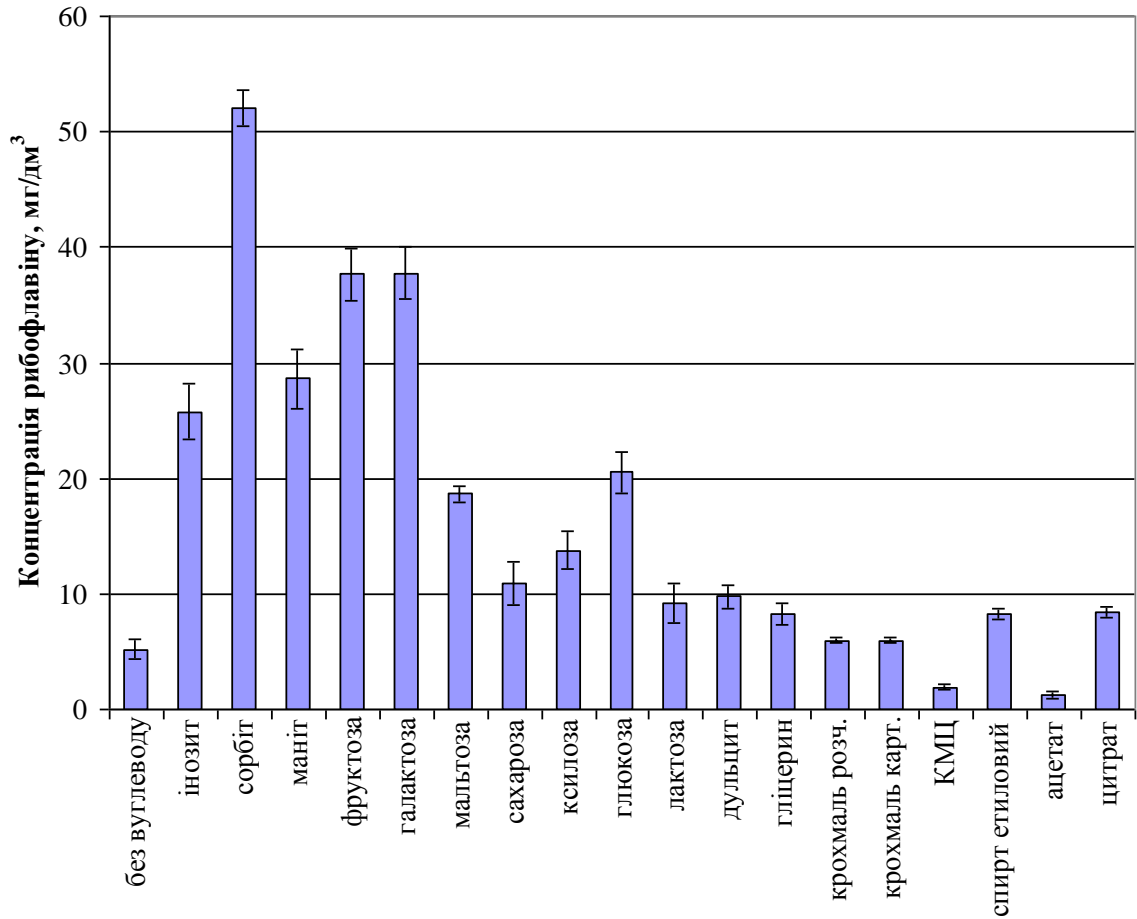


Рисунок 6 – Рівень біосинтезу рибофлавіну *E. ashbyi* F-340 на середовищах з різними джерелами карбону ( $p < 0,05$ )

