

УДК 579.61:616-092.7

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВЕ ЭРЕМОТЕЦИЯ – ПРОДУЦЕНТА РИБОФЛАВИНА И ЭФИРНОГО МАСЛА

Шпичка А.И., Семенова Е.Ф.

ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», Пенза,
e-mail: ana-shpichka@yandex.ru, sef1957@mail.ru

Представители рода *Eremothecium* являются перспективными продуцентами как рибофлавина, так и эфирного масла, что обуславливает необходимость в дальнейшей разработке биотехнологий. Экономическая целесообразность производства на основе эремотеция может быть увеличена за счет применения технологии комплексного получения биологически активных веществ для удовлетворения потребности в них химико-фармацевтической, косметической, пищевой промышленности.

Ключевые слова: биотехнология, рибофлавин, эфирное масло, продуцент, *Eremothecium*

THE CURRENT STATE AND PROSPECTS OF BIOTECHNOLOGY ON BASE OF EREMOTHECIUM – RIBOFLAVIN AND ESSENTIAL OILS PRODUCER

Shpichka A.I., Semenova E.F.

Penza State University, Penza, e-mail: ana-shpichka@yandex.ru, sef1957@mail.ru

Representatives of *Eremothecium* genus are perspective as riboflavin and essential oil producers that causes a need for further biotechnologies development. The economic reasonability of production on the basis of *Eremothecium* can be increased at the expense of application of complex technology by receiving biologically active substances for satisfaction of chemical, pharmaceutical, cosmetic, food industry requirements.

Keywords: biotechnology, riboflavin, essential oil, producer, *Eremothecium*

В настоящее время одним из перспективных направлений развития биотехнологии является поиск новых источников получения эфирных масел и витаминов, обладающих ценными фармакологическими эффектами. Использование продуцентов биологически активных соединений требует детального исследования их культурально-морфологических, физиолого-биохимических особенностей, основных биотехнологических показателей для прогнозирования стабильности культуры в производстве и дальнейшего внедрения в фармацевтическую промышленность.

На основе проведенных ранее исследований с культурами микроскопических грибов представляется особо важным дальнейшее изучение и внедрение в производство *Eremothecium ashbyi*, *Eremotecium gossypii* (*syn. Ashbya gossypii*, *Nematospora gossypii*) в качестве продуцентов рибофлавина и эфирного масла, аналогичного составу розового масла, являющихся ценными натуральными веществами и находящими применение в бытовой химии, парфюмерии, косметике, медицине, а также в пищевой промышленности [13].

Целью данного исследования является проведение анализа литературных источников, касающихся биотехнологического сырья и препаратов на его основе, и выяв-

ление основных этапов технологических процессов с использованием *Eremothecium*.

Материалы и методы исследования

В работе использован контент-анализ научной литературы, содержащей информацию о биотехнологическом сырье, технологиях получения рибофлавина и ароматических продуктов на его основе, а также официальных источников информации о препаратах, зарегистрированных в Минздраве РФ и разрешенных к медицинскому применению [7, 11].

Результаты исследования и их обсуждение

Рибофлавин (витамина В₂) является важным элементом в нормальном функционировании человеческого организма, участвует в окислительно-восстановительных процессах. В организме рибофлавин фосфорилируется, превращаясь в коферменты – флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), входит в состав основных дыхательных ферментов, с помощью которых осуществляется тканевое дыхание. В природе продуцентами витамина В₂ являются высшие растения, дрожжи, мицелиальные грибы и бактерии. Большинство микроорганизмов, в том числе микроскопические грибы, образуют свободный рибофлавин и две его коферментные формы ФМН и ФАД. Основной формой флавинов, выделяемых грибами в среду, является

рибофлавин. Как правило, витамин В₂ образуется микроорганизмами в больших количествах, чем нужно для удовлетворения потребности клетки в этом витамине. Применение большинства микроорганизмов в промышленных целях позволяет получать биотехнологическое сырье с высоким содержанием витамина.

Среди плесневых грибов наиболее активные продуценты рибофлавина – *Aspergillus niger* и другие виды этого рода (табл. 1). Использование мицелия грибов как источника флавинов экономично, поскольку мицелий является отходом антибиотической промышленности [10, 54].

Таблица 1

Микромицеты – продуценты рибофлавина

Микроорганизм	Таксономическое положение (царство, класс, отдел, семейство)	Источник информации
<i>Candida famata</i>	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Saccharomycetaceae	[50, 54]
<i>Pichia guilliermondii</i>	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Saccharomycetaceae	[28]
<i>Eremothecium ashbyi</i>	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Eremotheciaceae	[13, 53]
<i>Eremothecium gossypii</i>	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Eremotheciaceae	[13, 53]
<i>Aspergillus niger</i>	Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Trichocomaceae	[53]

У флавиногенных дрожжей индукция рибофлавина происходит при депрессии по железу. Среди представителей семейства *Saccharomycetaceae* продуцентами витамина В₂ являются *Candida famata* [50, 53, 54], *Pichia guilliermondii* [20, 28].

Аскомицеты *Eremothecium gossypii*, *Eremothecium ashbyi* являются активными продуцентами рибофлавина, могут накапливать от 2480 до 6420 мг рибофлавина в 1 л культуральной жидкости [10, 25, 32, 37, 39, 56].

