

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь магістр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

АНДРЕЄВА Богдана Валерійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Грибні метаболіти для підвищення стресостійкості рослин»

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна к.т.н. доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05.11.2025 року № 912-к

2. Строк подання здобувачем роботи 26.11.2025

3. Вихідні дані до роботи Літературні дані щодо класифікації грибних метаболітів, їх біологічної ролі та галузей застосування; Сучасні методи одержання, виділення, очищення й ідентифікації грибного метаболіту 6-пентил- α -пірону; Перспективи використання 6-пентил- α -пірону як екологічно безпечного біостимулятора росту рослин

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1. Грибні метаболіти для боротьби з патогенами рослин, РОЗДІЛ 2. Грибні метаболіти в медицині та фармації, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу, РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення та очищення 6-пентил- α -пірону, РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва, РОЗДІЛ 7. Проект заявки на корисну модель, Висновки.
5. Перелік графічного матеріалу: Апаратурні схеми - 1 лист А1 та 1 лист А2, Технологічні схеми - 2 листа А3: апаратурна та технологічна схеми виділення та очищення 6-пентил-альфа пірону, апаратурна та технологічна схеми отримання аерозольної форми 6-пентил-альфа-пірону

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Написання Розділу 1. Грибні метаболіти для боротьби з патогенами рослин, Розділу 2. Грибні метаболіти в медицині та фармації	01.10.2025- 18.10.2025	
	Написання Розділу 3. Техніко-економічне обґрунтування	19.10.2025- 23.10.2025	
	Написання Розділу 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу, Розділу 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення та очищення 6-пентил- α -пірону. АС та ТС схеми.	24.10.2025- 08.11.2025	
	Написання Розділу 6. Контроль виробництва	10.11.2025- 20.11.2025	
	Написання Розділу 7. Проект заявки на корисну модель	22.11.2025- 23.11.2025	
	Написання Реферату, Вступу та Висновків.	24.11.2025- 25.11.2025	
	Остаточне оформлення Кваліфікаційної роботи.	24.11.2025- 26.11.2025	

Здобувач _____
(підпис)

_____ **Богдан АНДРЕЄВ** _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

_____ **Вікторія КРАСІНЬКО** _____
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The qualification thesis is devoted to the development of a biotechnological method for obtaining 6-pentyl- α -pyrone — a volatile fungal metabolite that exhibits a wide range of biological activities. The work reviews literature data on the classification of fungal metabolites, their biological roles, and their applications in medicine, pharmacy, and agriculture. An analysis of modern methods for the extraction, purification, and identification of 6-pentyl- α -pyrone has been conducted, and the optimal conditions for its post-fermentation recovery have been determined.

A technological scheme for the extraction, dehydration, and concentration of the product is proposed, and the rationale for the choice of dosage form and packaging is provided. Special attention is given to the potential use of 6-pentyl- α -pyrone as an environmentally safe plant growth biostimulant.

The thesis consists of an introduction, seven chapters, conclusions, and a list of references. The total volume is 139 pages and includes 15 tables and 10 figures. The graphical part contains one apparatus scheme (A1 format), one apparatus scheme (A2) and two technological scheme (A3 format).

Keywords: 6-pentyl- α -pyrone, fungal metabolites, biotechnology, extraction, volatile organic compounds, bioactivity, phytopathogens, plant stress.

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню біотехнологічного способу одержання 6-пентил- α -пірону — леткого грибного метаболіту, що проявляє широкий спектр біологічної активності. У роботі розглянуто літературні дані щодо класифікації грибних метаболітів, їх біологічної ролі, застосування у медицині, фармації та сільському господарстві. Проведено аналіз сучасних методів виділення, очищення та ідентифікації 6-пентил- α -пірону, визначено оптимальні умови його післяферментаційного виділення.

Запропоновано технологічну схему процесу екстракції, зневоднення та концентрування продукту, а також наведено обґрунтування вибору форми випуску та пакування. Окрему увагу приділено можливостям використання 6-пентил- α -пірону як екологічно безпечного біостимулятора росту рослин.

Робота складається зі вступу, семи розділів, висновків і списку літератури. Загальний обсяг – 139 сторінок, містить 15 таблиць та 10 рисунків. Графічна частина містить одна апаратурна схема (формат А1) та одна апаратурна схема (формат А2) та дві технологічні схеми (формат А3)

Ключові слова: 6-пентил- α -пірон, грибні метаболіти, біотехнологія, екстракція, леткі органічні сполуки, біоактивність, фітопатогени, рослинний стрес.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1.ГРИБНІ МЕТАБОЛІТИ ДЛЯ БОРОТЬБИ З ПАТОГЕНАМИ РОСЛИН	11
1.1. Хітозан.....	11
1.2 Кумарини.....	13
1.3 Глікозиди.....	14
1.4 Полікетиди	15
1.5 Ксантони.....	25
1.6 Терпени та терпеноїди	26
1.7 Гетероциклічні сполуки.....	32
1.8 Кислоти та їх похідні	38
1.9 Леткі органічні сполуки (ЛОС).....	40
РОЗДІЛ 2. ГРИБНІ МЕТАБОЛІТИ В МЕДЕЦИНІ ТА ФАРМАЦІЇ	58
2.1 Алкалоїди	58
2.2 Полікетиди	61
2.3 Стероїди.....	63
2.4 Терпеноїди.....	67
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	80
3.1 Характеристика 6-пентил-альфа-пірону	80
3.1.1. Фізико-хімічні властивості.....	80
3.1.2. Практичне використання БРР	81
3.2 Розрахунок річної потужності виробництва	91
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	93
4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання біотехнологічного продукту.....	93
4.1.1. Видалення біомаси <i>Trichoderma viride</i>	94
4.1.2. Виділення 6-пентил- α -пірону.....	95
4.1.3. Зневоднення екстракту 6-пентил- α -пірону.....	97
4.1.4. Концентрування зневодненого екстракту.....	98

4.1.5. Пакування 6-пентил- α -пірону	99
4.2. Обґрунтування вибору форми та упаковки 6-пентил-альфа-пірону.....	100
4.2.1. Обґрунтування форми випуску	100
4.2.2 Обґрунтування вибору пакування.....	101
4.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	103
4.4. Специфікація обладнання.....	106
4.5 Обґрунтування вибору аерозольної форми 6-пентил-2-пірону.....	108
Розробка технології отримання наноемульсійної аерозольної форми 6-пентил- α -пірону.....	109
4.6 Специфікація обладнання альтернативної форми випускі.....	114
РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення та очищення 6-пентил- α -пірону.....	116
5.1 Опис технологічної схеми приготування аерозольної форми 6-пентил- α -пірону	118
РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва.....	121
6.1 Методи контролю рідкої форми 6-пентил- α -пірону.....	121
6.1.1 Кількісний та якісний аналіз	121
6.1.2 Аналіз протигрибкової активності	121
6.1.3 Визначення залишкової вологості методом Карла Фішера.....	122
6.2 Методи контролю наноемульсійної аерозольної форми 6-пентил- α -пірону .	123
6.2.1. Органолептичний контроль наноемульсії	123
6.2.2. Визначення кислотності (рН).....	124
6.2.3. Визначення розміру частинок та полідисперсності методом DLS	124
6.2.4. Визначення в'язкості наноемульсії	124
6.2.5. Оцінка фізичної стабільності (центрифугування та температурні цикли) .	125
6.2.6. Визначення вмісту 6-пентил- α -пірону методом газової хроматографії.....	125
6.2.7. Оцінка піноутворення	126
6.2.8. Контроль герметичності та тиску аерозольного балона	126
6.2.9. Визначення виходу аерозольного факела.....	126
6.2.10. Оцінка адгезії препарату на листовій поверхні.....	126
РОЗДІЛ 7. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ.....	128
7.1. Опис до деклараційного патенту на корисну модель.....	128

7.2. Реферат до деклараційного патенту №	129
7.3. Формула винаходу.....	130
7.4. Висновки	130
ВИСНОВОК.....	131
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	133

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ID - Захворюваність

LMW - низькомолекулярний хітозан

MMW - середньомолекулярний хітозан

HMW - високомолекулярний хітозан

DPPH – 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразил

ТШХ – тонкошарова хроматографія

МІК - мінімальна інгібуюча концентрація

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ГХ/МС – Газохромато-мас-спектрометричний аналіз

FDI – feeding deterrence indexes

АМЕ - 9-метиловий ефір альтернаріолу

ЛОС - Леткі органічні сполуки

ТЕМ - Трансмісійна електронна мікроскопія

АФК - Активні форми кисню

SI - індекс селективності

НТК - гістидин-триптофан-кетоглутарат

СІ - холодова ішемія

PI - ядерне фарбування

LPS – ліпополісахарид

DLBCL - клітини дифузної великої В-клітинної лімфоми людини

РКО - клітини раку товстої кишки людини

DV3 - вірусу денге людини типу 3

RSV - респіраторно-синцитіальний вірус

NA - Поверхневий глікопротеїн нейрамінідази

ВСТУП

Сучасний розвиток біотехнології відкриває нові можливості для використання метаболітів мікроорганізмів як джерела біологічно активних сполук. Серед них особливе місце займають грибні метаболіти, які характеризуються широким спектром фізіологічної активності та значним потенціалом для застосування у медицині, фармації, харчовій промисловості та агробіотехнологіях.

Одним із перспективних представників цієї групи є 6-пентил- α -пірон (6-PP) - леткий ароматичний метаболіт, який продукується грибами роду *Trichoderma* та іншими мікроорганізмами. Його біологічна активність зумовлює інтерес як до промислового одержання сполуки, так і до пошуку ефективних методів її виділення та очищення.

Основною проблемою сучасних технологій є складність післяферментаційного виділення летких органічних речовин, їх нестійкість та схильність до втрат при обробці. Тому актуальним завданням є розроблення оптимізованого біотехнологічного способу одержання 6-PP, який забезпечить стабільність продукту та економічну ефективність процесу.

Метою даної дипломної роботи є розроблення та обґрунтування технологічного процесу одержання 6-пентил- α -пірону, включно з етапами екстракції, зневоднення, концентрування і пакування, а також аналізом його потенційного застосування у біотехнології та фармації.

Наукова новизна роботи полягає у систематизації даних щодо біотехнологічного одержання 6-PP та створенні технологічного алгоритму, який може бути використаний у промислових умовах.

Практичне значення полягає у можливості застосування запропонованого процесу для виробництва біопрепаратів природного походження.

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Андреев Б.В.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					10	1
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 1.ГРИБНІ МЕТАБОЛІТИ ДЛЯ БОРОТЬБИ З ПАТОГЕНАМИ РОСЛИН

1.1. Хітозан

Результати досліджувань Torres-Rodriguez et al. (2024) показали що концентрації хітозану (0.5, 1, 2 та 3 г/л) мали фунгіцидний ефект проти *F. oxysporum*.

Найефективнішим був Т4 (3 г/л), який пригнічував ріст міцелію на 79.92%, що можна порівняти з ефективністю синтетичного фунгіциду.

Найменший відсоток пригнічення спостерігався при 0.5 г/л (51.51%). У контрольній групі (без хітозану) пригнічення росту не спостерігалось.

В усіх досліджених варіантах хітозан значно знижував біомасу *F. oxysporum*. Найкращий ефект спостерігався при 3 г/л (Т4), який значно перевершив 0,5 г/л (Т1), 1г/л (Т2) і 2 г/л (Т3) за рівнем пригнічення біомаси (0.65 г). Різниця між Т4 (3 г/л) та синтетичним фунгіцидом була несуттєвою

Обробка томатів концентрацією 2 та 3 г/л хітозану повністю запобігала розвитку некротичних уражень та гниття плодів. Найбільші некротичні плями спостерігалися при 0.5 г/л хітозану, проте цей варіант не відрізнявся від синтетичного фунгіциду.

Обробка 3 г/л хітозану призвела до найбільшої маси свіжих та сухих плодів, показавши значні переваги перед синтетичним фунгіцидом (Карбендазімом).

Захворюваність (ID) була значно нижчою у помідорах, оброблених хітозаном, у порівнянні з контролем.

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андрєєв Б.В.				РОЗДІЛ 1.ГРИБНІ МЕТАБОЛІТИ ДЛЯ БОРОТЬБИ З ПАТОГЕНАМИ РОСЛИН	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінко В.О.						11	47
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Найкращі результати досягнуто при застосуванні 2 і 3 г/л хітозану, що показало значні відмінності від інших варіантів хітозану та синтетичного фунгіциду. Контрольний варіант (без хітозану) призвів до 100% захворюваності томатів. Обробки хітозаном показали або вищу, або рівнозначну ефективність у порівнянні із застосуванням синтетичного фунгіциду

У дослідженні Nunes da Silva et al. (2014) було показано дію хітозану на соснову нематоду.

Результати даного дослідження показали що розчини хітозану концентрацією 0,35%, для рівномірного розподілу хітозану у ґрунті розчини наносили піпеткою в чотири різні точки кожної рослини (по 10 мл на точку).

У контрольних рослинах *P. pinaster* популяція нематод не зазнала значних змін до 12-го дня після інокуляції (dai), хоча кількість нематод дещо зросла порівняно з початковим інокуляційним рівнем (близько 1000 нематод). Однак, з 12 до 24 дня після інокуляції відбулося різке збільшення популяції нематод (приблизно в 2,8 раза), досягнувши 3825 ± 100 нематод у стеблах на кінець досліджу.

У рослинах *P. pinaster*, оброблених низькомолекулярним хітозаном (LMW), значних змін у чисельності нематод протягом експериментального періоду не спостерігалось, хоча з 18 до 24 дня їх кількість зменшилася приблизно в 2,6 раза. Крім того, у рослинах, оброблених хітозаном, кількість нематод була у 1,7–9,6 раза меншою, ніж у контрольних рослин.

У рослинах *P. pinaster*, оброблених середньомолекулярним хітозаном (MMW), чисельність нематод зросла приблизно в 1,9 раза з 6 до 18 дня після інокуляції, але на 18-й день вона була значно нижчою (в 1,3 раза), ніж у контрольних рослин. Найважливіше, що з 18 до 24 дня після інокуляції популяція нематод значно зменшилася, досягнувши 662 ± 138 нематод на кінець експерименту, що приблизно в 5,8 раза менше, ніж у контрольних рослин, і в 2,5 раза менше від початкового рівня інокуляції.

Обробка високомолекулярним хітозаном (HMW) не спричинила значних змін у чисельності нематод до 18 дня після інокуляції. Проте їх чисельність була у 1,6–3 рази нижчою, ніж у контрольних рослин, і в 1,2–1,6 раза меншою, ніж початковий

рівень інокуляції. Крім того, з 18 до 24 дня після інокуляції кількість нематод значно зменшилася (приблизно у 21,9 раза), досягнувши 175 ± 25 нематод.

У рослинах *P. pinea* значних змін у чисельності нематод до 12 дня після інокуляції не спостерігалось. Проте з цього моменту і до кінця експерименту чисельність нематод суттєво знизилася навіть у контрольних рослинах (до 70 ± 47 нематод). Це зниження було ще більш вираженим у рослинах, оброблених хітозаном, особливо у випадку LMW-хітозану, де чисельність нематод зменшилася у 28,5 раза (до 10 ± 6 нематод). На 24-й день після інокуляції порівняно з необробленими рослинами *P. pinea* LMW-хітозан забезпечив найбільш радикальне зниження чисельності нематод (приблизно в 7 разів), хоча ця різниця не була статистично значущою ($p = 0,141$). Незалежно від обробки, чисельність нематод у *P. pinea* завжди була у 2,2–54,6 раза меншою, ніж у *P. pinaster*, і в 3,5–100 разів меншою, ніж початковий рівень інокуляції.

1.2 Кумарини

У дослідженні Morales-Sánchez et al. (2021) було оцінено екстракти етилацетату з SPH2 на їх властивості біоконтролю проти патогенів рослин (*Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata* та *Botrytis cinerea*), комах-шкідників (*Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*) і нематод, що паразитують на рослинах (*Meloidogyne javanica*) та кліщі (*Hyalomma lusitanicum*). Біологічне фракціонування екстрактів SPH2 призвело до виділення сполук 1–3. Сполука 1 була ідентифікована як меллеїн на основі її ГХ-МС і спектроскопічних даних. Сполуки 2 і 3, раніше виділені як природні продукти з *Aspergillus ochraceus*, були ідентифіковані як неоаспергілова та неогідроксіаспергілова кислоти, відповідно, на основі їх спектроскопічних даних.

Меллеїн (1), виділений з іксодицидної фракції, продемонстрував сильну дію проти личинок *H. lusitanicum* ($LD_{50} = 0,48$ мкг/мг, 0,44–0,51 95% довірчі межі), будучи в 10 разів ефективнішим за тимол ($LD_{50} = 2,94$ мкг/мг, 2,08–3,54 95% довірчі межі).

Неоаспергілова кислота (2) продемонструвала потужну протигрибкову дію проти *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* та *Fusarium oxysporum*.

Сполука **2** з'явилася під час експоненціальної фази росту грибів, тоді як неогідроксіаспергілова кислота **3** з'явилася під час стаціонарної фази, що свідчить про те, що **2** є біосинтетичним попередником **3**.

Токсин охратоксин А не виявлено. Таким чином, грибковий ендofіт SPH2 може бути біотехнологічним інструментом для виробництва іксодицидних екстрактів, багатих мелеїном.

1.3 Глікозиди

У дослідженні Charla et al. (2018) було оцінено сполуки отримані з ендofітних грибів *Colletotrichum crassipes* та *Xylaria sp.*

У сукупності була визначена плоска структура сполуки 1-фенілетил- O -a- L -рамнопіранозиду (**1**). Відносні конфігурації для C-1' до C-5' були встановлені одновимірним експериментом NOESY (ядерна спектроскопія з ефектом Оверхаузера) і парним постійним значенням. Подібну сполуку виділено з ендofітних грибів *Xylaria sp.* асоціюється з *Pinus tabuliformis* з Китаю. L -рамнопіраноза є компонентом, що міститься в різних природних біоактивних сполуках, ці похідні сполуки широко використовуються в косметиці та харчовій промисловості.

Окрім нового виділеного природного продукту, ідентифіковано шістнадцять відомих сполук: дикетопіперазини цикло(D)-Pro-(L)-Val (**2**), цикло(D)-Pro-(D)-Tyr (**3**), цикло(D)-Val-(D)-Tyr (**4**), цикло(D)-Hyp-(L)-Phe (**5**), ¹цикло(D)-Pro-(D)-Leu (**6**), цикло(D)-Pro-(L)-Phe (**7**), ¹цикло(D)-Pro-(L)-Phe (**8**) та цикло(D)-Pro-(D)-Phe (**9**). Разом з N-(2-фенілетил)ацетамідом (**10**) і тирозол (**11**), які були виділені з ендofіту *Colletotrichum crassipes*. Крім того, з *Xylaria sp.* були виділені такі сполуки: гризеофульвін (**12**), дехлорогризеофульвін (**14**), три відомі цитохалазини В (**13**), С (**15**) і D (**16**), і 5-карбоксі-6-гідрокси-3-метил-3,4-дигідроізокумарин (**17**).

Виділені сполуки оцінювали на здатність поглинати радикал DPPH. Профіль біоавтографії ТШХ ізольованих сполук показав, що чотири сполуки (**9, 12, 13** і **16**) показали жовті плями на фіолетовому фоні. Іншими словами, тільки сполуки **9, 12, 13** і **16** виявляли антиоксидантну здатність при 1 мг/ ^{мл}. У контексті зв'язку

структура-активність, центральною ознакою, пов'язаною з ефективністю відновлення радикалів DPPH[•] була потреба в групах-донорах електронів. Різниця між **12** (активна сполука) і **14** (неактивна) полягає лише в наявності –Cl, який збільшує антиоксидантну здатність сполуки через зниження DPPH. Ці результати продемонстрували, що активність поглинання радикалів була зумовлена прямим відновленням через перенесення електронів та/або гасіння радикалів, стабілізуючи радикал DPPH.

Виділені сполуки перевіряли на їх протигрибкову дію проти двох фітопатогенних грибів (*C. cladosporioides* і *C. sphaerospermum*) за допомогою методу дифузії ТШХ. Сполуки **9**, **10** і **17** показали високу протигрибкову активність проти обох штамів грибів. Ці сполуки показали потужну протигрибкову активність при 50 мкг проти *C. cladosporioides* і помірну активність проти *C. sphaerospermum* при такій же кількості. Сполуки **9** і **17** виявляли протигрибкову активність при 10 мкг. Інші сполуки були неактивними при 100 мкг. Раніше повідомлялося, що біоактивні сполуки **9** і **10** є протигрибковими агентами. Ці мікроорганізми можуть виробляти протигрибкові метаболіти як самозахист або для захисту рослин від інших патогенних мікроорганізмів.

Сполуки оцінювали на їх інгібіторну активність AChE за допомогою біоавтографії ТШХ. Серед усіх ізольованих сполук, які були протестовані, лише три сполуки (**9**, **13** і **15**) продемонстрували потужне інгібування AChE при дозі 60 мкг. Інші сполуки не виявили значного інгібуючого ефекту.

1.4 Полікетиди

Полікетиди виявляють протигрибкову дію загалом: (а) порушують цілісність клітинної мембрани грибка, (б) пригнічують синтез клітинної стінки, (в) перешкоджають процесам транскрипції та трансляції та (г) порушують функцію мітохондрій.

У дослідженні Gao et al. (2020) було показано два біосинтетично споріднені нових метаболіти, евкаліптову кислоту А (1) та евкалактам В (2), разом з шістьма відомими сполуками (3-8): еугеніолом (3), цитоспороном С (4), 4-гідроксифенетиловим спиртом (5), 1-(4-гідроксифеніл)етан-1,2-діолом (6), N-(2-

гідрокси-2-фенілетил)ацетамідом (7) та фомопеном (8) які були отримані з *Diaporthe eucalyptorum* KY-9. Також з 2 було отримано два додаткових нових похідних (2a, 2b).

Результати дослідження протигрибкової активності показали що метаболіти 1, 4, 6 та 7 інгібували ріст *A. solani* з мінімальними інгібуючими концентраціями (МІК) в діапазоні від 6,25 до 50 мкМ, а 6 та 7 мали таку ж протигрибкову активність проти *A. solani*, як і позитивний контроль гімексазол (МІК 6,25 мкМ), що показало, що *A. solani* був більш чутливим до тестованих сполук, ніж інші гриби. Навпаки, 2 та його похідні 2a та 2b не виявили жодної протигрибкової активності. Результати показують, що вільні 11-ОН та -COOH групи 1 є важливими для активності. Крім того, 1 пригнічував ріст чотирьох грибів з МІК від 12,5 до 50 мкМ, а решта речовин виявили слабе пригнічення росту.

У дослідженні Yin et al. (2019) описано метаболіти отримані з двох штамів ендоефітних грибів. Штам A761 був виділений з листя *Morinda officinalis*, яке було зібрано з міста Гаояо провінції Гуандун у січні 2015 року. Штам був ідентифікований аналізом послідовності рРНК ITS (внутрішній транскрибований спейсер) області. Послідовність області ITS гриба A761 була подана до GenBank (номер доступу KU529867). Використовуючи BLAST (програма порівняння нуклеотидних послідовностей) для пошуку в базі даних GenBank, було виявлено, що A761 має 99,5% схожість із *Cytospora rhizophorae* M225 (номер доступу KR056292). Штам A658 був виділений зі стебел *Pogostemon cablin*, який був зібраний у місті Янчунь провінції Гуандун, Китай, у жовтні 2012 року. Штам був ідентифікований за допомогою аналізу послідовності рРНК ITS-області. Послідовність ITS-області грибового штаму A658 була подана до GenBank (номер доступу KF498871). За допомогою BLAST (програма порівняння нуклеотидних послідовностей) для пошуку в базі даних GenBank було виявлено, що A658 має 99,80% схожості з *Phomopsis phyllanthicola* A6 (номер доступу EF488373). Для отримання метаболітів штами культивували на картопляно-декстрозному бульйоні (PDB, картопля 20%, глюкоза 2%, K_2HPO_4 0,3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15%, вітамін В 10 мг/л) та витримували в середовищі з картопляним декстрозним агаром

(PDA) при 28 °C протягом 5 днів, а потім три частини (0,5 × 0,5 см²) міцеліальних пробок агару висівали в колби Ерленмейєра об'ємом 20 × 500 мл, кожна з яких містила 250 мл PDB. Після 4 днів інкубації при 28 °C на ротаційному шейкері зі швидкістю 120 об/хв 25 мл зразків A761 і A658 асептично переносили в загальну кількість 100 колб (ємністю 1000 мл), кожна з яких містила 500 мл PDB. Подальше рідинне культивування проводили протягом 7 днів при 28 °C і 120 об/хв на ротаційному шейкері. Далі відбувалася центрифугування для отримання бульйону та міцелію. Бульйон чотири рази ретельно екстрагували EtOAc, а потім етанольні екстракти об'єднували та випаровували при зниженому тиску при температурі не вище 40 °C, отримуючи темно-коричневу камедь (20 г) A658 і (26 г) A761. Потім за допомогою хроматографії отримували 5 різних фракцій і далі очищали дані фракції за допомогою флеш-хроматографії та напівпрепаратною ВЕРХ.

Фітохімічне дослідження екстракту EtOAc грибів *Phomopsis phyllanthicola* A658 і *Cytospora rhizophorae* A761 призвело до виділення дванадцяти відомих сполук, включаючи чотири октакетиди — цитоспоровин В (**1**), цитоспоровин М (**2**), дотіорелон А (**3**) і дотіорелон В (**4**); три ароматичні сполуки — 4-гідроксибензальдегід (**5**), 2-р-ацетоксифенілетанол (**6**) і 3-фенілпропан-1,2-діол (**7**); два монотерпени, —(–)-(1R, 2R, 3S, 4R) -п-ментан-1,2,3-тріол (**8**) та (3R, 4aR, 5S, 6R) -6-гідроксил-5-метилрамулозин (**9**); і три полікетиди — нектріапірон А (**10**), фомопіронол (**11**) і нектріапірон D (**12**).