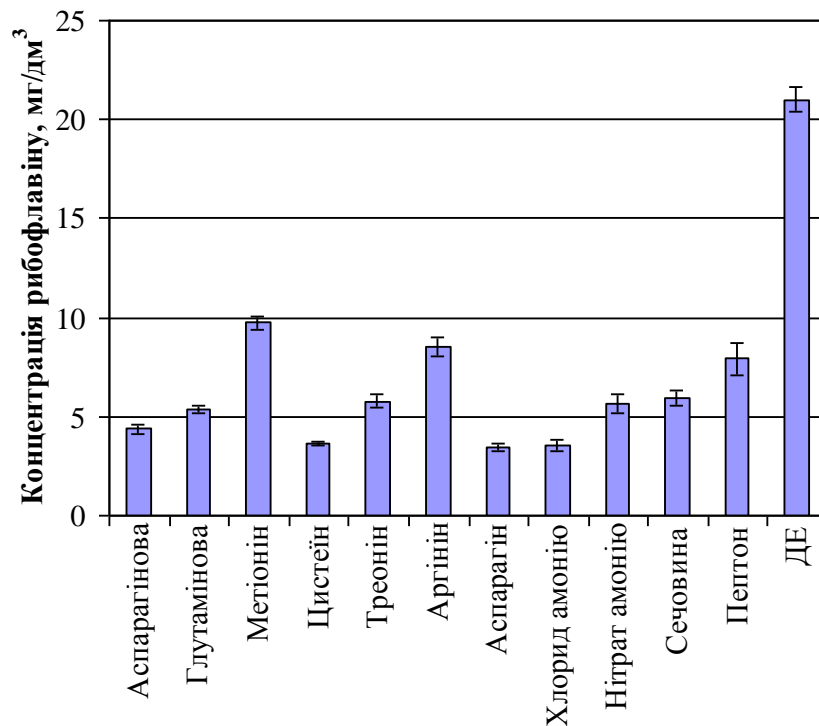


Рисунок 7 – Рівень біосинтезу рибофлавіну *E. ashbyi* F-340 на середовищах з різними джерелами нітрогену ( $p < 0,05$ )

У шостому розділі «Дослідження біосинтетичної здатності продуценту за культивування на глюкозо-фруктозних сиропах» 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 за використання ГФС-10 (140 мг/дм<sup>3</sup>), що у 7 разів більше, ніж на середовищі з глюкозою, та у 3,8 разів більше, ніж на середовищі з фруктозою (рис. 8).