По имеющимся данным, касающихся биохимической активности продуцентов, химическая природа субстрата и тип катализируемой реакции определяются способностью микроорганизмов к проявлению тех или иных признаков в соответствующих условиях среды, так как характер ферментов, которые микромицеты продуцируют и выделяют во внешнюю среду, существенно различается; другими словами, уровень активности сахаролитических, протеолитических и окислительно-восстановительных ферментов, активирующих соответственно расщепление углеводов и белков, неодинаков и является видоспецифичным (например, *E. ashbyi* и *E. gossypii* имеют разную способность к утилизации таких полисахаридов, как крахмал и целлюлоза, к восстановлению нитратов [16, 17, 46]). В ранее проведенных исследованиях по изучению синтеза рибофлавина *E. gossypii* и *E. ashbyi*

в зависимости от природы субстратов питательных сред максимальные уровни специфического роста и продукции рибофлавина наблюдались на средах, содержащих как глюкозу, так и подсолнечное масло в качестве субстратов. Хотя более высокая продукция рибофлавина была отмечена у *E. ashbyi* на среде, имеющей в составе молочную сыворотку, по сравнению со средой с глюкозой, но более низкие показатели достигались у *E. gossypii* при одинаковых экспериментальных условиях. Это возможно обусловлено тем, что сыворотка в основном состоит из лактозы и уровень ассимиляции дисахарида *E. gossypii* ниже, чем глюкозы [16, 17, 27, 40, 42].

Динамика накопления вторичного метаболита – рибофлавина культурой *E. ashbyi* в жидких питательных средах, различающихся компонентным составом, представлена на рис. 1. Содержание рибофлавина сохраняет тенденцию к увеличению с возрастанием pH независимо от состава среды и достигает достаточно высоких показателей. Влияние ионов К⁺ и Na⁺ на показатели продуктивности были изучены в специальных опытах с использованием разных по составу сред, но с одинаковым начальным значением pH. Добавление в среду ионов К⁺, в отличие от варианта с добавлением Na⁺, стимулирует продуктивность микромицета, кроме синтеза рибофлавина. При этом не только количество, но и соотноше-

ние ионов влияет на продуктивность культуры. Через двое суток роста происходит подкисление среды, причем в большей степени в присутствии ионов K^+ . Вероятно, подкисление среды обусловлено выбросом клетками ионов H^+ [2, 18, 19, 33]. Кроме того, было показано, что повышение концентрации фосфатов в питательной среде с 0,0015 мМ до 150 мМ увеличивало рост продуцента до 70%, но снижало накопление флавинов в бульоне до 60%. Однако, в это же самое время величина общей концентрации продуцированных флавинов во время роста (специфические флавины) снизилась до 80%. Причем интересно отметить, что соотношение рибофлавина к флавиномононуклеотиду уменьшилось в 7 раз. Ингибирование синтеза рибофлавина может быть связано с ингибированием повышенной концентрацией фосфатов гуа-

нозинтрифосфат-циклогидролазы, которая катализирует первый этап биосинтеза рибофлавина [36].

Примечательно, что время конверсии субстрата в рибофлавин в мицелии может быть продлено с целью улучшения продукции рибофлавина. Это может быть достигнуто при добавлении минеральной поддержки (AID PLUS ML-50D, Niigata, Japan). В культуре без нее наблюдались единичные гифы при 108-часах. Этот мицелий был автолизирован или пустым внутри. При 120 часах культивирования без минеральной поддержки не наблюдалось ни мицелия, ни интрацеллюлярного рибофлавина. Единственной возможной причиной этого различия может быть электронный заряд минеральной поддержки. В ее присутствии мицелий возможно более стабилен, и продукция рибофлавина может быть продлена [31].

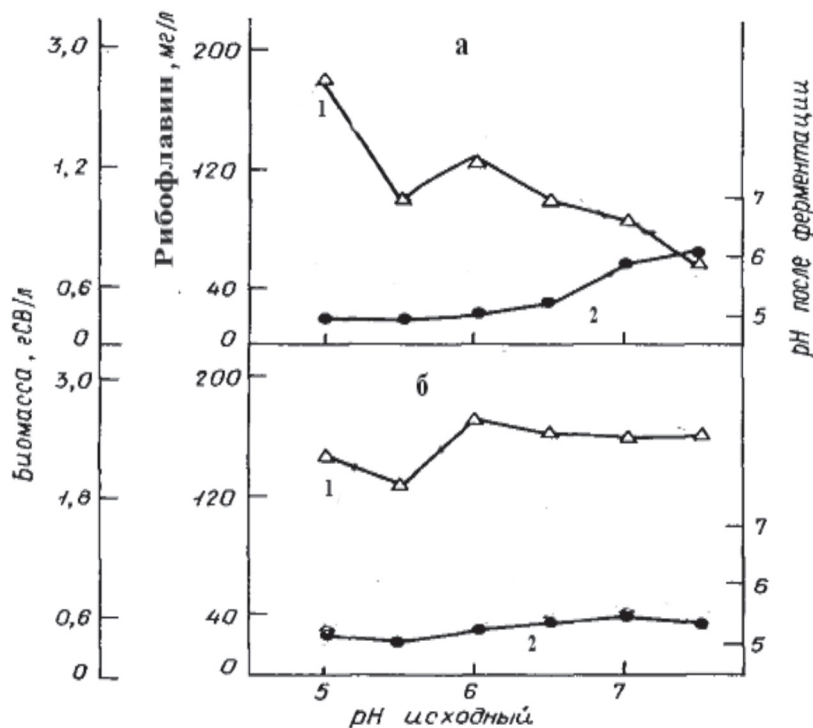


Рис. 1. Динамика накопления рибофлавина и биомассы при глубинном культивировании *E. ashbyii* (по Бугорский П.С., Семенова Е.Ф., Родов В.С., 1990): а – среда №2; б – среда №1 с 0,5 г/л гидрофосфата калия, 1 – биомасса; 2 – рибофлавин

Кроме того, максимальный уровень синтеза рибофлавина в культуре *E. gossypii* может быть достигнут при добавлении тиамин в глюкозную питательную среду. Добавление тиамина, инозитола и биотина в среды, содержащие глюкозу или молочную сыворотку, увеличивало уровень специфического роста до 34% и 97%, со-

ответственно. Скорость роста и продукция рибофлавина, напротив, снижались на средах, содержащих и факторы роста, и подсолнечное масло [41].

На рис. 2 представлены основные технологические процессы получения рибофлавина при использовании представителей рода *Eremothecium* в качестве продуцента [9].