Результати дослідження активності цитоспоровину В *in vivo* та *in vitro* показали що коефіцієнт інгібування цитоспоровину В (сполука 1) досяг 63,4%, що було подібно до показника позитивного контролю. Ефективність інгібування цитоспоровину В проти *G. citri-aurantii* показала дозозалежну поведінку з EC₅₀ = 26,11 мкг/мл, тоді як комерційний фунгіцид прохлораз має EC₅₀ = 18,92 мкг/мл. Крім того, МІС були оцінені як 105 мкг/мл і 95 мкг/мл для цитоспоровину В і прохлоразу відповідно. Крім того, цитоспоровин В продемонстрував багатообіцяючий захисний ефект на цукровому апельсині, інокульованому *G. citri-aurantii*, що свідчить про те, що

ефективність контролю *in vivo* цитоспору В у концентрації 500 мкг/мл була порівнянна з ефективністю прохлоразу в концентрації 250 мкг/мл

Результати протигрибкового скринінгу щодо *G. citri-aurantii* також продемонстрували попередній зв'язок між структурою та активністю, де було підтверджено, що октакетиди є переважаючими компонентами, що відповідають за потужну протигрибкову активність ендofітів *P. phyllanthicola* A658 і *C. rhizophorae* A761. Крім того, спостерігалось, що гідроксильна функціональність в ацильному ланцюзі похідних цитоспору В відіграє вирішальну роль у їх протигрибковій активності, і її існування має тенденцію до різкого зниження протигрибкової активності цитоспору В. Однак розташування гідроксильної групи та проста заміна етилового фрагмента на метиловий фрагмент у складноєфірній групі для похідного цитоспору В мало впливають на протигрибкову активність (2-4). Ці результати вказують на зворотний зв'язок між силою грибової активності та наявністю гідроксильної функціональності в ацильних хвостах похідних цитоспору В.

У статті Luo et al. (2019) показано два полікетиди, продуковані ендofітом *Penicillium citrinum* DBR-9 з лікарської рослини *Stephania kwangsiensis*.

У цьому дослідженні, на основі методу виділення, спрямованого на активність, і спектроскопічного аналізу, два активних полікетиди, цитринін (1) і емодин (2), були виділені та ідентифіковані з ферментації ендofітного гриба *Penicillium citrinum* DBR-9.

Два полікетиди певною мірою виявляли протигрибкову активність. Цитринін (1) виявляв протигрибкову активність проти 7 патогенних для рослин грибів зі значеннями IC_{50} в діапазоні від 3,1 до 123,1 мкг/мл і показав найвищу активність щодо патогенних грибів *Alternaria citri*. Емодин (2) продемонстрував протигрибкову активність проти 6 патогенних грибів зі значеннями IC_{50} в діапазоні від 3,0 до 141,0 мкг/мл, демонструючи найвищу активність щодо патогенних грибів *Bipolaris maydis*.

**Противіробкова активність двох полікетидів щодо рослинних патогенних
грибів (Luo et al. 2019)**

Збудники	IC ₅₀ (95% довірчий інтервал)/(мкг/мл) ^a	
	Цитринін (1)	Емодін (2)
<i>Alternaria citri</i>	3,1 (2,1 - 4,0)	— ^b
<i>Alternaria oleracea</i>	—	—
<i>Bipolaris maydis</i>	—	3.0 (0.3 - 5.7)
<i>Colletotrichum capsici</i>	123.1 (73.4 - 172.7)	—
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	10.0 (7.2 - 12.8)	62.4 (43.5 - 81.3)
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	56.8 (35.0 - 78.7)	105.4 (71.2 - 139.6)
<i>Diaporthe citri</i>	14.2 (8.8 - 19.6)	59.2 (43.5 - 74.9)
<i>Exserohilum turcicum</i>	6.1 (3.7 - 8.4)	20.3 (13.3 - 27.3)
<i>Pestalotiopsis theae</i>	19.9 (13.5 - 26.3)	—
<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	—	141.0 (89.4 - 192.6)

^a Значення виражені як середнє ± стандартне відхилення (*n* = 3). Карбендазім використовувався як позитивний контроль

^b «—» означає, що значення IC₅₀ не розраховуються, оскільки противіробкова активність сполук щодо цих патогенних грибів була надто низькою (Luo et al. 2019)

Порівняно з контролем (без емодину) (Рисунок 1.4.1 а), дослідження гіф, оброблених емодином, виявило кілька морфологічних аберацій, включаючи набряк, викривлення та видиму втрату пігментації (Рисунок 1.4.1 б). Ці результати були подібні до результатів, отриманих для гіф інших грибів.

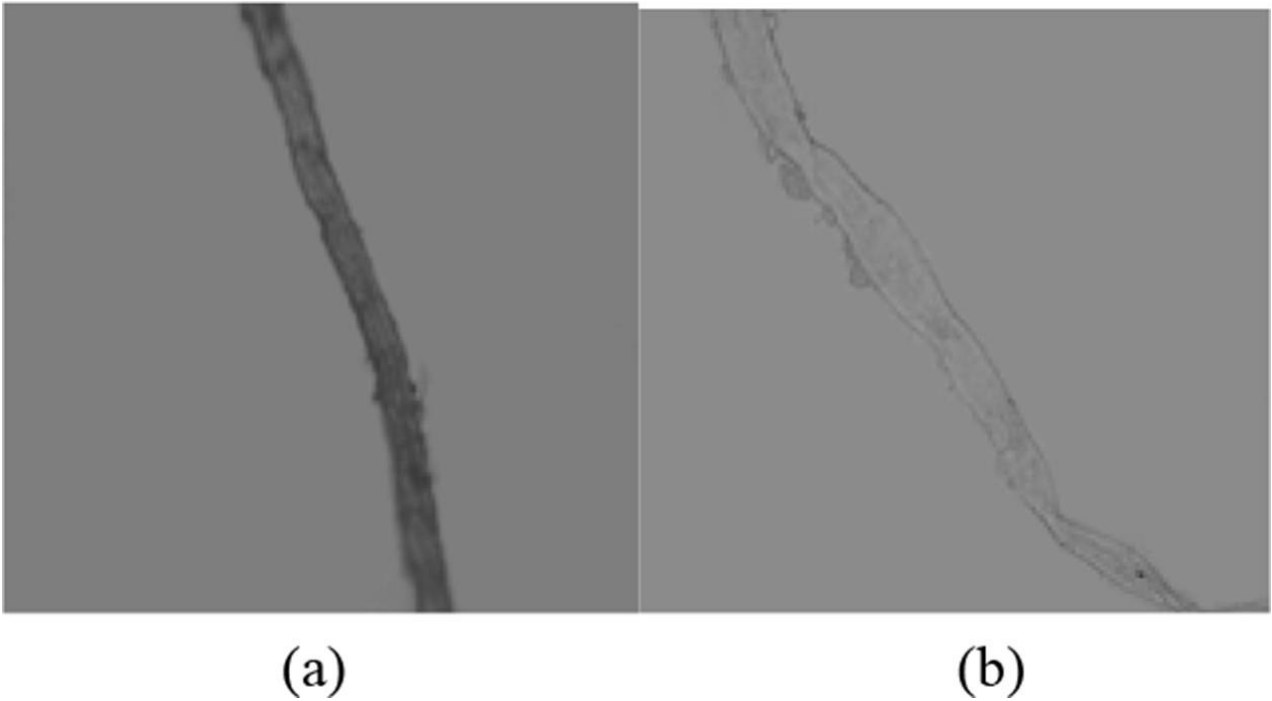


Рисунок 1.4.1 Вплив емодину на морфологію міцелію *P. parasitica var. nicotianae* (40×) ((a) контрольна група, додана суміш ацетону та води (1:1 за об'ємом) замість розчину емодину; (b) група, яка отримувала емодин, оброблена 100 мкг/мл емодину). (Luo H et al. 2019)

Зміни відносної проникності мембран *P. parasitica var. nicotianae* позитивно корелювали з тривалістю лікування. Відносна проникність у групі, яка отримувала емодин, різко зросла і становила від 8,21% до 44,44% протягом 30-360 хвилин, значно вище, ніж у контрольній групі (без емодину) (7,63%-25,44%) зі збільшенням на 7,60%-74,69%. Клітинна мембрана відіграє основну роль у захисті клітинних компонентів від позаклітинного середовища та протидії антимікробним агентам. Витік клітинних компонентів може свідчити про пошкодження грибкової мембрани. Більшість протигрибкових пептидів також головним чином націлені на клітинну стінку та мембрану грибка. Різке збільшення відносної проникності в групі, яка отримувала емодин, вказує на те, що емодин може індукувати руйнування цитоплазматичних мембран і викликати витік міжклітинного вмісту, що може призвести до загибелі грибів.

Концентрація розчинного білка в групі, яка отримувала емодин, була значно нижчою, ніж у контрольній групі. Крім того, зі збільшенням часу обробки концентрація розчинного білка в міцелії поступово знижувалася. Після лікування протягом 48 годин концентрація розчинного білка міцелію становила приблизно 0,50 мг/мл, зменшившись на 20,63% порівняно з контрольною групою (без емодину)

(0,63 мг/мл). Результати показали, що емодин може впливати на синтез білка грибкової клітини, а потім впливати на основні компоненти клітинних мембран.

У статті Ding et al. (2020) продемонстровано геномодифікований штам ендofітного гриба *Trichoderma afroharzianum* OE::*Talae1*.

Оскільки геномна послідовність *T. afroharzianum* Fes1712 наразі невідома, геномну послідовність *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 використовували для відбору генів і початкового дизайну праймера. *LaeA* - подібний ген був ідентифікований за допомогою Local-Blast з *A. nidulans* *LaeA* ген (AN0807) як запит. Дві пари специфічних праймерів, включаючи два внутрішніх праймери (Ta85012iF/R) з термінальними сайтами рестрикції *XbaI* та *EcoRV*, були використані як праймери вкладеної ПЛР-ампліфікації *talae1* з геномної ДНК штаму Fes1712. Продукт ПЛР гена *talae1* розщеплювали за допомогою ендонуклеаз і вставляли в той самий сайт рестрикції вектора pZeo, щоб створити pZeo-*talae1*. Ген *talae1* із штаму Fes1712 був секвенований компанією Sangon Biotech (Шанхай, Китай) і розміщений у базі даних GenBank під номером доступу MT313929. Вектор надекспресії pZeo-*talae1* складався з касети безперервної експресії, включаючи промотор P_{gpdA}, ген *talae1* і термінатор T_{trpC}, а також два маркери селекції (ген стійкості до ампіциліну для селекції штаму *Escherichia coli* та ген стійкості до блеоміцину для трансформанта Fes1712). Рекомбінантний вектор трансформували в штам *E.coli* Trans1-T1 для вилучення плазмід для трансформації. Потім екстраговані плазмиди переносили в WT, отримуючи трансформант із надекспресованим геном *talae1* (OE::*Talae1*) за допомогою PEG-опосередкованої трансформації протопластів (Tang et al., 2017), тоді як контрольний трансформант також генерували з використанням вакантного pZeo. Трансформанти відбирали та очищали в присутності блеоміцину. Генотип трансформанта з надлишковою експресією було підтверджено діагностичною ПЛР.

Аналіз послідовності за допомогою InterProScan показав, що білок *talae1* був S-аденозил-L-метіонін-залежною метилтрансферазою, що узгоджується з функцією *LaeA*. Аналіз BLAST показав, що білок *Talae1* мав 73,9, 68,1, 57,1 і 56,8% ідентичність послідовності з *Lae1* (XP_006966726.1) *Trichoderma reesei*, *Lae1*

(XP_013938600.1) *Trichoderma atroviride*, LaeA (XP_018233436.1) *F. oxysporum* і Lae1 (XP_018742755.1) *F. verticillioides*, відповідно.

Щоб дослідити вплив надекспресії гена *talae1* на вторинний метаболізм у штамі Fes1712, трансформант *OE::Talae1* і контрольний трансформант були сконструйовані та культивовані на рисовому середовищі при 28°C протягом 15 днів у статичних умовах. ПЛР у реальному часі проводили для визначення різниці в рівнях транскрипції гена *talae1* між *OE::Talae1* та контрольними трансформантами. Результати показали, що рівень транскрипції гена *talae1* був у 7,7 разів підвищений у трансформанті *OE::Talae1*. Продукти бродіння екстрагували та аналізували за допомогою ВЕРХ. Трансформант *OE::Talae1* показав очевидну зміну у вторинному метаболічному профілі, про що свідчить поява кількох нових піків (рис. 1.4.2), порівняно з контрольним трансформантом. Очищення нових піків призвело до виділення двох відносно високопродуктивних сполук **1** і **2**.

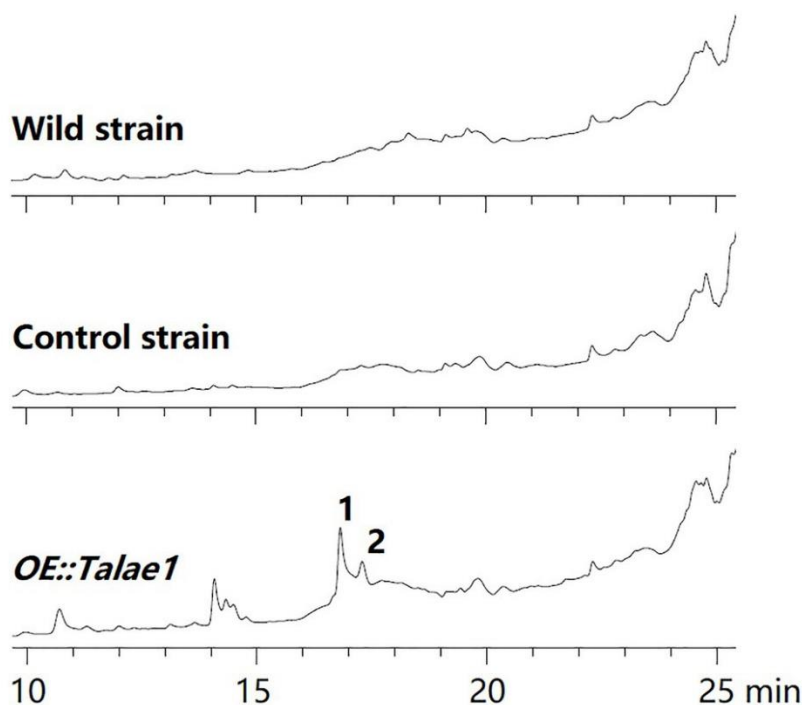


Рисунок 1.4.2. Порівняльний аналіз ВЕРХ-профілів вторинних метаболітів *OE::Talae1* і контрольних трансформантів. Цифри представляють сполуки, виділені з трансформанта *OE::Talae1*. Детектування проводили при 210 нм. (Ding et al. 2020)

Для виробництва SMs трансформант із надекспресією та контрольний трансформант культивували на середовищі PDA (PDA, 20% картоплі, 2% декстрази

та 1,5% агару) при 28°C протягом 5 днів. Потім їх інокулювали в 1-літрові колби Ерленмейера, кожна з яких містила 80 г рису та 120 мл дистильованої води, і інкубували при 28°C у статичних умовах. Через 15 днів ферментований субстрат у кожній колбі розбивали за допомогою диспергатора (T18, ІКА, Німеччина) і тричі екстрагували 200 мл MeOH. Рідкі шари збирали і випарювали для видалення MeOH. Залишковий екстракт суспендували в H₂O і тричі екстрагували рівним об'ємом EtOAc. Шари EtOAc розділяли та випарювали при зниженому тиску, отримуючи твердий екстракт. Очищення екстрактів проводили за допомогою напівпрепаративною ВЕРХ, елююючи 70% MeOH-H₂O, щоб отримати сполуку **1** (9,0 мг) і **2** (4,5 мг).

Отримані сполуки (R,3E,5E)-1-(3,5-дигідрокси-2,4-диметилфеніл)-1-гідрокси гепта-3,5-дієн-2-он (**1**) і (R,3E,5E)-1-(3,5-дигідрокси-2,4-диметилфеніл)-1-метокси гепта-3,5-дієн-2-он (**2**) були оцінені на протигрибкову активність проти чотирьох бактерій і шістьох рослин-патогенних грибів. Сполуки **1** і **2** показали селективну протигрибкову активність зі значеннями MIC в діапазоні від 8 до 32 мкг/мл. Сполука **1** виявила найвищу інгібіторну активність із значеннями MIC 8, 8 і 32 щодо *B. cinerea*, *F. oxysporum* f. зр. *nicotianae* та *C. lagenarium* відповідно. Було показано, що рід *Trichoderma* продукує численні полікетиди з різною біоактивністю. Наприклад, відомо, що види грибів роду *Trichoderma* є основними продуцентами сімейства сорбіциліну, які структурно подібні до сполук **1** і **2**. (Reátegui et al. 2006) повідомили про протигрибкову дію аналогів сорбіциліну проти *Aspergillus flavus* і *Fusarium verticillioides*. Крім того, сполуки **1** і **2** також показали слабку антибактеріальну активність проти грампозитивних бактерій *S. aureus*.

Таким чином, надмірна експресія глобального регулятора Talae1 посилювала продукцію SM в ендofітному грибі *T. afroharzianum*, і два нових полікетиди (**1** і **2**) були виділені та ідентифіковані з трансформанта надмірної експресії. Ці результати вказують на те, що глобальний регулятор Talae1 бере участь у вторинній метаболічній регуляції *T. afroharzianum* і впливає на біосинтез ряду протигрибкових полікетидів. Це дослідження також демонструє, що генетична

маніпуляція глобальним регулятором є багатообіцяючим підходом для активації нових SM та покращення метаболічного потенціалу біоконтрольних грибів.

У статті Yehia et al. (2020) було отримано та проаналізовано вторинні метаболіти з ендоефітного гриба *Cladosporium cladosporioides* з ендемічної рослини *Zygodphyllum mandavillei*. Отримані метаболіти були оцінені як в очищеному вигляді так і в неочищеній формі.

Результати ГХ/МС екстракту *C. cladosporioides* показали, що шість основних компонентів були успішно ідентифіковані, молекулярні маси сполук. Сполуки включали кладоспорин, ізокладоспорин, 5'-гідроксіасперентин, ді(2-етилгексил) фталат і аспідоспермідин-20-ол,1-ацетил-17 метокси, тоді як 3-фенілпропіонова кислота була вперше виділена з *Cladosporium cladosporioides*.

Очищені сполуки, виділені з *C. cladosporioides*, були досліджені на їх антимікробну здатність. Загалом, усі сполуки показали відносно хорошу антимікробну дію як проти бактеріальних, так і проти грибкових патогенів. 3-фенілпропіонова кислота показала підвищену антимікробну активність навіть у низьких концентраціях з МІК від 3,90 до 15,62 мкг/мл проти всіх досліджених патогенів, потім 5'-гідроксіасперентин з МІК в діапазоні 7,81–62,5 мкг/мл, тоді як найнижчу інгібіторну активність виявлено для кладоспорину (табл. 1.2). Таким чином, цитотоксичність *in vitro* 3-фенілпропіонової кислоти була додатково досліджена як багатообіцяючого антибактеріального та протигрибкового засобу.

Таблиця 1.2.

МІК очищених сполук (мкг/мл) з ендоефітних грибів *Cladosporium cladosporioides* проти бактеріальних і грибкових патогенів. (Yehia et al. 2020)

Сполуки	Бактеріальні штами		Штами грибів	
	<i>X. oryzae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>A. flavus</i>	<i>F. solani</i>
кладоспорин	500	>1000	500	62,50
Ізокладоспорин	15.62	15.62	125	62,50
5'-гідроксіасперентин	15.62	62,50	15.62	7.81

Ді(2-етилгексил)фталат	125	31.25	31.25	31.25
Аспідоспермідин-20-ол, 1-ацетил-17-метокси-	125	62,50	320.5	>1000
3-фенілпропіонова кислота	15.62	7.81	7.81	3.90
Стрептоміцин	0,25	0,25	–	–
Амфотерицин В	–	–	0,49	0,49
Стерильна вода †	–	–	–	–

Як негативний контроль використовували стерильну воду з 1% ДМСО і 0,1% Твіну 80.

Результати даного дослідження показали що сполука 3-фенілпропіонова кислота виявила найкращу антибактеріальну та протигрибкову активність проти всіх досліджуваних збудників з найнижчим значенням МІК (3,90–15,62 мкг/мл) Ці результати узгоджуються з попереднім дослідженням, у якому повідомлялося про антибактеріальну та протигрибкову дію широкого спектру дії 3-фенілпропіонової кислоти, екстрагованої з актинобактерій *Streptomyces albidoflavus*, ця сполука була ефективною не тільки *in vitro*, але й *in vivo* в біологічному контролі хвороби рослин, спричиненої *Fusarium udum* на горошині Narayana et al. (2007). Це означає важливість ендofітного гриба *S. cladosporioides* для рослини як постачальника антимікробних сполук, які захищають рослину від інвазії патогенів.

1.5 Ксантони

Ксантони являють собою групу ароматичних оксигенованих гетероциклічних сполук, що характеризуються дибензо- γ -піроновим каркасом Pinto et al. (2005). Зазвичай вони мають трициклічну структуру, де два бензольні кільця (А і В) з'єднані через центральне піронове кільце. Декілька похідних ксантонів були експресовані культивованими ендofітними грибами та виявляють різноманітну біоактивність, включаючи протигрибкові, антиоксидантні, протизапальні та протиракові властивості. Cao et al. (2022)

У дослідженні Miao et al. (2020) було показано 5 метаболітів отриманих з ендofітного гриба *Paraconionthyrium sp.* УМ 311593.

В результаті аналізу даних ESIMS та спектрів ЯМР було встановлено, що виділені сполуки є глобозуксантоном А (1), вертиксантоном (2), гідроксивертиксантоном (3), 3,8-дигідрокси-1-метил-9Н-ксантен-9-оном (4) та дантроном (5).

Противіробкову активність сполук 1–5 щодо чотирьох фітопатогенів досліджували за допомогою методу мікророзведення в бульйоні. Сполука 1 виявила очевидну противіробкову активність щодо *B. cinerea*, *F. graminearum* та *F. solani* з МІК 16, 4 та 8 мкг/мл відповідно. Тим часом, сполука 2 помірно стримувала ріст *F. graminearum*, *F. solani* та *P. oryzae* з МІК 16, 32 та 64 мкг/мл відповідно. Сполука 3 також виявила значну інгібуючу активність проти *F. graminearum* та *B. cinerea* з МІК 8 та 64 мкг/мл відповідно. Сполуки 4 та 5 виявили лише слабку противіробкову активність щодо *P. oryzae* з МІК 128 мкг/мл.

1.6 Терпени та терпеноїди

У дослідженні Yan et al. (2021) було отримано 18 сполук з ендоефітного гриба *Phyllosticta sp.* WGHL2.

Після ідентифікації було знайдено такі нові сполуки: Гінардіанон У (1), Гінардіанон V (2), Гінардіанон W (3), Гінардіанон X (4). Відомі сполуки з *Phyllosticta sp.* WGHL2 були ідентифіковані шляхом порівняння їхніх даних ЯМР з літературними джерелами, включаючи одинадцять меротерпенів: гінардіанон А (5), гінардіанон В (6), гінардіанон С (7), гінардіанон F (8), гінардіанон Н (9), гінардіанон К (10), гінардіанон М (11), гінардіанон G (12), гінардіанон К (13), гінардіанон I (14) [21] та гінардіанон L (15), а також три похідні діоксаланону: гіньярдіанон С (16), гінардіанонова кислота (17) та метиловий ефір фенгінардіанонової кислоти (18).

Ідентифікація сполук показала що сполуки 1-15 відносяться до метеотерпенів, сполуки 1-4 являються новими метеотерпенами, названі гінардіанонами, сполуки 16-18 відомі похідні діоксаланону.

Виділені сполуки були протестовані на противіробкову активність проти восьми видів рослинних патогенних грибів: *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *F. graminearum*, *B. cinerea*, *F. sulphureum*, *A. solani*, *F. moniliforme*, *G. graminis*, з

боскалідом як позитивним контролем. У результаті сполука 16 виявила широкий спектр протигрибкової активності проти *R. solani*, *F. graminearum*, *B. cinerea* при концентрації 50 мкг/мл зі швидкістю інгібування 48,43%, 40,98% та 49,53% відповідно, а інші сполуки показали слабе протигрибкове інгібування при 50 мкг/мл. Сполука 16 була потім обрана для проведення дослідження її захисної дії проти *B. cinerea in vivo* продемонструвала ефективність захисту 33,3% при концентрації 200 мкг/мл, що відповідає ефективності захисту 35,0% позитивного контролю (боскалід) при 100 мкг/мл. Крім того, сполука 16 могла ефективно інгібувати проростання спор *B. cinerea*, демонструючи швидкість інгібування 52,2% при 50 мкг/мл та 70,4% при 100 мкг/мл відповідно, порівняно з боскалідом (98,5%) при 50 мкг/мл.

У біологічних аналізах сполука 16 показала широку протигрибкову активність проти фітопатогенів, а також ефективне інгібування проростання спор *B. cinerea*. Ці знахідки сприяють структурному різноманіттю меротерпенів та підкреслюють сільськогосподарський потенціал метаболітів, виділених з роду *Phyllosticta*.

У дослідженні Hu et al. (2019) було показано 12 сесквітерпенів отриманих з ендofітного гриба *Trichoderma virens* FY06 виділеного з плоду *Litchi chinensis* Sonn. Усі речовини були ідентифіковані за допомогою комплексного спектроскопічного аналізу.

Результати аналізу речовин показали 4 нові речовини: моносесквітерпенова діетилгліокладова кислота (1), новий димерний сесквітерпен дивіренсол Н (9) та два нових тримерних сесквітерпени тривіренсоли А та В (11 та 12). Та 8 уже відомих: гліокладова кислота (2), 3-ацетилгліокладова кислота (3), ксиларинова кислота В (5), гідрогептелідова кислота (6), хлоргептелідова кислота (7) та дивіренсол D (10), сполуки 4 та 8 були відомими сесквітерпенами, які виявилися ідентичними двом описаним метаболітам, риномілізінам В та А.

Усі сполуки були оцінені за допомогою аналізу методом розведення в бульйоні, як описано раніше,^{16,18} на їхню інгібіторну активність проти фітопатогенних грибів *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *P. italicum* та *F. graminearum*, за винятком 7 через малу кількість. Як показано в Таблиці 4, всі вони

виявляли помірну та високу активність проти цих грибів, за винятком 6, який не показав жодного інгібування щодо *F. oxysporum* (МІК > 400 мкг/мл).

Сполуки 9 та 11, що належать до димерних та тримерних сесквітерпенів, відповідно, обидві показали сильну інгібіторну активність проти всіх патогенів, і їхня активність перевершувала активність позитивного контролю, тріадимефону. Крім того, 9 була більш активною, її активність щодо *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *P. italicum* та *F. graminearum* була в 4, 4, 1, 8 та 16 разів вищою, ніж у 11, і в 8, 8, 3.2, 8 та 24 рази вищою, ніж у тріадимефону.

