

Шпичка Анастасия Иосифовна

**БИОЛОГИЯ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА ЕРЕМОТНЕСИУМ –  
ПРОДУЦЕНТОВ ЭФИРНОГО МАСЛА И РИБОФЛАВИНА**

03.01.06. Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2013 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет».

**Научный руководитель**      **Семенова Елена Федоровна**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

**Официальные оппоненты**   **Садыкова Вера Сергеевна**  
доктор биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
Научно-исследовательский институт по изысканию новых  
антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН,  
лаборатория химических исследований биологически  
активных соединений микробного происхождения,  
старший научный сотрудник

**Корнеева Ольга Сергеевна**  
доктор биологических наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования  
Воронежский государственный университет инженерных  
технологий, зав. кафедрой биохимии и биотехнологии

**Ведущая организация**      Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

Защита состоится 24 декабря 2013 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001. 21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 1199234, Москва, Ленинские горы, дом 1, корп.12, Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, ауд. М-1. Тел.8(495)939-54-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ.

Автореферат разослан «\_\_» ноября 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Пискункова Нина Федоровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** На протяжении длительного времени традиционным источником летучих душистых веществ были эфирные масла, получаемые из растений. Однако трудности плантационного культивирования эфирносов и недостаток сырья существенно лимитируют развитие парфюмерно-косметической, фармацевтической и пищевой промышленности. Кроме того, качество таких эфирных масел может сильно варьировать в зависимости от ряда условий, сложно поддающихся контролю.

В связи с этим представляется особенно важным поиск альтернативных источников получения летучих душистых веществ с применением биотехнологических подходов (Krings, Berger, 1998; Vicas et al., 2010). В частности, ранее показана возможность применения микроорганизмов, способных продуцировать соединения с различными направлениями запаха путем как их синтеза *de novo*, так и биоконверсии дополнительно введенных в питательную среду предшественников ароматобразующих веществ (Soetaert, Vandamme, 2010). Так, за рубежом внедрены в производство способы получения 4-декалактона с персиковым запахом (BASF), макроциклических компонентов мускуса (Nippon Mining Co., Quest International), ванилина (Evolva) и других ароматизаторов (Janssens et al., 1992; Bomgardner, 2012).

Биотехнология розового эфирного масла, одного из ценнейших масел в мире, до сих пор не разработана. Было выявлено, что количество синтезированного масла в клеточной культуре розы на порядок ниже, чем в лепестках интактного растения. При этом состав экстрагируемых масел отличался от розового масла, полученного из растения (Егорова, Ставцева, 2006). В 90-е годы прошлого века была показана возможность получения ароматического продукта на основе штаммов *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995, сходного по составу с эфирным маслом из свежих цветков розы (Бугорский, Семенова, Родов, 1990; Бугорский, Семенова, 1991). Поэтому актуальна разработка биотехнологии эфирного масла на основе микромицетов рода *Eremothecium*.

**Цель работы** – исследовать биологические аспекты технологии получения ароматических продуктов при глубинном культивировании штаммов *Eremothecium*.

### **Задачи исследования:**

- выявить особенности онтогенеза видов *Eremothecium*;
- исследовать влияние посевного материала, физико-химических параметров ферментации и компонентов питательных сред на продуктивность изучаемых культур;
- изучить состав вторичных метаболитов и закономерности их накопления в зависимости от условий ферментации;

- усовершенствовать методические аспекты отбора высокоактивных вариантов с определенным содержанием значимых компонентов в смеси биологически активных соединений;
- разработать проект лабораторного регламента биотехнологии эремотецевого масла.

**Научная новизна.** Впервые обобщены сведения по видам рода *Eremothecium*, способных синтезировать летучие душистые вещества. Получены новые данные о состоянии и характере развития микроморфологических структур, накапливающих эфирное масло и рибофлавин. Изучено влияние компонентов питательной среды, физико-химических условий, состояния инокулята на продуктивность глубинной культуры и состав синтезируемого эфирного масла. Впервые осуществлен скрининг ароматобразующей способности рабочей коллекции штаммов *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995, и выявлены перспективные культуры для селекции производственных штаммов. Показаны антимикробные свойства масла, синтезируемого микроорганизмами. Предложены методические подходы отбора высокоактивных вариантов и штаммов, синтезирующих комплекс биологически активных соединений.

**Практическая значимость работы.** На основе комплексной оценки выявлены лучшие штаммы и определены биотехнологические параметры их культивирования, которые рекомендованы для внедрения в производство. Усовершенствованные методические подходы для отбора вариантов и(или) штаммов с заданным составом целевого продукта осуществляются в селекции продуцентов эфирных масел. Разработан проект лабораторного регламента биотехнологии эремотецевого масла. Результаты исследования используются в научно-исследовательских работах и в учебных курсах Пензенского государственного университета.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Уровень накопления рибофлавина и эфирного масла в культуре *Eremothecium* связан с формированием некоторых клеточных структур в онтогенезе.
2. Компоненты питательной среды, физико-химические условия, состояние инокулята существенно влияют на качественный и количественный состав биологически активных соединений, синтезируемых *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995.
3. При отборе высокоактивных вариантов и селекции штаммов с измененным компонентным составом вторичных метаболитов целесообразно использование предлагаемых методических подходов, заключающихся в анализе соотношений главных компонентов целевого продукта.

**Апробация работы.** Основные положения, выводы и предложения диссертационного исследования прошли многократную апробацию на XXII Внутривузовских научно-технических

конференциях профессорско-преподавательского состава и студентов ПГУ (Пенза, 2011), Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 40-летию фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты» (Самара, 2011), I и II Международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны» (Пенза, 2011; 2012 - дипломы I степени); IV Международном студенческом научном форуме (Москва, 2012); Международной молодежной научной школе «Современные биоинженерные и ядерно-физические технологии в медицине» (Саратов, 2012 - Гран-При); II и III Международных научно-практических конференций «Современные проблемы медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области» (Пенза, 2012; 2013 – дипломы I степени); VII Международной научной конференции молодых ученых-медиков (Курск, 2013); Международной научно-практической Интернет-конференции "Биотехнология. Взгляд в будущее" (Казань, 2013); 77-й итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 90-летию со дня рождения профессора П. Г. Макарова и 90-летию со дня рождения доцента Б. М. Зельмановича (Красноярск, 2013); VII Всероссийской (81-й Итоговой) студенческой научной конференции, посвященной 90-летию СНО СамГМУ «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» (Самара, 2013 - диплом за лучший доклад); V Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины» (Беларусь, Гомель, 2013); II Межрегиональной научной конференции «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (Пенза, 2013); III Международной научно-практической конференции «Ароматкоррекция психофизического состояния человека» (Украина, Ялта, 2013).

Полученные данные легли в основу инновационных разработок по получению ароматического продукта с запахом розы на основе биотехнологического сырья и комплексной технологии получения рибофлавина и эфирного масла, которые были представлены на конкурсе «У.М.Н.И.К.» (2012), III Межрегиональном форуме «INNOMED-2013», Образовательно-промышленном форуме «Инновационное образование – локомотив технологического прорыва России», XI ярмарке «Российским инновациям – Российский капитал» (Нижний Новгород, 2013) и многочисленных региональных выставках.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** В соответствии с формулой и областями исследований специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» в данном диссертационном исследовании отражены некоторые биотехнологические аспекты селекционных исследований в прикладной микробиологии;

оптимизации процессов биосинтеза; изучения и разработки технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов для получения продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучения их состава.

**Личный вклад автора.** Проведение опытов, анализ литературных, экспериментальных данных и оформление полученных результатов осуществлен автором самостоятельно, в соответствии с планом, согласованным с научным руководителем. ГЖХ-анализ образцов ароматических продуктов выполнен совместно с Даниловой И.Л., с.н.с. ИЭЛК и ИСХК. Вклад автора в подготовке и написании совместных публикаций составляет 50–90%.

**Связь с тематическими планами НИР.** Диссертационные исследования проведены в рамках задания по теме «Фармакогностические и технологические аспекты изучения новых источников лекарственного сырья растительного и микробного происхождения, лекарственных форм и препаратов на его основе» (№ госрегистрации 01201062254), Гранта Министерства образования и науки РФ 4.4052.2011 «Фарммикробиологические и биотехнологические аспекты получения эфирного масла и рибофлавина на основе культуры *Eremothecium*».

**Публикация результатов исследования.** На основе полученных результатов было подготовлено и опубликовано 27 научных публикаций, в том числе 6 статей в журналах перечня ВАК и 4 - в международных журналах на английском языке.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 163 страницах компьютерного текста, состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и приложений, включает 20 таблицы, 35 рисунков, 4 приложения. Список использованной литературы включает 164 источников, в том числе 124 – иностранных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Виды рода *Eremothecium*: характеристика и перспективы использования в биотехнологических производствах биологически активных соединений

На основании анализа литературных источников в главе обсуждаются таксономическое положение, морфологическое описание, эколого-физиологические особенности видов рода *Eremothecium*, химический состав их метаболитов, перспективы практического использования синтезируемых ими биологически активных веществ (Миронов, Цибульская, 1971, 1982; Бугорский, Родов, Носов, 1986; Бугорский, Семенова, Родов, 1990; Бугорский, Семенова, 1991; Семенова, Богданов, 2000; Погорельская и др., 2001, 2003; Семенова, 2007; Поліщук, Маланюк, Дуган, 2011; Omeliansky, 1923; Krneta-Jordi, 1962; Batra, 1973; von Arx et al., 1977; Ozbas, Kutsal, 1986, 1991, 1992; Janssens et al., 1992; Kurtzman et al, 1995, 1998, 2003; Ertrk, Erkmen, Oener,

1998; Stahmann, Revuelta, Seulberger, 2000; Leeuw et al., 2006, 2007; Kimura, Tokumaru, Kuge, 2008; Sudeshna, Chandra, 2011; Wendland, Walther, 2011).