Что касается эфирных масел, широко распространенных в растительном мире, от грибов и водорослей до цветковых растений, то к настоящему времени для производственных целей используется лишь сравнительно небольшое число видов высших растений [43]. Качество эфирного масла существенно зависит от экологических факторов, местности, в которой выращиваются эфирносы, кроме того плантационное выращивание характеризуется сезонностью. Указанных недостатков лишено биотехнологическое производство.

Однако биотехнологии получения эфирных масел в культуре изолированных клеток и тканей не являются конкурентоспособными по сравнению с биотехнологиями на основе микробного синтеза [55], поэтому особый интерес в качестве нетрадиционных источников эфирных масел и ароматических веществ представляют бактерии, дрожжи, актиномицеты, грибы, водоросли, способные как синтезировать эти субстанции *de novo*, так и биоконвертировать их из менее ценных компонентов (жирные кислоты, спирты, алканы и др.).

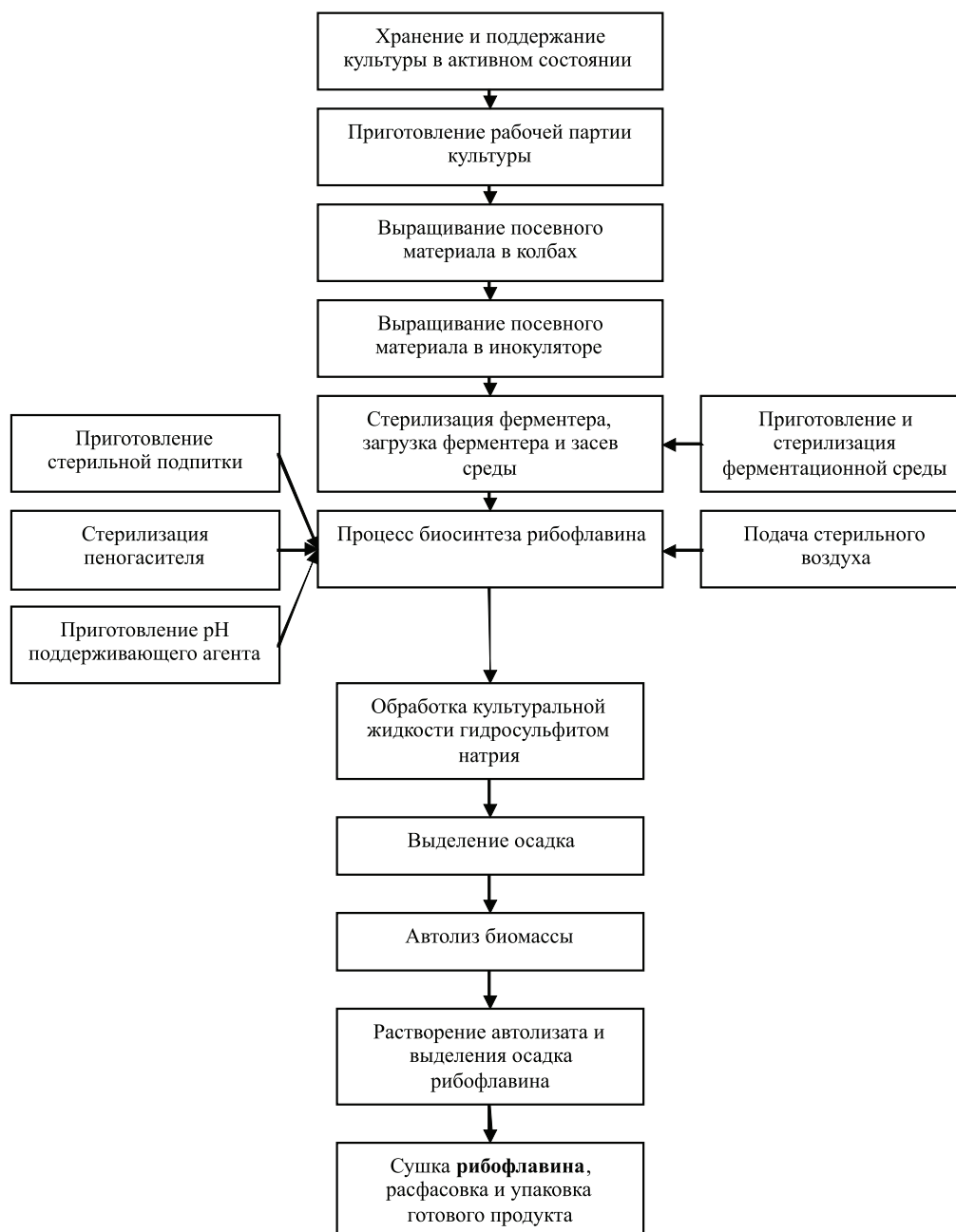


Рис. 2. Блок-схема получения рибофлавина на основе *Ermothecium* (по Дуган А.М. с соавт., 2011)

В проведенных ранее исследованиях было начато изучение новых природных источников душистых веществ. Оценка проводилась по уровню накопления и составу эфирного масла, скорости роста культуры и другим свойствам, важным для биотехнологического производства [13, 15, 29, 30, 35]. Кроме этого, особое внимание уделяется исследованию механизмов синтеза ароматообразующих соединений, выяснению путей метаболизма, влияющих на этот процесс [12, 13, 15, 29, 30, 35].

Среди изученных представителей дрожжей (роды *Saccharomyces*, *Endomycopsis*) выявлены штаммы, продуцирующие ароматобразующие вещества в количестве до 95 мг/л (табл. 2). Как правило, у этих культур в состав ароматических продуктов входит β-фенилэтанол. По сравнению с другими группами микроорганизмов они обладают самой большой скоростью роста, что дает преимущество в связи с увеличением выхода целевого продукта на единицу полезного объема оборудования [21].