Сполуки 1-6 є моносесквітерпенами. Особливо, єдина відмінність між 4 та 5 полягає в тому, що замісники при С-15 є С1 та ОСН₃, відповідно. Обидві вони виявляли сильну активність проти *F. oxysporum* з однаковими значеннями МІК, що й тріадимефон, та помірну активність проти *P. italicum* з однаковими значеннями МІК, що свідчить про те, що С1 та ОСН₃, заміщені при С-15, мали однаковий вплив на протигрибкові ефекти щодо *F. oxysporum* та *P. italicum*. Водночас, сполука 4 показала вищу активність, ніж тріадимефон, проти інших трьох грибів. Проте, сполука 5 показала лише еквівалентну активність щодо *C. gloeosporioides* та нижчу активність щодо *C. musae* та *F. graminearum*, порівняно з тріадимефоном. Це свідчить про те, що С1, заміщений при С-15, має кращий підсилюючий ефект на цю протигрибкову активність, ніж ОСН₃.

Сполуки 1 та 3 є 4,14-діацетильованим та 3-ацетильованим похідними 2, відповідно. Але не було виявлено очевидного зв'язку між структурою та активністю для цих трьох аналогів. Інгібіторна активність усіх їх щодо *F. graminearum*, 1 щодо *C. gloeosporioides* та *C. musae*, та 3 щодо *F. oxysporum* була сильнішою, ніж у тріадимефону. Водночас, активність 1 та 2 щодо *F. oxysporum*, та 2 та 3 щодо *C. gloeosporioides*, була рівною активності тріадимефону. Залишкова сполука 6 показала вибіркочу сильну активність проти *C. gloeosporioides* з тим же значенням МІК, що й тріадимефон.

Сполуки 8 та 10 належать до димерних сесквітерпенів. Обидві вони показали сильну активність проти *F. oxysporum* зі значеннями МІК, що дорівнювали тріадимефону. Сполука 10 також виявляла еквівалентну активність щодо *C.*

gloeosporioides, як і триадимефон, тоді як сполука 8 виявляла вищу активність як проти *C. gloeosporioides* (МІК 25 мкг/мл), так і проти *F. graminearum* (МІК 100 мкг/мл), ніж триадимефон (МІК 50 та 150 мкг/мл, відповідно).

Сполука 12 була ще одним тримерним сесквітерпеновим естером, крім 11. Вона показала сильну активність проти *C. gloeosporioides* (МІК = 50 мкг/мл) та *F. oxysporum* (МІК = 100 мкг/мл), що узгоджується з триадимефоном.

Результати виявили потенціал сесквітерпенів як фітопатогенних фунгіцидів. Цікаво, що всі сесквітерпени виявляли сильну протигрибкову активність проти *C. gloeosporioides*, що свідчить про те, що сесквітерпени, вироблені цим ендоефітним грибом зі свого господаря *L. chinensis*, можуть відігравати захисну роль, пригнічуючи деякі інвазивні фітопатогенні гриби, особливо *C. gloeosporioides*.

У дослідженні Yang et al. (2018) було виділено біологічно активні сполуки, а саме трихотекротоцини А-С (1-3) з культур ендоефітного гриба картоплі *T. crocicinigenum*. Рацемат (\pm)-3 був додатково розділений хіральним препаратом на (+)-3 та (-)-3, а їх абсолютні конфігурації були визначені за допомогою дифракції рентгенівських променів на монокристалі (-)-3. Було оцінено інгібіторну активність сполук 1, 2, (+)-3 та (-)-3 на збудників рослин (*P. infestans*, *A. solani*, *R. solani* та *F. oxysporum*).

Загальна структура 1 була спочатку встановлена за допомогою аналізу його 2D ЯМР спектрів, зокрема даних НМВС та ^1H - ^1H COSY. Сполука 1 була встановлена як тетрациклічний сесквітерпеноїд із замісником (2Z)-бутенової кислоти. Через жорстку кільцеву систему відносна конфігурація 1 була легко встановлена зі спектру ROESY.

Попередній аналіз даних сполуки 2 ^1H та ^{13}C ЯМР показав, що 2 також є (2Z)-бутенової кислоти замісником трихотеценовим сесквітерпеноїдом. Крім того, найбільш новою особливістю сполуки 2 було те, що новий ефірний зв'язок був присутній між С-6 та С-11, що підтверджується ключовою кореляцією НМВС Н-6 з δC 91.1 (с, С-11), а не між С-6 та С-12, як це спостерігалось у типових трихотеценах.

(\pm)-Трихотекротоцин С (3) був ідентифікований як меросесквітерпеноїдом.

Трихотекротоцини А (1) та В (2) були незвичайними трихотеценовими сесквітерпеноїдами. Було продемонстровано, що трихотецени походять від важливого попередника триходієну який утворював запропонований скелет А. Епоксидування подвійного зв'язку С-11/С-12 в А може генерувати пару С-11 епімерів. За кислих умов реакція -ену В (S-форма С-11) утворювала б новий вуглець-вуглецевий зв'язок між С-9 та С-12,²⁰ утворюючи нову сполуку 1. Продукт діепоксидування С (R-форма С-11) міг бути перетворений на 2 шляхом нуклеофільної атаки 7,8-епоксидного кільця іоном хлориду.

(±)-Трихотекротоцин С (3) також мав новий меротерпеноїдний скелет. Ключовим етапом його біосинтезу могла бути С-С циклізація між С-6 та С-10 (Схема 2), що свідчить про наявність спеціальної циклази в грибі.

Після біокерованого виділення було оцінено інгібіторну активність сполук 1-3 проти чотирьох збудників картоплі, включаючи *P. infestans* (фітофтороз), *A. solani* (рання гниль), *R. solani* (чорна парша) та *F. oxysporum* (в'янення). Сполуки 1, 2 та (±)-3 всі показали сильну інгібіторну активність щодо *A. solani* та *F. oxysporum*, тоді як (±)-3 слабо інгібував *P. infestans* та *R. solani*. (Таблиця 1.3).

Таблиця 1.3

Інгібіторна дія трихотекротоцинів А-С (1-3) на чотири фітопатогени (МІК, мкг/мл) (Yang et al. 2018)

Сполука	<i>P. infestans</i>	<i>A. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
1	-	16	-	32
2	-	32	-	16
(+)-3	128	8	128	16
(-)-3	64	8	32	16
Гігроміцин В*	8	<4	8	64

*Позитивний контроль; -: немає активності.

На завершення, загалом чотири нові сполуки були виявлені з ендofітного гриба картоплі *T. crotocinigenum*. Нові структури та їх біологічна активність можуть зробити їх кандидатами на антифітопатогенні агенти з перспективою застосування як фунгіциди в сільському господарстві.

У дослідженні Zhao et al. (2023) було виділено та оцінено 9 сполук з гриба *Psathyrella candolleana* який культивували разом з *Dioscorea opposite*. Загалом після спільного культивування було виділено сім нових гуанакастанових дитерпеноїдів: псяямін (1) як безпрецедентний 5/7/6/6/6/6/7/5-злитий восьмициклічний спіро-скелет як у рідких, так і в напівтвердих умовах, псатини А–С (4–6) з 5/7/6 трициклічним скелетом у рідкому середовищі, псатини D–E (7–8) як ті ж безпрецедентні скелети 5/6/7/6-злитих тетрациклічних або 6/7/6 трициклічних структур, і псатин F (9) з 5/7/5/6 тетрациклічним скелетом у напівтвердому середовищі. Структури були розшифровані за допомогою детальних спектроскопічних аналізів, а структури 1 і 7 були визначені за допомогою рентгенівської кристалографії монокристалів.

Дані сполуки було перевірено на протигрибкову активність та антифідантну активність. Результати показали що сполука 5 показала значну протигрибкову активність проти фітопатогену *F. incarnatum* з мінімальною інгібуючою концентрацією (MIC) 8 мкг/мл, а сполука 4 показала значну протигрибкову активність проти фітопатогену *Alternaria sp.* з MIC 2 мкг/мл.

Результати антифідантної активності показали, що сполуки 1 та 8 виявляли антифідантну активність проти шовкопрядів з FDI 50% при концентраціях 50 мкг/см². Сполуки 4, 5 та 7 показали слабку активність з FDI 26–31%. Позитивний контроль абамектин виявляв антифідантну активність проти шовкопрядів з FDI 85%.

Крім того було досліджено інгібування ацетилхолінестерази та цитотоксичність сполук 1, 2 та 4–6. 1 виявляв антиацетилхолінестеразну активність з IC₅₀ 37,3 мкМ та значну цитотоксичність проти HL-60, A-549, SMMC-7721, MCF-7 та SW480 з IC₅₀ 10,87 ± 0,24–15,96 ± 0,30 мкМ. Сполуки 2 та 4–6 не показали

очевидної активності. Тому 6/6-злите біциклічне кільце, утворене зв'язками ефірів C2'-C4 та C5-C14', було життєво важливим для відповідних активностей. Сполука 1 помітно індукувала апоптоз у HL-60 при 10, 20 мкМ у концентраційно-залежний спосіб.

1.7 Гетероциклічні сполуки

У дослідженні Khan et al. (2021) повідомляється про виділення та встановлення структури 14 вторинних метаболітів, включаючи три нових еремофіланових сесквітерпени фомадекаліни G, H та I (1–3) та два нових похідних бензолу мікродиплізени A та B (12 і 13), а також вісім відомих еремофіланових сесквітерпенів (4–11) та одне відоме похідне феніл-1-бутанону (14). Ці сполуки були отримані з ендоефітного гриба *Microdiplodia sp.* WGHS5.

Усі сполуки (1–14) були оцінені на їх біологічну активність, а саме протигрибкову, антибактеріальну та антипроліферативну.

В результаті сполука 4 показала інгібування проти *Botrytis cinerea* та *Fusarium graminearum* з коефіцієнтом інгібування 81,8% та 59,6% відповідно при концентрації 100 мкг/мл. Виділені сполуки також були протестовані на їх антипроліферативну активність проти клітин раку шлунка людини (BGC-823) при двох різних концентраціях (10 та 50 мкг/мл) методом МТТ, з 5-фторурацилом як позитивним контролем. У дозі 50 мкг/мл сполуки 3, 4 та 10 показали помірну активність зі значеннями інгібування 78,17, 76,63 та 73,16% відповідно, порівняно з клінічно використовуваним 5-фторурацилом (90,64%), тоді як сполуки 6, 7 та 9 були менш ефективними.

У дослідженні Ma et al. (2017) було показано новий ізохінолоновий алкалоїд, 5-гідрокси-8-метокси-4-фенілізохінолін-1(2H)-он (3), який був виділений з ендоефітного гриба роду *Penicillium sp.* R22, отриманого з *Nerium indicum*. А також 2 раніше відомі сполуки. 3-О-метилвіридикатин (1) та віридикатол (2).

Результат протигрибкової активності (Таблиця 1.4) показав, що сполуки 1, 2 та 3 виявляють сильну протигрибкову активність, особливо сполука 1 проти

Alternaria brassicae, *Alternaria alternata* та *Valsa mali* зі значенням МІС 31,2 мкг/мл, сполука 2 проти *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea* та *Valsa mali* зі значенням МІС 31,2 мкг/мл, сполука 3 проти *Alternaria brassicae*, *Alternaria alternata* та *Botrytis cinerea* зі значенням МІС 31,2 мкг/мл. Сполуки 1 і 3 мали слабку антибактеріальну активність, сполука 2 виявила помітну антибактеріальну активність проти *Staphylococcus aureus* зі значенням МІС 15,6 мкг/мл.

Таблиця 1.4.

Результати антимікробної активності всіх сполук. (Ma et al. 2017)

МІС (мкг/мл)														
Бактерії							Патогенні гриби							
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	62.5	125	62.5	125	62.5	125	62.5	31.2	31.2	31.2	62.5	250	31.2	62.5
2	31.2	31.2	15.6	31.2	12.5	62.5	62.5	31.2	31.2	31.2	62.5	31.2	31.2	62.5
3	125	125	125	62.5	125	125	125	31.2	31.2	31.2	31.2	250	62.5	62.5
Стрепт оміцин сульфа т	7.81	7.81	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Пеніци лін натрій	–	–	7.81	7.81	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Карбен дазим	–	–	–	–	–	–	–	62.5	31.2	31.2	31.2	62.5	31.2	62.5

Примітка: A: *E. coli*, B: *P. aeruginosa*, C: *S. aureus*, D: *S. lactis*, E: *F. graminearum*, F: *C. gloeosporioides*, G: *S. turcica*, H: *A. alternata*, I: *A. brassicae*, J: *S. sclerotiorum*, K: *B. cinerea*, L: *P. capsici*, M: *V. mali*, N: *P. anthracnose*.

"–" означає, що експеримент не проводився.

У дослідженні Tanapichatsakul et al. (2020) було продемонстровано виділення, очищення та перевірка протигрибкової активності проти рослинно-патогенного гриба *Athelia rolfsii*, 8-метоксинафтаден-1-олу, виділеного з ендofітного гриба *Diatrype palmicola* MFLUCC 17-0313.

Перед тим, як біоактивну сполуку екстрагували за допомогою різних органічних розчинників. Неочищені екстракти перевіряли на їх протигрибкову активність проти збудника *A. rolfsii*. Лише сирий гексановий екстракт міцелію грибів виявляв значну протигрибкову активність із інгібуванням 64,71%, тоді як амфотерицин В (приготований у концентрації 5 мг/мл) продемонстрував відсоток інгібування 67,53%. Жодної протигрибкової активності проти *A. rolfsii* не було виявлено в інших протестованих бульйонах або екстрактах міцелію.

Для очищення неочищеного гексановий екстракт міцелію грибів фракціонували для отримання екстракту, що містить біоактивну сполуку. Результати методу дискової дифузії показали, що фракція F19 містить біоактивну сполуку з відсотком інгібування $76,42 \pm 0,04\%$. Значення МІК виділеної сполуки 8-метоксинафтаден-1-олу. Результати виявили помірну антимікробну активність сполуки проти *A. rolfsii* з МІК 250 мкг/мл.

У цьому дослідженні 8-метоксинафтаден-1-ол, який показав помірну протигрибкову активність проти *A. rolfsii*, був додатково перевірений на його фітотоксичну дію на листя рослин. Використовуючи тести листового диска та аналізи поглинання, спостерігали розвиток симптомів після обробок 8-метоксинафтаден-1-олом у різних концентраціях і порівнювали їх із симптомами, отриманими від гліфосату у тих самих концентраціях. У контрольних дослідах використовували дистильовану воду та суміш 0,25% твіну 20 з 4% метанолу. Згідно з результатами, 8-метоксинафтаден-1-ол і негативні контролю не виявляли візуального впливу на листя, тоді як гліфосат позитивного контролю виявляв фітотоксичну дію на листя *S. lycopersicum* у всіх концентраціях.

У дослідженні Harwooko et al. (2021) було виділено та ідентифіковано чотири дитіодикетопіперазини з двох ендofітів. Серед них нове похідне ЕТП (1) разом із претриходермамідом А (2) було виділено з ендofітного гриба *T. harzianum*, а два

відомих біоактивних вторинних метаболіти, епікоразин А (3) та *ent*-епікоцин G (4), були отримані з культури *E. nigrum*. Для отримання цих сполук екстракти EtOAc вищезгаданих грибів розділяли проти н-гексану та 10% MeOH, а фази MeOH додатково розділяли за допомогою ВЕРХ, з подальшою гель-фільтраційною хроматографією на Sephadex LH-20. Як заключний етап очищення, для отримання сполук 1-4 застосовували напівпрепаративну ВЕРХ.

DKP 1-4 були піддані аналізам на протигрибкову та антибактеріальну активність проти фітопатогенного гриба *Ustilago maydis* та панелі патогенних для людини бактерій. Претриходермамід А (2) вибірково інгібував ріст *U. maydis* зі значенням МІС 1 мг/мл порівняно з позитивними контролями ністатином (МІС ¼ 0,02 мг/мл) та нурсеотрицином (МІС ¼ 2 мг/мл). Остання сполука широко використовується як селективний маркер для створення трансгенних штамів грибів. Лише претриходермамід А (2) та епікоразин А (3) виявили потенційні інгібуючі ефекти проти *U. maydis*, демонструючи зони інгібування 15 та 10 мм при 100 мкг/диск, відповідно. Тим часом, ністатин 10 мг/мл та нурсеотрицин 20 мг/мл показали діаметри інгібування 29 та 14 мм, відповідно.

У дослідженні Zhao et al. (2019) показано 12 сполук виділених з ендofітного гриба *Saccharicola bicolor*. Дані сполуки були ідентифіковані як галогенові циклопентени під назвою Біколорин А-І.

Протигрибкова активність сполук 1-12 проти п'яти фітопатогенних грибів (*Uromyces viciae-fabae*, *Pythium dissimile*, *Gibberella zeaе*, *Aspergillus niger* та *Sclerotinia sclerotiorum*). Загалом, бромовані циклопентенони виявляли кращу протигрибкову активність, ніж хлоровані циклопентенони. Біколорини В та D (2 та 5) виявляли сильну протигрибкову активність проти *P. dissimile* зі значеннями МІС 6,2 та 8,5 мкг/мл, відповідно, порівняно з циклогексимідом (МІС 8,6 мкг/мл). Сполука 5 показала найпотужніший інгібуючий ефект проти *S. sclerotiorum* (МІС: 9,8 мкг/мл) порівняно з циклогексимідом (МІС: 11,6 мкг/мл). (таблиця 1.5)

Протигрибкова активність сполук 1-12 (МІК, мкг/мл) (Zhao et al. 2019)

Сполука	<i>Uromyces viciae-fabae</i>	<i>Pythium dissimile</i>	<i>Gibberella zeae</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	МІК	інгібування (%)	МІК	інгібування (%)	МІК
1	42	92	10.2	90	36
2	48	91	6.2	92	10.5
3	>100	60	>100	94	>100
4	25	94	85	91	75
5	65	91	8.5	90	50
6	>100	>100	>100	>100	>100
7	88	90	46	92	24
8	36	92	9.8	92	28
9	>100	86	>100	90	>100
10	>100	52	>100	91	>100
11	>100	64	72	90	86
12	>100	48	>100	90	82
Циклогексимід	12.4	93	8.6	91	9.5

Сполука 5 показала найпотужніший інгібуючий ефект проти *S. sclerotiorum* (МІК: 9,8 мкг/мл). Тому для подальшої оцінки *in vivo* ефекту 5 проти RSR було використано тест на листі капусти, зараженому *S. sclerotiorum*. Результат показав, що обробка сполукою 5 у концентрації 500 мкг/мл мала захисну ефективність 44,2% проти RSR порівняно із захисною ефективністю 65,9% позитивного контролю карбендазиму в концентрації 500 мкг/мл, що свідчить про те, що вона може мати потенціал для розробки як кандидат для запобігання RSR.

У дослідженні Yang et al. (2019) було виділено шість метаболітів (1–6), включаючи 1 нове похідне фузаринової кислоти, позначене як атрансфузарин (1), і 5 відомих сполук, (3R, 6R) -3-бензил-6-ізопропіл-4-метилморфолін-2,5-діон (2), даукотерол (3), аденозин (4), цереброзид В (5) і 2,3-дигідроксипропіл (Z,Z)-

9,12-октадекадієнат (6) виділено з твердої культури ендofіту *Alternaria atrans* MP-7, асоційованого з лікарською рослиною *Psidium guajava*.

Усі виділені сполуки (1–6) перевіряли на їх токсичну та протигрибкову активність. Лише 2 виявив токсичну активність проти *Artemia salina* із середнім значенням летальної концентрації (LC₅₀) 25,5 мкг/мл, тоді як інші не виявили активності. Крім того, протигрибкову активність 1–6 також перевіряли проти кількох фітопатогенних грибів, включаючи *B. cinerea*, *A. solani*, *C. gloeosporioides* і *P. grisea* (Cooke) Sacc. Сполука 2 продемонструвала чудову протигрибкову активність проти *A. solani*, *C. gloeosporioides* і *P. grisea* з мінімальними інгібуючими концентраціями (МІК) усіх 6,25 мкМ, які були набагато кращими, ніж у позитивного контролю, карбендазиму та фузаринової кислоти. Більше того, (+)-атрансфузарин (1) виявляв слабку активність проти *B. cinerea* та *A. solani* (МІК = 50 мкМ), але жодна з решти сполук не виявилася активною проти досліджуваних патогенів (МІК >100 мкМ).

Як основний компонент, сполука 2 показала чудову протигрибкову активність проти всіх 4 досліджуваних фітопатогенних грибів, включаючи *B. cinerea*, *A. solani*, *C. gloeosporioides* і *P. grisea*, кращу, ніж у звичайного фунгіциду широкого спектру дії карбендазиму. У результаті його можна використовувати як новий природний ресурс протигрибкового засобу.

У дослідженні Lou et al. (2016) було продемонстровано що 9-метиловий ефір альтернариолу (АМЕ) проявляв антибактеріальну активність щодо шести різних штамів бактерій зі значеннями ІС 50, що варіюються від 16,00 до 38,27 мкг/мл. АМЕ продемонстрував сильнішу антибактеріальну дію проти *R. solanacearum*, ніж звичайний антибіотик стрептоміцину сульфат. Цей результат вказує на те, що штам *R. solanacearum* може бути стійким до стрептоміцину. Значення ІС 50 АМЕ проти проростання спор *M. oryzae* становило 87,18 мкг/мл. АМЕ також продемонстрував антинематодну активність проти *C. elegans* і *B. xylophilus* зі значеннями ІС 50 74,62 мкг/мл і 98,17 мкг/мл відповідно. АМЕ виявляв сильну протигрибкову активність проти *Microbotryum violaceum*, індукував мітохондріальний апоптоз у клітинах карциноми товстої кишки людини і

демонстрував розриви ланцюгів ДНК , мікроядра та генні мутації в різних культивованих клітинах ссавців. Результати цієї роботи додатково підтвердили антимікробну активність АМЕ. Проте механізми дії АМЕ потребують подальшого вивчення.

1.8 Кислоти та їх похідні

У статті Morales-Sánchez et al. (2021) показано метаболіти які виділяються грибом *Aspergillus* sp. SPH2 який був виділений із частин стебла ендемічної рослини *Bethencourtia palmensis*.

Загалом було ідентифіковано 3 сполуки. Меллеїн (1); сполуки 2 і 3 , раніше виділені як природні продукти з *Aspergillus ochraceus*, були ідентифіковані як неоаспергілова та неогідроксіаспергілова кислоти.

Результати протигрибкової активності показали що Сполука 2 (неоаспергілова кислота) була ефективним протигрибковим засобом проти *A. alternata*, *B. cinerea* та *F. oxysporum*, відповідно, за якою слідував меллеїн (1). табл. 1.8

Меллеїн (1), виділений з іксодицидної фракції, продемонстрував сильну дію проти личинок *H. lusitanicum* ($LD_{50} = 0,48$ мкг/мг, 0,44–0,51 95% довірчі межі), будучи в 10 разів ефективнішим за тимол ($LD_{50} = 2,94$ мкг/мг, 2,08–3,54 95% довірчі межі).

Таблиця 1.6.

Протигрибкові ефекти (пригнічення росту міцелію) сполук 1 – 3

З'єднання	Ефективні дози (мг/мл) ^a	Пригнічення росту міцелію		
		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>
1	EC 50	0,34 (0,27–0,43)	0,44 (0,34–0,57)	0,29 (0,23–0,37)
2	EC 50	0,07 (0,04–0,10)	0,01 (0,00–0,02)	0,04 (0,03–0,04)
3	EC 50	>0,5	0,20 (0,17–0,25)	>0,5

Примітка.^a Ефективні дози, розраховані шляхом лінійної регресії

У даній статті було вперше показано сильну іксодицидну дію малеїну (1) проти личинок твердого кліща *Hyalomma lusitanicum*, також неоаспергілова кислота (2) продемонструвала потужну протигрибкову дію проти *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* та *Fusarium oxysporum*. Сполука 2 з'явилася під час експоненціальної фази росту грибів, тоді як неогідроксіаспергілова кислота 3 з'явилася під час стаціонарної фази, що свідчить про те, що 2 є біосинтетичним попередником 3.

Види *Aspergillus* секції *Circumdati* виробляють охратоксин А, нефротоксичний мікотоксин але під час експериментів охратоксин А не було виявлено. Таким чином, грибовий ендофіт SPH2 може бути біотехнологічним інструментом для виробництва іксодицидних екстрактів, багатих мелеїном.

У дослідженні Wu et al. (2022) було отримано новий похідний глобосцинової кислоти, апертубін А (1), разом із чотирма відомими сполуками (панаксітріол (2); карвіолін (3); асперікова кислота (4) та асперазин (5)).

Усі сполуки були досліджені на протигрибкову активність проти фітопатогенів *A. tubingensis*, *Nigrospora oryzae* та *Phoma herbarum*. Аутоотоксична сполука 1 з *A. tubingensis* S1120 та 2 з червоного женьшеню показали селективне інгібування проти тестованого гриба *A. tubingensis*, зі значеннями МІС 8 мкг/мл. Екстракти кокультури та монокультури показали протигрибкову активність проти всіх тестованих грибів (штами *A. tubingensis*, *N. oryzae* та *P. herbarum*) зі значеннями МІС 4-64 мкг/мл. Протигрибкова активність екстракту кокультури проти *P. herbarum* була вищою, ніж у монокультури. Результати показали, що лікарська рослина та ендофіт мали синергічний ефект на стійкість рослин до хвороб.

Підсумовуючи, один новий похідний глобосцинової кислоти, названий апертубін А (1), разом із чотирма відомими метаболітами (2-5), були виділені з *Aspergillus tubingensis* S1120, культивованого в червоному женьшені. Екстракт кокультури та сполуки 2 і 4 показали значну антифідантну активність проти шовкопряда. Сполуки 3 і 5 продемонстрували слабку атрактантну активність. Оцінка протигрибкової біологічної активності показала, що екстракти проявляли

протигрибкову активність проти всіх тестованих грибів. Екстракт кокультури показав вищу антифідантну та протигрибкову активність проти *P. herbarum*, ніж монокультура. Сполуки 1 і 4 з *A. tubingensis* S1120 мали аутоксичність, а сполука 2 з червоного женьшеню мала селективну протигрибкову активність. Отже, лікарська рослина та ендоефіт мали синергічний ефект на стійкість рослин до хвороб.

У статті Elias et al. (2018) було виділено та оцінено 2 сполуки які продукуються штамми ендоефітних грибів (*Xylaria* sp. 214 та *Xylaria* sp. 249). Після культивування, екстракції та хроматографії було ідентифіковано 2 активні сполуки d1b4 та d3c. Які далі були ідентифіковані за допомогою аналізу спектроскопічних даних (МС і ЯМР) і порівняні зі сполуками в базі даних Словника природних продуктів. як піліформієва кислота та цитохалазин D.