## Глава 2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили штаммы *Eremothecium ashbyi* Guilliermond 1935 ВКМ F-124, ВКМ F-1397, ВКМ F-3009, ВКПМ F-6, ВКПМ F-36, ВКПМ F-108, ВКПМ F-340 и *Eremothecium gossypii* (Ashby S.F. et Nowell W. 1926) Kurtzman 1995 ВКМ F-1398, ВКМ F – 2627, ВКМ F-3276, ВКМ F-3296, ВКПМ F-35. Более детально изучались штаммы *E. ashbyi* Guilliermond 1935 ВКМ F-3009, ВКПМ F-36 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 ВКМ F-3276, ВКМ F-3296.

Жизнеспособность микроорганизмов оценивали прямым макрокультуральным методом на мальт-агаре (г/л: солодовое сусло (3,5°Б) – 1,0 л; агар-агар – 20, 0 г) (Нетрусов, 2005). Утилизация источников углерода и азота исследуемыми культурами изучалась на модификациях среды Чапека.

Микроскопию проводили в нативных и окрашенных метиленовым синим, йодом, суданом III, черной тушью препаратах с использованием микроскопа МИНИМЕД-5321(XSZ-2107) при 10-, 40-, 100-кратном увеличении (Саркисова, Перова, 1996).

Морфофизиологические особенности видов и штаммов *Eremothecium* исследовали в различных условиях культивирования, в частности – при температурах от 18 до 38°С и при исходных значения рН от 4,00 до 7,5.

Материал для инокуляции посевных сред готовили культивированием в течение 72...168 ч. при температуре 28°С на поверхности скошенных агаризованных сред: на соево-сахарозной (г/л: сахароза – 10,0; соевая мука – 40,0; агар-агар – 20,0; рН 6,8...7,0), картофельно-глюкозной (декстрозной) (г/л: картофель – 200,0; глюкоза (декстроза) – 20,0; агар-агар – 30,0; рН 6,0), глюкозо-пептонной с дрожжевым экстрактом (г/л: дрожжевой экстракт – 2,0; пептон – 2,0; глюкоза – 10,0; агар-агар – 20,0; рН 6,5...6,7).

На следующем этапе материал выращивали глубинным способом в жидких питательных средах различного состава: соево-сахарозной (г/л: СС1- сахароза – 15,0; соевая мука – 20,0; кукурузный экстракт – 10,0; калия гидрофосфат – 1,0; рН 6,0...7,0; СС2 - соевая мука – 20; сахароза – 20, рН 7,0) и глюкозо-пептонной (г/л: глюкоза – 7,5; пептон – 4,0; натрия сукцинат – 2,0; К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> – 0,5; инозит – 0,14; рН 6,5) при непрерывном встряхивании 150-200 кач./мин. в течение 24...72 часов при температуре 28°С. Объем инокулята – 1...10 % от объема засеваемой среды.

Ферментацию осуществляли глубинным способом в соево-сахарозной (г/л: сахароза – 5,00...20,0; соевая мука – 5,00...35,0; рН 7,0), картофельно-глюкозной (картофельно-

декстрозной) (г/л: картофельный экстракт – 6,5; глюкоза (декстроза) – 20,0; рН 5,8) жидких питательных средах и бульоне с экстрактом солода (г/л: солодовый экстракт – 6,0; декстроза – 6,0; мальтоза – 6,0; дрожжевой экстракт – 1,2; глюкоза – 7,5; пептон – 4,0; калия  $K_2HPO_4$  – 0,5) в течение 18...120 часов при температуре 28°C и непрерывном встряхивании на качалке 200-240 кач./мин. (перемешивании в ферментере 250-600 об./мин.).

Культуральную жидкость в трехкратной повторности отбирали каждые 12 часов. Биомассу продуцента отделяли фильтрованием от питательной среды и взвешивали до и после высушивания. Содержание рибофлавина определяли на спектрофотометре СФ-103 при длине волны 445 нм с использованием калибровочного графика после предварительного гидролиза культуральной жидкости (КЖ) и биомассы при 100°C в течение 30 мин в присутствии 6 Н раствора соляной кислоты (Бугорский, Семенова, Родов, 1990). Выделение ароматообразующих соединений (АОС) осуществляли методом экстракции и дистилляции (Чипига и др., 1981). Определение компонентного состава извлеченного масла проводили с использованием газового хроматографа PerkinElmer Clarus 680 с пламенно-ионизационным детектором на полярной колонке методом внутреннего стандарта (Сидорова и др., 1984; Гуринович, Пучкова, 2005).

Определение антимикробных свойств эфирного масла, синтезируемого видами рода *Eremothecium*, осуществляли диско-диффузионным методом и методом серийных разведений (Государственная фармакопея Российской Федерации, 2008; Семенова, 2011). В качестве тест-культур использовали штаммы, относящиеся к видам *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Mycococcus sp.*, *Bacillus subtilis*, *B. antracoides*, *B. thuringiensis*, *B. megatherium*, *Streptomyces violascens*, выращенные на питательном агаре, и *Candida albicans*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium rubrum*, *Rhizopus sp.*, выращенные на агаре Сабуро. Антимикробные эффекты наблюдали в течение 14 суток и учитывали ежедневно.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы STATISTICA 10.0 Trial Version (Платонов, 2000).

### **Глава 3. Структурно-функциональные аспекты онтогенеза у видов *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995**

При изучении онтогенеза *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 и связанных с ним морфологических и цитологических изменений были обнаружены структурные особенности, характерные как для вегетативного, так бесполого и полового процессов размножения (рис. 1).



Нами было показано, что бесполое размножение, осуществляемое за счет терминального и латерального формирования на мицелии конидий, имеющих веретеновидную или продолговатую форму, характерно для обоих видов. Однако, в работе L.R. Vatra (1973) указывается на отсутствие данного процесса у *E. ashbyi* Guilliermond 1935, что не получило ни опровержения, ни подтверждения в отечественной литературе (Горленко, Соколов, 1976; Семенова, 2007). Кроме того, размножение бесполом путем у изучаемых микроорганизмов возможно также с помощью почкующихся клеток, которые могут прорасти в мицелий. При изменении компонентного состава питательной среды эти клетки могут дать начало дрожжевой стадии развития микромицетов. Таким образом, изучаемые виды склонны к проявлению диморфизма, что не было отмечено ранее в цитоморфологических исследованиях (Nadal, García-Pedrajas, Gold, 2008).

Однако, несмотря на сходство репродуктивных процессов у изучаемых видов микроорганизмов проведенное исследование выявило существенные видовые различия.

Важной отличительной особенностью *E. ashbyi* Guilliermond 1935 от *E. gossypii* Kurtzman 1995 является отсутствие слияния спор. Аскоспоры, прорастая, дают начало новому мицелию. При микроскопии было отмечено, что в гаплоидном мицелии в начальной фазе роста присутствуют несколько ядер, хотя в дальнейшем остается только одно. Данное явление дает основание предположить, что при его развитии происходит кариогамия, которая и влечет за собой сокращение числа ядер. Подобного же мнения придерживается L.R. Vatra (1973), отмечающий в своей работе указанное изменение в грибной клетке. Впоследствии в мицелии интеркалярно образуются аски со спорами (рис. 2).

Проведенные эксперименты показали, что *E. gossypii* Kurtzman 1995 имеет многоядерный гаплоидный мицелий с немногочисленными септами, на котором латерально или терминально могут образовываться структуры бесполого размножения. В его гифах интеркалярно формируются вытянутые булавовидные или сигмоидальные аски, в которых созревают споры, прорастающие без слияния в новый гаплоидный мицелий. В случае слияния аскоспор образуется зигота, которая дает начало одноядерному диплоидному мицелию. На его гифах терминально формируются спорангии (рис.3).

Следует отметить, что варьирование параметров культивирования существенно влияло на процессы бесполого и полового размножения. Так, при дополнении глюкозо-пептонной посевной среды дрожжевым экстрактом количество спор в культуре *E. ashbyi* Guilliermond 1935 возрастало с 0,2–0,5 до 6,0–7,0 млн/мл. Кроме того, в условиях проводимых экспериментов бесполое размножение было в большей степени характерно для *E. gossypii* Kurtzman 1995, чем для *E. ashbyi* Guilliermond 1935.