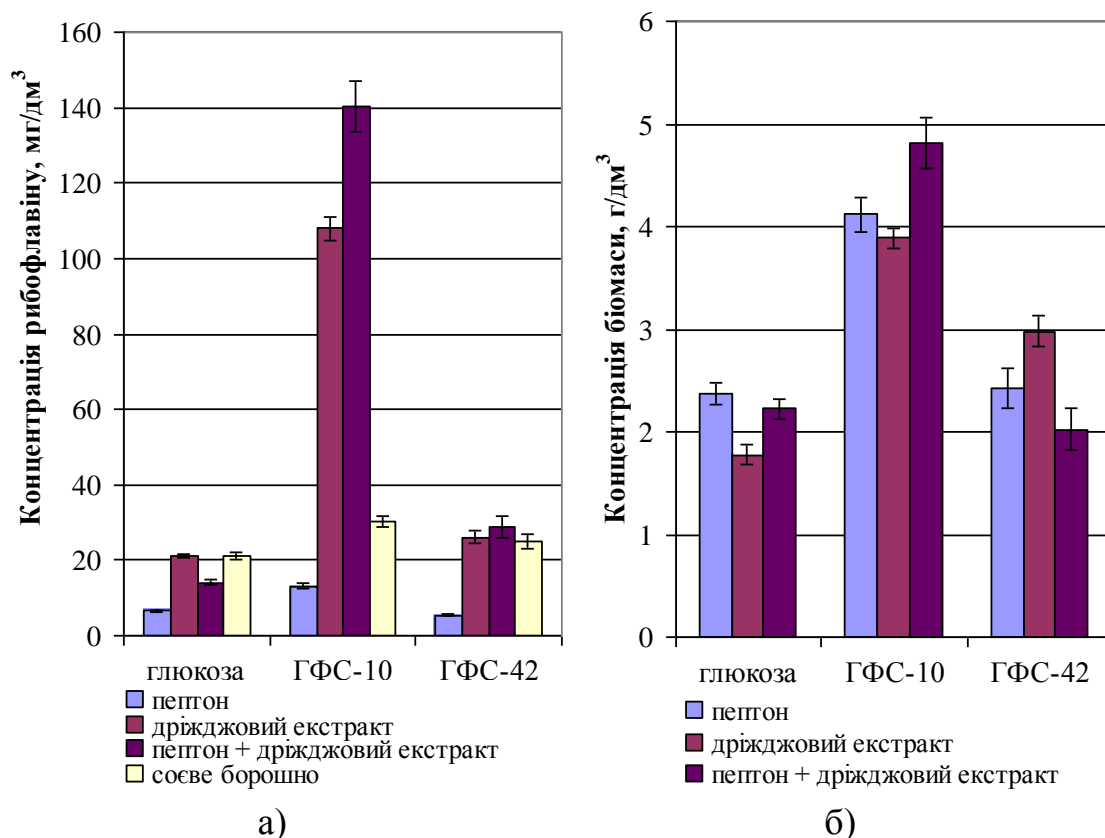


Рисунок 8 – Накопичення рибофлавіну (а) та біомаси (б) штамом *E. ashbyi* F-340 під час культивування на середовищі з глюкозо-фруктозними сиропами ( $p < 0,05$ )

У дослідженнях із встановлення впливу концентрації ГФС-10 на біосинтетичну здатність штаму-продуценту *Eremothecium ashbyi* показано, що найбільша кількість рибофлавіну синтезується продуцентом за найменшої концентрації ГФС-10 у дослідженому діапазоні 10–50 г/дм<sup>3</sup> у перерахунку на глюкозу.

З метою здійснення оптимізації поживного середовища проведено повний факторний експеримент на двох рівнях для 3 факторів, матрицю планування доповнили «зірковими» точками та отримали ортогональний центральноматричний 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):

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

Рівняння регресії залежності сумарної концентрації рибофлавіну в культуральній рідині та біомасі від складу середовища:

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

За аналізом поверхонь відгуку встановлено склад модифікованого середовища: оптимальна концентрація ГФС-10 для максимального накопичення рибофлавіну становить 40 г/дм<sup>3</sup>, концентрації дріжджового екстракту та пептону у середовищі становлять відповідно 10 та 1 г/дм<sup>3</sup>. Кількість рибофлавіну, що утворюється за культивування на модифікованому середовищі у культуральній рідині становить 350,4±15 мг/дм<sup>3</sup>, що у 17 разів 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 становить 373±19 мг/дм<sup>3</sup>.

**Визначення вмісту у культуральній рідині ефірної олії** проводили трьохкратною екстракцією гексаном з наступним видаленням розчинника. Показаний широкий діапазон варіювання кількості ефірної олії (табл. 4). Найбільша кількість спостерігається на середовищі, що містить в якості джерела карбону ГФС-10. Кількість ефірної олії збільшується зі збільшенням концентрації ГФС у середовищі.

Таблиця 4 – Рівень накопичення ефірної олії *E. ashbyi* в залежності від середовища культивування (p<0,05)

Поживні середовища	Вміст ефірної олії, мг/дм <sup>3</sup>
Вік посівного – 3 доби	60±3
Вік посівного – 4 доби	74±4
Вік посівного – 5 доби	53±2
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
Модифіковане середовище	373±19

У цьому розділі «Технологія отримання рибофлавіну та ефірної олії на глюкозо-фруктозному сиропі» наведено технологічну схему одночасного отримання рибофлавіну та ефірної олії методом гідродистиляції (рис. 9) з подальшим розділенням потоків виділення рибофлавіну та ефірної олії.