Результати дослідження даних сполук показали що виділені сполуки piliformic acid і cytochalasin D мають фунгістатичну активність проти *C. gloeosporioides*. Піліформова кислота пригнічувала 51,33% росту міцелію *C. gloeosporioides* методом дискової дифузії, а цитохалазин D – 38,76%, обидва в концентрації 500 мкг диск⁻¹. У аналізі мікророзведення усі сполуки показали протигрибкову активність. Каптан і дифенконазол були включені як позитивні контролю (MIC 16,63 і 0,02 мкмоль мл⁻¹ відповідно). Піліформієва кислота та цитохалазин D були активними проти *C. gloeosporioides* з MIC 2,92 та 2,46 мкмоль мл⁻¹ відповідно. Обидва мають вищу MIC, ніж активний інгредієнт дифенконазол, але нижчу, ніж каптан. Комерційні фунгіциди були обрані тому, що вони належать до різних хімічних класів і мають різні механізми дії.

Сполуки, виділені в цій роботі, вперше повідомляються як протигрибкові агенти проти *C. gloeosporioides*, відповідного патогена рослин у всьому світі. Однак необхідно провести тести на токсичність і біотести in vivo.

1.9 Леткі органічні сполуки (ЛОС)

Летючі органічні сполуки (ЛОС) — це невеликі органічні молекули, які легко випаровуються, і мають низку біологічних функцій, включаючи антимікробну активність. ЛОС виконують подвійну екологічну роль; вони допомагають у захисті

рослини-господаря від патогенів і сприяють пристосованості гриба до рослинного середовища

У дослідженні Yang et al. (2021) повідомляється про 17 сполук виділених з *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (ЛОС), але оскільки виділення за допомогою твердофазні мікроекстракції використовували різні покриття які мають різні характеристики поглинання тому серед 17 ідентифікованих ЛОС сполук лише три (2-метокси-4-вінілфенол, бензол, 2М4V; 3,4-диметоксистирол, 34D; і каріофілен, β -С) були доступні від компаній-реагентів. Ці три ЛОС були відібрані для подальшого тестування протигрибкової активності проти ФОК. Усі три ЛОС пригнічували ріст міцелію ФОС у концентрації 10 мкл/планшет. 2М4V і 34D показали більш сильну протигрибкову активність, ніж β -С при тій же концентрації. Також було протестувано діапазон концентрацій, щоб визначити значення EC50 вибраних ЛОС проти ФОС. Результати показали, що інгібіторна активність ЛОС зростала з концентрацією. Вимірювали діаметр колонії та розраховували EC50 шляхом статистичного аналізу. Оскільки об'єм вільного простору планшетів становив 90 мл, автори перетворили одиницю мкл/планшет у мкл/л. Значення EC50 для 2М4V, 34D і β -С проти ЛОС були 36, 60 і 2900 мкл/л відповідно.

Подвійне флуоресцентне фарбування FDA/PI використовувалося для аналізу живих/мертвих клітин у поєднанні з флуоресцентною мікроскопією. FDA є зондом активності ферменту, який розпізнається неспецифічними естеразами; це розпізнавання вивільняє зелену флуоресценцію, коли воно потрапляє в живі клітини, таким чином слугуючи індикатором живих клітин. PI флуоресціює червоним у відповідь на пошкодження мембрани і використовується як індикатор мертвих клітин. Як показано на (рисунку 1.9.1) , необроблені гіфи були окреслені зеленою флуоресценцією (живі клітини), і спостерігалось кілька мертвих клітин (червона флуоресценція). Навпаки, після обробки концентрацією EC50 2М4V або 34D пропорції червоно-флуоресцентних клітин гіф зросли, а зелена флуоресценція стала розмитою. Навпаки, більшість гіф, оброблених β -С, показали зелену флуоресценцію з невеликою кількістю мертвих клітин, як і для необроблених гіф. У поєднанні з результатами TEM ці спостереження вказують на те, що 2М4V і 34D

руйнують клітинні мембрани гіф, тим самим пригнічуючи ріст ЛОС, тоді як β -С інгібує ЛОС іншим шляхом.

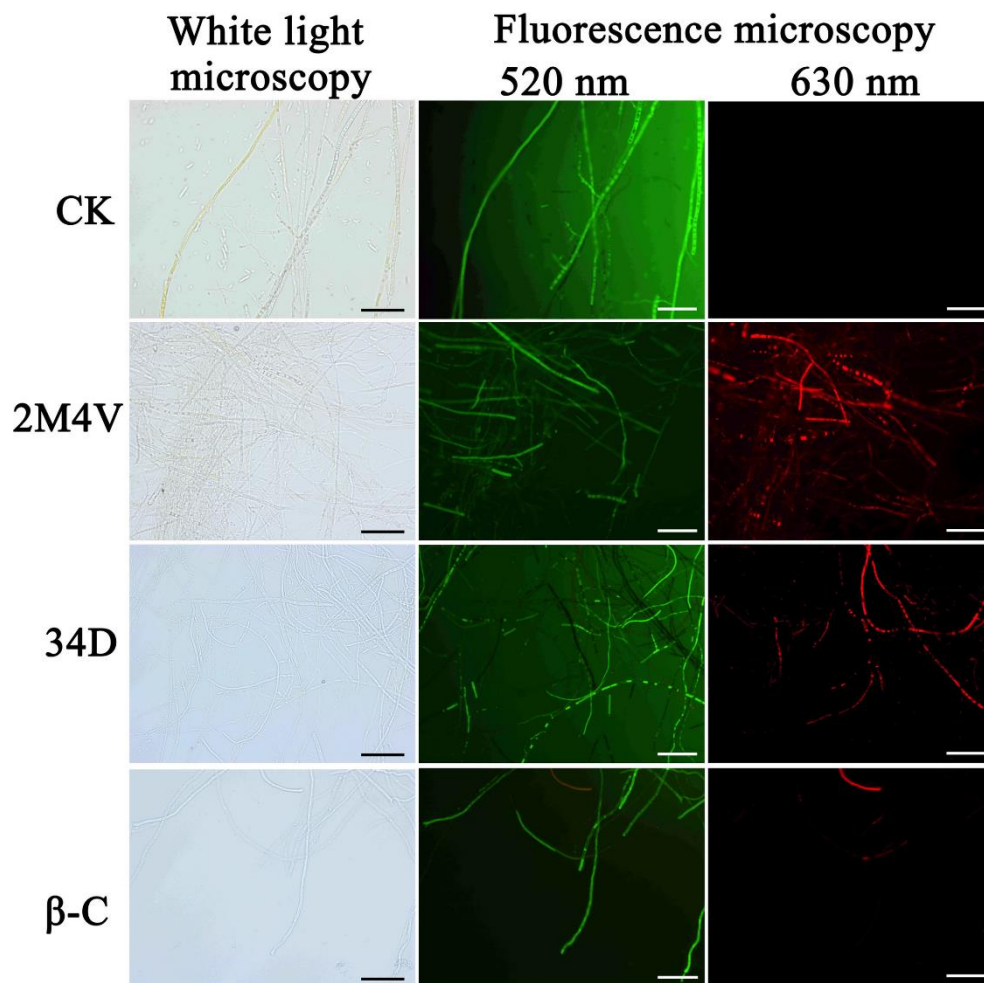


Рисунок 1.9.1. Виявлення життєздатності FOC на основі фарбування FDA/PI після обробки вибраними ЛОС. Живі грибкові клітини з непошкодженими мембранами демонструють зелену флуоресценцію; клітини грибів з пошкодженими мембранами показали червону флуоресценцію. Метанол служив контролем (СК). Плитка: 20 мкм. 2M4V: 2-метокси-4-вінілфенол; 34D: 3,4-диметоксистирол; β -С: каріофілен. (Yang et al. 2021)

Було продемонстровано що 34D та 2M4V викликають мікро- та ультраструктурні зміни гіф ЛОС. Гіфи ЛОС, оброблені 2M4V і 34D, показали зовсім інші та неправильні структури без інтактних плазматичних мембран, змащеної цитоплазми та витоку вмісту клітин. Крім того, клітинні стінки гіф, оброблених 34D, були в два-три рази товщі, ніж в інших групах. (Рисунок 1.9.2).

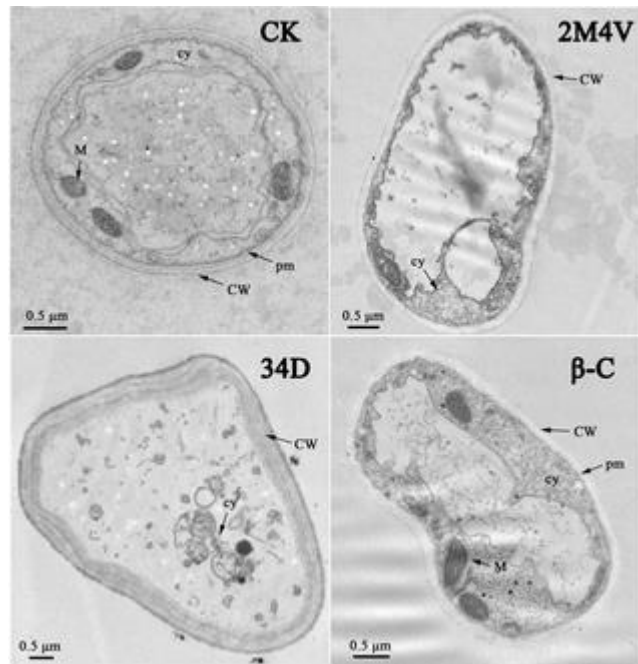


Рисунок 1.9.2. Ультраструктурні ефекти концентрації EC50 вибраних ЛОС на ФОК, визначені за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). CW, клітинна стінка; cy, цитоплазма; pm, плазматична мембрана; М, мітохондрія. Штрих: 0,5 мкм. 2M4V: 2-метокси-4-вінілфенол; 34D: 3,4-диметоксистиrol; β-С: каріофілен. (Yang et al. 2021)

Крім того було показано що після проведення ПЛР тесту оброблених 34D, ЛОС показав, що рівень експресії генів хітинсинтази ChsVb (FOIG_06735) і класу V (FOIG_06738) значно підвищився після обробки.

Також щоб визначити участь трьох вибраних ЛОС у біосинтезі фузаринової кислоти в ЛОС, дослідники інкубували ЛОС із сумішшю стерилізованих зерен пшениці/овеса/кукурудзи (1:1:1) з ЛОС або без них у сублетальних концентраціях (2M4V і 34D: 1 мкл/чашка, β-С: 40 мкл/чашка). Після 23 днів інкубації ЛОС значно зменшили накопичення фузаринової кислоти в ядрах. У *Fusarium* 1 генний кластер був ідентифікований як біосинтетичний кластер генів фузаринової кислоти. Вчені проаналізували рівні експресії двох генів цього кластера FUB2 і FUB5. 2M4V, 34D і β-С вивели експресії FUB2 і FUB5. Ці результати свідчать про те, що при сублетальних концентраціях (2M4V і 34D: 1 мкл/планшет, β-С: 40 мкл/планшет) три вибрані ЛОС можуть негативно впливати на біосинтез фузаринової кислоти.

Підсумовуючи вище згадане можна прийти висновку що 2-метокси-4-вінілфенол, 3,4-диметоксистиrol і каріофілен показали протигрибкову активність проти *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (ЛОС) з 50% ефективними концентраціями

36, 60 і 2900 мкл/л вільного простору, відповідно. Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) і подвійне флуоресцентне фарбування показали, що 2-метокси-4-вінілфенол і 3,4-диметоксистиrol пошкоджують плазматичні мембрани, що призводить до загибелі клітин. 3,4-диметоксистиrol також міг індукувати експресію генів хітинсинтази та змінювати клітинні стінки гіф ЛОС. Фарбування дихлор-дигідро-флуоресцеїн-діацетатом вказує на індуковане каріофіленом накопичення активних форм кисню (АФК) у гіфах ЛОС. Усі три цільові ЛОС можуть зменшувати біосинтез фузарінової кислоти при сублетальній концентрації.

Дані ЛОС можуть прийти на заміну бромистому метилу який був ефективним фумігантом проти хвороботворних мікроорганізмів, що передаються через ґрунт, і широко використовувався в усьому світі для багатьох культур до 2015 року, коли його було припинено, оскільки він руйнує озоновий шар. У цьому дослідженні було ідентифіковано три протигрибкові ЛОС з HND5. Два з них мають високу анти-ЛОС активність і демонструють потенціал як альтернативи бромистому метилу. Було також з'ясовано механізми протигрибкової активності цих ЛОС проти ФОК. Отримані дані свідчать про те, що HND5 та ЛОС, які він створює, є перспективними для використання як агентів біологічного контролю або фумігантів проти ФОС у системах сільськогосподарського виробництва.

У статті Khruengsaï et al. (2021) було отримано та оцінено Газохромато-мас-спектрометричний (ГХ-МС) аналіз летких органічних сполук, утворених ендofітним ізолятом ВР11, призвів до ідентифікації 60 сполук. Ці ЛОС перераховані в таблиці 1.7. У профілі летких речовин ендofітного ізоляту ВР11 переважала присутність вуглеводнів (35,0%), за якими йшли монотерпенові вуглеводні (39,4%) і сесквітерпенові вуглеводні (37,3%). Основними леткими сполуками, які утворює ендofітний ізолят ВР11, були елеміцин (23,8%), бензальдегід диметилацеталь (8,5%), етилсорбат (6,8%), метилгеранат (6,5%), транс-сабіненгідрат (5,4%) і 3,5-диметил-4-гептанон (5,1%). Крім того, ЛОС, отримані з ендofітного ізоляту ВР11, мали солодкий і фруктовий запах.

**Ідентифіковані леткі сполуки з ендofітного гриба
D. eschscholtzii MFLUCC 19-0493, проаналізовані методом SPME-GC-MS.
(Khruengsai et al. 2021)**

Сполуки	Індекс збереження	% площі	З'єднання	Індекс збереження	% площі
3,5-диметил-4-гептанон	973	45662,0	2-адамтанон	1310	1.0
октен-3-ол	974	0,1	метилгеранат	1322	45783
2-октанон	988	0,3	анісилформіат	1330	1.0
2,4,5-триметил-тіазол	994	45778,0	4-гідрокси-бензолметанол	1335	0,2
2-етил-3-метил-піразин	1002	45658,0	сильфінен	1345	0,4
ізо-сильвестрен	1007	3.0	9-деценова кислота	1359	0,5
2-ацетил-тіазол	1014	45750,0	пара-метиланізат	1371	45748
сильвестрен	1025	0,7	туїнова кислота	1382	1.0
цис-арбускулон	1046	0,2	альфа-дупрезіанен	1387	45658
мета-толуальдегід	1069	0,2	альфа-туяпліцин	1410	0,1
2E,4E-гексадієнол ацетат	1081	3.0	етил-антранілат	1414	0,3
дітилацеталь-2Z-гексенал	1085	45660,0	бета-дупрезіанен	1422	0,2
2-ацетил тіофен	1086	0,7	диктамнол	1428	0,1
етилсорбат	1092	45875,0	пінонова кислота	1440	0,3
метилтіопіразин	1093	0,6	презизасн	1444	0,3
транс-сабінен гідрат	1098	45752,0	альфа-акорадієн	1464	0,5
бензальдегід диметилацеталь	1109	45785,0	гамма-мууролєн	1478	0,3
2-етилгексанова кислота	1119	0,5	ізодавцен	1500	0,2
транс-пінєнгідрат	1119	2.0	альфа-туяпліцінол	1509	0,7
альфа-камфолєнал	1122	0,3	транс-каламенєн	1521	0,2
стємон	1124	0,2	зонарєне	1528	0,4
Z-міроксид	1131	0,5	цис-каламенєн	1528	0,1
ізо-3-туянол	1134	45901,0	єлеміцин	1555	45892
2-ацетил-3-етил-піразин	1156	0,3	E-неролідол	1561	0,3
fragranol	1214	0,6	Z-азарон	1616	0,5
нор-даванон	1228	0,4	єпі-цєдрол	1618	0,1
єтиловий єфір бензолу оцтової кислоти	1243	0,9	5-цєдранон	1628	0,1
Z-анєтол	1249	45809,0	cedr-8(15)-єn-10-ol	1650	0,1
метилнеролат	1280	45870,0	5-ізо-цєдранол	1672	0,2
2E,6Z-нонадієнолу ацетат	1303	0,6	5-нео-цєдранол	1684	0,6

Примітки: Індекс утримання визначали за допомогою гомологічного ряду n-алканів. % площі піку розраховували за допомогою методу нормалізації без коригувальних коефіцієнтів.

6 найпоширеніших ЛОС виділених в цій роботі (3-5-диметил-4-гептанон(5,1%); етилсорбіт (6,8%); бензальдегід диметилацетат (8,5%); транс-сабінен гідрат (5,4%); елеміцин (23,8%).) Результати показують, що ці вибрані синтетичні ЛОС мали різний ступінь протигрибкової активності. Для кожної досліджуваної леткої сполуки найвищий відсоток інгібування був виявлений у день 1 і продовжував знижуватися в наступні дні ($p < 0,05$). Елеміцин продемонстрував найвищий відсоток інгібування протягом періоду спостереження, охоплюючи діапазон від 15,3% до 76,6% ($p < 0,05$). Етилсорбат показав слабку протигрибкову активність проти *S. acutatum*. Крім того, ЛОС, отримані з ендofітного ізоляту ВР11, мали солодкий і фруктовий запах.

Було виявлено позитивний зв'язок між кількістю використаних синтетичних ЛОС (на мл вільного простору) та відсотками інгібування. У випадку елеміцину кінцевий нахил лінійної регресії на 1 день інкубаційного періоду становив 22,1. Протягом періоду спостереження нахили елеміцину були в діапазоні від 22,1 до -24,7. Крім того, нахили лінійної регресії інших сполук (у день 1) також були позитивними зі значеннями 22,5, 18,0, 13,4, 22,3 і 8,9 для 3,5-диметил-4-гептанону, етилсорбату, диметилацеталу бензальдегіду, транссабіненгідрату та метилгеранату відповідно (дані не показані).

Також було оцінено активність елеміцину *in vivo* проти інфекцій *S. acutatum* на плодах полуниці. Результати показали менше фізичне пошкодження на плодах, інокульованих *S. acutatum* і оброблених елеміцином, ніж на зразках позитивного контролю. Інгібування, захворюваність і тяжкість захворювання у відсотках цього лікування становили 70,9%, 21,5% і 15,9% відповідно. Плоди полуниці після обробки елеміцином показані на малюнку 1.9.3.

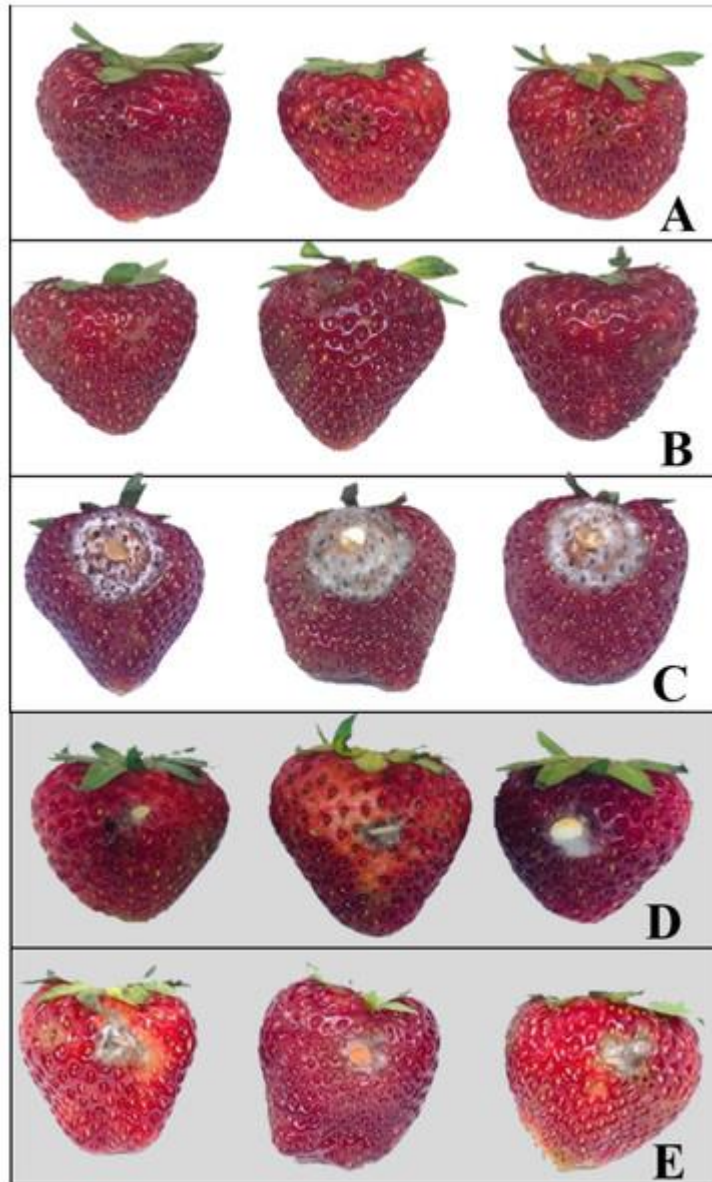


Рисунок 1.9.3. Приклади полуниці, отримані в результаті різних експериментів *in vivo*; негативний контроль (А), контроль (В), позитивний контроль (С), ендofітний ізолят ВР11 (D) і елеміцин (Е). Кожну обробку проводили в трьох повторах ($n = 15$) і повторювали тричі (загальна кількість $n = 135$). (Khruengsai et al. 2021)

З огляду на скринінговий аналіз, елеміцин, ймовірно, є ключовим ЛОС, який забезпечує більшу частину протигрибкового ефекту. Загалом, леткі сполуки, які виробляє *D. eschscholtzii* MFLUCC 19-0493, можна використовувати як біофумігаційні агенти для боротьби з післязбиральними інфекціями *S. acutatum*. Використання цих ЛОС для фумігації свіжої полуниці є відносно недорогим. Вони можуть використовуватися місцевими фермерами та можуть замінити синтетичні

хімічні речовини або токсичні гази, які зараз використовуються як фуміганти для боротьби з післяжнивним антракнозом, викликаним *S. acutatum*.

У дослідженні Khruengsai et al. (2021) було оцінено ЛОС отримані з 2 штамів *T. afroharzianum* MFLUCC19-0090 та *T. afroharzianum* MFLUCC19-0091. Більша кількість летких сполук (67 сполук, що становить 99,79% від загальної кількості) була виявлена у штамі *T. afroharzianum* MFLUCC19-0090 порівняно з тими, що виробляються штамом *T. afroharzianum* MFLUCC19-0091 (59 сполук, що становить 99,77% від загальної кількості). Фенілетиловий спирт (24,43%), додецен (9,81%) і 2-метил-4-гептанон (8,92%) були виявлені як основні сполуки в леткому профілі *T. afroharzianum* MFLUCC19-0090. Тим часом фенілетиловий спирт (21,22%), бензальдегід (19,09%) і Е-анетол (11,41%) були виявлені у великих кількостях у леткому профілі *T. afroharzianum* MFLUCC19-0091.

Результати фумігаційної активності ЛОС показали що всі леткі сполуки показали певний ступінь протигрибкової активності. Найвищу протигрибкову активність спостерігали в 1-й день, і вона значно знижувалася в наступні дні. Фенілетиловий спирт був найсильнішим інгібітором для обох патогенів *Fusarium*. Фенілетиловий спирт показав 70,54% і 76,31% інгібування росту міцелію (при оціненій концентрації 1,36 мкл мл⁻¹ у просторі над пластиною) для *F. oxysporum* і *F. proliferatum*, відповідно. 2-Метил-4-гептанон, бензальдегід і додекан показали значно нижчу протигрибкову активність проти *F. oxysporum* і *F. proliferatum*, ніж фенілетиловий спирт. Були виявлені позитивні кореляції між оціненими концентраціями синтетичної сполуки та відсотками інгібування. Нахили фенілетилового спирту, що спостерігалися в 1-й день періоду інкубації, становили 23,61 (для *F. oxysporum*) і 21,04 (для *F. proliferatum*).

У дослідженні Pena et al. (2019) було досліджено ЛОС які утворюють 2 ізоляти *Muscodor* sp. LGMF1255 і LGMF1256. У *M. brasiliensis* LGMF1256 було виявлено 14 ЛОС, а *Muscodor* sp LGMF1255 аналіз дав загалом 12 хімічних сполук. Усі сполуки, присутні в контролі, не враховувалися, як і силільовані сполуки, що належали до колонки обладнання. Обидва штами продукували 10 спільних сполук. Сполуками, що виробляються обома штамми, були октилформіат, 2-

фенілетилацетат, 2-ундеканон, β -елемен, *n*-тетрадекан, α -гуаєн, β -селінен, ацифілен, α -булнесен і гостол. Активна сполука, фенілетиловий спирт, виявлена в *M. brasiliensis* LGMF1256, пригнічує ріст грамнегативних мікроорганізмів, перешкоджаючи синтезу ДНК, стабільності клітинних мембран, і може бути пов'язана з інгібуванням *P. digitatum*. Найбільш репрезентативним ЛОС, утвореним обома ізолятами, був гостол, виділений спочатку з *Pogostemon cablin*, рослини з родини *Lamiaceae*, сполуки, яка вже використовується як антимікробний засіб Swamy and Sinniah (2015).

Виробництво ЛОС з протигрибковою активністю проти *Penicillium digitatum* (LGMF1507) штамами LGMF1255 і LGMF1256 оцінювали головним чином у середовищах PDA з використанням чашок із дільником Pena et al. (2017). Штам, який показав найвищу протигрибкову активність, був обраний для оцінки виробництва ЛОС в автоклавованих зернах пшениці або вівсянки як джерела поживних речовин.

Результати показали що штами LGMF1255 і LGMF1256, на середовищі PDA, інгібували *P. digitatum* на 70% і 100% відповідно. З огляду на значне пригнічення, спричинене ЛОС, що продукуються *M. brasiliensis* LGMF1256, цей штам був обраний для аналізу виробництва ЛОС із використанням пшеничного або вівсяного борошна як джерела живлення.