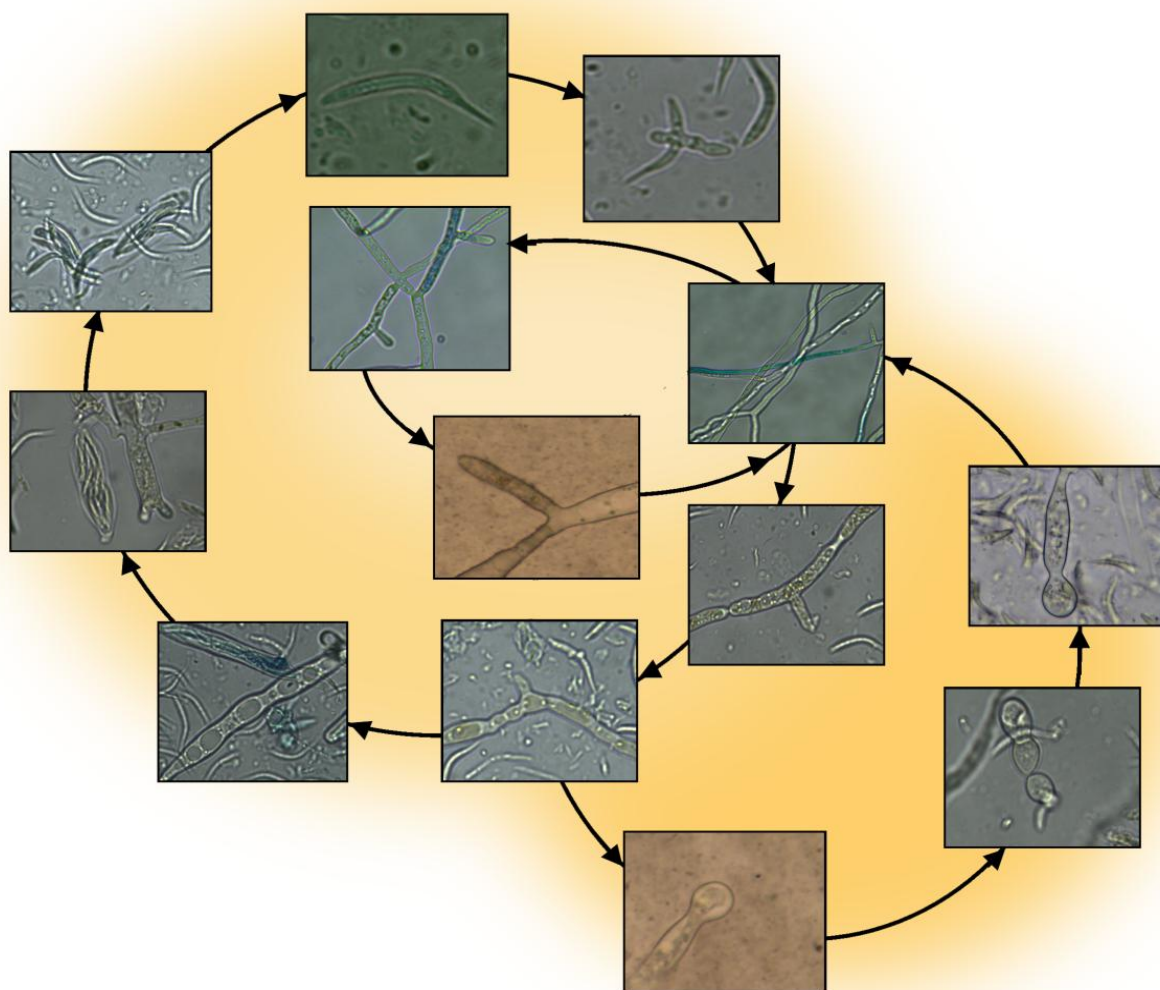


Рис. 1. Онтогенетический цикл *E. ashbyi* Guilliermond 1935: центральный круг – половое размножение; внутренний круг – бесполое размножение путем конидиеобразования; внешний круг – бесполое размножение путем почкования клетки (авторские микрофотографии и контент-анализ).

Динамика накопления биомассы *E. ashbyi* Guilliermond 1935 при культивировании в жидкой питательной среде подчиняется известным закономерностям для простых периодических культур: до 36 часов рост идет экспоненциально и достигает  $2,17 \pm 0,35$  г сухой биомассы на 1 л культуральной жидкости, затем наблюдается замедление скорости роста, характерное при переходе к стационарной фазе и к концу ферментации – началу автолиза культуры. При этом происходит сдвиг pH: закисление культуральной жидкости в период активного роста до 5,46 и увеличение pH до 6,23 в стационарную фазу и фазу лизиса. Синтез и накопление рибофлавина начинался в фазе стационарного роста и увеличивался по мере лизирования культуры до  $30,32 \pm 0,41$  мг/г сухой биомассы. Максимум накопления основного компонента – гераниола – наступал в период между 36 и 48 часами культивирования и составил

24,87±0,28 мг/г сухой биомассы (рис. 4). Аналогичным закономерностям подчиняется динамика роста и развития штаммов *E. gossypii* Kurtzman 1995. Продуктивность *E. ashbyi* Guilliermond 1935 в отношении синтеза эфирного масла при глубинном культивировании на соевой ферментационной среде составляет 80,2-473,1 мг/л, в то время как продуктивность *E. gossypii* Kurtzman 1995 – 87,9-565,5 мг/л ароматического продукта.

### ***Бесполое размножение***

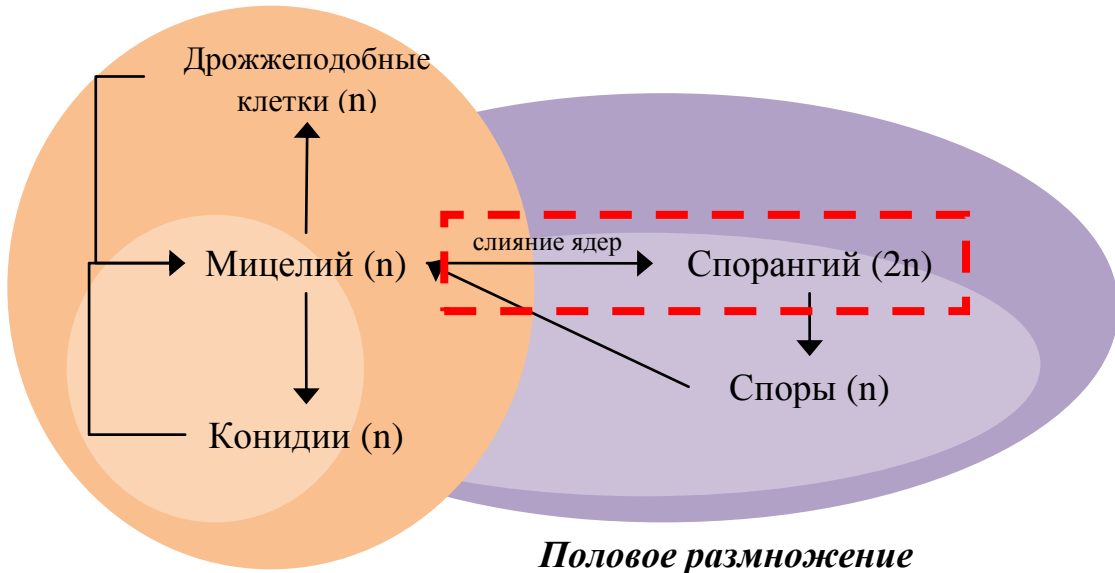


Рис. 2. Схематическое изображение полового и бесполого размножения у *E. ashbyi* Guilliermond 1935.

### ***Бесполое размножение***

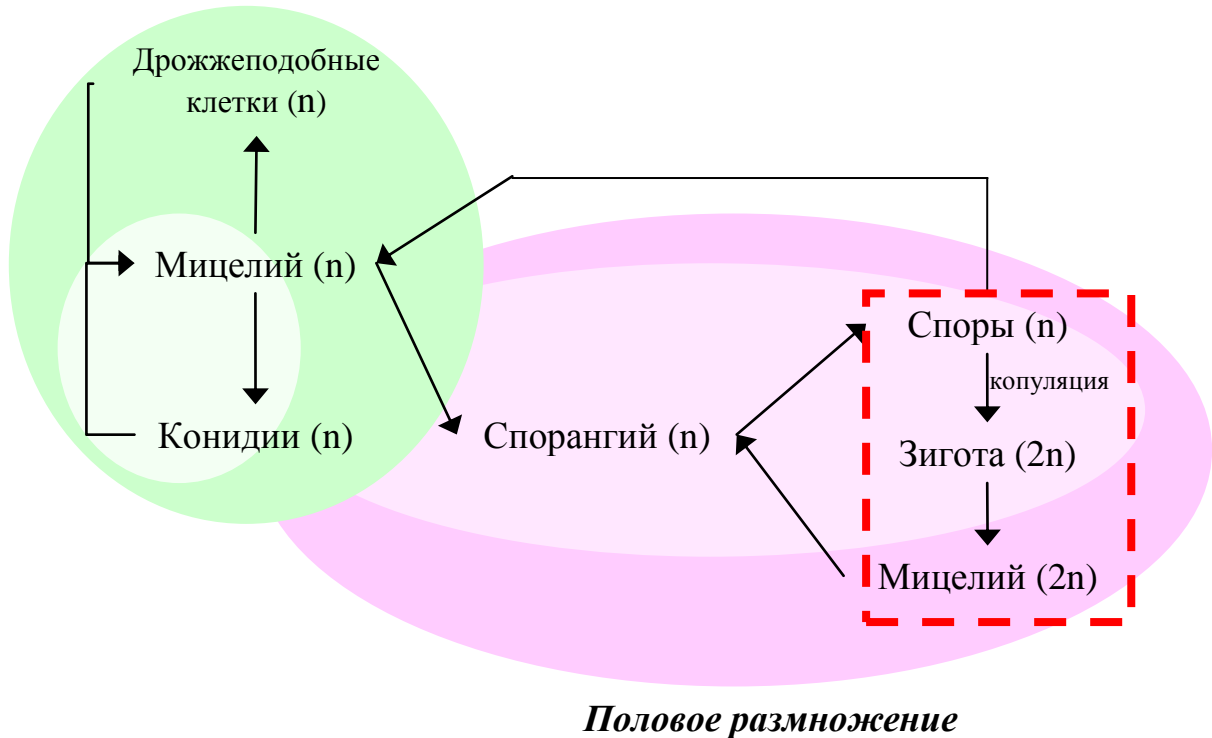


Рис. 3. Схематическое изображение полового и бесполого размножения у *E. gossypii* Kurtzman 1995.