Осуществленный направленный поиск перспективных объектов для биотехнологии ароматических продуктов в пределах родов *Trichoderma*, *Ceratocystis*, *Aspergillus*, *Eremothecium* дал возможность охарактеризовать различия между видами, штаммами по уровню биосинтетической активности и составу эфирного масла [22]. Синтез эфирного масла *E.ashbyi* достигает 180 мг/л культуральной жидкости в течение первых двух суток роста на ферментационной среде, что может быть сопоставлено с содержанием эфирного масла в 500-600 г цветков розы [3, 13]. Основными компонентами эфирного масла являются гераниол, β-фенилэтанол, а также идентифицированы нерол, цитронеллол, нераль и гераниаль [3, 8]. По составу эфирное масло, синтезируемое *E.ashbyi*, приближается к эфирному маслу свежих цветков розы и обладает приятным запахом. Компонентный состав эфирного масла *E. gossypii* сходен, но соотношение монотерпеновых спиртов более приближено к их содержанию в болгарском розовом масле [3]. Этот натуральный продукт, цена которого на мировом рынке достигает 80\$ за 1 грамм, чрезвычайно востребован. Ведь более 50% мировых парфюмерных брендов изготавливается на основе розового масла. Оно также используется в медицине и фармацевтике. Розовое масло обладает умеренным антибактериальным (бактериостатическим) действием, при этом β-фенилэтанол ингибирует синтез макромолекул, но не токсичен в равной сте-

пени для всех микроорганизмов и штаммов [13, 51]. Показана его эффективность против широкого спектра бактерий, грибов, вирусов, повышение на их фоне чувствительности возбудителей к антибактериальным средствам. Масло применяют в качестве корриганта фармацевтических препаратов с целью улучшения их вкуса и запаха. Розовое масло регулирует работу надпочечников, оказывает жаропонижающее, противовоспалительное, противоотечное, желчегонное, гепатопротекторное действие, применяется в лечении стоматита, пародонтоза, кожных и других заболеваний [6]. Эфирное масло оказывает также стимулирующее или успокаивающее действие на центральную нервную систему, проявляет иммуномодулирующий эффект, регулирует окислительные процессы в организме [24, 38].

Основные технологические процессы получения эремотецевого масла показаны на рис. 3 [1, 49]. С целью получения более чистого, качественного конечного продукта необходимо введение дополнительных методов очистки синтезируемого эфирного масла от побочных веществ, что также учтено в представленной схеме.

Выход розового масла составляет в среднем 0,025%, так что для получения 1 кг масла приходится собрать вручную и переработать около 4 тонн лепестков. После перегонки масла остается розовая вода. В ней доля масла составляет около 0,2%. Основным поставщиком розовой воды на мировой рынок является Иран. Однако масло в Иране не производят [44]. В мире производят розовое масло высшего качества (объем которого в настоящее время около 600 кг/год) всего 4 страны: Саудовская Аравия (город Таиф), Болгария (Казанлык), Турция (Стамбул) и Узбекистан (Ташкентская область) [23, 26, 34, 45, 52].

До 1992 года производство розового масла методом гидродистилляции в республиках СССР (Украина, Молдавия и др.) составляло около 4 т/год. Сейчас оно резко сократилось из-за экономического кризиса в странах СНГ [4]. Например, в 2005 г. В Крыму было выработано 600 кг эфирного масла (экстракта) розы, что в 2 раза меньше по сравнению с максимально достигнутыми эфиромасличной отраслью этого региона показателями [5].

Использование штаммов рода *Eremothecium* позволяет получать как эфирное масло, так и рибофлавин, поэтому может быть предложена следующая комплексная технологическая блок-схема (рис. 4), существенно повышающая рентабельность биотехнологического производства.

Таблица 2

Микромицеты – продуценты летучих соединений

Микроорга- низм	Таксономическое положение (царство, отдел, класс, семейство)	Компонентный состав аро- матического продукта	Ис- точник инфор- мации
<i>Saccharomyces</i> sp.	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Saccharomycetaceae HYPERLINK «http://bvi.rusf.ru/taksa/s0020/s0020298.htm»	β -фенилэтанол	[21]
<i>Kluyveromyces</i> <i>lactis</i>	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Saccharomycetaceae HYPERLINK «http://bvi.rusf.ru/taksa/s0020/s0020298.htm»	цитронеллол, гераниол, линалоол, β -фенилэтанол, эфирь	[35]
<i>Endomycopsis</i> sp.	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Endomycetaceae	β -фенилэтанол	[21]
<i>Eremothecium</i> <i>ashbyi</i>	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Eremotheciaceae	гераниол, β -фенилэтанол	[13]
<i>Eremothecium</i> <i>gossypii</i>	Fungi, Ascomycota, Hemiascomycetes, Eremotheciaceae	гераниол, β -фенилэтанол	[13]
<i>Aspergillus</i> <i>foetidus</i>	Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Trichocomaceae	лактоны, терпеновые и ароматические спирты, альдегиды, кетоны	[14]
<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Trichocomaceae	метилкетонь, пиразинь	[14]
<i>Penicillium</i> <i>canescens</i>	Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Trichocomaceae	лактоны, терпеновые и ароматические спирты, альдегиды, кетоны	[14, 30]
<i>Ceratocystis</i> <i>paradoxa</i>	Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Ophiostomataceae	лактоны, терпеновые и ароматические спирты, альдегиды, кетоны	[35]
<i>Ceratocystis</i> <i>fimbriata</i>	Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Ophiostomataceae	ацетальдегид, изопропанол, этилацетат, этилизобутират, изобутилацетат, изоамилацет- тат, этил-3гексаноат	[29, 35]
<i>Trichoderma</i> <i>viride</i>	Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreaceae	лактоны, терпеновые и ароматические спирты, альдегиды, кетоны	[30, 35]
<i>Ceratocystis</i> <i>pilifera</i>	Fungi, Ascomycota Sordariomycetes, Ophiostomataceae	лактоны, терпеновые и ароматические спирты, альдегиды, кетоны	[35]
<i>Ischnoderma</i> <i>benzoinum</i>	Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporaceae	бензальдегид, 4- метоксибензальдегид	[35]
<i>Pycnoporus</i> <i>cinnabarinus</i>	Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporaceae	ванилин, метилантранилаг	[35]
<i>Lentinus</i> <i>edodes</i>	Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporaceae	лентиноин, 1-октен-3-ол, 1-октен-3-он	[35]
<i>Wolfiporia</i> <i>cocos</i>	Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporaceae	линалоол	[30, 35]
<i>Mycena pura</i>	Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetes, Thicholomataceae	цитронеллол	[35]
<i>Polyporus</i> <i>tuberaster</i>	Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetes, Polyporaceae	метилбензоат, этилбензоат, летучие вещества дубового мха	[35]
<i>Rhizopus</i> <i>arrhizus</i>	Fungi, Zygomycota Zygomycetes, Mucoraceae	эфирь длинноцепочечных жирных кислот	[14]