Також було досліджено потенційне використання *M. brasiliensis* LGMF1256 для контролю зеленої плісняви під час транспортування фруктів. Результати показали що в експерименті з відокремленими органічними помаранчевими фруктами, штучно інфікованими *P. digitatum* LGMF1507. *M. brasiliensis* LGMF1256 зміг зменшити розмір уражень зеленої плісняви приблизно на 77% у відокремлених органічних апельсинах, ураження досягли 25,2 см² у позитивному контролі і 5,9 см² під час лікування *M. brasiliensis* LGMF1256. У негативному контролі симптомів зеленої плісняви не спостерігалось, а обробка фунгіцидом повністю пригнічувала розвиток збудника. Зменшення (77%) тяжкості симптомів зеленої плісняви свідчить про те, що ЛОС LGMF1256 мають великий потенціал для контролю захворювання.

У дослідженні Xing et al. (2023) було показано що 6PP який являвся домінуючою сполукою (78,77% від загальної площі піків) з проаналізованих у *Trichoderma erinaceum*.

Результати дослідження здатності 6PP пригнічувати збудника лічи *Peronophythora litchii in vitro* показали дозозалежний ефект при якому зі збільшенням концентрації ріст міцелію, споруляція та проростання спор зменшувалися.

Через 7 днів після обробки ріст міцелію *P. litchii* був пригнічений на 25,28% при концентрації 0,02 г/л і на 89,76% при концентрації 0,15 г/л 6PP.

Концентрація 6PP, яка інгібувала 50% росту міцелію (EC50), становила 0,043 г/л. При концентрації $2,0 \times EC50$ 6PP повністю пригнічував споруляцію та проростання спор.

Ультраструктурний аналіз показав порушення органел, руйнування мітохондрій, потовщення клітинної стінки та руйнування мембран.

Основний механізм дії ЛОС — руйнування клітинної стінки та мембран, що призводить до витоку внутрішньоклітинного вмісту та індукції окисного стресу.

Крім того було досліджено протигрибковий ефект леткого 6PP для контролю післязбирального пероноспорозу лічи. Зі збільшенням концентрації 6PP ступінь ураження зменшувався.

При застосуванні 6PP у концентраціях $0,5 \times EC50$ та $1 \times EC50$ культури *P. litchii* утворювали темно-коричневі плями з білим міцелієм і спорангієносцями. При $1,5 \times EC50$ білий міцелій і спорангієносці зникли з уражених ділянок.

Фрукти, оброблені 6PP при $2,0 \times EC50$, не мали жодних симптомів хвороби, а індекс ураження становив лише 7. Обробка фруктів контрольним препаратом ДММ у концентрації 0,25 г/л призвела до вищого індексу ураження (16,67) та нижчого ефекту контролю (82,27%).

Оцінювали показники потемніння та втрати маси плодів лічи протягом 8 днів при різних видах обробки: NCK, NP, PCK і PP. Індекс потемніння та рівень втрати маси плодів збільшувалися з часом у всіх варіантах обробки. Однак ці показники

зростали повільніше у плодів, оброблених бРР, порівняно з необробленим контролем.

На 8-й день обробка бРР призвела до індексу потемніння 0,58 та втрати маси плодів 2,19%, тоді як у РСК ці показники становили 0,93 та 4,49% відповідно. Також індекс потемніння та втрати маси були нижчими при обробці НР, ніж у НСК.

Ці результати свідчать про те, що бРР ефективно зменшує потемніння та втрату маси, спричинені післязбиральним пероноспорозом лічи, а також має консервувальний ефект на плоди лічи навіть за відсутності патогену

Отримані дані показують, що після 8 днів зберігання потемніння перикарпу та втрата червоного кольору у РСК досягли рівня, що свідчить про зниження комерційної цінності плодів. З іншого боку, плоди, оброблені бРР, залишалися візуально привабливими навіть через 8 днів зберігання.

Для підтвердження того, що обробка бРР індукує післязбиральну стійкість плодів лічи до *P. litchii* та уповільнює старіння, було проведено аналіз метаболітів у зразках РР, РСК, НР і НСК за допомогою UHPLC-ESI-QE HFX-MS/MS.

Для підтвердження того, що обробка бРР індукує післязбиральну стійкість плодів лічи до *P. litchii* та уповільнює старіння, було проведено аналіз метаболітів у зразках РР, РСК, НР і НСК за допомогою UHPLC-ESI-QE HFX-MS/MS.

Усі ідентифіковані та анотовані метаболіти використовувалися для виявлення диференційних метаболітів між обробками РР проти РСК та НР проти НСК.

На основі критерію $VIP \geq 1,0$ та p -значення $< 0,05$ було ідентифіковано 64 диференційних метаболіти (DEMs) у порівнянні РР vs РСК (33 метаболіти з підвищеною концентрацією і 31 – зі зниженою).

До основних диференційних метаболітів належали:

- органічні кислоти та їх похідні (26,56%),
- ліпіди та ліпідоподібні молекули (20,31%),
- органогетероциклічні сполуки (15,63%),
- бензоноїди (14,06%),
- органічні кисневмісні сполуки (7,81%),
- фенілпропаноїди та полікетиди (6,25%),

- алкалоїди та їх похідні (3,13%),
- органічні азотні сполуки (3,13%)

У порівнянні NP vs NCK було ідентифіковано 84 диференційних метаболіти: 41 з підвищеною концентрацією та 43 зі зниженою.

Основні групи метаболітів:

- ліпіди та ліпідоподібні молекули (40,51%),
- органічні кислоти та їх похідні (13,92%),
- органогетероциклічні сполуки (11,39%),
- органічні кисневмісні сполуки (11,39%),
- бензоноїди (11,39%),
- органічні азотні сполуки (5,06%),
- фенілпропаноїди та полікетиди (3,80%),
- нуклеозиди, нуклеотиди та їх аналоги (2,53%)

Значно збагачені метаболічні шляхи у порівнянні PP vs PCK включали:

- метаболізм аргініну та проліну,
- біосинтез аміноацил-тРНК,
- біосинтез ізохінолінових алкалоїдів,
- метаболізм цистеїну та метіоніну,
- метаболізм фенілаланіну.

У порівнянні NP vs NCK основними метаболічними шляхами були:

- метаболізм аргініну та проліну,
- метаболізм гліцерофосфоліпідів,
- біосинтез ізохінолінових алкалоїдів,
- метаболізм цистеїну та метіоніну,
- біосинтез аміноацил-тРНК

Отримані результати свідчать, що основними диференційними метаболітами були органічні кислоти, їх похідні та ліпіди.

Обробка бРР значно вплинула на метаболізм амінокислот і ліпідів у порівняннях PP vs PCK і NP vs NCK.

Органічні кислоти – це природні хімічні сполуки, які містяться в овочах і фруктах та впливають на їхню поживну цінність і смакові характеристики. Тип і кількість органічних кислот є важливими показниками якості фруктів.

Покращення вмісту амінокислот у рослинах може підвищити їхню здатність реагувати на зовнішні стресові фактори та водночас зберігати смакові властивості.

Результати показали, що у порівнянні РР vs РСК підвищилася концентрація 13 органічних кислот і їх похідних, включаючи чотири амінокислоти:

- *L-аспарагін*,
- *L-пролін*,
- *L-тирозин*,
- *L-гістидин*

У порівнянні NP vs NСК було підвищено вміст дев'яти органічних кислот і їх похідних, серед яких чотири амінокислоти:

- *L-аргінін*,
- *L-метіонін*,
- *L-аланін*,
- *L-тирозин*

Інтерактивна діаграма показала, що ці амінокислоти перебували в центрі мережі взаємодії метаболітів і мали тісний зв'язок з іншими сполуками. Ці результати вказують на важливу роль амінокислот у захисті плодів лічи від *P. litchii* та гниття.

Результати показали, що у порівнянні NP vs NСК концентрація гліцерофосфоліпідів (РС і РЕ) значно зменшилася, а цикл трикарбонових кислот (ТСА) (*L-яблучна кислота*) суттєво активувався.

Можливо, що РС і РЕ через ацетил-КоА активують ТСА-цикл, сприяючи виробленню енергії для підтримки клітинних функцій, фізіологічних процесів і/або посилення захисних механізмів.

Метаболомний аналіз показав, що обробка бРР змінює профіль метаболітів плодів лічи під час зараження *P. litchii* та зберігання.

Обробка бРР підвищує рівень амінокислотного метаболізму та активує ТСА-цикл для забезпечення достатньої енергії, що, ймовірно, сприяє індукції стійкості до пероноспорозу лічи та продовженню терміну зберігання плодів.

Окрім цього бРР здатен проявляти антибактеріальну активність проти *S. aureus* ATCC 6538, який реагував на бРР за концентрації 100 мкг/мл, демонструючи зону інгібування 9,0 мм. Значення MIC бРР проти цього бактеріального штаму також було знайдено за цією концентрацією, але значення MBC було більшим, становлячи 125 мкг/мл.

Також було показано що бРР здатен впливати на виробництво афлатоксину В1 (AFB1). Результати показали що виробництво AFB1 *A. flavus* та *A. parasiticus* зменшилося на 8,84–21,18% після застосування нижчої концентрації бРР (55 мкг/мл). Відсоток зменшення AFB1 збільшився до 34,28–54,63% після застосування вищої концентрації бРР (75 мкг/мл). Інгібуючий ефект бРР на виробництво AFB1 був значним у культурах AUMC3943 та AUMC3042, фіксуючи зменшення більше ніж на 50%. Ismaiel et al. (2017)

У статті Таһа et al. (2021) було показано що при високих концентраціях бРР (40 та 50 мкг/мл) захисна реакція рослини була значною, досягаючи ефективності біоконтролю 100%.

Узагальнена характеристика грибних метаболітів для боротьби з патогенами рослин

Сполука	Основні цільові патогени/мікроорганізми	Ефективність/МІК/ІС50	Література
Хітозан	<i>Fusarium oxysporum</i> , нематоди	Пригнічує ріст міцелію на 79,92% (3 г/л)	Torres-Rodriguez et al. (2024); Nunes da Silva et al. (2014)
9-метиловий ефір альтернаріолу (АМЕ)*	<i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i>	ІС50: 16,00–38,27 мкг/мл (бактерії), 87,18 мкг/мл (гриби)	Lou et al. (2016)
Піліформієва кислота	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Пригнічує ріст міцелію на 51,33% МІС: 2,46 мкмоль мл ⁻¹	Elias et al. (2018)
Цитохалазин D	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Пригнічує ріст міцелію на 38,76% МІС: 2,92 мкмоль мл ⁻¹	Elias et al. (2018)
Неоаспергілова кислота	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	ЕС50: 0,07–0,01 мг/мл	Morales-Sánchez et al. (2021)
1-фенілетил-О-а-L-рамнопіранозид	<i>Colletotrichum cladosporioides</i> , <i>C. sphaerospermum</i>	Активність при 10–50 мкг	Chapla et al. (2018)

Евкалиптова кислота А	<i>Alternaria solani</i>	МІК: 6,25 мкМ	Gao et al. (2020)
Цитоспорон В	<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	EC50: 26,11 мкг/мл	Yin et al. (2019)
Цитринін	<i>Alternaria citri, Ceratocystis paradoxa</i>	IC50: 3,1–123,1 мкг/мл	Luo et al. (2019)
Емодін	<i>Bipolaris maydis, Ceratocystis paradoxa</i>	IC50: 3,0–141,0 мкг/мл	Luo et al. (2019)
(R,3E,5E)-1-(3,5-дигідрокси-2,4-диметилфеніл)-1-гідрокси гепта-3,5-дієн-2-он	<i>Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum, Colletotrichum lagenarium</i>	МІК: 8–32 мкг/мл	Ding et al. (2020)
3-фенілпропіонова кислота	<i>Xanthomonas oryzae, Pseudomonas syringae, Aspergillus flavus</i>	МІК: 3,90–15,62 мкг/мл	Yehia et al. (2020)
Глобозуксантон А	<i>Botrytis cinerea, Fusarium graminearum, Fusarium solani</i>	МІК: 4–16 мкг/мл	Miao et al. (2020)
Дивіренсол Н	<i>Fusarium oxysporum, Colletotrichum gloeosporioides, Penicillium italicum</i>	МІК: 6,25–25 мкг/мл	Hu et al. (2019)
Трихотекротоцин А	<i>Alternaria solani, Fusarium oxysporum</i>	МІК: 16–32 мкг/мл	Yang et al. (2018)
Фомадекалін G	<i>Botrytis cinerea, Fusarium graminearum</i>	Інгібує ріст на 81,8% 100 мкг/мл	Khan et al. (2021)
5-гідрокси-8-метокси-4-фенілізохінолін-1(2H)-он	<i>Alternaria brassicae, Alternaria alternata, Botrytis cinerea</i>	МІК: 31,2 мкг/мл	Ma et al. (2017)

8-метоксинафтален-1-ол	<i>Athelia rolfsii</i>	МІК: 250 мкг/мл	Tanapichatsakul et al. (2020)
Претриходермамід А	<i>Ustilago maydis</i>	МІК: 1 мг/мл	Harwoko et al. (2021)
Біколорин В	<i>Pythium dissimile, Sclerotinia sclerotiorum</i>	МІК: 6,2–9,8 мкг/мл	Zhao et al. (2019)
(3R,6R)-3-бензил-6-ізопропіл-4-метилморфолін-2,5-діон	<i>Alternaria solani, Colletotrichum gloeosporioides, Pyricularia grisea</i>	МІК: 6,25 мкМ	Yang et al. (2019)
Апертубін А	<i>Aspergillus tubingensis, Nigrospora oryzae, Phoma herbarum</i>	МІК: 8 мкг/мл	Wu et al. (2022)
2-метокси-4-вінілфенол	<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	EC50: 36 мкл/л	Yang et al. (2021)
Елеміцин	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Інгібує ріст на 76,6% 50 мкл	Khruengsai et al. (2021)
Фенілетиловий спирт	<i>Fusarium oxysporum, Fusarium proliferatum</i>	Інгібує ріст на 70,54–76,31% 1,36 мкл мл ⁻¹	Khruengsai et al. (2021)
Гостол	<i>Penicillium digitatum</i>	Пригнічує ріст <i>P. digitatum</i>	Pena et al. (2019)

Примітка: •МІК (мінімальна інгібуюча концентрація) – найменша концентрація сполуки, яка пригнічує ріст мікроорганізму.

- IC50 (концентрація, що інгібує 50% росту) – концентрація сполуки, яка знижує ріст мікроорганізму на 50%.
- EC50 (ефективна концентрація, що інгібує 50% росту) – концентрація сполуки, яка знижує ріст мікроорганізму на 50%.
- LD50 (летальна доза, що вбиває 50% популяції) – доза сполуки, яка вбиває 50% популяції організмів. * окрім протигрибкової має протибактеріальну та антинематодну активність

РОЗІДЛ 2. ГРИБНІ МЕТАБОЛІТИ В МЕДИЦИНІ ТА ФАРМАЦІЇ

2.1 Алкалоїди

У дослідженні Afiyatullov et al. (2018) було описано п'ять нових пренільованих індольних алкалоїдів, 17-гідроксинотоамід D (1), 17- O - етилнотоамід M (2), 10- O -ацетилсклеротіамід (3), 10- O - етилсклеротіамід (4) і 10- O - етилнотоамід R (5) які були виділені з спільної культури *Aspergillus sulphureus* КММ 4640 та *Isaria felina* КММ 4639. Крім нових сполук, (-)-нотоамід B (6), нотоамід C (7), дегідронотоамід C (8), нотоамід D (9), нотоамід F (10), нотоамід Q (11), 17- eni- нотоамід Q (12), нотоамід M (13) і склеротіамід (14) також були виділені з екстракту спільної культури.

В даній роботі було досліджено вплив речовин 1 , 2 , 5 – 9 , 13 і 14 на життєздатність незлоякісних клітин і клітин раку передміхурової залози людини, а також утворення колоній клітин раку простати людини 22Rv1. Аналіз МТТ виявив, що всі речовини, перевірені як нецитотоксичні для незлоякісних (MRC-9 і НЕК 293 T), а також злоякісних (22Rv1, PC-3 і LNCaP) клітинних ліній у концентраціях до 100 мкМ після 48 годин лікування (дані не показані). У той же час сполуки 2 , 6 , 8 , 13 і 14 інгібували утворення колоній клітин раку простати 22Rv1 у концентрації 100 мкМ. Сполуки 2 і 13 значно зменшили утворення колоній при концентраціях 10 мкМ на 25 і 55% відповідно.

Відомо, що клітини 22Rv1 стійкі до гормональної терапії, включаючи нові препарати 2 покоління абіратерон і ензалутамід, через наявність варіанту сплайсингу андрогенного рецептора AR-V7. Тому лікарські засоби, активні в цих клітинах, можуть представляти інтерес для подальших досліджень у терапії стійкого до ліків раку простати людини.

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андреев Б.В.				РОЗІДЛ 2. ГРИБНІ МЕТАБОЛІТИ В МЕДЕЦИНІ ТА ФАРМАЦІЇ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.						58	22
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Також у дослідженні повідомляється що досліджувані гриби, культивовані окремо, не продукували цих метаболітів. Проте бревіанамід F, який є поширеним попередником отриманих алкалоїдів, був виділений раніше з гриба *A. sulphureus*.

У дослідженні Shi et al. (2023) було виділено та оцінено чотири неописані цитохалазини (борелазини A–D (1–4)) які були отримані з ендofітного гриба *Boeremia exigua*.

Сполуки 1–4 були оцінені на їхню цитотоксичну активність проти п'яти ліній клітин раку людини: HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7 та SW480. Результати показали що сполука 3 виявила значну цитотоксичність проти клітинних ліній HL-60, SMMC-7721 та MCF-7 зі значеннями IC₅₀ $2,89 \pm 0,13$, $4,33 \pm 0,16$ та $5,79 \pm 0,07$ мкМ відповідно. Сполуки 1, 2 та 4 показали помірну цитотоксичність проти частини або всіх п'яти ліній ракових клітин зі значеннями IC₅₀ в діапазоні від 9,73 до 30,56 мкМ.

У дослідженні Wang et al. (2023) було показано новий астерихінон, охріндол F (1), та п'ять раніше описаних аналогів (2–6) були виділені з культури гриба *Aspergillus sp.* GZWMJZ-258. Крім того, вісім нових похідних (7–14) були синтезовані з основних метаболітів 2 та 3. Ліпофільна циклопентильна група та водорозчинний морфоліновий фрагмент були введені в атом азоту сполуки 2, що призвело до утворення сполук 7 та 8 відповідно. Сполуки 9–14 були отримані шляхом модифікації фенольного гідроксилу сполуки 3 шляхом введення ацетофенону, хлорацетофенону, етилу, циклопентилу, морфоліну та цукрового фрагмента відповідно.

Результат скринінг цитотоксичної активності показав, що сполуки 1–6 помірно активні проти лінії клітин лейкемії MV4-11, але слабо інгібують лінію нормальних клітин печінки людини L-02. Однак селективність між лініями клітин MV4-11 та L-02 можна покращити.

Також було протестовано похідні (7–14), ці новостворені сполуки набагато ефективніше зупиняють ріст клітин, ніж природні продукти 2 та 3, з активністю у 7–88 разів вищою (таблиця 2.1). Цікаво, що сполуки залишалися безпечними для клітин печінки людини, L-02, зі значеннями IC₅₀, що перевищують 100 мкМ. Хоча

вони не були такими сильними, як препарат першої лінії для AML, РКС-412, найбільш перспективна сполука 12 все ще була безпечнішою з індексом селективності (SI), що перевищує 710 (у 300 разів вище).

Таблиця 2.1.

Цитотоксична активність сполук 1-14 (Wang et al. 2023)

Сполука	IC50 значення (мкМ)	Індекс селективності (SI) ^a
MV4-11	L-02	
1	1.8 ± 0.1	17 ± 1
2	5.9 ± 0.1	>100
3	12 ± 1	>100
4	1.3 ± 0.1	>100
5	6.5 ± 0.2	>100
6	1.2 ± 0.1	11 ± 1
7	0.84 ± 0.03	>100
8	0.48 ± 0.06	>100
9	1.3 ± 0.1	>100
10	0.99 ± 0.04	>100
11	0.20 ± 0.02	>100
12	0.14 ± 0.01	>100
13	0.45 ± 0.01	>100
14	0.26 ± 0.00	>100
РКС-412	0.020 ± 0.01	8.1 ± 0.1

Примітка. ^a Індекс селективності (SI) = IC50 L-02 / IC50 MV4-11.

Сполуки 12 та 14 пригнічували ріст клітин MV4-11, частково шляхом індукції апоптозу та блокування клітинного циклу у фазі S. Також було досліджено вплив як сполуки 12 та 14 впливають на кіназу FLT-3, і виявили, що обидві сполуки знижують експресію FLT-3 у клітинах MV4-11 залежно від дози.

У дослідженні Jin et al. (2023) було виділено та оцінено одинадцять нових індохіназолінових алкалоїдів, а саме аспергілоїди А–К (1–11), разом із п'ятьма

відомими конгенерами (12–16), які були отримані з гриба *Aspergillus clavatonanicus* який було виділено з кишківника багатоніжки.

Дані сполуки перевіряли на кардіоміоцитну захисну активність проти холодової ішемічної травми. щоб перевірити дану активність дослідники використовували кардіоміоцити H9C2 в розчині для холодового зберігання при 4 °C (гістидин-триптофан-кетоглутарат, НТК) з цими сполуками або без них. У результаті аналіз з використанням набору для підрахунку клітин 8 (ССК-8) показав, що додавання сполук 1–3, 5, 8, 12–14 та 16 у концентрації 40 мкМ полегшило холодову ішемічну травму через 24 та 36 годин після холодової ішемії (СІ). Однак додавання сполук 1, 2, 5, 12–14 та 16 також покращило холодову ішемічну травму через 48 годин після СІ. Для підтвердження захисного ефекту сполук 1, 5 та 14 на холодову ішемічну травму використовували ядерне фарбування PI. Сполуки 1, 5 та 14 могли запобігти індукованому холодовою ішемією виробництву ROS. Додавання сполук 1, 5 та 14 запобігає індукованому холодовою ішемією дефосфорилюванню Ser9 GSK3β через 12 годин після СІ. Цей ефект сполуки 5 також був підтверджений у залежній від часу холодовій ішемії. У сукупності ці сполуки можуть інгібувати сигналізацію GSK3β для захисту від індукованої окислювальним стресом холодової ішемічної травми.

Поточна робота підкреслює індолохіназолінові алкалоїди як перший клас природних кардіоміоцитних захисних агентів проти холодової ішемічної травми, які можна розробляти для нових кардіопротекторів у медицині трансплантації серця.

2.2 Полікетиди

У дослідженні Liang et al. (2023) було отримано та досліджено 4 сполуки виділені з гриба *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Їхні структури, включаючи абсолютні конфігурації, були визначені за допомогою спектроскопічних аналізів, методу Мошера та розрахунків ECD. Сполуки 1 та 2 були ідентифіковані як лазіодіплодіапірони А і В (1 і 2), два нових похідних преуссомерину, що володіють 6-метил-4Н-фууро[3,2-с]піран-4-онною частиною та високофункціоналізованою

сполучною та складною поліциклічною кільцевою системою. Сполуки 3 та 4 були ідентифіковані як відомі преуссомерин В та преуссомерин SA1.

Попередні дослідження протизапальної активності преуссомеринів дали напрямок для скринінгу біологічної активності. Сполуки 1–4 зменшували виробництво оксиду азоту (NO), індуковане ліпополісахаридом (LPS), зі значеннями IC₅₀ 4,8, 8,5, 5,9 та 12,8 мкМ відповідно з MG132 (IC₅₀ = 2,6 ± 0,3 мкмоль/л) як позитивний контроль

Дослідження показали, що ці сполуки мають широкий спектр фармакологічної активності, включаючи протигрибкову, антибактеріальну, антиплазмодійну, цитотоксичну та протизапальну.

У дослідженні Yang et al. (2020) було виділено та оцінено п'ятнадцять полікетидів, включаючи чотири нові сполуки, ізоверсіол F (1), декумбенон D (2), палітантин В (7) і 1,3-ді- O -метил-норсолорінова кислота (8), разом з 11 відомими сполуками (3-6 і 9-15), були виділені з гриба *Aspergillus versicolor* SH0105.

У цьому дослідженні всі ізольовані сполуки 1-15 були оцінені на предмет їх антимікробної активності проти чотирьох патогенних для людини мікробів і п'яти штамів бактерій, що обростають . Результати показали, що сполука 3,7-дигідрокси-1,9-диметилдобензофуран (14) демонструє сильну інгібіторну активність проти *Staphylococcus aureus* (ATCC 27154) зі значенням МІК 13,7 мкМ, що було порівнянно з позитивним контролем ципрофлоксацину (МІК = 9,4 мкМ), і демонструвала помірну інгібіторну активність проти *Aeromonas salmonicida* (ATCC 7965D) з таким же значенням МІК 13,7 мкМ (sea nine 211, МІС = 1,4 мкМ; . Крім того, аналізи антиоксидантів ізольованих сполук проводили за допомогою моделей поглинання радикалів DPPH і FRAP. Результати показали, що аспермутаруброл/віолацеол-I (15) демонстрували значну активність поглинання радикалів DPPH зі значенням IC₅₀ 34,1 мкМ і демонстрували сильне зниження Fe³⁺ зі значенням FRAP 9,0 мМ при концентрації 3,1 мкг/мл; таким чином, 15 був більш потужним, ніж аскорбінова кислота позитивного контролю (DPPH, IC₅₀ =

115,1 мкМ; FRAP = 5,6 мМ при 3,1 мкг/мл; . Однак ефекти поглинання радикалів 1-14 були менш ніж на 50% при концентрації 50 мкг/мл.

2.3 Стероїди

У дослідженні Wei et al. (2023) було виділено та проаналізовано 5 сполук (Спектастероли А–Е (1–5)) виділених з *Aspergillus spectabilis*. Сполуки 1 і 2 мають кільцеву систему 6/6/6/5/5 з додатковим циклопентеном, тоді як 3 і 4 мають незвичайну кільцеву систему 6/6/6/6, утворену розширенням кільця D шляхом 1,2-алкільних зсувів.

Сполуки 1 і 2 є першими прикладами ергостеролів з пентациклічною та ароматичною кільцевою системою 6/6/6/5/5, а 3 і 4 є першими прикладами ароматичного ергостеролу з кільцевою системою 6/6/6/6. Перегрупування бічного ланцюга 5 робить його унікальним у сімействі ергостеролів.

Сполуки 1–5 були оцінені на їх цитотоксичність проти ліній клітин раку людини (RKO, A549, HEPG2, SU-DHL-2 та HL60) методом ССК-8.19 Сполука 3 була активна проти клітин SU-DHL-2 та HL60 зі значеннями IC₅₀ 6,9 та 8,7 мкМ відповідно, та викликала зупинку клітинного циклу та апоптоз клітин HL-60.