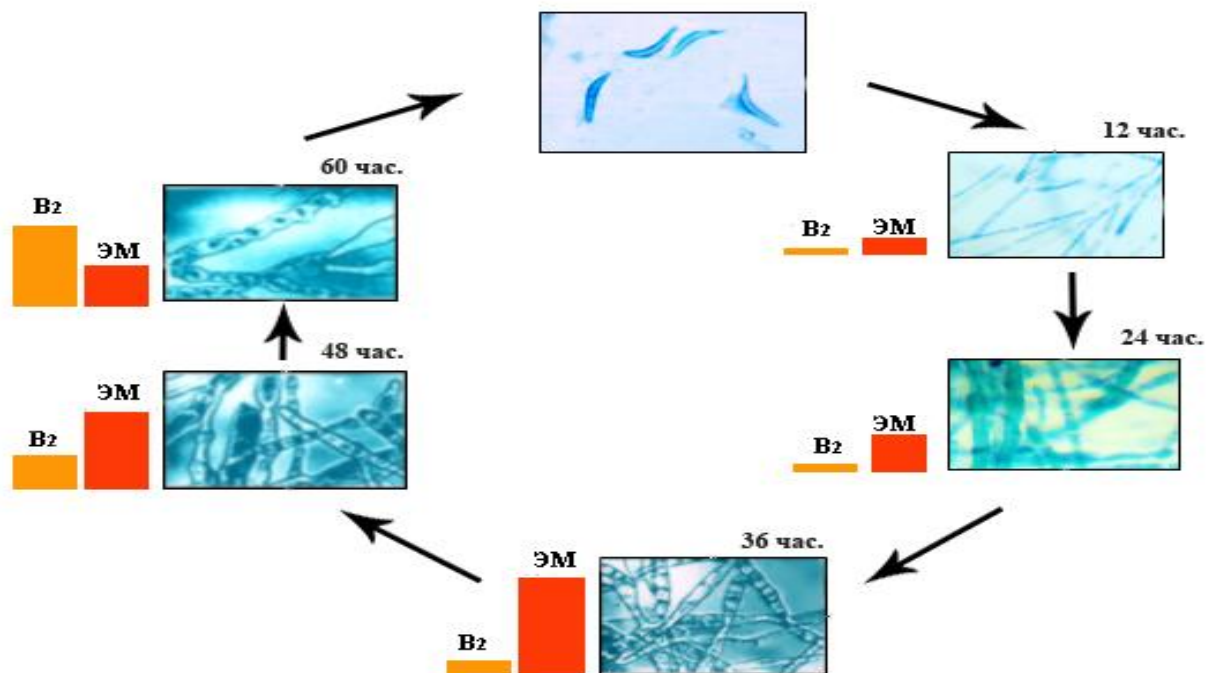


Рис. 4. Динамика накопления эфирного масла и рибофлавина в онтогенезе *E. ashbyi* Guilliermond 1935 (периоды культивирования от момента прорастания аскоспор, час.; ЭМ - эфирное масло; B<sub>2</sub> – рибофлавин).

С особенностями биосинтетической активности коррелирует формирование и развитие некоторых клеточных структур. В вегетативных гифах суточной глубинной культуры присутствовали липидные тела. Количество их в динамике изменялось параллельно с уровнем накопления компонентов эфирного масла в культуральной жидкости. Выраженная вакуолизация мицелия отмечалась в период 36...48 часов культивирования. Активное спорообразование происходило в стационарной фазе изучаемых продуцентов (48-60 часов роста) (рис. 4).

Одним из видов биологической активности рассматриваемых продуцентов, который изучался нами, являются антимикробная. Предварительно диско-диффузионным методом были выявлены наиболее чувствительные к эрмотецевому и розовому маслам культуры, которые затем тестировались методом серийных разведений по отношению к двум образцам эфирного масла гриба (экстрактивного и гидродистилляционного) в сравнении с розовым маслом. Состав эрмотецевого масла образца № 1 включал до 65 % парафинов, 8,3 % цитраля, 6,2 % фенилэтанола и около 20 % монотерпеновых спиртов (гераниола, нерола, цитронеллола). Содержание данных компонентов в образце № 2 соответственно равнялось: 6,7%, 9,3%, 53,6% и 22,9 %. В образце розового масла массовая доля β-фенилэтилового спирта составила 75,5 %, а монотерпеновых спиртов - 8,0 %.

Результаты определения антимикробных свойств эремотецевого масла по сравнению с маслом из цветков розы эфиромасличной свидетельствуют, что у образцов № 1 и № 2 антимикробная активность наблюдалась в отношении *C. albicans* при разведении 1:2048, к *S. aureus* – в разведении 1:1024 и к *E. coli* – от 1:512 до 1:1024. Антимикробное действие образца № 3 на *E. coli* было аналогично образцу № 2, а в отношении *C. albicans* и *S. aureus* – значительно ниже (от 1:256 до 1:512). Таким образом, установлено наличие антимикробной активности у образцов эфирного масла гриба *E. ashbyi* Guilliermond 1935, соответствующей пределам активности эфирного масла из лепестков розы в отношении *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*. Антимикробное действие в значительной мере обусловлено не только количественным содержанием отдельных ароматобразующих соединений, но и их сочетанием, дающим дополнительный ингибирующий эффект. Полученные данные являются предпосылкой для применения эремотецевого масла в медицине и косметике.

#### **Глава 4. Влияние факторов среды на биосинтез вторичных метаболитов**

Уровень активности сахаролитических, протеолитических и окислительно-восстановительных ферментов, активирующих соответственно расщепление углеводов и белков, неодинаков и является видоспецифичным: *E. ashbyi* Guilliermond 1935 в отличие от *E. gossypii* Kurtzman 1995 слабо или не утилизирует сукцинат, лактозу, манит, лактат, но способен восстанавливать нитраты. Более того, отношение к шестиуглеродному спирту циклогексана – инозиту – является штаммоспецифичным признаком: *E. ashbyi* Guilliermond 1935 ВКМ F-3009 утилизирует его в отличие от ВКПМ F-340; *E. gossypii* Kurtzman 1995 ВКМ F-2627 утилизирует его в отличие от ВКМ F-3296.

В проводимом исследовании по изучению влияния источников углерода и азота на биосинтетическую активность микромицетов использовались 2 основные жидкие питательные среды: глюкозо-пептонная и соево-сахарозная. Зависимость биосинтетической активности от компонентов питательных сред различна у изучаемых видов микроорганизмов: более высокие показатели продуктивности в отношении синтеза АОС для *E. ashbyi* Guilliermond 1935 достигались на соево-сахарозной (202,3-280,0 мг/л), для *E. gossypii* Kurtzman 1995 – глюкозо-пептонной (209,5-247,5 мг/л). Так наиболее предпочтительной ферментационной средой для *E. ashbyi* Guilliermond 1935 является соево-сахарозная, а для *E. gossypii* Kurtzman 1995 – глюкозо-пептонная. Причем компоненты изучаемых питательных сред влияют в незначительной степени на состав эфирного масла *E. gossypii* Kurtzman 1995: на глюкозо-пептонной среде массовая доля ФЭС составляет 44,1-56,4 %, МТС - 43,6-55,9%; на соево-сахарозной среде массовая доля ФЭС - 43,2-50,3%, МТС - 49,7-56,8%. Как видно из представленных данных (рис. 5), массовая доля ФЭС в эфирном масле *E. gossypii* Kurtzman 1995 приблизительно равна доле