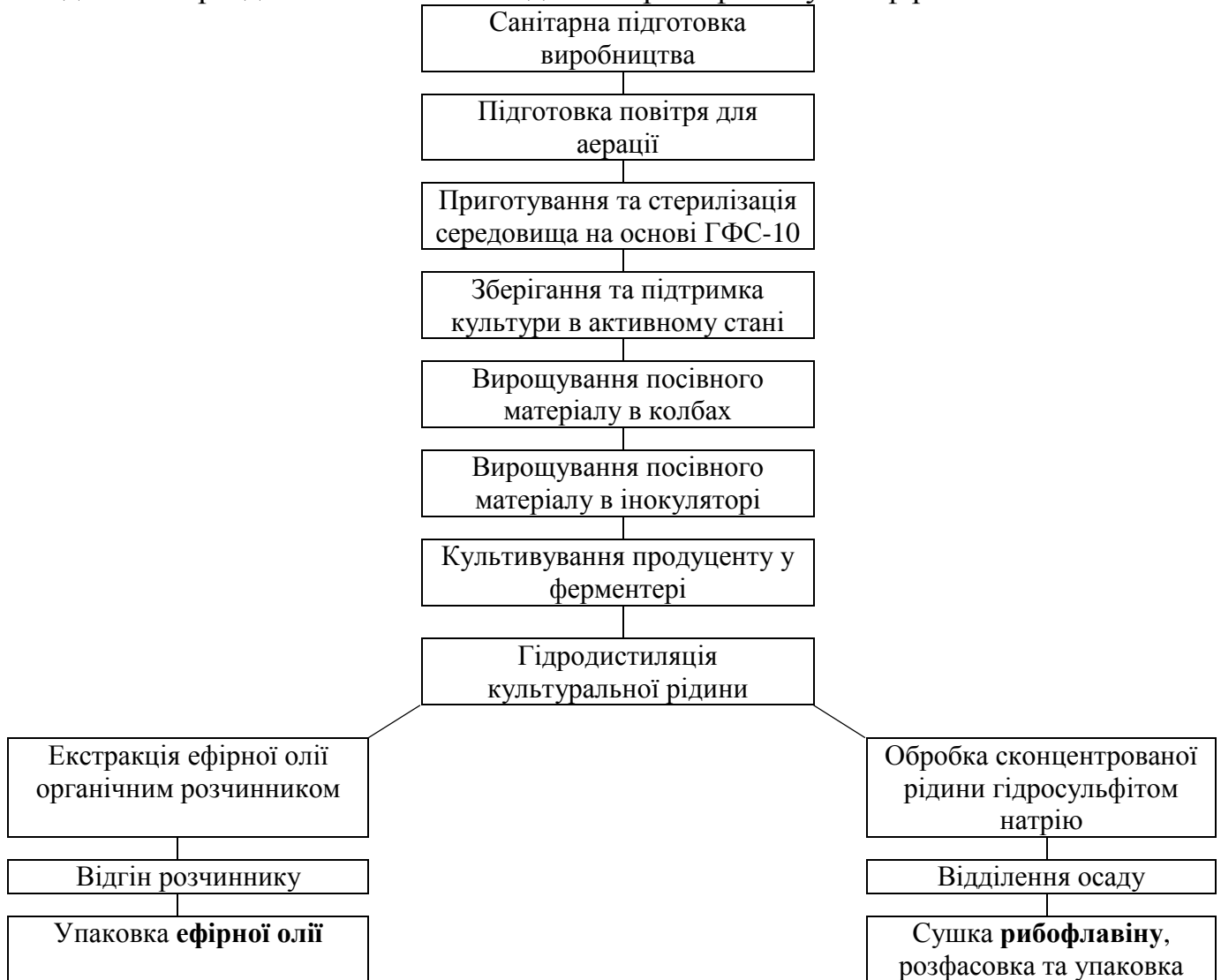


Рисунок 9 – Принципова технологічна схема виробництва рибофлавіну та ефірної олії з використанням *E. ashbyi*

## 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/дм<sup>3</sup>. Другий етап накопичення рибофлавіну відбувається на 5–7 добу, що пов'язано з автолізом культури (вміст рибофлавіну



становить  $55,2 \pm 2,7$  мг/дм<sup>3</sup>). 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 біомаси, починаючи з 5 доби кількість рибофлавіну у міцелії зменшується. Максимальна кількість ефірної олії накопичується в експоненціальній фазі росту та становить  $31 \pm 2$  мг/дм<sup>3</sup>.

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 %. Оптимальна температура культивування становить 27–29°C.

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 сушло. Продуцентом синтезовано рибофлавіну  $77,0 \pm 3,85$  мг/дм<sup>3</sup>, що у 2,8 рази більше ніж на глюкозо-пептонно-дріжджовому середовищі та соєвому середовищі. Приріст біомаси становить  $4,16 \pm 0,17$  г/дм<sup>3</sup>, 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 ( $273 \dots 420$  мг/дм<sup>3</sup>).