Сполука 3 показала значний інгібуючий ефект на виробництво NO в RAW264.7 зі значенням IC₅₀ 19,3 мкМ. Її протизапальний показник RAW264.7 за допомогою qRt-PCR був проаналізований на рівні транскрипції. Класично активовані або запальні (M1) та альтернативно активовані або протизапальні (M2) макрофаги є двома основними типами макрофагів, які відіграють важливу роль в імунній відповіді.²⁰ M1 макрофаги можуть бути стимульовані LPS та виділяти цитокинові фактори, такі як IL-1 β та COX-2, які активують індукцибельну синтазу оксиду азоту (NOS2 або iNOS) для виробництва NO.²¹ Отже, був досліджений рівень транскрипції відповідних показників. Результати показали, що сполука 3 може знижувати рівні мРНК прозапальних цитокінів, включаючи COX-2, iNOS, IL-1 β .

У дослідженні Chinthanom et al. (2023) було показано що культивованих плодових тіл *Ganoderma weberianum* призвело до виділення 11 раніше невідомих ланостанових димерів: гановеберіанонів C (3a), D (4a), E (5a), F (6a), G (7a) і H (8a)

та ізогановеберіанонів А (1b), В (2b), D (4b), G (7b) і Н (8b). Також було виділено шість нових похідних ганодермантріолу у вигляді трьох пар діастереомерів (11/12, 13/14 і 15/16) та п'ять нових гановеберіанових кислот (17–21).

Усі ланостанові димери (крім 5a та 8b через їх малу кількість зразка) та невідомі ланостанові мономери були протестовані на активність проти *P. falciparum* К1 (мультирезистентний штам) та цитотоксичність до незлоякісних клітин Vero (фібробласти нирок африканської зеленої мавпи). Серед нещодавно виділених ланостанових димерів гановеберіанон D (4a) та його ізомер ізогановеберіанон D (4b) показали потужну антималярійну активність зі значеннями IC₅₀ 0,057 та 0,035 мкМ відповідно, що було порівнянно з гановеберіаноном А (1a) (IC₅₀ 0,050 мкМ, повідомлено раніше). Істотна відмінність полягала в тому, що цитотоксичність 4a та 4b (IC₅₀ 8,1 та 19 мкМ відповідно) була значно слабшою, ніж у 1a (IC₅₀ 0,21 мкМ). Ці нові результати показали, що антималярійна активність цих ланостанових димерів не залежить від їхніх цитотоксичних властивостей. Більшість ланостанових мономерів були неактивними в антималярійних аналізах, тоді як кілька похідних ганодермантріолу (11/12 та 15/16) показали незначну активність.

Ці дослідження показали, що гриб *G. weberianum* є потужним джерелом нових насінневих структур як антималярійних агентів. Також було показано, що масове виробництво цього гриба як потенційного антималярійного лікарського гриба можливе шляхом штучного культивування за протоколом, подібним до комерційного виробництва лінчжі (*G. lucidum*).

У дослідженні Zheng et al. (2023) було виділено та оцінено 9 нових ергостероїдів (1–9) та сім відомих (10–16).

Відомі сполуки були ідентифіковані шляхом порівняння їхніх спектроскопічних даних з даними, повідомленими в літературі, як кальвастерол В (10), 12 (14β,22E)-9,14-дигідроксиергоста-4,7,22-трієн-3,6-діон (11), 13 5β,6β-епокси-3β,7α-дигідрокси-(22E,24R)-ергоста-8(14),22-дієн-15-он (12), 14 5β,6β-епокси-3β,7α,9α-тригідрокси-(22E,24R)-ергоста-8(14),22-дієн-15-он (13), 14

3 β ,14 β -дигідрокси-6-оксо-А-нор-ергоста-7,22-дієн-4-ова кислота δ -лактон (14), 11 та данкастерони А (15) та В (16)

Сполуки 1–16 були оцінені на їхню цитотоксичність проти клітин промієлоцитарної лейкемії людини (HL-60), клітин дифузної великої В-клітинної лімфоми людини (DLBCL) (SD-DHL-2), клітин раку товстої кишки людини (РКО), клітин гепатоцелюлярної карциноми людини (HepG-2) та клітин недрібноклітинного раку легенів людини (А-549) методом МТТ; сполуки 2–6, 9, 11 та 15 виявили цитотоксичність. Сполука 3 виявила активність проти клітин SU-DHL-2 зі значеннями IC₅₀ 0,4 мкМ. Для клітинної лінії РКО сполуки 2–5 показали цитотоксичність зі значеннями IC₅₀ 13, 14, 9,2 та 11 мкМ відповідно. Результати показали, що сполука 3 має сильну селективність до клітин SU-DHL-2. Крім того, сполука 3 продемонструвала виражену цитотоксичність у лініях клітин лімфоїдної карциноми, і це було додатково досліджено для розуміння механізму дії. Результати проточної цитометрії показали, що сполука 3 індукує апоптоз клітин. У клітинах SU-DHL-2 3 призвела до 20,97% (2 мкМ) та 69,00% (10 мкМ) випадків апоптозу порівняно з контрольною групою (7,62%)

Сполука 7 виявила значний імуносупресивний ефект проти проліферації В-лімфоцитів, індукованої ліпополісахаридами (LPS), зі значенням IC₅₀ 8,6 мкМ; проте інші сполуки не виявили інгібуючої активності.

У дослідженні Guo et al. (2023) було виділено та оцінено шістнадцять нових полікетидів, офіцирсинів А–Р (1–16), включаючи чотири нові вуглецеві скелети (5–9, 14, 15 та 16) які були отримані з *Ophiobolus cirsii* LZU-1509. Дані сполуки оцінювали на їх протипухлинну активність та антиоксидантні ефекти.

Протипухлинну активність 1–16 оцінювали в клітинах HepG2 та HT-1080 за допомогою аналізу ССК8. Усі сполуки демонструють слабку цитотоксичність або нетоксичність при 20 мкМ протягом 48 годин у двох пухлинних клітинах. 1–16 виявляють низьку цитотоксичність у клітинах HepG2. Сполуки 5–7 та 12 виявляють слабку протипухлинну активність (приблизно 10% зниження швидкості росту клітин інгібітора порівняно з контрольними клітинами). У клітинах HT-1080 всі сполуки демонструють нетоксичність протягом 48 годин. Ці результати

показують, що сполуки 1–16 мають низьку цитотоксичність або нетоксичність у пухлинних клітинах.

Результати антиоксидантної активності в нейроноподібних клітинах PC12, індукованих перекисом водню показали що сполуки 12 та 16 виявляють низький захисний ефект на клітини PC12, стимульовані перекисом водню, у дозі 20 мкМ. Серед цих сполук 15 виявляє найвищу захисну здатність (майже повністю рятуючи життєздатність клітин) від ушкодження перекисом водню. Попередня обробка 15 збільшує життєздатність з 44,5 до 96,1% ($P < 0,01$).

Для більш детального дослідження антиоксидантного ефекту було перевірено здатність поглинати радикали DPPH. В результаті було показано що сполука 15 виявляє потужну здатність поглинати радикал DPPH, і вона сильніша, ніж позитивна група ресвератрол.

У дослідженні Fu et al. (2023) було отримано та оцінено чотири нові γ -лактони (Альтерстероїди А–D (1–4)) які були виділені з культур аскоміцетового гриба *Alternaria sp.* Сполуки 1–4 були протестовані на цитотоксичність проти чотирьох ліній пухлинних клітин, A549 (клітини аденокарциноми легенів людини), HCT116 (клітини колоректальної карциноми людини), MB49 (клітини карциноми сечового міхура миші) та MB49 CisR (стійкі до цисплатину клітини карциноми сечового міхура миші).

Результати показали що сполука 3 показала цитотоксичну дію зі значеннями IC50 4,8–12,7 мкМ, тоді як позитивний контроль цисплатин показав значення IC50 1,6–25,9 мкМ. Примітно, що сполука 3 показала еквівалентну активність проти чутливих до цисплатину клітин MB49 і стійких до цисплатину клітин MB49 CisR, зі значенням IC50 12,7 мкМ, тоді як цисплатин показав значення IC50 25,9 мкМ проти MB49 CisR, що значно менш потужно, ніж проти клітин MB49 (1,6 мкМ).

Щоб дослідити можливий механізм дії, за допомогою якого сполука 3 інгібує проліферацію обраних ліній пухлинних клітин, клітини A549 обробляли 3, а потім активацію каспази 3/7, апоптотичного маркера, контролювали за допомогою аналізу високого вмісту. Кількість клітин, позитивних на каспазу 3/7, значно зростає залежно від дози (21,1% і 81,9% було виявлено після обробки 31,6 і 100 мкМ 3

відповідно). Середня інтенсивність флуоресценції каспази 3/7 зросла з 2000 до понад 5000 при обробці 10–100 мкМ 3, що свідчить про те, що 3 індукувала апоптотичний процес, опосередкований каспазою 3/7, у клітинах A549.

Альтерстероїди A–D (1–4) є незвичайними метаболітами, отриманими з 9,11-секостероїдів, що містять γ -лактонну частину, з'єднану з D-кільцем стероїду в C-13/C14. Хоча були повідомлені синтетичні секостероїдні похідні, що містять 26,23- γ -лактонну частину на бічному ланцюгу,³⁰ лише один грибоквий метаболіт, циклосекостероїд A,¹⁶ був повідомлений як секостероїд, що містить γ -лактонну частину, з'єднану з D-кільцем стероїду в C-13/C14 до цього дослідження. Сполуки 1–4 відрізняються від відомого прецеденту відсутністю гідроксильної групи в C-25. Крім того, сполука 2 є продуктом окислення C-6 сполуки 1, 3 є продуктом дегідрогенізації C-4–C-5 і стереоізомерним аналогом C-3 сполуки 1, тоді як 4 є продуктом окислення C-3 і C-6 сполуки 3.

На сьогодні біосинтез секостероїдів залишається недостатньо вивченим, і, ймовірно, як ферментативні, так і неферментативні процеси беруть участь у пізніх стадіях диверсифікації секостероїдів.³¹ Відкриття 1–4 ще більше розширило структурне різноманіття секостероїдів і може надати підказки для майбутніх біосинтетичних досліджень.

2.4 Терпеноїди

У дослідженні Chang et al. (2023) було отримано та оцінено 8 солук виділених з *Penicillium sp.*sb62. Загалом було ідентифіковано такі сполуки п'ять нових меротерпеноїдів (Пеніандроноїди A–E (1–5)), разом з трьома відомими аналогами (ізопеніцину C (6), ізопеніцином A (7), ізопеніцин B (8)).

Була оцінена активність сполук 1 та 6 проти вірусу грипу A (H1N1), з рибавірином як позитивним контролем. 1 та 6 показали противірусну активність зі значеннями EC₅₀ 19 та 14 мкг/мл відповідно. Обидві сполуки 1 та 6 показали слабку токсичність проти клітин MDCK у цій моделі, що призвело до сприятливого індексу селективності. Противірусні ефекти 1 проти вірусу денге людини типу 3 (DV3) або респіраторно-синцитіального вірусу (RSV) не спостерігалися.

Була протестована імуносупресивна активність сполук 1–8 на проліферацію лімфоцитів миші, стимульовану конканаваліном А (ConA) або ліпополісахаридом (LPS), *in vitro*. Сполуки 3, 4 та 7 показали значні інгібуючі ефекти проліферації проти Т-клітин, індукованих ConA, зі значеннями EC50 4,3, 11 та 8,5 мкМ відповідно. Сполуки 3, 4, 7 та 8 показали значні інгібуючі ефекти проліферації проти В-клітин, індукованих LPS, зі значеннями EC50 11, 8,8, 8,5 та 7,5 мкМ відповідно. Цікаво, що сполука 3 виявила низьку цитотоксичність на спленоцитах миші з CC50 > 50 мкМ, з індексом селективності понад 11, що показало, що сульфгідрильна група може відігравати ключову роль в імуносупресивній активності 3.

Сполуки 1–6 не були цитотоксичними проти п'яти ліній клітин раку людини (HCT116, HT-29, A549, MCF-7 та HeLa) або однієї нормальної лінії клітин печінки людини (L02).

У дослідженні Cao et al. (2023) було виділено та оцінено дев'ять нових індолдигтерпенів, жантинелумінів А–І (1–9), разом із дванадцятьма відомими аналогами (10–21) дані сполуки були отримані під час спільного культивування морських грибів *Penicillium janthinellium* з *Paecilomyces formosus*. Індолдигтерпени були перевірені на інгібуючу активність РТР (РТР1В, ТСРТР, SHP1, SHP2 та CD45); противірусна активність (вірус грипу А); антибактеріальну активність (*Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* та *Vibrio alginolyticus*.)

Результати досліджень показали що сполуки (1–21) були протестовані на активність проти вірусу грипу А проти штамів А/WSN/33 (H1N1) та А/Hong Kong/1/68 (H3N2). Серед цих сполук 1, 2 та 7 показали значну активність проти двох штамів. Значення IC50 1 проти А/WSN/33 (H1N1) та А/Hong Kong/1/68 (H3N2) становили 3,8 та 13,3 мкМ відповідно, що сильніше, ніж у позитивного контролю Т-705. Сполука 2 також показала активність проти двох штамів зі значеннями IC50 7,3 та 15,7 мкМ відповідно. Більше того, сполука 7 показала активність проти двох штамів зі значеннями IC50 11,4 та 20,6 відповідно. Також було проведено тест на цитотоксичність (CC50) 1, 2 та 7 була отримана за допомогою методу МТТ, зі

значеннями CC_{50} 70,7, 132,4 та 134,7 відповідно, що вказує на їх відносно низьку токсичність.

Поверхневий глікопротеїн нейрамінідази (NA) вірусу грипу А може використовуватися як цільова молекула протигрипозних сполук [43]. У даному дослідженні активність NA 1, 2 та 7 була протестована за допомогою флуоресценції 4-метилумбеліферону з використанням набору для скринінгу інгібування NA. Сполуки 1, 2 та 7 показали активність NA залежно від дози та могли інгібувати понад 50% активності NA, коли концентрація перевищує 500 мкМ. Таким чином дослідники припустили, що NA є можливою мішенню 1, 2 та 7.

Щоб підтвердити вищезазначене, Arg371 був обраний для подальшого дослідження за допомогою зворотної генетики. Рекombінантний вірус WSN з мутацією Arg371 або без неї в NA був отриманий з клітин 293Т. Потім сполуки 1, 2 та 7 були використані для перевірки їх активності проти рекombінантного вірусу та вірусу WSN дикого типу за допомогою аналізу інгібування цитопатичного ефекту (CPE). Було виявлено, що сполуки 1, 2 та 7 мають інгібуючий вплив на віруси WSN дикого типу та рекombінантні віруси WSN, зі значеннями IC_{50} в діапазоні від 3,5 до 12,5 мкМ. Однак обробка рекombінантного вірусу Arg371 1, 2 та 7 призвела до зниження рівня виживання клітин-господарів з великими значеннями IC_{50} . На основі вищезазначеного аналізу можна зробити висновок, що взаємодія між сполуками та Arg371 була важливою для їх протигрипозного ефекту. Однак значення IC_{50} для активності NA 1, 2 та 7 становили понад 500 мкМ, що значно перевищує значення IC_{50} (3,8–20,6 мкМ) для протигрипозної активності 1, 2 та 7, що свідчить про те, що інгібування NA може бути не єдиним механізмом їх протигрипозної активності.

Результати інгібуючої активності РТР показали що сполуки 1, 2, 4, 5, 9–16 та 19–21 показали потужну та широку інгібуючу активність щодо РТР. Серед них сполуки мали найкращу інгібуючу активність щодо РТР1В зі значеннями IC_{50} в діапазоні від 0,6 до 9,2 мкМ, більшість з яких були сильнішими, ніж у позитивного контролю Na_3VO_4 ($IC_{50} = 8,5$ мкМ). Особливо сполуки 4 та 21 показали найперспективнішу активність з даними IC_{50} 0,6 та 0,9 мкМ відповідно.

Тринадцять сполук (2, 4, 5, 9–14, 16 та 19–21) показали видатну активність проти ТСРТР зі значеннями IC50 в діапазоні від 1,7 до 18,9 мкМ. Десять сполук (1, 2, 10–14, 16, 20 та 21) показали інгібуючу активність SHP1 зі значеннями IC50 в діапазоні від 2,9 до 10,4 мкМ. Сполуки 1, 2, 10, 11, 13 та 20 показали інгібуючу активність SHP2 зі значеннями IC50 в діапазоні від 2,4 до 10,7 мкМ. Крім того, сполука 16 мала значну інгібуючу активність CD45 зі значенням IC50 3,8 мкМ.

Взявши активність РТР1В як приклад, було вивчено залежність структура-активність (SAR) інгібуючої активності РТР похідних індол-дитерпену (1, 2, 4, 5, 9–16 та 19–21). Сполука 2, яка містила гідроксильну групу в положенні 13, мала сильнішу активність, ніж 1 (IC50 2,7 для 2 проти IC50 7,9 для 1), що свідчить про те, що 13-ОН може збільшити потенцію проти РТР1В. Сполука 9 була активнішою, ніж сполука 8, що вказує на те, що частина N-CH₃ була корисною для покращення інгібуючої активності РТР. Циклізація між С-7 та С-34 через ефірний зв'язок також сприяла збільшенню інгібуючої активності РТР, виходячи з того, що сполуки 4 та 5 показали сильнішу активність, ніж сполуки 1 та 2 відповідно. Більше того, сполука 21, що містить ізоаміленову частину в положенні С-20, показала значно більшу активність, ніж 9–16, доводячи, що 20-ізоамілен був важливим фармакофором. Однак, порівняно з 2, сполуки 3 та 7 показали не/слабку інгібуючу активність РТР1В відповідно, що свідчить про те, що заміна 7-гідрокси на Δ6 або 7-метокси призвела до зниження інгібуючої активності РТР.

Щоб дослідити механізм інгібуючої активності РТР цих похідних індол-дитерпену, було проведено молекулярний докінг режимів зв'язування між цільовими білками SHP1, ТСРТР, SHP2, РТР1В та сполуками 10, 11, 20, 21 відповідно. Найбільш стабільні конформери 10, 11, 20 та 21 та симуляції докінгу. Було виявлено, що індольне кільце в сполуці 21 може утворювати водневий зв'язок з амінокислотними залишками GLN-262 та водневі взаємодії з PHE-182, ALA-217 та ILE-219 у цільовому білку РТР1В. Крім того, група 32-CH₃ може утворювати водневі зв'язки з TYR-46, VAL-49 та ALA-217. Ланцюг 21 може утворювати водневі взаємодії з ASP-181, PHE-182 та LYS-120. Два водневі зв'язки з довжиною зв'язку 1,9 та 2,1 Å утворилися між атомами O-8/O-25 у 11 та амінокислотними

залишками ARG-524/CYS-532 у цільовому білку TCPTP відповідно. Крім того, сполука 11 також мала гідрофобні взаємодії з ASP-548/ARG-524. Для симуляції докінгу 10 з білком SHP1 індольне кільце та 13-ОН у 10 утворювали водневі зв'язки з ALA-320 та ALA-448 відповідно. Крім того, бензольне кільце 10 мало π -сірчану взаємодію з атомом сірки LYS-310. Крім того, гідрофобні взаємодії утворилися між 10 та THR-322/GLN-422/GLU-443. Для симуляції докінгу 20 з білком SHP2 індольне кільце та 7-ОН у 20 утворювали водневі зв'язки з GLU-249 та THR-253 відповідно. Гідрофобні взаємодії також спостерігалися між 20 та ARG-111/GLU-250/LEU-233

Крім того, антибактеріальна активність 1–21 також була оцінена щодо трьох патогенних видів *Vibrio*: *V. anguillarum*, *V. parahemolyticus* та *V. alginolyticus*. Серед них лише 1, 8 та 17 показали слабку анти-*Vibrio* активність щодо *V. anguillarum* зі значеннями MIC 12,5, 25,0 та 25,0 мкг/мл відповідно

Проаналізовані літературні дані свідчать, що грибні метаболіти становлять окремий клас біологічно активних речовин із широким спектром застосувань. Узагальнені дані щодо біологічної активності розглянутих грибних метаболітів наведено в таблиці 2.2.

Розглянуті приклади використання грибних метаболітів у рослинництві, медицині та фармації підтверджують високий потенціал летких вторинних метаболітів як цінних біотехнологічних продуктів. Це підкреслює актуальність створення ефективних біотехнологій їх одержання, зокрема 6-пентил- α -пірону, технологічні післяферментаційні аспекти якого розглянуто в наступних розділах.

Узагальнена характеристика грибних метаболітів, перспективних для лікування хвороб людини

Клас сполук	Джерело грибів	Сполука	Біологічна активність	Клітинні лінії/Мішені	Значення IC50 (мкМ)	Літературне посилання
Алкалоїди	<i>Aspergillus sulphureus</i> , <i>Isaria felina</i>	17-гідроксинотоамід D (1)	Нецитотоксичний	MRC-9, НЕК 293Т, 22Rv1, РС-3, LNCaP	>100	Afiyatullo, S. S. та ін. (2018)
		17-О-етилнотамід М (2)	Інгібування утворення колоній	22Rv1	10 (25% зменшення)	Afiyatullo, S. S. та ін. (2018)
		10-О-ацетилсклеротіамід (3)	Нецитотоксичний	MRC-9, НЕК 293Т, 22Rv1, РС-3, LNCaP	>100	Afiyatullo, S. S. та ін. (2018)
		10-О-етилсклеротіамід (4)	Нецитотоксичний	MRC-9, НЕК 293Т, 22Rv1, РС-3, LNCaP	>100	

		10-О-етилнотоамід R (5)	Нецитотоксичний	MRC-9, HEK 293T, 22Rv1, PC-3, LNCaP	>100
		(-)-нотоамід B (6)	Інгібування утворення колоній	22Rv1	100
		Нотоамід C (7)	Нецитотоксичний	MRC-9, HEK 293T, 22Rv1, PC-3, LNCaP	>100
		Дегідронотоамід C (8)	Інгібування утворення колоній	22Rv1	100
		Нотоамід D (9)	Нецитотоксичний	MRC-9, HEK 293T, 22Rv1, PC-3, LNCaP	>100
		Нотоамід F (10)	Нецитотоксичний	MRC-9, HEK 293T, 22Rv1, PC-3, LNCaP	>100
		Нотоамід Q (11)	Нецитотоксичний	MRC-9, HEK 293T, 22Rv1, PC-3, LNCaP	>100

		17-епі-нотоамід Q (12)	Нецитотоксичний	MRC-9, HEK 293T, 22Rv1, PC-3, LNCaP	>100	
		Нотоамід M (13)	Інгібування утворення колоній	22Rv1	10 (55% зменшення)	
		Склеротіамід (14)	Інгібування утворення колоній	22Rv1	100	
	<i>Boeremia exigua</i>	Борелазин А (1)	Цитотоксичність	HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7, SW480	9.73-30.56	Shi, B. B. та ін. (2023)
		Борелазин В (2)	Цитотоксичність	HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7, SW480	9.73-30.56	
		Борелазин С (3)	Цитотоксичність	HL-60, SMMC- 7721, MCF-7	2.89	
		Борелазин D (4)	Цитотоксичність	HL-60, A549, SMMC-7721, MCF-7, SW480	9.73-30.56	

	<i>Aspergillus</i> <i>sp. GZWMJZ-</i> 258	Охріндол F (1)	Цитотоксичність	MV4-11, L-02	1.8	Wang, L. та ін. (2023)
		Аналоги (2-6)	Цитотоксичність	MV4-11, L-02	1.2-12	
		Похідні (7-14)	Цитотоксичність	MV4-11, L-02	0.14-1.3	
	<i>Aspergillus</i> <i>clavatonanicu</i> <i>s</i>	Аспергілоїди А–К (1-11)	Кардіоміоцитний захист	Кардіоміоцити H9C2	40	Jin, X. та ін. (2023)
		Конгенери (12-16)	Кардіоміоцитний захист	Кардіоміоцити H9C2	40	
Полікетиди	<i>Lasiodiplodia</i> <i>pseudotheobr</i> <i>omae</i>	Лазіодіплодіапірон А (1)	Протизапальна	LPS-індуковані клітини	4.8	Liang, Y. та ін. (2023)
		Лазіодіплодіапірон В (2)	Протизапальна	LPS-індуковані клітини	8.5	
		Преуссомерин В (3)	Протизапальна	LPS-індуковані клітини	5.9	
		Преуссомерин SA1 (4)	Протизапальна	LPS-індуковані клітини	12.8	

	<i>Aspergillus versicolor</i> SH0105	3,7-дигідрокси-1,9-диметилдибензофуран	Антимікробна, антиоксидантна	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 27154), <i>Aeromonas salmonicida</i> (ATCC 7965D)	13,7	Yang, L та ін. (2020)
		аспермутаруброл/віолацеол-I	антиоксидантна	DPPH, FRAP	34,1; 3,1 мкг/мл	Yang, L та ін. (2020)
Стероїди	<i>Aspergillus spectabilis</i>	Спектастерол С	Цитотоксичність	RAW264.7, SU-DHL-2 та HL60	19,3; 6,9 та 8,7	Wei, M та ін. (2023)
	<i>Ganoderma weberianum</i>	гановеберіанон D	Антималарійний, цитотоксичність	<i>P. falciparum</i> K1 (мультирезистентний штаб); Vero	0,057	Chinthano m, P та ін. (2023)
		ізогановеберіанон D	Антималарійний, цитотоксичність	<i>P. falciparum</i> K1 (мультирезистентний штаб); Vero	0,035	
	<i>Talaromyces adpressus</i>	ергостероїд 3	Цитотоксичність	SU-DHL-2	0,4	Zheng, M та ін. (2023)
ергостероїд 2-5		Цитотоксичність	PKO	13, 14, 9,2 та 11 відповідно		

		ергостероїд 7	імуносупресія	<i>B-лімфоцитів LPS</i>	8,6	
		офіцирсини E-G та L	Цитотоксичність	<i>HepG2</i>	20	Guo, X та ін. (2023)
		офіцирсини A-P	Цитотоксичність	<i>HT-1080</i>	20 (10% зменшення)	
		офіцирсини L та P	Антиоксидантна	<i>PC12</i>	20 (збільшення життє клітин від дії перексиду водню з 44,5% до 96,1%)	
	<i>Alternaria sp.</i>	Альтерстероїд C	Цитотоксичність	<i>A549, HCT116, MB49, MB49 CisR</i>	4,8–12,7	
Терпеноїди	<i>Penicillium sp.sb62.</i>	Пеніандроноїд А, ізопеніцину С	Противірусна	<i>груп А (H1N1)</i>	19 та 14 відповідно	Chang, J та ін. (2023)
		Пеніандроноїд С, Пеніандроноїд D, ізопеніцин А, ізопеніцин В	імуносупресія	<i>B-клітин LPS</i>	11, 8,8, 8,5 та 7,5 відповідно	

Спільне культивуван ня <i>Penicillium</i> <i>janthinellium</i> з <i>Paecilomyces</i> <i>formosus</i>	жантинелуміни А,В,С	Противірусна, цитотоксичність(про ти здорових клітин)	групу А штами <i>A/WSN/33 (H1N1)</i> та <i>A/Hong</i> <i>Kong/1/68 (H3N2)</i>	жантинелумін А - 3,8 для Н1Н1 та 13,3 для Н3Н2 жантинелумін В - 7,3 для Н1Н1 та 15,7 для Н3Н2 жантинелумін Г - 11,4 для Н1Н1 та 20,6 для Н3Н2 70,7, 132,4 та 134,7 відповідно	Сао, F та ін. (2023)
	жантинелуміни А–І, 13- дегідроксипаксилін, паспалін, еміндол SB, паспалітрем С	Інгібуюча активність	<i>PTP, PTP1B</i>	0,6-9,2	

		жантинелуміни В,D,E,I, шеаринін А, шеаринін Е, гідроксилшеаринін F, шеаринін F, шеаринін H, 7- α -гідроксипаксилін, 13-дегідроксипаксилін, паспалін, паспалітрем С	Інгібуюча активність	<i>TCPTP</i>	1,7-18,9	
		жантинелуміни А,В, шеаринін А, шеаринін Е, гідроксилшеаринін F, шеаринін F, шеаринін H, 13-дегідроксипаксилін, еміндол SB, паспалітрем С	Інгібуюча активність	<i>SHP1</i>	2,9-10,4	
		жантинелуміни А, H, 7- гідрокси-13- дегідроксипаксилін	антибактеріальна	<i>Vibrio anguillarum</i>	МІС: 12,5, 25,0 та 25,0 відповідно	

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Характеристика 6-пентил-альфа-пірону

6-пентил-альфа-пірон лактон із характерним солодким кокосовим ароматом, має шестичленне кільце, що містить атом кисню та карбонільну групу. На відміну від γ -піронів, де карбонільна група розташована в четвертій позиції відносно атома кисню в кільці, α -пірони (також звані 2-піронами) мають карбонільну групу в другій позиції, а 6-PP має пентил група, прикріплена до шостої позиції.