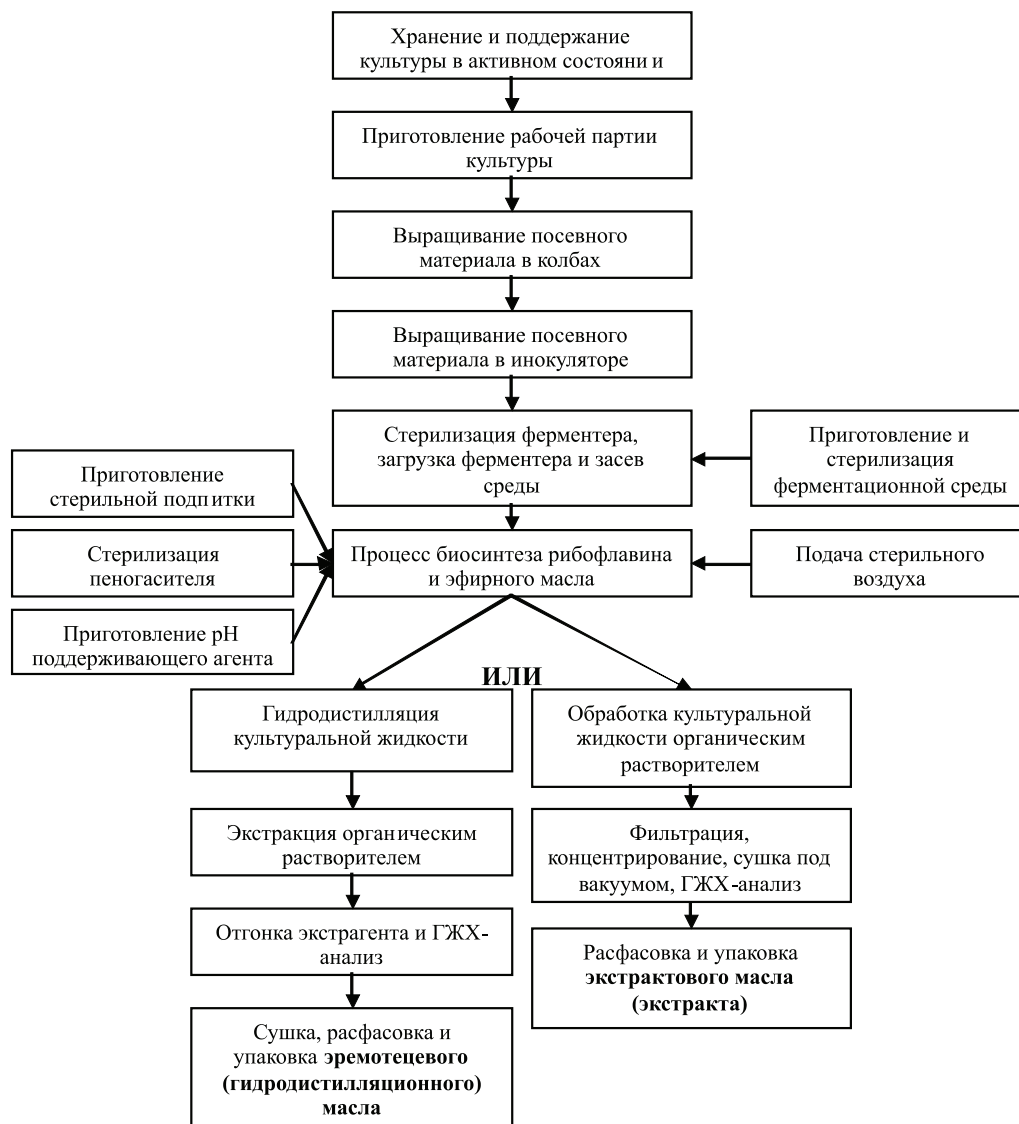


Рис. 3. Разработанная блок-схема основных технологических процессов получения эфирного масла на основе *Erremothecium*