9. За допомогою методів математичного планування визначено склад модифікованого середовища для продукування рибофлавіну (склад: ГФС-10 40 г/дм<sup>3</sup>, дріжджовий екстракт 10 г/дм<sup>3</sup>, пептон 1 г/дм<sup>3</sup>), 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### **Статті у наукових фахових виданнях України:**

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. (Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні, підготовці та проведенні досліджень, статистичній обробці та аналізі експериментальних даних, написанні статті)

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. (Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні, підготовці та проведенні досліджень, статистичній обробці та аналізі експериментальних даних, написанні статті)

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. (Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні, підготовці та проведенні досліджень, статистичній обробці та аналізі експериментальних даних, написанні статті)

### **Статті у наукових фахових виданнях України,**

#### **які входять до міжнародних наукометричних баз даних:**

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. (Входить до: DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, WorldCat, J-Gate, Google Scholar, Chemical Abstracts Plus (CASSI), OpenAIRE, Ulrich's Periodicals Directory, BASE, Open Academic Journal Index, AcademicKeys, ResearchBib, Turkish Education Index, Eurasian Scientific Journal Index, Cosmos Impact Factor, Miar, WCOSJ, I2OR, Scholarsteer, SIS, IIJIF, InfoBase Index, PИИЦ). (Особистий внесок дисертанта: проведено літературний огляд за темою дослідження, написання статті)

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. (Входить до: Index Copernicus, Ulrich's Periodicals Directory, DRIVER, Bielefeld Academic Search Engine (BASE), Российский индекс научного цитирования (РИИЦ), ResearchBib, Directory of Open Access Journals (DOAJ), WorldCat, EBSCO, CrossRef) (Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні, підготовці та проведенні досліджень, статистичній обробці та аналізі експериментальних даних, написанні статті)

### **Статті в іноземних фахових виданнях:**

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), Issue: 132. – P. 82–84. (Входить до: Index

Copernicus, Global Impact Factor, Inno Space Scientific Journal, International Scientific Indexing, Google Scholar) *(Особистий внесок дисертанта: підготовлено методу проведення експериментальних досліджень та виконано експериментальні дослідження, написання статті)*

**Статті в інших наукових виданнях:**

7. 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. *(Особистий внесок дисертанта: проведено літературний огляд за темою дослідження, написання статті)*

**Тези доповідей:**

8. 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. *(Особистий внесок дисертанта: проведено літературний огляд за темою дослідження, підготовка тез)*

9. 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. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)*

10. Поліщук В. Ю. Перспективи отримання ефірної олії для парфюмерії біотехнологічним способом / В. Ю. Поліщук, Ю. В. Єлісеєва, 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. *(Особистий внесок дисертанта: проведено літературний огляд за темою дослідження, підготовка тез)*

11. 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. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)*

12. 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. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)*

13. 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. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)*

14. 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. (Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)

15. 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. (Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)

16. 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. (Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)

17. 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. (Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)

18. 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. (Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)

19. Поліщук В. Ю. Використання глюкозо-фруктозних сиропів для культивування продуценту рибофлавіну *Eremothecium ashbyi* Guillier. / 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. (Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту і підготовка тез)

## АНОТАЦІЯ

**Поліщук В. Ю. Розробка технології виробництва рибофлавіну і ефірної олії, що продукуються *Eremothecium ashbyi* Guill.** – 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.

Дисертаційна робота присвячена біотехнології отримання рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди з використанням аскоміцету *Eremothecium ashbyi*.

Досліджено біологічні властивості *E. ashbyi* F-340 та рівень його біосинтетичної активності. Виявлено умови довготривалого зберігання продуценту. Запропоновано методи підвищення біосинтетичної здатності продуценту за допомогою підтримуючої селекції та УФ-опромінення. Встановлено вік та концентрацію посівного матеріалу, за яких спостерігається максимальне накопичення рибофлавіну.