3.1.1. Фізико-хімічні властивості

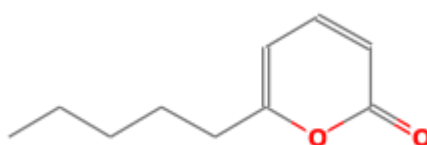


Рисунок 3.1. Хімічна структура

Формула: C₁₀H₁₄O₂

Молекулярна маса : 166,2170

Температура плавлення >230°C

Температура кипіння: 93 °C / 0,3 мм рт. ст.

Щільність: 1,004 г/мл при 25 °C (освітлення)

Форма: прозора рідина

Колір: Від безбарвного до коричневого

Запах: при 1,00% вмісті дипропіленгліколю. тонка(запах характерний для бобів тонка), лактоновий(молочні, вершкові, фруктові відтінки), кокосовий, креманий, жирний, восковий.

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андреев Б.В.				РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красинько В.О.						80	13
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

На даний момент немає жодного препарату на основі даної речовини оскільки вчені досі шукають можливості збільшення утворення даної сполуки без суттєвого збільшення ціни, хоч і на даний момент можна хімічно синтезувати бРР але це дуже важко та дорого. Наприклад, 1 г хімічно синтезованого бРР в Китаї коштує 800 доларів США. [CAS DataBase List]

3.1.2. Практичне використання бРР

бРР (Pyrone 6-pentyl-2Hpyran-2-one) який виділяється грибами роду *Trichoderma* може проявляти протигрибкову активність. Дана речовина пригнічує ріст та розвиток патогена *Cylindrocarpon destructans*. У статті (Jin et al. 2020) було продемонстровано що бРР проявив значну протигрибкову активність проти *C. destructans*, із середньою ефективною концентрацією (EC₅₀) 23,247 мкл/л, а обробка середовища PDA, бРР у концентрації 50 мкл/л зменшила ріст міцелію *C. destructans* приблизно на 60%. Також щоб перевірити, чи викликає бРР аутофагію у *C. destructans*, було проведено фарбування MDC, що є маркером аутофагосом.

- Гіфи, оброблені бРР, містили численні аутофагічні вакуолі, які випромінювали синю флуоресценцію, тоді як у контрольних зразках таких структур майже не було.
- Це вказує на масове утворення аутофагосом у клітинах *C. destructans* під впливом бРР.
- Аутофагосоми є ключовим етапом аутофагії (Takuo et al., 2019), що підтверджує, що бРР індукує аутофагію у *C. destructans*.

Загалом антифунгальний механізм являє собою:

- **Вплив на метаболізм амінокислот**

Тобто даний метаболіт може створювати дисбаланс амінокислот що може викликати загибель клітин. У результаті метаболомного аналізу було показано, що бРР значно знижував рівень амінокислот (аспарагіну, лізину, глутамінової кислоти, ізолеїцину, аспарагінової кислоти, орнітину), що пригнічувало біологічну активність *C. destructans*.

- **Пригнічення циклу трикарбонових кислот**

Під впливом бРР значно знижувалися рівні щавлевооцтової, бурштинової, лимонної та фумарової кислот.

- **Інгібування *ECHS1***

ECHS1 був визначений як ключовий ген, що регулює метаболічний баланс у *C. destructans*. бРР значно знижував експресію *ECHS1*, а також зв'язувався з білком *ECHS1*, утворюючи стабільний комплекс, що могло пригнічувати його активність.

Крім того було показано що бРР можна використовувати в післязбиральний сезон плодів лічі. Результати дослідження здатності бРР пригнічувати збудника лічі *Peronophythora litchii in vitro* показали дозозалежний ефект при якому зі збільшенням концентрації ріст міцелію, споруляція та проростання спор зменшувалися.

Через 7 днів після обробки ріст міцелію *P. litchii* був пригнічений на 25,28% при концентрації 0,02 г/л і на 89,76% при концентрації 0,15 г/л бРР (Рисунок 3А).

Концентрація бРР, яка інгібувала 50% росту міцелію (EC_{50}), становила 0,043 г/л. При концентрації $2,0 \times EC_{50}$ бРР повністю пригнічував споруляцію та проростання спор.

Ультраструктурний аналіз показав порушення органел, руйнування мітохондрій, потовщення клітинної стінки та руйнування мембран.

Основний механізм дії VOCs — руйнування клітинної стінки та мембран, що призводить до витоку внутрішньоклітинного вмісту та індукції окисного стресу.

Крім того було досліджено протигрибковий ефект леткого бРР для контролю післязбирального пероноспорозу лічі. Зі збільшенням концентрації бРР ступінь ураження зменшувався.

При застосуванні бРР у концентраціях $0,5 \times EC_{50}$ та $1 \times EC_{50}$ культури *P. litchii* утворювали темно-коричневі плями з білим міцелієм і спорангієносцями. При $1,5 \times EC_{50}$ білий міцелій і спорангієносці зникли з уражених ділянок.

Фрукти, оброблені бРР при $2,0 \times EC_{50}$, не мали жодних симптомів хвороби, а індекс ураження становив лише 7. Обробка фруктів контрольним препаратом ДММ у концентрації 0,25 г/л призвела до вищого індексу ураження (16,67) та нижчого ефекту контролю (82,27%).

Оцінювали показники потемніння та втрати маси плодів лічи протягом 8 днів при різних видах обробки: NCK, NP, PCK і PP. Індекс потемніння та рівень втрати маси плодів збільшувалися з часом у всіх варіантах обробки. Однак ці показники зростали повільніше у плодів, оброблених БРР, порівняно з необробленим контролем.

На 8-й день обробка РР призвела до індексу потемніння 0,58 та втрати маси плодів 2,19%, тоді як у РСК ці показники становили 0,93 та 4,49% відповідно. Також індекс потемніння та втрати маси були нижчими при обробці NP, ніж у NCK.

Ці результати свідчать про те, що БРР ефективно зменшує потемніння та втрату маси, спричинені післязбиральним пероноспорозом лічи, а також має консервувальний ефект на плоди лічи навіть за відсутності патогену

Отримані дані показують, що після 8 днів зберігання потемніння перикарпу та втрата червоного кольору у РСК досягли рівня, що свідчить про зниження комерційної цінності плодів. З іншого боку, плоди, оброблені БРР, залишалися візуально привабливими навіть через 8 днів зберігання. Xing et al. (2023). Також дана речовина здатна впливати на продукування афлатоксину В1 та проявляє протибактеріальну активність проти *S. aureus* ATCC 6538.

S. aureus ATCC 6538 реагував на БРР за концентрації 100 мкг/мл, демонструючи зону інгібування 9,0 мм. Значення МІС БРР проти цього бактеріального штаму також було знайдено за цією концентрацією, але значення МВС було більшим, становлячи 125 мкг/мл.

Хоча БРР продемонстрував негативну активність проти чотирьох штамів *S. albicans*, він показав значно більшу інгібуючу активність на нитчасті гриби, ніж на бактерії. БРР виявляв значну протигрибкову активність ($P \leq 0,05$) за високої концентрації, 100 мкг/мл, порівняно з іншими концентраціями (75–95 мкг/мл). Дані свідчать про те, що грибкові штами демонстрували різну чутливість до антимікробної активності БРР. *F. acuminatum* WAIR142 був найбільш чутливим штамом (діаметр зони інгібування 25,0 мм при 100 мкг БРР на мл), за ним йшов *A. flavus* AUMC 3943 (діаметр зони інгібування 23,0 мм при 100 мкг БРР на мл). *A. parasiticus* AUMC 3042 та *P. expansum* LC015096 реагували однаково (діаметр зони

інгібування 22,6 мм при 100 мкг БРР на мл). Зареєстроване значення МІС БРР проти цих грибкових штамів становило 80 мкг/мл. *A. flavus* AUMC 36, AUMC 4509, *P. vulpinum* СМ1, *A. parasiticus* AUMC 3944 та *A. alternata* WAIR133 показали помірну чутливість, і діаметри їх зон інгібування варіювалися від 18 до 20,6 мм при 100 мкг БРР на мл. МІС БРР проти цих штамів становив 80–85 мкг/мл. *A. flavus* AUMC 2446, ОС1 та *A. niger* ОС20 були менш чутливими до антибіотичної активності БРР (діаметр зони інгібування 15,0–15,3 мм при 100 мкг/мл), а МІС БРР становив 85–90 мкг/мл. Антимікробна сила БРР також була визначена за МФС, який становив 100–110 мкг/мл проти досліджуваних грибкових штамів.

SEM дослідження контрольних клітин показало, що бактерії виглядають як виноградоподібні скупчення, а клітини виглядають круглими та неушкодженими (рис. 3.1.2.1a). Після обробки БРР деякі бактерії мали набряк з пухирцеподібними структурами на зовнішній поверхні (рис. 3.1.2.1 b), а інші численні клітини мали клітинну дезорганізацію та були повністю лізовані (рис. 3.1.2.1 c,d).

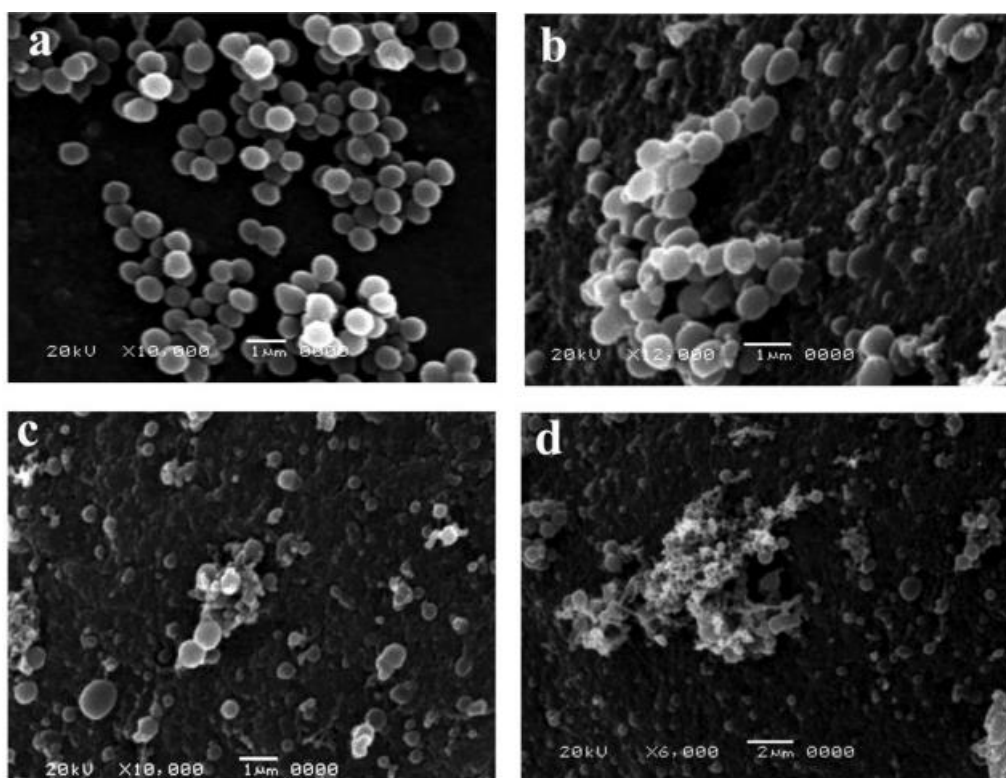


Рис. 3.1.2.1. Скануючі електронні фотомікрографії *Staphylococcus aureus*, вирощеного в поживному бульйоні з БРР (95 мкг/мл) та без нього протягом 24 годин інкубації за 35 °С. (a) Контрольні клітини, що демонструють виноградоподібні скупчення; (b) клітини, оброблені БРР, що демонструють набряк з пухирцеподібною структурою; (c,d) клітини, оброблені БРР, що демонструють

клітинну дезорганізацію та лізис. На всіх мікрофотографіях масштабна лінійка представляє 1 мкм, за винятком мікрофотографії (d), де масштабна лінійка представляє 2 мкм. (Ismail et al. 2017)

Вплив БРР на морфологію гіф трьох грибкових штамів (*A. flavus* AUMC 3943, *P. expansum* LC015096 та *F. acuminatum* WAIR142), досліджених за допомогою SEM. Контрольні гіфи трьох штамів, вирощені на агарі YES, виглядали однорідними, лінійними, з гладкими стінками. Крім того, контрольні гіфи *A. flavus* були тургорними, а гіфи *P. expansum* характеризувалися товстими кільцеподібними перегородками. Обробка гіф трьох грибкових штамів БРР показала серйозне пошкодження.

Вплив БРР на ріст та виробництво AFB1 штамами *A. flavus* та *A. parasiticus*

Афлатоксини — це клас канцерогенних мікотоксинів, що виробляються грибами *Aspergillus* і, як відомо, забруднюють значну частину світових запасів їжі. Афлатоксин В1 (AFB1) є найпотужнішою з цих сполук, і було добре охарактеризовано, що він призводить до розвитку гепатоцелюлярної карциноми (НСС) у людей і тварин.

Вплив різних концентрацій БРР (55–75 мкг/мл) на ріст та виробництво AFB1 сімома грибковими штамами *A. flavus* та *A. parasiticus*, вирощеними в бульйоні YES

Зокрема, зменшення як росту, так і виробництва AFB1 під впливом БРР залежало від дози, і два параметри (ріст та виробництво AFB1) не були взаємопов'язані між собою. За всіх випробуваних концентрацій БРР було отримано значне зниження рівнів AFB1 ($P \leq 0,05$) порівняно з контрольним варіантом (без БРР). За концентрації 75 мкг БРР на мл (вища концентрація БРР) MDW зменшувався в культурах *A. flavus* та *A. parasiticus* на 11,45–21,07%. Хоча *A. flavus* AUMC36 та *A. parasiticus* AUMC3944 показали негативну здатність продукувати AFB1, їх MDW зменшився на 11,45% та 17,03%, відповідно; після обробки їх культур 75 мкг БРР на мл. Результати показали що виробництво AFB1 *A. flavus* та *A. parasiticus* зменшилося на 8,84–21,18% після застосування нижчої концентрації БРР (55 мкг/мл). Відсоток зменшення AFB1 збільшився до 34,28–54,63% після застосування вищої концентрації БРР (75 мкг/мл). Інгібуючий ефект БРР на виробництво AFB1 був значним у культурах AUMC3943 та AUMC3042, фіксуючи

зменшення більше ніж на 50%. Ismaiel et al. (2017). Також було показано що бРР може інгібувати вірус тютюнової мозаїки. Протівірусну активність бРР проти *TMV* у тютюну оцінювали шляхом розрахунку швидкості інгібування та середнього індексу DS. Для аналізу активності бРР в індукції стійкості тютюну до інфекції *TMV*, бРР застосовували в різних концентраціях (10–50 мкг/мл). Симптоми захворювання з'являлися на листках тютюну через 7 та 14 днів після зараження *TMV* (рис. 3.1.2.2). Через 7 днів після зараження на рослинах тютюну спостерігалася важка мозаїчність та пухирі на листках. Ці симптоми зберігалися у рослин тютюну, оброблених *TMV* (ТІС), через 14 днів після зараження, де на листках також з'являвся некроз жилок (Рис. 3.1.2.2 б). Обробка бРР постійно індукувала значну зміну симптомів, особливо у старих рослин, де обробка бРР в концентраціях 10, 20 та 30 мкг/мл призводила до зміни симптомів з важкої мозаїчності та пухирів через 7 днів після зараження на легку мозаїчність та просвітлення через 14 днів (Рис. 3.1.2.2 с–е) порівняно з обробками ТІС (Рис. 3.1.2.2 б). При високих концентраціях бРР (40 та 50 мкг/мл) симптоми явно зникли через 7 та 14 днів після зараження (Рис. 3.1.2.2 f, g) до кінця експерименту (28 днів після зараження).

Швидкість інгібування *TMV* у рослин, оброблених бРР, порівняно з позитивним контролем рослин ТІС через 7 днів після зараження виявила значні відмінності ($F = 363$; $df = 5$; $P < 0,0001$). Рослини, оброблені бРР в концентраціях 10, 20 та 30 мкг/мл, демонстрували інфекції *TMV* приблизно на 90%, 80% та 40% нижчі, ніж у контрольних рослин, що свідчить про те, що бРР пригнічує симптоми захворювання. Обробка листків бРР у вищих концентраціях 40 та 50 мкг/мл досягла значного повного пригнічення захворювання *TMV* (100% пригнічення захворювання *TMV*).

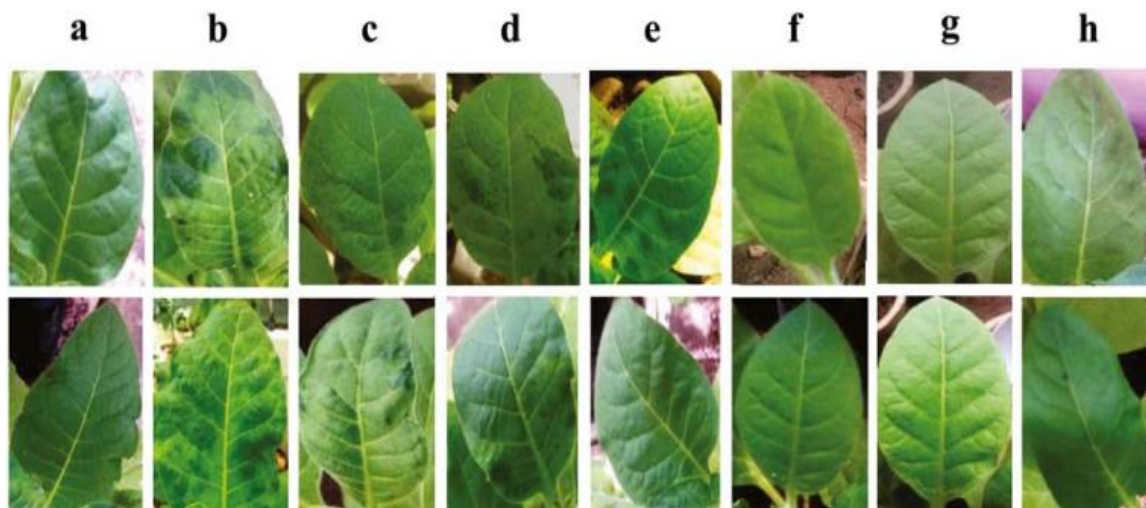


Рис. 3.1.2.2. Індукція стійкості листя тютюну до TMV за допомогою 6PP. П'ятий-сьомий листки від верхівки рослини (на стадії 8–10 листків) попередньо обробляли розчином 6PP шляхом розпилення за 4 дні до інокуляції TMV у другий-четвертий листки. Фотографії, що зображують симптоми хвороби, були зроблені через 7 днів після інокуляції (dpi) (листки у верхньому ряду) та через 14 днів після інокуляції (листки у нижньому ряду). а) Здоровий негативний контроль (НС, дистильована вода), б) Позитивний контроль TMV (ТІС), с) 10 мкг 6PP мл⁻¹, d) 20 мкг 6PP мл⁻¹, е) 30 мкг 6PP мл⁻¹, f) 40 мкг 6PP мл⁻¹, g) 50 мкг 6PP мл⁻¹, h) Здоровий негативний контроль, оброблений 50 мкг 6PP мл⁻¹ (ТС50). (Taha et al. 2021)

На основі вимірювань ELISA накопичення *TMV* після зараження вірусом через 7 днів після зараження, середні значення поглинання у контрольних та оброблених 6PP рослин виявили значні відмінності ($F = 483,97$; $df = 7$; $P < 0,0001$). Середні значення поглинання у рослин, оброблених 6PP в концентраціях 10, 20 та 30 мкг/мл, були значно нижчими, ніж у рослин ТІС, на 1,82, 2,03 та 3,95 відповідно. У рослин, оброблених 6PP в концентраціях 40 та 50 мкг/мл, середні значення поглинання були майже нульовими, що свідчить про безсимптомність, як і у здорових контрольних рослин (НС) (рослини, обприскані стерильною водою) та рослин ТС50 (контрольні рослини, оброблені лише 6PP в концентрації 50 мкг/мл).

Значні відмінності в індексах DS (Ступінь ураження) *TMV* були зареєстровані серед рослин тютюну, оброблених 6PP ($F = 259,85$; $df = 7$; $P < 0,0001$). Після застосування 6PP в концентраціях 10, 20 та 30 мкг/мл до рослин тютюну, індекси DS *TMV* були значно знижені до 78%, 66% та 24% порівняно з індексом DS позитивного контролю рослин тютюну (ТІС), який становив 96%. Застосування 6PP до рослин тютюну в концентраціях 40 та 50 мкг/мл призвело до 0,0% індексу DS, як і у здорових контрольних рослин (НС та ТС50). Крім того у всіх оброблених

БРР листках спостерігалось різке збільшення концентрації проліну порівняно з контрольними обробками (НС, ТІС і ТС50). Порівняно з листям ТІС, концентрація проліну збільшилася в 1,9 і 2,04 рази при застосуванні БРР у концентраціях 40 і 50 мкг мл⁻¹ у листі, інокульованому ТМV, відповідно. Дані також вказали на незначне збільшення концентрації проліну в листі ТС50 порівняно з листям ТІС. Тим часом листя НС накопичило менше проліну, ніж листя ТІС і ТС50.

Результати цього дослідження показали, що БРР є ефективним метаболітом для захисту рослини тютюну від ТМV, що проявлялося у придушенні симптомів захворювання і, отже, зменшенні тяжкості захворювання. Захисна реакція рослини була очевидною та значною, досягаючи ефективності біоконтролю 100% при високих концентраціях БРР (40 та 50 мкг/мл). Таһа et al. (2021)

Крім противірусної, протигрибкої активності б-пентил-а-пірон здатен проявляти потибіоплівкову активність. Було показано що БРР у концентрації 0,001 мкг/мл руйнував біоплівку приблизно на 70%. ДМСО (використаний як розчинник БРР у концентрації 0,1%) не заважав цілісності біоплівки.

Аналіз CLSM підтвердив результати, отримані за допомогою кристалічного фіолетового тесту. Як показано на рисунку 4, БРР (0,001 мкг/мл) і фаг при окремому застосуванні спричинили невелике зменшення маси біоплівки. Однак, коли БРР комбінували з фагом і НА, спостерігалось послідовне зниження утворення біоплівки. Papatanni et al. (2020).

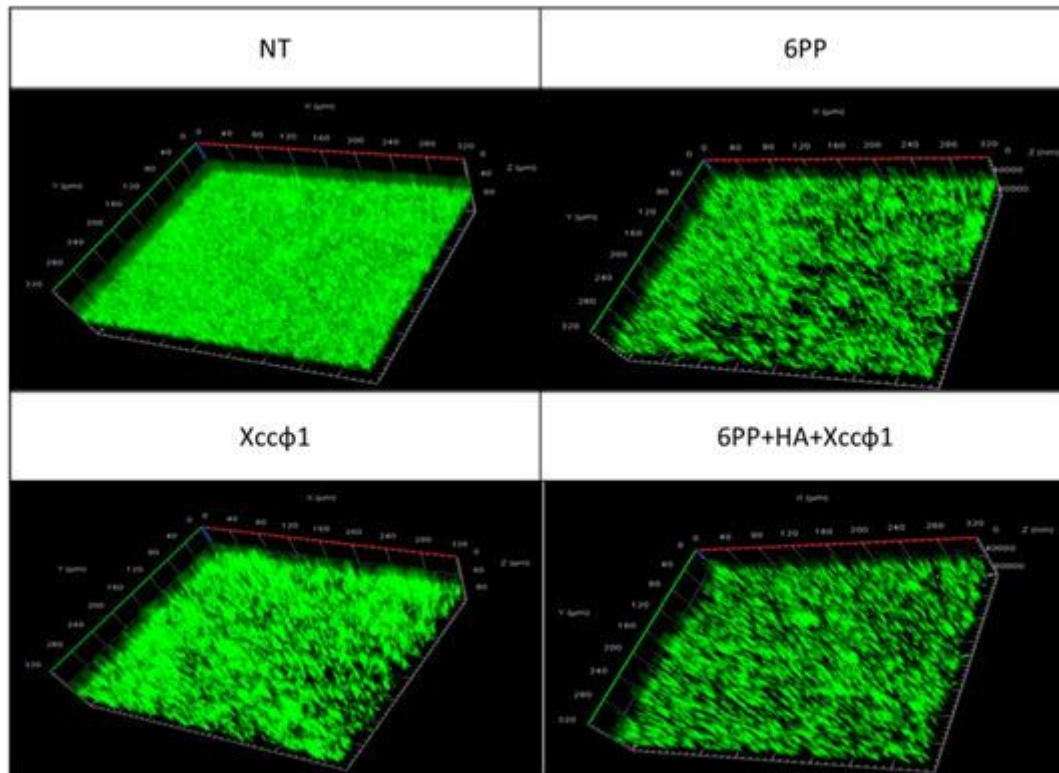


Рисунок 3.1.2.3. Спостереження за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії (CLSM) за формуванням біоплівки *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* в статичних умовах. Обробки були свіжим середовищем, без обробки (NT); 6-пентил- α -пірон (6PP, 0,001 мкг/мл); *Xanthomonas campestris* pv. фаг *campestris* (Xcc ϕ 1); і комплекс 6PP, гідроксиапатит (НА) плюс Xcc ϕ 1. Аналіз біоплівки проводили на зрілій біоплівці після 72 годин інкубації при 24 °С. Тривимірна структура біоплівки була продемонстрована за допомогою набору LIVE/DEAD Biofilm Viability. (Papaiani et al. 2020)

Також 6PP впливає на ріст саджанців *Arabidopsis*. Дослідження показало що 6-PP при концентраціях 50 і 100 мкМ ріст коренів і пагонів розсади та розгалуження коренів збільшувалися та при концентрації 150 мкМ зменшувала ріст первинного кореня, але сильно сприяла розвитку бокового кореня. Крім того 6-PP зменшувало флуоресценцію GFP у судинному пучку і кінчику кореня. Esparza-Reynoso et al. (2021).