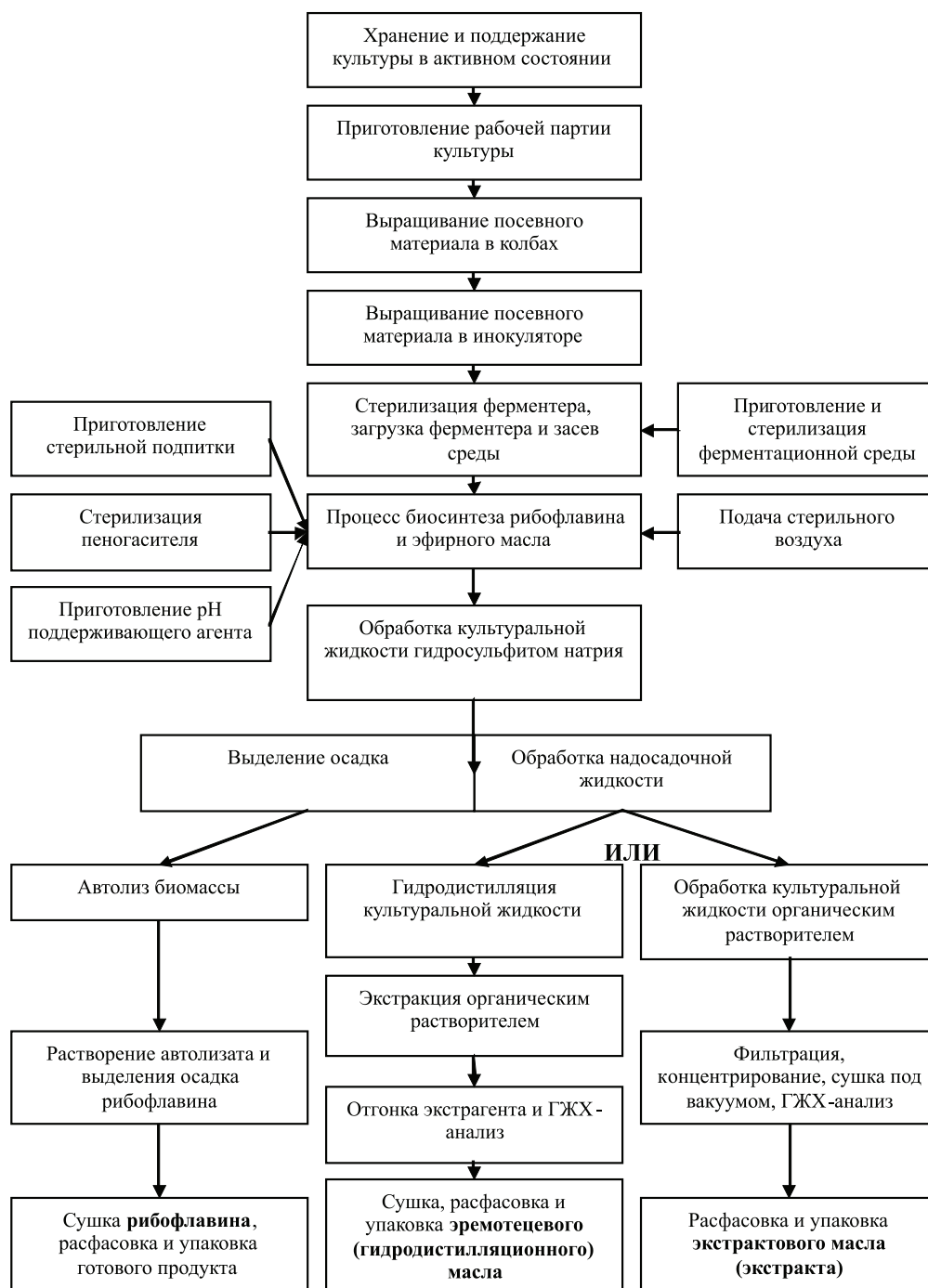


Рис. 4. Предлагаемая блок-схема комплексной биотехнологии эфирного масла и рибофлавина на основе *Ermothecium*

Анализ разрабатываемых ароматических продуктов и технологий на основе *Ermothecium* дает основание полагать, что их использование может осуществляться по следующим направлениям (рис. 5).