Встановлено джерела карбону та нітрогену, що сприяють збільшенню виходу рибофлавіну, оптимальні значення вихідного рН середовища для максимального біосинтезу рибофлавіну та біомаси, доцільні умови перемішування. Вперше показано можливість використання в якості джерела карбону глюкозо-фруктозного сиропу: вітчизняної відновлюваної сировини, що виробляється з кукурудзи. Доведено здатність *E. ashbyi* F-340, одночасно з рибофлавіном, синтезувати ефірну олію з ароматом троянди в широкому варіаційному діапазоні. Найбільша кількість олії продукується на середовищі з глюкозо-фруктозним сиропом.

За допомогою факторного експерименту отримано склад модифікованого поживного середовища, що призвело до значного збільшення виходу рибофлавіну. На основі проведених досліджень розроблено технологічну схему одночасного отримання рибофлавіну та ефірної олії з ароматом троянди з використанням *E. ashbyi* F-340.

**Ключові слова:** *Eremothecium ashbyi*, рибофлавін, ефірна олія, глибинне культивування, посівний матеріал, поживне середовище, глюкозо-фруктозний сироп, математичне планування.

## АННОТАЦІЯ

**Полищук В. Ю. Разработка технологии производства рибофлавина и эфирного масла, продуцируемых *Eremothecium ashbyi* Guill.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского», Киев, 2018.

Диссертация посвящена биотехнологии получения рибофлавина и эфирного масла с ароматом розы с использованием аскомицета *Eremothecium ashbyi*.

Исследованы биологические свойства *E. ashbyi* F-340 и уровень его биосинтетической активности. Выявлены условия длительного хранения продуцента. Предложены методы повышения биосинтетической способности продуцента с помощью поддерживающей селекции и УФ-облучения. Установлены возраст и концентрация посевного материала, при которых наблюдается максимальное накопление рибофлавина.

Установлены источники углерода и азота, которые способствуют увеличению выхода рибофлавина, оптимальные значения исходного рН среды для максимального биосинтеза рибофлавина и биомассы, целесообразные условия перемешивания. Впервые показана возможность использования в качестве источника углерода глюкозо-фруктозного сиропа: отечественного возобновляемого сырья, получаемого из кукурузы. Доказана способность *E. ashbyi* F-340,

одновременно с рибофлавином, синтезировать эфирное масло с ароматом розы в широком вариационной диапазоне. Наибольшее количество масла производится на среде с глюкозо-фруктозным сиропом.

С помощью факторного эксперимента получен состав модифицированной питательной среды, что привело к значительному увеличению выхода рибофлавина. На основе проведенных исследований разработана технологическая схема одновременного получения рибофлавина и эфирного масла с ароматом розы с использованием *E. ashbyi* F-340.

**Ключевые слова:** *Eremothecium ashbyi*, рибофлавин, эфирное масло, глубинное культивирование, посевной материал, питательная среда, глюкозо-фруктозный сироп, математическое планирование.

## SUMMARY

**Polishchuk V.Yu. 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.

During the work, morphological and cultural peculiarities of the strain *Eremothecium ashbyi* F-340 have been investigated. The strain storage conditions have been investigated. Long-term storage of *E. ashbyi* culture (for 7 months) is possible only at room temperature.

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 stationary 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 stationary growth phase on culturing day 3–4, and its concentration reaches 34 mg/dm<sup>3</sup>. The second stage of riboflavin accumulation occurs on day 5-7 and is associated with culture autolysis; riboflavin content reaches 55 mg/dm<sup>3</sup>. 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. UV 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.

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. 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/dm<sup>3</sup>), 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/dm<sup>3</sup>, and concentrations of yeast extract and peptone in the medium are 10 and 1 g/dm<sup>3</sup>, respectively. Riboflavin concentration observed during culturing on modified medium in cultural fluid is 350.4±15 mg/dm<sup>3</sup>, which is 17 times higher than on GPY medium and 2.5 times higher than on initial medium with GFS-10.

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/dm<sup>3</sup>) 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.

**Key words:** *Eremothecium ashbyi*, riboflavin, essential oil, inoculum, submerged culturing, nutrient media, glucose-fructose syrup, mathematical planning.