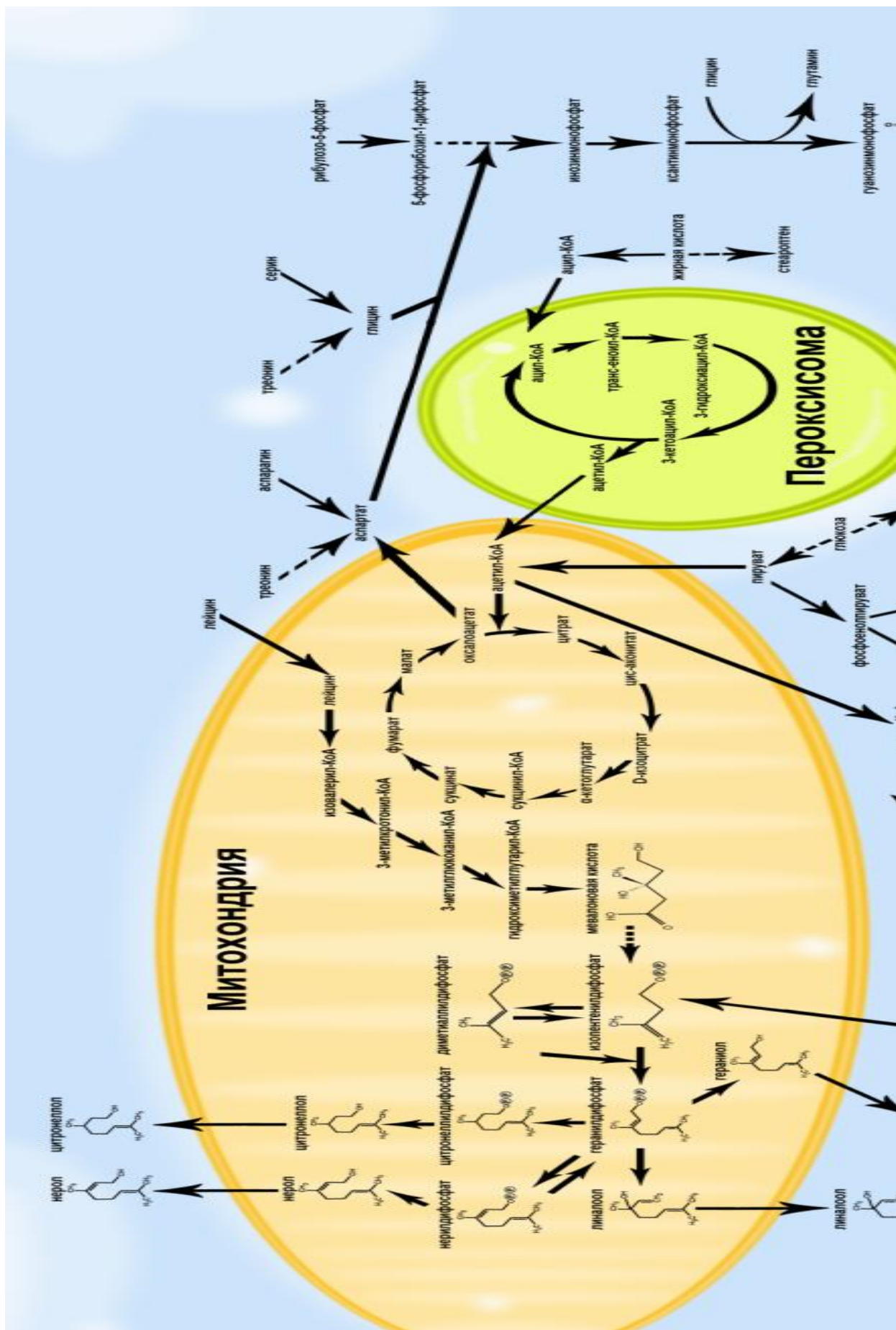
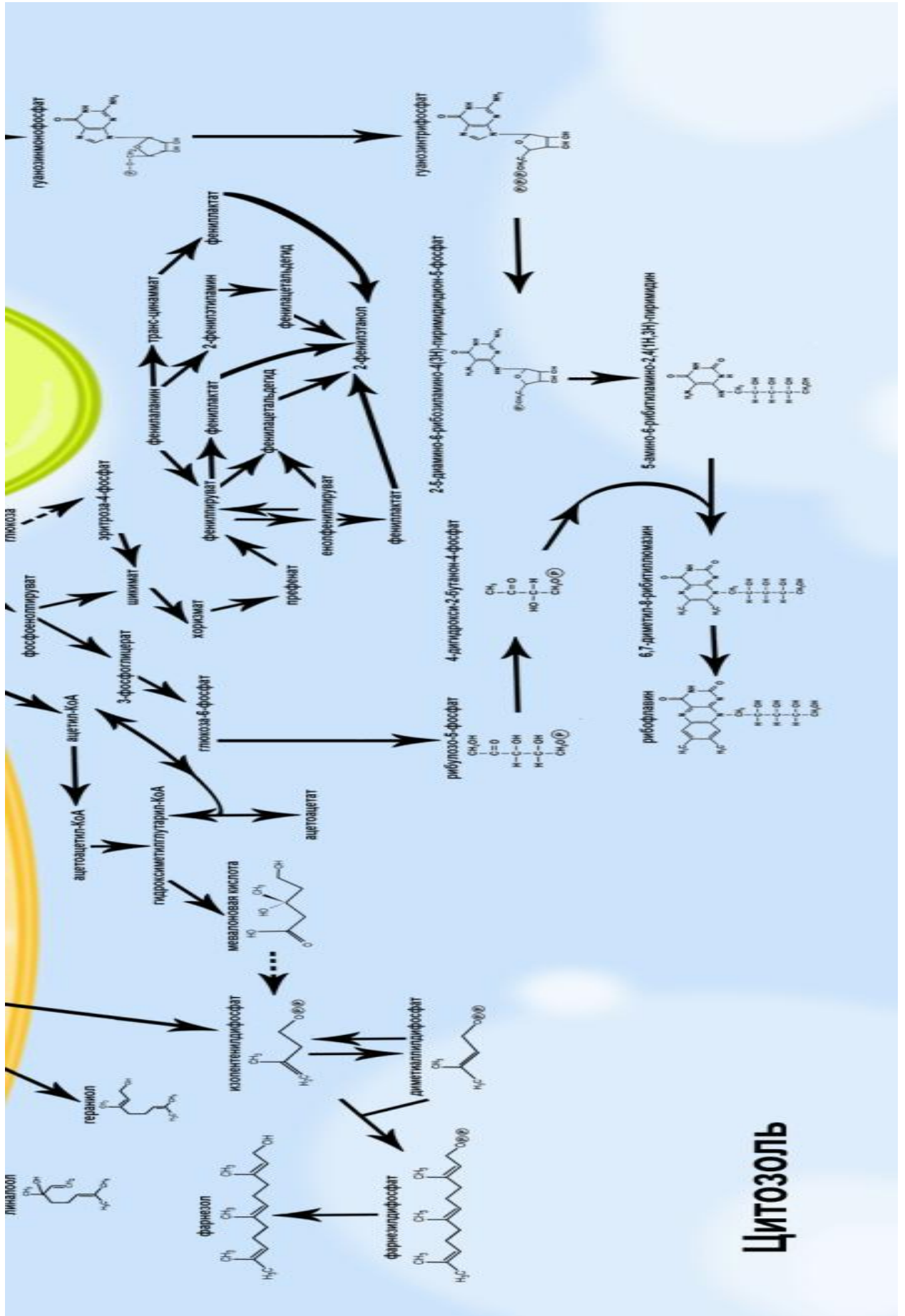


Рис. 6. Гипотетическая метаболическая модель путей биосинтеза основных биологически активных соединений *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995.



# ЦИТОЗОЛЬ

МТС, однако в 1,8-5,0 раз выше, чем в эфирном масле *E. ashbyi* Guilliermond 1935 (на глюкозо-пептонной среде массовая доля ФЭС - 16,4-29,8%, на соево-сахарозной - 9,8-12,7%). Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что ферментативная активность *E. gossypii* Kurtzman 1995 в отношении метаболизма фенилаланина и глюкозы с образованием фенилпирувата – предшественников ФЭС (Watanabe et al., 2002) – значительно выше, чем *E. ashbyi* Guilliermond 1935, и рассматриваемые составы питательных сред не оказывают ингибирующего действия в отношении синтеза данного компонента (рис. 6). Таким образом, для достижения других показателей, более близких к существующим стандартам на розовое эфирное масло необходимо существенное изменение состава питательных сред, варьирование других биотехнологических параметров, а также способов выделения получаемого ароматического продукта.

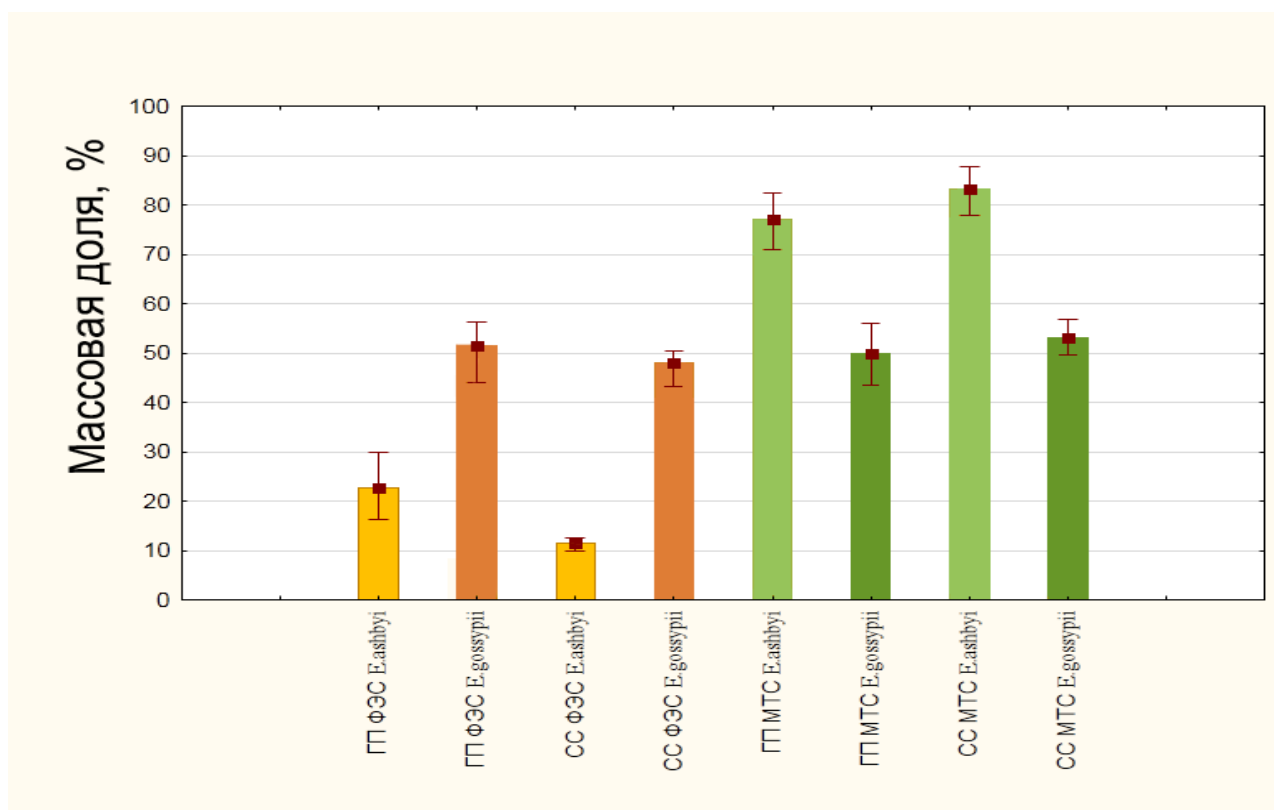


Рис. 5. Массовая доля  $\beta$ -фенилэтилового спирта (ФЭС) и суммы монотерпеновых спиртов (МТС) при культивировании *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 на питательных средах разного состава (ГП – глюкозо-пептонная среда; СС – соево-сахарозная среда).