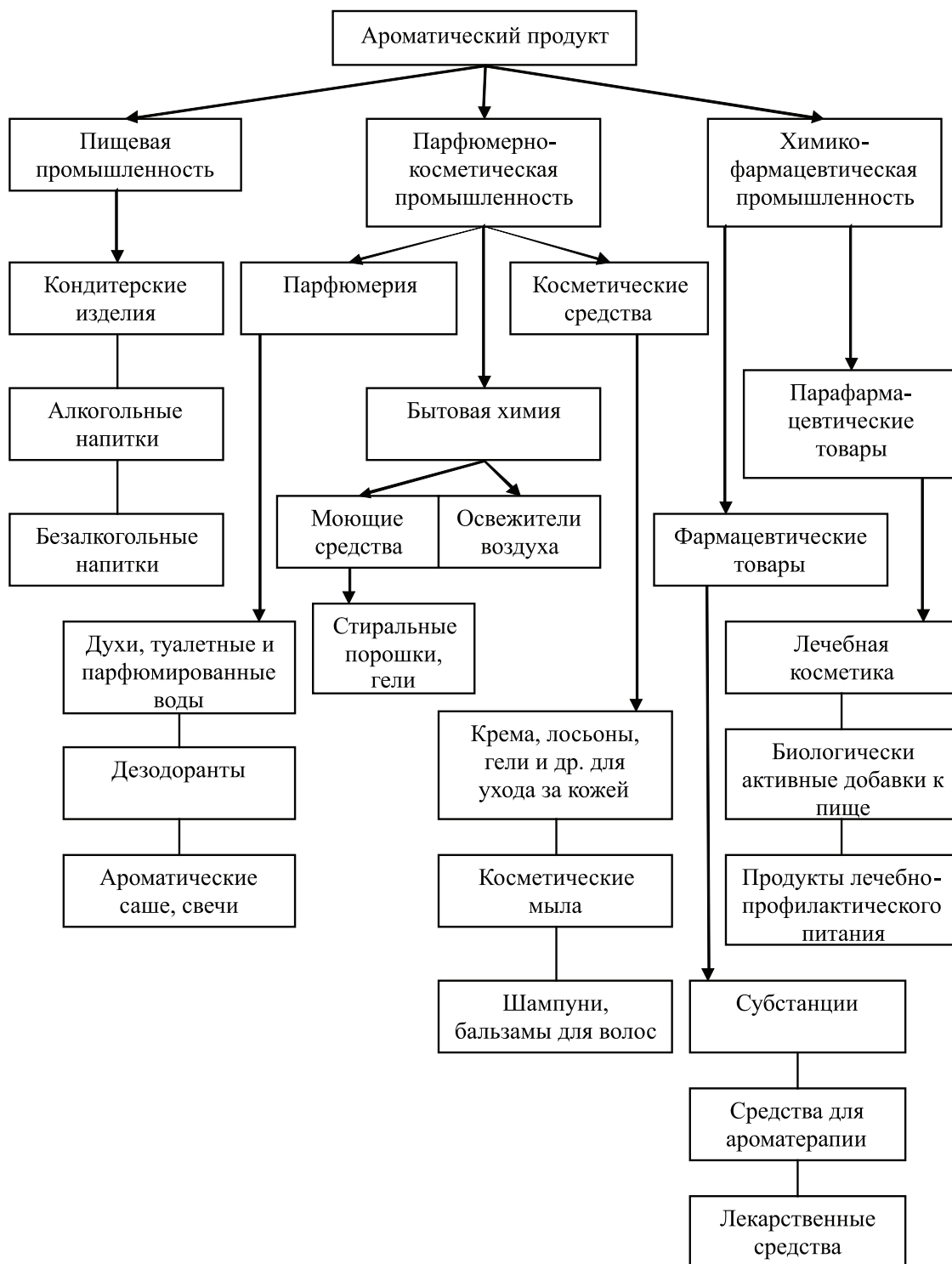


Рис. 5. Направления использования ароматического продукта, получаемого на основе *Erethothecium*

Заклучение

Представители рода *Eremothecium* являются перспективными продуцентами как рибофлавина, так и эфирного масла, что обуславливает необходимость в дальнейшей разработке биотехнологий [46-48]. Экономическая целесообразность производства на основе эремотеция может быть увеличена за счет применения технологии комплексного получения биологически активных веществ для удовлетворения потребности в них химико-фармацевтической, косметической, пищевой промышленности.

Список литературы

1. Биотехнологические методы в помощь создания рентабельного эфиромасличного производства с наиболее полной утилизацией отходов / А.Н. Погорельская, Е.С. Кочетков, П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова // Труды Института эфиромасличных и лекарственных растений. Симферополь, 1999. – Т. 25. – С. 170-180.
2. Бугорский П.С., Семенова Е.Ф., Родов В.С. Влияние ионов водорода, калия и натрия на продуктивность гриба *Eremothecium ashbyi* // Микробиологический журнал, 1990. – Т. 52. – № 3. – С. 44-47.
3. Бугорский П.С., Семенова Е.Ф. Душистые вещества мицелиального гриба *Ashbya gossypii* // Химия природных соединений, 1991. – № 3. – С. 428.
4. Войткевич С.А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии. – М.: Пищевая промышленность, 1999. – 284 с.
5. Концепция развития эфиромасличной отрасли Крыма / В.А. Шляпников, А.В. Афонин, О.А. Пехова, В.М. Сучкова // Эфиромасличные и лекарственные растения / Научные труды Института эфиромасличных и лекарственных растений УААН, 2006. – Вып. 26. – С.12-18.
6. Куркин В.А. Фармакогнозия. – 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»: ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., исп. и доп. – М.: РИА «Новая волна», 2007. – 1206 с.
8. О биосинтезе компонентов эфирного масла грибом *Eremothecium ashbyi* (структурно-функциональные особенности) / А.Н. Погорельская, П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова, Н.П. Бузулукова, Е.И. Горнунг // Вестник Российской академии с.-х. наук, 2003. – № 1. – С. 83-85.
9. Полішук В.Ю., Дуган О.М. Рибофлавін – виробництво і застосування // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України (Збірник наукових праць).-2009.-Вып.134, ч. 3.- 16 с.
10. Промышленная микология / В.А.Галынкин, Н.А. Заикина, И.В. Миндукшев, Н.А. Юрлова. СПб.: Изд-во СПХФА, 2003.- 220с.
11. Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств. Гл. ред: Г.Л. Вышковский. – М.: РЛС-МЕДИА, 2010. – Вып. 18. – 1296 с.
12. Родов В.С., Бугорский П.С., Семенова Е.Ф. Получение эфирного масла розового направления на основе биотехнологии // Труды ВНИИ эфиромасличных культур. Симферополь, 1987. – Т. 18. – С. 13-15.
13. Семенова Е.Ф. Биосинтетическая активность и антимикробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill // Известия вузов. Поволжский регион, 2007.-Серия «Медицинские науки», № 4.-С. 44 – 50.
14. Семенова Е.Ф., Богданов Н.И. Некоторые результаты биотехнологии ароматических продуктов // Сб. трудов «Инновационные технологии и продукты». Новосибирск, 2000. – Вып. 4. – С. 9 – 13.
15. Семенова Е.Ф. Скрининг водорослей – продуцентов летучих душистых веществ // V симпозиум «Основные

направления научных исследований по интенсификации эфиромасличного производства» (тезисы докладов). Кишинев, 1990. – С. 199-200.