Кроме того, при введении в состав ферментационной среды дрожжевого экстракта в концентрации 0,5 г/л с целью увеличения продуктивности *E. gossypii* Kurtzman 1995 по эфирному маслу не было отмечено возрастания его содержания в культуральной жидкости, то есть при культивировании в глюкозо-пептонной среде накопление эфирного масла составляло в среднем 197,0 мг/л, в то время как в модифицированной среде в среднем 156



мг/л, при этом доля МТС уменьшалась с 53,0% до 46,3%, что привело к соответственному повышению массовой доли ФЭС с 47,0% до 52,8%.

Для *E. ashbyi* Guilliermond 1935, синтезирующего ароматический продукт с более высоким содержанием ценных МТС представляет интерес не только подбор отдельных компонентов питательной среды, но и их концентраций. Нами было показано, что накопление эфирного масла изменяется при их варьировании (рис. 7). Так наименьшие показатели продуктивности микроцета были отмечены на среде, содержащей одинаковые концентрации соевой муки и сахарозы, равные 10 г/л. Однако при повышении содержания соевой муки в составе ферментационной среды наблюдалось увеличение выхода ароматического продукта, при этом накопление АОС было выше, когда соотношение основных компонентов составило 2:1.

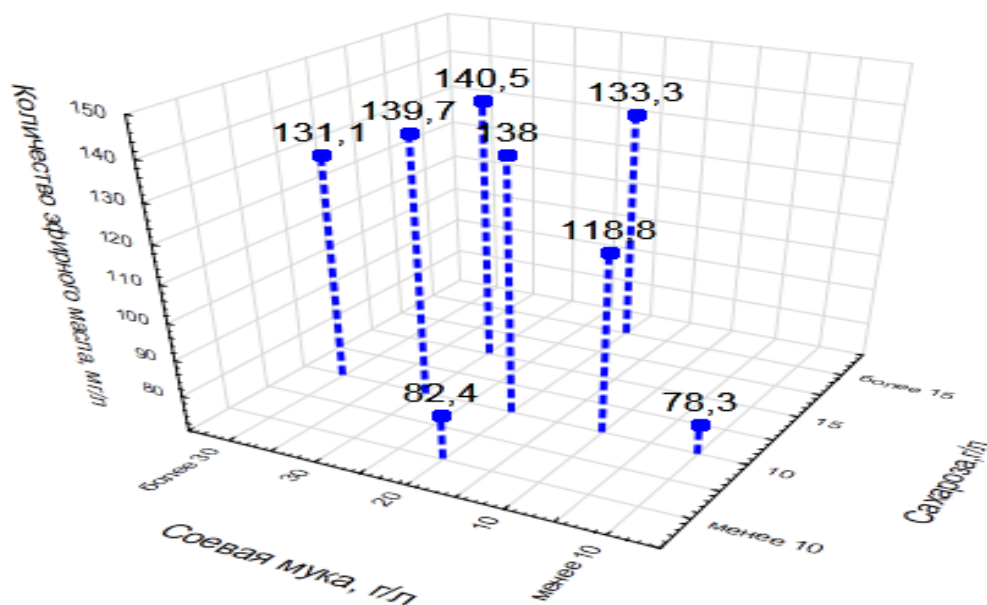


Рис. 7. Влияние концентрации компонентов ферментационной среды на биосинтез *E. ashbyi* Guilliermond 1935.

Физико-химические условия, к которым относятся температурные показатели, pH, режимы аэрации, играют важную роль в процессе культивирования микроорганизмов. По отношению к кислороду изучаемые микроорганизмы являются аэробами в условиях поверхностного и глубинного культивирования. При инкубировании в строго анаэробных условиях отмечалось отсутствие роста всех изученных штаммов. Проведенное исследование по изучению влияния температурных режимов на рост и развитие *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 показало, что изучаемые микромицеты способны к росту в

диапазоне 20-35°C, при более высоких температурах роста не наблюдалось, а их температурный оптимум составляет 26-28°C.

*E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 способны к росту при значениях pH в области 3,5-7,5, однако оптимум pH лежит в диапазоне 5,5-6,5, при этом накопление биомассы характеризуется максимумом при pH 6,0. При культивировании микроорганизмов наблюдался сдвиг pH культуральной жидкости после ферментации, который зависел от начального значения pH: среды с pH 5,0 подщелачивались, а с pH 5,5-7,5 подкислялись. При этом изменение исходного значения pH в большей степени было характерно при ферментации в глюкозо-пептонной среде, чем в соево-сахарозной среде. Полученные данные свидетельствуют о том, что количество рибофлавина имеет тенденцию к увеличению с возрастанием pH (рис. 8) независимо от состава среды и характеризуется максимумом при pH 6,5. Максимумы содержания АОС отмечены нами при разных начальных значениях pH и зависели от питательной среды: в глюкозо-пептонной при pH 6,5, в соево-сахарозной при pH 6,0 (рис. 8).

Кроме того, было обнаружено, что накопление биомассы и вторичных метаболитов (АОС и рибофлавин) связано с величиной снижения pH. Возможно, степень подкисления среды определяет эффективность транспорта в клетки питательных веществ, что, вероятно, является причиной увеличения прироста биомассы и синтеза биологически активных соединений.

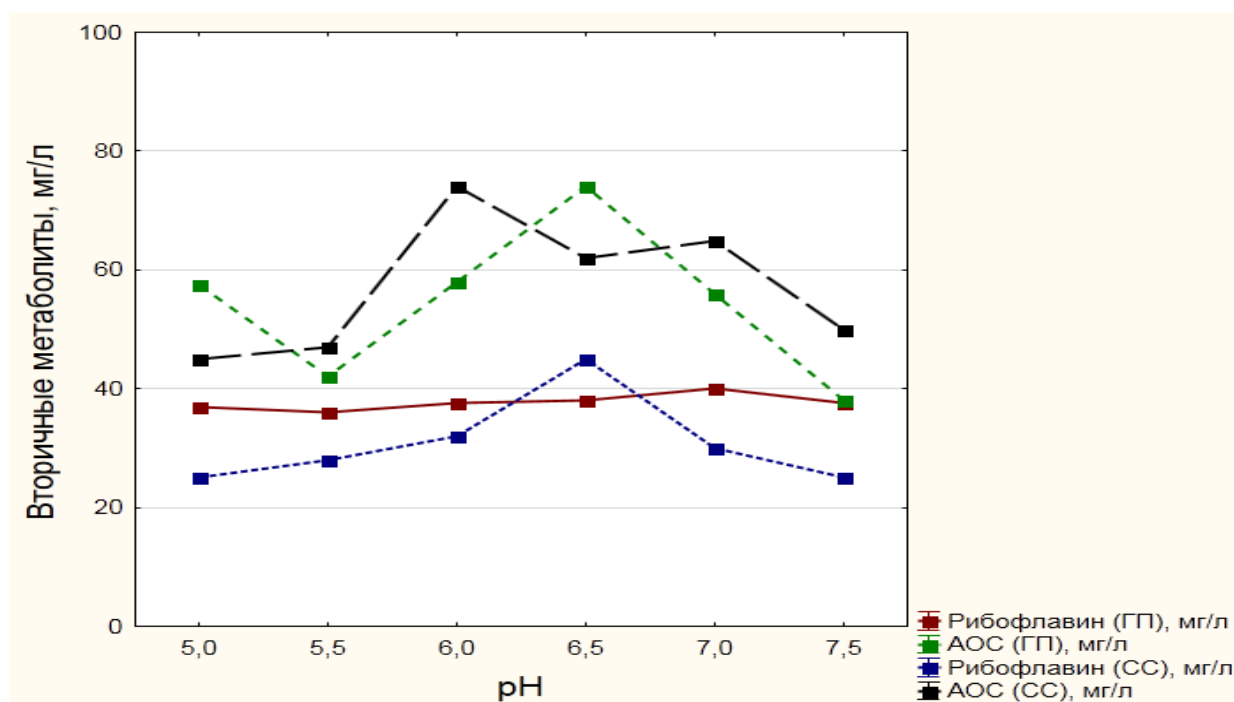


Рис. 8. Зависимость синтеза вторичных метаболитов (рибофлавина и АОС) от значения pH питательной среды при культивировании *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 (ГП – глюкозо-пептонная; СС – соево-сахарозная).

Состояние инокулируемого материала имеет большое значение для синтеза и накопления БАС, однако влияние морфофизиологического состояния посевного материала на образование компонентов эфирного масла до настоящего времени не исследовалось. Результаты ферментации, полученные при использовании посевного материала различного возраста, показали, что благоприятными для накопления АОС являлось выращивание посевного материала в течение 2 – 3 суток. Микроскопический анализ показал, что к этому моменту мицелий гриба представлен сильно разросшимися гифами, диаметром 12-16 мкм с большим числом вакуолей и многочисленными включениями, что соответствует стационарной фазе роста культуры. При этом глюкозо-пептонная посевная среда обеспечивала более высокий выход компонентов эфирного масла по сравнению с соевосахарозной. Наибольший уровень накопления АОС был достигнут в тех вариантах, где инокулят вносили в ферментационную среду в количестве 5% от ее объема. Таким образом, согласно полученным данным, оптимальным посевным материалом для получения эфирного масла *E. ashbyi* Guilliermond 1935 является культура продуцента, выращенная на глюкозо-пептонной среде в течение трех суток (стационарная фаза роста), вносимая в ферментационную среду в количестве 5% (по объему).

#### **Глава 5. Создание новых форм с комплексом полезных свойств и признаков**

Известно, что для качественной оценки эфирномасличного сырья большое значение имеет содержание и компонентный состав эфирного масла. При проведении количественного анализа летучих душистых веществ, содержащихся в биотехнологическом сырье (БТС) *Eremothecium*, отмечено, что проанализированные образцы сырья видов *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 значительно варьировали по количеству АОС в л КЖ (50,9-565,5 мг/л). Так, например, одни из наивысших значений были отмечены у 50-часовой культуральной жидкости *E. gossypii* Kurtzman 1995 (565,5 мг/л) и 68-часовой культуральной жидкости *E. ashbyi* Guilliermond 1935 (473,1 мг/л).

Результаты анализа методом газожидкостной хроматографии образцов эфирного масла подтвердили литературные данные (Бугорский, Семенова, 1991; Погорельская и др., 2003; Семенова, 2007). Компонентами синтезируемого видами *Eremothecium* масла являются ФЭС, гераниол, цитронеллол, нерол, линалоол, гераниаль, нераль. Кроме того, в составе ароматического продукта некоторых штаммов были обнаружены предельные углеводороды – стеароптены, массовая доля которых может достигать 97,2%.

Как указывалось выше, синтезируемый микроорганизмами ароматический продукт аналогичен по компонентному составу розовому маслу, что указывает на целесообразность, при проведении скрининга перспективных источников эфирномасличного сырья с розовым

направлением запаха, использования в качестве эталона сравнения показателей, регламентируемых нормативной документацией на масло из цветков розы. Отечественными стандартами являются ОСТ 10-60-87 «Розовое масло», ГОСТ 31791-2012 РФ «Продукция и сырье эфиромасличное, травянистое и цветочное. Технические условия». Кроме того, следует также принять во внимание показатели, регламентируемые международным стандартом ISO 9842:2003 «Rose Oil», украинским - ДСТУ 4652:2006 «Олія ефірна трояндова», китайским - GB/T 22443-2008 «Розовое масло», действующие за рубежом. В приведенной нормативной документации используются разные показатели. Согласно ГОСТ, ДСТУ, ОСТ регламентируются общая массовая доля свободных спиртов (75-88%), массовая доля терпеновых спиртов (не менее 8%). По ISO и GB/T методом газожидкостной хроматографии определяется значение показательных и характерных компонентов (этанол, цитронеллол, гераниол, нерол, ФЭС, гептадекан, нонадекан, генэйкозан и др.). Кроме того, компонентный состав розового масла, соответствующего российским стандартам, отличается значительным содержанием ФЭС. Однако, на наш взгляд, в качестве эталона при проведении скрининга продуцентов розового масла следует использовать данные ISO, так как эфирное масло, регламентируемое международным стандартом, отличается более высоким качеством за счет сниженного содержания ФЭС и относительного увеличения доли МТС. Полученные результаты скрининга штаммов *E. gossypii* Kurtzman 1995 и *E. ashbyi* Guilliermond 1935 показывают, что компонентный состав синтезируемого эфирного масла сильно варьирует и, таким образом, можно получать ароматические продукты, отвечающие показателям разных стандартов.

Важным моментом при получении новых штаммов с определенным комплексом БАС являются критерии оценки и соответствия современным требованиям. В связи с этим нами были предложены методические подходы, которые могут быть использованы при селекционных исследованиях в прикладной микробиологии. Одним из показателей качества эфирного масла розы является содержание ФЭС и суммы терпеновых спиртов (гераниола, цитронеллола, нерола), поэтому соотношение этих компонентов является важным критерием отбора продуцента. В качестве эталона сравнения (0,04-0,08) использовали соотношение ФЭС к сумме терпеновых спиртов розового масла, рассчитанное на основании показателей международного стандарта ISO 9842:2003. Было выявлено, что по указанному соотношению наиболее приближено к нему эфирное масло, получаемое из 48-54-часовой культуральной жидкости *E. ashbyi* Guilliermond 1935 штаммов ВКПМ F-340 (0,11), ВКМ F-3009 (0,12).

Однако, для более точного и полного отбора высокоактивных вариантов и штаммов продуцента эфирного масла с определенным содержанием индивидуальных соединений использование одного показателя для комплексной оценки биосинтетической способности

микроорганизма недостаточно, поэтому предлагается дополнительное использование соотношений отдельных монотерпеновых спиртов между собой, а именно гераниола к цитронеллолу, гераниола к неролу. В качестве эталона сравнения (0,13-1,12 и 0,55-7,67 соответственно) служили соотношения, рассчитанные на основании данных международного стандарта ISO 9842:2003 по розовому маслу различного происхождения. При анализе образцов эфирного масла, полученного в результате ферментации штаммов продуцентов, было установлено полное соответствие только по соотношению гераниола к неролу (ВКМ F-124 – 6,96; ВКПМ F-36 – 3,65-6,54); лучшее значение показателя по соотношению гераниола к цитронеллолу было отмечено у штамма ВКПМ F-36 – 2,51.

Полученные результаты свидетельствуют, что использование подхода, основанного на расчете соотношений компонентов как одинаковой, так и разной химической структуры, позволяет более точно и полно провести анализ биосинтетической способности продуцента, выявить штамм или вариант с наиболее желательным составом смеси БАС и определить направление селекции. При скрининге видов и штаммов, синтезирующих эфирное масло, подобный подход облегчает задачу по поиску микроорганизма с определенным качественным и количественным составом биологически активных веществ и по сравнению с традиционным подходом позволяет установить взаимосвязи по уровню биосинтеза и накопления индивидуальных соединений, а также, в частности, процесса биотрансформации геранилпирофосфата в нерол и цитронеллол.

В результате многократного ступенчатого отбора колоний с постоянным контролем компонентного состава синтезируемого ими эфирного масла методом газожидкостной хроматографии нами был получен штамм *E. ashbyi* Guilliermond 1935 810-ssb-III из штамма *E. ashbyi* Guilliermond 1935 ВКПМ F-36, который в отличие от исходного образует колонии большего диаметра 8..12 мм на агаре Сабуро (у исходного – 4-8 мм), слабо утилизирует в качестве источников углерода ацетат и цитрат, слабо разжижает желатин. Штамм синтезирует эфирное масло, в состав которого входит гераниол (26,5-64,9%), цитронеллол (9,4-27,0%), нерол (2,6-11,9%), ФЭС (6,8-24,0%), линалоол (0,1-0,4%), гераниаль (0,1-0,2%) и др. *E. ashbyi* Guilliermond 1935 810-ssb-III отличается компонентным составом синтезируемого ароматического продукта от другого известного штамма *E. ashbyi* Guilliermond 1935 ВКМ F-3009 и по соотношениям главных компонентов более близок к показателям розового масла, регламентируемого международным стандартом ISO 9842:2003 (табл. 1).

Сравнительная характеристика компонентного состава эфирного масла, синтезируемого *E. ashbyi* Guilliermond 1935 810-ssb-III, ВКМ F-3009, ВКПМ F-36, и розовым маслом болгарского происхождения

| Источник эфирного масла     | Соотношение ФЭС/МТС | Соотношение гераниол/цитронеллол | Соотношение гераниол/нерол | Эффективность продукционного процесса по эфирному маслу, мг на г биомассы в ч |
|-----------------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------|---|
| 810-ssb-III                 | 0,08-0,31           | 0,98-6,90                        | 2,22-10,17                 | 0,825-1,237   |
| ВКМ F-3009                  | 0,02-0,12           | 9,12-15,30                       | 13,6-24,65                 | 0,813-1,298   |
| ВКПМ F-36                   | 0,22-0,39           | 2,51-7,04                        | 3,65-68,20                 | 0,930-1,358   |
| <i>Rosa damascena</i> Mill. | 0,04-0,08           | 0,13-1,12                        | 0,55-7,67                  | 0,0001-0,0035   |

### ВЫВОДЫ

1. Впервые на основе результатов морфофизиологического исследования обобщены и охарактеризованы онтогенетические особенности *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995, оптимальные условия их культивирования и показана возможность диморфизма у изученных микромицетов. Установлено, что с уровнем синтеза и накопления рибофлавина и эфирного масла связано образование некоторых структурных элементов грибной клетки: липидных тел, кристаллов рибофлавина в вакуолях.
2. Выявлены видоспецифические свойства в отношении утилизации единственных источников углерода и азота: *E. ashbyi* Guilliermond 1935, в отличие от *E. gossypii* Kurtzman 1995 слабо утилизирует сукцинат, крахмал, целлюлозу, но способен восстанавливать нитраты.
3. Впервые подобраны питательные среды с целью повышения биосинтеза эфирного масла: для *E. ashbyi* Guilliermond 1935 наилучшие показатели достигались на соево-сахарозной среде при соотношении 2:1, для *E. gossypii* Kurtzman 1995 – глюкозо-пептонной основе.
4. Выявлено варьирование уровня накопления и состава смеси ароматобразующих соединений у коллекционных штаммов *E. ashbyi* Guilliermond 1935 и *E. gossypii* Kurtzman 1995 (50,9-565,5 мг/л; гераниол – 1,4...88,3 мг /л, цитронеллол – 0,0-12,3 мг/л, нерол – 0,0-21,2 мг/л, линалоол – 0,0-45,3 мг/л, β-фенилэтиловый спирт – 0,6-61,4 мг /л), что позволило подобрать для максимальной эффективности продукционных процессов состав ферментационной среды, объем вносимого посевного материала - 5%, продолжительность культивирования от засева посевной среды до окончания ферментации – 72-120 часов.
5. Путем многократного ступенчатого отбора по соотношениям главных компонентов эрмотецевого и розового масел, имеющих как одинаковую (монотерпеновые спирты), так и

иную химическую природу ( $\beta$ -фенилэтиловый спирт), селекционирован штамм *E. ashbyi* Guilliermond 1935 810-ssb-III, синтезирующий эфирное масло, близкое к основным показателям международного стандарта ISO 9842:2003.