16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Adaptation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* to hyperosmotic stress: different osmoresponse to NaCl and mannitol stress / C. Foerster, S. Marienfeld, V.F. Wedisch, R. Kraemer // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998. – Vol. 50. – P. 219-226.
20. A genome-wide transcription analysis of a fungal riboflavin overproducer / M. Karos, C. Vilarino, C. Bollschweiler, J.L. Revuelta // Biotechnol. – 2004. – 113, №1-3. – P. 69-76.
21. Biotechnological production of 2-phenylethanol / M.M.W. Etschmann, W. Bluemke, D. Sell, J. Schrader // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – V. 59. – P. 1-8.
22. Bugorskiy P.S., Semenova E.F. On biosynthesis of aroma building compounds of *Eremothecium ashbyi* and *Ashbya gossypii* // 12 th International congress of flavours, fragrances and essential oils. Vienna, Austria. October 4 th-8 th, 1992. – 1 p.
23. Bulgarian rose oil of white oil-bearing rose/ N. Nedkov, A. Dobрева, N. Kovacheva, V. Bardarov, A. Velcheva // Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2009. – Vol. 15, № 4. – P. 318-322.
24. Chemical composition and antioxidant activity of the extract and essential oil of *Rosa damascena* from Iran, population of Guilan / N. Yassa, F. Masoomi, Rohani S.E. Rankouhi, A. Hajajakhond / DARU, 2009. – Vol. 17, № 3. – P. 175-180.
25. Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii* / G. Schmidt, K.P. Stahmann, B. Kaesler, H. Sahn // Microbiology. – 1996. – V. 142. – P. 419-426.
26. Erdogan Gunes. Turkey rose oil production and marketing: a review on problem and opportunities // Journal of Applied Sciences, 2005. – Vol. 5, № 10. – P. 1871-1875.
27. Ertrk E., Erkmen O., Oener M. Effects of various supplements on riboflavin production by *Ashbya gossypii* in whey // Tr. J. of Engineering and Environmental Science. – 1998. – V.22. – P. 371-376.
28. Fedorovich D., Protchenko O., Lesuisse E. Iron uptake by the yeast *Pichia guilliermondii*. Flavinogenesis and reductive iron assimilation are co-regulated processes // Biometals. – 1999. – V. 12, № 4. – P. 295-300.
29. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid state fermentation/ Marlene Soares, Pierre Christen, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol // Process Biochemistry, 2000. – Vol. 35, № 8. – P. 857-861.
30. Hausler A., Munch T. Microbial production of natural flavors // ASM News, 1998. – V. 63, N. 10. – P. 551-559.
31. Improvement of riboflavin production using mineral support in the culture of *Ashbya gossypii*/ Sung Han Lin, Hwa Ming, Enoch Y. Park, et al. // Food Technol. Biotechnol. – 2003. – V. 41 (2). – P. 137-144.
32. Isolation of *Ashbya gossypii* mutant for an improved riboflavin production targeting for biorefinery technology / E.Y. Park, J.H. Zhang, S. Tajima, L. Dwiarti // Journal of Appl. Microbiol. – 2007. – V. 103. – P. 468-476.
33. Kolonne S., Seviour R.J., MacDougall B.M. Effect of pH on exocellular riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* // Biotechnology letters. – 1994. – V.16, N. 1. – P. 79-84.
34. Kovacheva N., Rusanov K., Atanassov I. Industrial cultivation of oil bearing rose and rose oil production in Bulgaria during 21st century, directions and challenges // Biotechnol. & Biotechnol. Eq., 2010. – №2. – P. 1793-1798.

35. Krings U., Berger R.G. Biotechnological production of flavours and fragrances // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998 – V. 49 – P. 1-8.
36. Mehta H.B., Modi V.V. The effect of phosphate on flavinogenesis in *Eremothecium ashbyii* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1981. - V.11. - P.131-132.
37. Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Ashbya gossypii* / A. Jimenez, M.A. Santos, J.L. Pompejus // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – 71, №10. - P. 5743-5751.
38. Nilgün Göktürk Baydar, Hasan Baydar. Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts // *Industrial Crops and Products*, 2013. – Vol. 41. - P. 375-380.
39. Ozbas T., Kutsal T. Oxygen transfer kinetics of riboflavin fermentation by *Ashbya gossypii* in agitated fermentors // *Enzyme Microb. Technol.*, 1992. - Vol. 14. – P. 984-990.
40. Ozbas T., Kutsal T. Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: *Eremothecium ashbyii* and *Ashbya gossypii* // *Enzyme Microb. Technol.* – 1986. – V. 8. – P. 593-596.
41. Ozbas T., Kutsal T. Effects of growth factors on riboflavin production by *Ashbya gossypii* // *Enzyme Microb. Technol.* – 1991. – V. 13. – P. 594-596.
42. Pujari V., Chandra T.S. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyii* // *Bioprocess Engineering*. 2000. V. 23. P. 3003-307.
43. Regulation of essential oil production on plants / N.S. Sangwan, A.H.A. Farooqi, F. Shabih, R.S. Sangwan // *Plant Growth Regulation*, 2001. – Vol. 34. – P. 3-21.
44. Research and current profile of Iranian production of damask rose (*Rosa damascena* Mill.) / M. Haghghi, A. Tehranifar, A. Nikbakht, M. Kafi // *Acta horticulturae*, 2008. – Vol. 769. – P. 499-455.
45. *Rosa damascena* – genetic resources and capacity building for molecular breeding / K. Rusanov, N. Kovacheva, K. Stefanova, A. Atanassov, I. Atanassov // *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 2009. – Vol. 23. – P. 1436-1439.
46. Semenova E.F., Shpichka A.I. Some pharmbiotechnological characteristics of *Eremothecium*, producer of riboflavin and essential oil // *International journal of applied and fundamental research*, 2012. – № 1. – P.170-172.
47. 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. – P. 35-36.
48. 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
49. 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 ashbyii* Guill // *International journal of applied and fundamental research*, 2011. – № 6. – P. 87.
50. Seong Han Lim, Jong Soo Choi, Enoch Y.Park. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famata*: an Overview // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* – 2001. –V. 6. –P. 75-88.
51. Seyhan Ulusoy, Gulgun Bosgelmez-Tinaz, Hale Secilmis-Canbay. Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute // *Curr. Microbiol.*, 2009. –Vol. 59. – P. 554-558.
52. Shawl A.S. Rose oil in Kashmiri India // *Perfumer and Flavorist.* – 2009. – V.34. – P. 2-5.
53. Shrikant A. Survase, Ishwar B. Bajaj, Rekha S. Singhal. Biotechnological production of vitamins // *Food Technol. Biotechnol.*, 2006. – № 44 (3). – P. 381-396.
54. Stahmann K.P., Revuelta J.L., Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – V. 53, №5. – P. 509-516.
55. Susan S. Roberts. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture // *Nature Chemical Biology*, 2007. – № 3. – P. 387-395.
56. Tanner F.W.J., Vojnovich C., Van Lanen J.M. Factors affecting riboflavin production by *Ashbya gossypii* // *Bacteriol.* – 1949. – V. 58, № 6. – P.737-745.