6. Установлено наличие антимикробного действия у эфирного масла, синтезируемого изученными микроорганизмами, в отношении *C. albicans* при разведении 1:2048, к *S. aureus* – в разведении 1:1024 и *E. coli* – от 1:512 до 1:1024. которое обусловлено не только количественным содержанием индивидуальных ароматобразующих соединений, но и их композицией, которая дает дополнительный ингибирующий эффект.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Расчет соотношений компонентов синтезируемого комплекса биологически активных соединений как одинаковой, так и разной химической природы позволяет определить качественные и количественные взаимосвязи между индивидуальными соединениями и биотехнологическими процессами при их оптимизации и может быть использован в теххимическом контроле производства и оценке качества продукции.

2. Разработанный лабораторный регламент служит перспективной основой для масштабирования производства в комплексной биотехнологии эромотецевого масла, которая при сравнительной оценке совокупности показателей (себестоимость, трудоемкость, выход целевого продукта, экологические факторы, утилизация отходов производства) превосходит традиционную технологию получения розового масла в 2,1 раза.

3. Оптимальными биотехнологическими параметрами для накопления ароматообразующих соединений являются температура 26-28°C, исходный pH питательной среды 6,0-6,5, трехсуточный инокулят, выращенный на глюкозо-пептонной среде и вносимый в объеме 5%, соево-сахарозная (*E. ashbyi* Guilliermond 1935) и глюкозо-пептонная (*E. gossypii* Kurtzman 1995) ферментационные среды.

### СПИСОК РАБОТ,

#### ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Публикации в изданиях, входящих в «Перечень российских рецензируемых журналов», рекомендованный ВАК РФ**

1. Особенности микофлоры семян лекарственных культур Средневолжского региона / Семенова Е.Ф., Микаелян М.В., Преснякова Е.В., **Шпичка А.И.** // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Медицинские науки», 2010. № 1. С. 47 – 55.

2. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.**, Моисеева И.Я. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства видов рода *Eremothecium* // Фундаментальные исследования, 2011. № 6. С. 210-214.

3. **Шпичка А.И.**, Семенова Е.Ф., Кузнецова А.В. К вопросу определения рибофлавина в биотехнологическом сырье // Современные проблемы науки и образования, 2011. № 1. С. 30-32.

4. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.** Морфологическое исследование некоторых представителей семейства *Eremotheciaceae* // Научные ведомости БелГУ. Серия «Естественные науки», 2011. Т.9 (104). Вып.15/1. С. 50-55.

5. **Шпичка А.И.**, Семенова Е.Ф. Сравнительная характеристика микроорганизмов, синтезирующих *de novo* летучие душистые вещества / *Фундаментальные исследования*, 2013. № 8 (часть 5). С. 1113-1124.

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

#### Монографии

1. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.**, Преснякова Е.В. Биология видов рода *Eremothecium* и их практическое использование в медицине и фармации. – Пенза: Изд-во ПГУ, 2014. – 165 с. (в печати) **Статьи, опубликованные в журналах на английском языке**

1. Semenova E.F., Rodov V.S., **Shpichka A.I.** Influence of conditions of inoculating material preparation on accumulation of aroma building substances in culture of *Eremothecium ashbyi* Guill. // *International journal of applied and fundamental research*, 2011. № 6. P. 87.

2. Semenova E.F., **Shpichka A.I.** Some pharmbiotechnological characteristics of *Eremothecium*, producer of riboflavin and essential oil // *International journal of applied and fundamental researches*, 2012. №1. P. 170-172.

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

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

#### Статьи, опубликованные в других научных журналах

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

#### Статьи в материалах международных конференций

1. **Шпичка А.И.**, Семенова Е.Ф. Оценка некоторых биотехнологических показателей при глубинном культивировании *Eremothecium ashbyi* // *Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны: материалы Международной научно-практической конференции (г. Пенза, 15-16 сентября 2011 г.): в 3 ч.* Пенза: Из-во ПГУ, 2011. 3 ч. С. 318-320.

2. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.**, Моисеева И.Я. К обоснованию разработки биотехнологии эремотецевого эфирного масла // *Сборник материалов Международной конференции «Биология – наука XXI века», 24 мая 2012 года.* Москва: РЭУ им. Г.В.Плеханова, Общество биотехнологов России, 2012. С. 825-826.

3. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.**, Косматова Е.А., Хайров Д. Р. Анализ душистых веществ *Eremothecium ashbyi* методом газожидкостной хроматографии // *Материалы II Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны», Пенза, 26 – 27 октября 2012 г.* Москва: ФГУП НТЦ «Информрегистр», Депозитарий электронных изданий, 2012. С. 319-323.

4. **Шпичка А.И.**, Преснякова Е.В., Семенова Е.Ф. Сравнительная микроморфологическая характеристика видов рода *Eremothecium* при глубинном культивировании // *Сборник научных статей V Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины» (Гомель, 7-8 мая 2013 года).* ГомГМУ, 2013. Том 4. С. 168-170.

5. **Шпичка А.И.**, Семенова Е.Ф. Анализ ароматобразующей способности аскомицетов // *Материалы VII Международной научной конференции молодых ученых-медиков (Курск, 1-2 марта 2013 г.): в 3 т. / под ред. В.А. Лазаренко, И.Э. Есауленко, К.Ш. Зыятдинова.* Курск: Изд-во КГМУ, 2013. Т. 3. С. 526-530.

6. **Шпичка А.И.**, Косматова Е.А., Семенова Е. Ф. Физико-химический анализ эремотецевого масла // *Биотехнология. Взгляд в будущее: II Международная научная*



Интернет-конференция; материалы конф. (Казань, 26 - 27 марта 2013 г.) / Сервис виртуальных конференций Raх Grid; сост. Синяев Д. Н. Казань: ИП Синяев Д. Н. , 2013. С. 404-408.

7. **Шпичка А. И.**, Семенова Е.Ф., Преснякова Е.В. Анализ биотехнологического сырья *Eremothecium* – нового вида биотехнологического сырья // 77-я итоговая студенческая научно-практическая конференция с международным участием, посвящённая 90-летию со дня рождения профессора П. Г. Макарова и 90-летию со дня рождения доцента Б. М. Зельмановича, Красноярск, 23-26 апреля 2013 г. : сб. материалов / Отв. ред. И. П. Артюхов. Красноярск: тип. КрасГМУ, Версо, 2013. С. 1022-1024.

8. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.**, Моисеева И.Я. Исследование эфирных масел микроорганизмов и их фармакологическое действие на организм человека // Ароматкоррекция психофизического состояния человека: материалы 3-й Международной научно-практической конференции. Украина, АР Крым, г. Ялта. 4-7 июня 2013. Ялта: Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, КРУ "НИИ им. И.М. Сеченова", 2013. С. 57-63.

#### **Статьи в материалах всероссийских, межрегиональных и других конференций**

1. **Шпичка А.И.**, Семенова Е.Ф. Создание и поддержание коллекции микроорганизмов для учебно-исследовательских работ // XXI научно-техническая конференция профессорско-преподавательского состава и студентов Пензенского госуниверситета / Сборник научных трудов (научное электронное издание). Пенза: Издательство ПГУ, 2010. С. 636-639.

2. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.** К вопросу разработки фармацевтического препарата «Эремотол» // Актуальные проблемы медицинской науки и образования: труды III межрегиональной научной конференции. Пенза: ИИЦ ПензГУ, 2011. С.35-37

3. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.** Фармбиотехнологическая характеристика *Eremothecium* – продуцента рибофлавина и эфирного масла // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / под ред. М. В. Гаврилина. Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2012. Вып. 67. С.368-372.

4. Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.**, Моисеева И.Я. Научное и технико-экономическое обоснование разработки нового ароматического продукта - эремотецевого масла // Сборник трудов Всероссийской молодежной конференции «Наукоемкие технологии и интеллектуальные системы в нанотехнологии». Саратов: СГТУ имени Ю.А.Гагарина, 2012. С. 48-52.

5. **Шпичка А.И.** Макроскопический анализ нового вида биотехнологического сырья – биомассы *Eremothecium* / Материалы IV Межрегиональной научной конференции «Актуальные проблемы медицинской науки и образования»: электронное научн. издание. ФГУП НТЦ «Информрегистр», Депозитарий электронных изданий, 2013. С. 473-475.

6. **Шпичка А.И.**, Семенова Е.Ф., Вязовкина Н.А. О скрининге продуцентов комплекса биологически активных соединений // Всероссийская молодежная научная конференция «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии». - Саратов: СГТУ, 2013. С. 283-289.

#### **Тезисы докладов**

1. **Шпичка А.И.**, Семенова Е.Ф. О соотношении главных компонентов в эфирных маслах розы и эремотеция // VII Всероссийская (81-й Итоговая) студенческая научная конференция «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты», посвященная 90-летию СНО СамГМУ: сборник материалов. Под ред. Котельникова Г.П., Куркина В.А. Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, 2013. С. 256-257.

2. Биотехнологии на основе *Eremothecium* / Семенова Е.Ф., **Шпичка А.И.**, Преснякова Е.В., Пресняков С.В. // Ароматкоррекция психофизического состояния человека: материалы 3-й Международной научно-практической конференции. Украина, АР Крым, г. Ялта. 4-7 июня 2013. Ялта: Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, КРУ "НИИ им. И.М. Сеченова", 2013. С. 89.