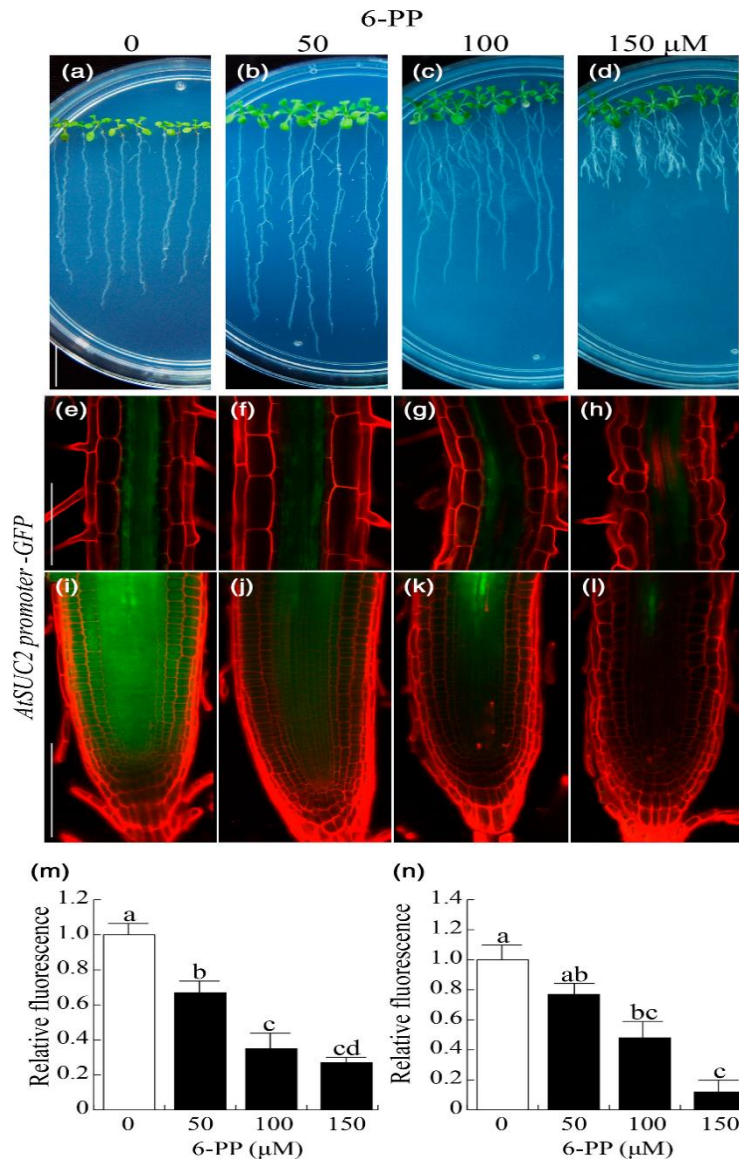


Рис. 3.1.2.4. Вплив 6-PP на ріст і експресію AtSUC2-GFP у саджанців *Arabidopsis*. Трансгенні саджанці, що експресують AtSUC2-GFP, вирощували в середовищі 0,2x MS з додаванням розчинника або 50, 100 і 150 мкМ 6-PP. Через 8 днів після проростання сіянці фарбували PI та аналізували за допомогою конфокальної мікроскопії. Репрезентативні фотографії показують вплив 6-PP на архітектуру кореневої системи та загальний ріст саджанців (a–d). Мікрофотографії судинного пучка в зоні диференціювання первинного кореня (eh) і верхівки кореня (i–l), що експресує AtSUC2-GFP. Гістограми ілюструють відмінності, оцінені як відносна інтенсивність флуоресценції в судинному пучку (m) і верхівці кореня (n), відповідно. Наведені значення представляють середні значення для 6 саджанців ± стандартне відхилення. Різні літери вказують на значні статистичні відмінності ($p < 0,05$). Масштабна шкала: 1 см і 100 мкм відповідно. Експеримент повторювали двічі з порівняними результатами (Esparza-Reynoso et al. 2021)

Окрім *Arabidopsis* було показано можливість використання 6PP для профілактики та боротьби з *Fusarium oxysporum* HF-26 в умовах гідропонічного вирощування. У дослідженні було показано що додавання 6PP в концентрації 25

мг/л до поживного розчину для вирощування томатів показало значний вплив на *Fusarium oxysporum* HF-26 інгібуючи 66% міцелію та впливаючи на ріст та формування гіф, а також зміг значно зменшити вміст фузаринової кислоти в порівнянні з контролем (у контролі було 0,4 мкг/мл, при застосуванні бРР – 0,25 мкг/мл) НАО et al. (2023).

Також крім вище зазначених властивостей дану речовину використовують в харчовій промисловості як ароматизатор кокосового запаху, бРР внесений до «Виконавчого регламенту Комісії (ЄС) № 872/2012 від 1 жовтня 2012 року про затвердження переліку ароматичних речовин, передбачених Регламентом Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 2232/96, його внесення до Додатку I до Регламенту Європейського Парламенту та Ради (ЄС) № 1334/2008». Також має ліцензію від Міжнародної асоціація парфумерії, 2007-2021. National Center for Biotechnology Information (2025).

3.2 Розрахунок річної потужності виробництва

Потреба в бРР зумовлена потребою перейти від забруднюючих навколишнє середовище хімічних речовин до повністю безпечних біопрепаратів. Крім того в Україні та у всьому світі стрімко розвиваються тепличні та безґрунтові системи вирощування сільськогосподарських культур які можуть вирощувати рослини в незалежності від кліматичних умов, але дані рослини все одно піддаються впливу шкідників та патогенів які призводять до втрат врожаю, тому дані підприємства використовують хімічні речовини якраз бРР може бути заміником карбенозиму який зараз широко використовується в сільському господарстві для боротьби та профілактики *Fusarium oxysporum*.

В Україні існує декілька тепличних підприємств які займаються тепличним та гідропонічним вирощуванням томатів та інших культур.

На ПрАТ «Комбінат «Тепличний» має 25 га теплиць які вирощують помідори на гідропонічній системі. Я пропоную покривати 0,5% (1250 м²) від загальної площі. Хареба (2021).

Концентрація в поживному розчині БРР: 25 мл/л

Площа 1250 м² на цій площі для найкращого освітлення та вентиляції зачасту використовують розсадку 2,5 рослини на м²:

$$2,5 * 1250 = 3125 \text{ рослин}$$

Для вирощування такої кількості рослин потрібно поживного розчину:

$$3125 * 225 = 703125 \text{ л}$$

Для приготування такої кількості розчину потрібно чистого БРР:

$$703125 * 0,025 = 17578 = 17,5 \text{ л}$$

Оскільки концентрація в культуральній рідині (КР) 1 г/л нам потрібно 17,5 м³ КР без врахування втрат.

З урахуванням втрат цільового продукту при виділенні (9%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$17,5 / (1 - 0,09) = 19,23 \text{ м}^3$$

Приймаємо кількість трудоднів – 100, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 19,23 / 120 = 0,1923 \text{ м}^3$$

$$\text{Кількість } V_{\text{цк}} = (K_1 * V_d * T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 * 0,1923 * 658) / 24 = 5,8 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

$$V_{\text{Г}} = V_{\text{цк}} / K_3 = 5,8 / 0,6 = 9,67 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, найближчим продукту за цикл буде становити:

$$\text{за геометричним об'ємом є ферментер } V_{\text{ф}} = 10 \text{ м}^3$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 5,8 / 10 = 0,58 \text{ – не перевищує заданого значення}$$

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання біотехнологічного продукту

Подальшим етапом виробничого біосинтезу є післяферментаційні процеси, які передбачають стадії виділення та очищення цільового продукту. Зазвичай процес виділення та очищення обирають з врахуванням основних характеристик цільового процесу, об'єму культуральної рідини, та необхідної чистоти кінцевого продукту. Так наприклад на сьогодні відомо декілька методів виділення та очищення 6-пентил- α -пірону, серед яких виділення даного продукту з культуральної рідини шляхом первапорації фільтрату з подальшою конденсацією продукту Bengtson et al. (1992), а також екстракція органічним розчинником з подальшим очищенням за допомогою колонки флеш-хроматографії з стаціонарною фазою у вигляді силікагелю Cerracchio et al. (2024), Kalyani et al. (2000), Staropoli et al. (2023), Vinale et al. (2008).

Перша методика має перевагу у вигляді малої кількості етапів виділення та очищення цільового продукту, однак наявна кількість інформації по даній технології мала що не дозволяє точно визначити доцільність цього методу, а також в даній технології необхідно використовувати специфічні мембрани для первапорації 6-пентил- α -пірону, які є дорогі, та потребуватимуть постійної заміни.

Другий метод використовує значно більше стадій, однак реагенти які використовуються в даній технології після застосовуються можна відновлювати що робить дану методику більш дешевою та в свою чергу більш привабливою.

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Андреев Б.В.			РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О..					93	23
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Підсумовуючи переваги та недоліки вищенаведених методів виділення та очищення 6-пентил- α -пірону, найкращим варіантом для виділення та очищення цільового продукту буде використання методу з екстракцією органічним розчинником та очищенням за допомогою колонки флеш-хроматографії з стаціонарною фазою у вигляді силікагелю, однак враховуючи що використання цільового продукту відбуватиметься в сільському господарстві, дану методику можна модифікувати та прибрати стадію очищення за допомогою колонки флеш-хроматографії, так як отримана чистота продукту після екстракцію повністю задовольнить передбачувану галузь використання. Отже, процес очистки 6-пентил- α -пірону перебає наявність наступних стадій:

1. Видалення клітин біологічного агента (центрифугування/фільтрування)
2. Екстрагування цільового продукту органічним розчинником
3. Зневодення екстракту
4. Концентрування зневодненого екстракту

Розглянемо більш детально зазначені стадії та визначимо оптимальні технології для їх ефективного впровадження в промисловому виробництві.

4.1.1. Видалення біомаси *Trichoderma viride*

В результаті одного ферментаційного циклу отримують 5,8 м³ культуральної рідини, в якій знаходиться біомаса *Trichoderma viride* ІМВ TV 4.89 невикористанні залишки поживного середовища та продукти життєдіяльності даного біологічного агента, серед яких знаходиться цільовий продукт біосинтезу, а саме 6-пентил- α -пірон. З огляду на той факт, що 6-пентил- α -пірон є вторинним метаболітом, який в процесі біосинтезу виділяється з клітини в культуральну рідину (даний продукт є екзометаболітом), на першому етапі виділення цільового продукту доцільно прибрати непотрібно біомасу *T. viride* ІМВ TV 4.89, що в подальшому дозволить полегшити процес виділення 6-пентил- α -пірону, з цією метою можна використовувати фільтрування або центрифугування, розглянемо переваги та недоліки даних методів.

Фільтрування передбачає пропускання рідкої культури через пористий бар'єр, який затримує тверді матеріали. Цей метод є більш доступним і краще підходить для масштабування, однак він може працювати повільніше через забивання пор мембрани, а також він не справляється з дуже дрібними частинками або густими, в'язкими розчинами.

Центрифугування передбачає використання високої швидкості для осадження твердих частинок в рідині. Це забезпечує швидке та ефективне розділення, але при цьому вимагає значних витрат енергії та постійного обслуговування обладнання.

З огляду на статті в яких відбувалось виділення та очищення 6-пентил- α -пірону Cerracchio et al. (2024), Kalyani et al. (2000), Staropoli et al. (2023), Vinale et al. (2008) процес видалення біомаси відбувався фільтруванням, однак в зазначених статтях використовується невеликий об'єм культуральної рідини (до 5 л), а враховуючи що в нашому випадку використовується значно більший об'єм культуральної рідини, використання даного способу є неефективним через постійне забивання пор фільтрувальної мембрани, що негативно впливатиме на процес фільтрування, тому з огляду на зазначену інформацію для видалення біомаси *T. viride* IMB TV 4.89 доцільно використовувати центрифугування, так як при використанні даного способу процес видалення клітин відбуватиметься значно швидше та стабільніше.

Отже, на першому етапі виділення та очищення 6-пентил- α -пірону, для видалення біомаси з культуральної рідини використовується центрифугування. Процес виглядатиме наступним чином, культуральну рідину направлятимуть в центрифугу де відбуватиметься осадження біомаси впродовж 15 хв при 5000 об/хв, отриманий супернатант направляють на подальші стадії, а осаджену біомасу направляють на знешкодження.

4.1.2. Виділення 6-пентил- α -пірону

В отриманому безклітинному супернатанті знаходяться продукти життєдіяльності *T. viride* IMB TV 4.89 серед яких 6-пентил- α -пірон та невикористанні залишки поживного середовища, для подальшого виділення

цільового продукту з супернатанту необхідно врахувати його фізико-хімічні властивості. 6-Пентил- α -пірон є мало розчинним у воді та добре розчинним в органічних розчинниках [Sumitquimica.com], з огляду на дану інформацію можна зробити висновок що подальшим етапом виділення даного продукту доцільно проводити шляхом екстракції його органічним розчинником.

В більшості статей Cerracchio et al. (2024), Staropoli et al. (2023), Vinale et al. (2008), Esquivel-Naranjo et al. (2024) під час екстракції 6-пентил- α -пірону використовують етилацетат, однак також зустрічається дихлорметан Kalyani et al. (2000). Враховуючи що зазначені органічні розчинники однаково ефективно справляються з екстракцією цільового продукту, для вибору оптимально екстрагента будемо обрати найдешевший. З огляду на зазначений критерій порівняння найкращим варіантом буде використання етилацетат, так як його вартість приблизно 70 грн/л (prom.ua), а вартість дихлорметану 115 грн/л (tdph.com).

Підсумовуючи вищенаведену інформацію, процес виділення 6-пентил- α -пірону з супернатанту відбуватиметься шляхом екстракції етилацетатом, та виглядатиме аналогічно як описано в статті Esquivel-Naranjo et al. (2024), до супернатанту додають етилацетат в співвідношенні 1 до 1, та перемішують, враховуючи що даний метод розписано для лабораторних умов та швидкість перемішування надто висока (3400 об/хв), в промислових масштабах можна провести перемішування на значно менших обертах (20 об/хв) однак для інтенсифікації процесу доцільно трохи підігріти розчин (40 °C). В подальшому розчин залишають в спокої для відстоювання, щоб розчин розподілився на дві фази, водну та органічну. Так як 6-пентил- α -пірон добре розчинний в етилацетаті передбачається що весь продукт знаходитиметься в верхній (органічній) фазі, однак враховуючи що якась частина продукту може не перейти в органічну фазу доцільно отриману водну фазу відправити на повторну екстракцію для мінімізації втрати цільового продукту. Тому після першої екстракції водну фазу направляють в реактор де відбувається зберігання до подальшого використання в повторній

екстракції, а органічну фазу направляють на подальшу стадію виділення та очищення цільового продукту.

4.1.3. Зневоднення екстракту 6-пентил- α -пірону

Отриманий екстракт містить залишковий вміст води, в статті Obana et al. (2001) зазначається що в етилацетатці після розділення фаз залишається приблизно 20-30 мг/мл води, враховуючи що в подальшому відбуватиметься концентрування екстракту наявність води в розчині може зменшити ефективність процесу, або навіть вплинути на стабільність продукту, тому необхідним етапом є видалення залишкової води. Так наприклад в статтях Cerracchio et al. (2024), Kalyani et al. (2000), Staropoli et al. (2023), Vinale et al. (2006) з цією метою використовували безводний сульфат натрію. Так як в даних статтях не зазначається яка кількість солі використовується можна провести розрахунок теоретичної кількості солі необхідної для видалення води: 1 моль безводного сульфату натрію може акумулювати 10 моль води, тобто 142 г сульфату натрію акумулює 180 г води, тоді 1 г сульфату натрію може акумулювати $180/142 =$ приблизно 1,27 г води. Однак під час висолювання в розчин вносять надлишок щоб повністю видалити вологу, тому доцільно під час зневоднення вносити в 10 разів більшу кількість солі, тобто на 1,27 г води використовували 10 г солі.

Після екстракції отримують приблизно 6,9 м³ органічної фази, в якій знаходиться $6,9 \text{ м}^3 * 20 \text{ кг/м}^3 = 138 \text{ кг}$ води, з огляду на раніше розраховану концентрацію солі для видалення води на 1,27 г води 10 г сульфату натрію, для видалення 138 кг води необхідно приблизно $138 / 1,27 * 10 = 1\ 100 \text{ кг}$ сульфату натрію.

Так як сульфат натрію нерозчинний в органічних розчинниках, а в нашому випадку органічна фаза складається з етилацетату, дана сіль після поглинання води в розчині буде знаходитись в кристалічній формі, з огляду на зазначений факт необхідно передбачити видалення сформованого осаду. Для видалення осаду сульфату натрію можна використати раніше розглянуті методи під час видалення біомаси (фільтрування або центрифугування), а враховуючи що в нашому випадку на першому етапі використовується центрифугування то і на дану стадію доцільно

обрати даний метод так як це дозволить зменшити економічні витрати на закупівлю різного обладнання.

Отже, підсумовуючи вище наведену інформацію, процес зневоднення екстракту виглядатиме наступним чином: в реактор до екстракту додають безводний сульфат натрію, та ретельно перемішують (50 об/хв) впродовж декількох годин, в подальшому за допомогою перистальтичного насоса отриманий розчин направляють до центрифуги де відбувається осадження сульфату натрію впродовж 15 хв при 5000 об/хв. Отриманий супернатант направляють на подальші стадії очищення цільового продукту, а отриманий осад сульфату натрію можна відновити шляхом нагрівання що в подальшому дозволить зменшити економічні витрати на повторну закупівлю даної солі.

4.1.4. Концентрування зневодненого екстракту

В отриманому супернатанті, основна частка розчину припадає на етилацетат, який використовували під час екстракції цільового продукту, враховуючи що в даному розчині вже знаходиться наш цільовий продукт з задовільним ступенем чистоти в подальшому доцільно провести концентрування розчину для виділення цільового продукту та його подальшого пакування.

Для концентрування можна використовувати ультрафільтрацію та випаровування, розглянемо переваги та недоліки даних методів.

Ультрафільтрація дозволяє проводити концентрування за низьких температур, шляхом селективного видалення розчину через фільтраційну мембрану, що дозволяє використовувати цей метод для роботи з термолабільними компонентами, але використання даного методу є обмеженим через поступове забруднення фільтрувальних мембран та необхідність високого тиску.

Випаровування концентрує розчин за рахунок нагрівання розчину до температури випаровування розчинника, забезпечуючи високу ефективність для великих об'ємів, однак даний метод не підходить для термолабільних компонентів.

Згідно фізико-хімічних властивостей 6-пентил- α -пірону по відношенню до температури (його температура кипіння становить 285 – 286 °C) даний компонент є термостабільним (hmdb.ca), а також враховуючи що в розглянутих статтях

виділення та очищення цільового продукту (Cerracchio et al. 2024, Vinale et al. 2006), для концентрування в основному використовується вакуум-випаровування, і враховуючи що необхідно прибрати велику кількість етилацетату, який має невелику температуру кипіння (приблизно 77 °С), даний метод є оптимальним так як він дозволить більшу частину випареного етилацетату в подальшому відновити шляхом конденсації, що дозволить його повторно використовувати під час екстракції цільового продукту, що в свою чергу призводить до менших економічних витрат на закупівлю органічного розчинника.

Процес концентрування виглядатиме наступним чином, зневоднений екстракт направляють в вакуум-випару установку де відбувається концентрування при 37 °С та 0,02 МПа шляхом випаровування етилацетату. Отриманий концентрат (6-пентил- α -пірон) направляють на подальшу стадію.

4.1.5. Пакування 6-пентил- α -пірону

З огляду на невеликий обсяг виробництва 6-пентил- α -пірону, до 4 літрів, фасування рідкого продукту можна ефективно здійснювати вручну за допомогою настільного поршневого дозатора рідини (prom.ua), який забезпечує точне, чисте і рівномірне наповнення індивідуальних емностей. Для пакування доцільно використовувати чорні ПЕТ-пляшки об'ємом 1 л, які мають достатню хімічну стійкість і захищають продукт від деградації внаслідок потрапляння світла.

Після наповнення кожна пляшка повинна бути надійно закупорена та промаркована з необхідною інформацією, включаючи назву продукту, номер партії, об'єм наповнення, дату виготовлення, термін придатності та рекомендації щодо зберігання. Герметично закриті упаковки зберігають у прохолодному, сухому і темному місці, бажано при кімнатній температурі або трохи нижче, щоб зберегти високу стабільність хімічних властивостей і якість кінцевого продукту.

4.2. Обґрунтування вибору форми та упаковки 6-пентил-альфа-пірону

4.2.1. Обґрунтування форми випуску

Вибір форми випуску препарату на основі 6-пентил- α -пірону (6-PP) як рідкого концентрату обумовлений його фізико-хімічними властивостями та вимогами до стабільності під час зберігання й транспортування. 6-PP є леткою органічною сполукою з відносно низькою температурою кипіння та помірною стабільністю при кімнатних температурах, що робить рідку форму більш технологічно доцільною для збереження активності сполуки протягом тривалого часу Kikuchi et al. (1974), Kalyani et al. (2000) .

Практичні дослідження з використання 6-PP у сільському господарстві показують ефективність саме рідких форм препарату Nao et al. (2023). З технологічної точки зору, виготовлення рідкого концентрату не потребує додаткових етапів, таких як сушіння, грануляція або мікрокапсулювання, що істотно зменшує собівартість кінцевого продукту та спрощує технологічний процес Kalyani et al. (2000), Nao et al. (2023).

Мікрокапсульовані форми летких органічних сполук можуть забезпечувати захист від зовнішніх факторів і контрольоване вивільнення активної речовини Szpicer et al. (2025), проте цей підхід є більш складним і дорогим, потребує додаткового обладнання та матеріалів, що робить його менш доцільним для масового промислового застосування 6-PP.

Таким чином, вибір рідкого концентрату як форми випуску 6-пентил- α -пірону обґрунтовується його леткими властивостями, потребою у стабільності під час зберігання, зниженням виробничих витрат та зручністю практичного використання в агропромислових системах, при цьому мікрокапсулювання може розглядатися як опціональний метод для спеціалізованих випадків, де важливе контрольоване вивільнення.

4.2.2 Обґрунтування вибору пакування

Оскільки обсяг випуску 6-пентил- α -пірону відносно невеликий (приблизно 5,3 л), процес пакування можна здійснювати вручну, без використання автоматизованих ліній розливу. Настільний поршневий дозатор рідини [prom.ua] є оптимальним вибором для таких виробничих обсягів, оскільки він забезпечує точне дозування та чітке наповнення що дозволяє досягти стабільної якості у всіх тарах, при цьому зменшуючи витрати на дороговартісне обладнання та спрощуючи експлуатацію. Втім, перш ніж детально розглядати процес наповнення, необхідно вибрати найбільш підходящий тип пакувальної тари.

Для рідких продуктів, таких як 6-пентил- α -пірон, найбільш оптимальними варіантами є скляні та пластикові пляшки. Скло традиційно вважається інертним пакувальним матеріалом з чудовою хімічною стійкістю та газонепроникними властивостями. Воно забезпечує довготривалу стабільність, є непроникним для кисню та забезпечує чудовий захист від міграції або взаємодії між продуктом та тарою. Особливо бурштинове скло захищає вміст тари від світла, що є надзвичайно важливим для сполук, які руйнуються під впливом ультрафіолетового випромінювання. Незважаючи на зазначені переваги, скло має також і суттєві недоліки в цьому застосуванні. Воно є важким та крихким, а отже, є більш складним в обслуговуванні та транспортуванні, особливо в виробничих умовах, де важливе значення має безпечне обслуговування. Вартість за одну одиницю тари з скла також значно вища, ніж у пластикових пляшок, і з огляду на невеликий обсяг виробництва, ці додаткові витрати не принесуть пропорційних переваг.

На відміну від скляних пляшок, пляшки з ПЕТ поєднують в собі достатню хімічну стійкість, легку вагу, механічну міцність і легкість у використанні. ПЕТ має низьку проникність для газів, що зменшує ризик окислювальної деградації, та сумісний з лактонами, такими як 6-пентил- α -пірон. При фарбуванні в чорний колір ПЕТ забезпечує ефективний захист від світла, запобігаючи фотодеградації та сприяючи збереженню стабільності продукту. Крім того, ПЕТ є ударостійким, що зменшує ризик розбиття у порівнянні зі склом, а також він легко піддається

переробці. Значно нижча вартість ПЕТ-пляшок порівняно зі склом робить їх більш економічно вигідними, особливо при поточному невеликому об'ємі виробництва цільового продукту. Разом взяті представлені аргументи демонструють, що, хоча скло має сильні бар'єрні властивості, пляшки з ПЕТ забезпечують більш збалансоване рішення, надаючи відповідний захист у поєднанні з безпекою, комфортом та економічною ефективністю. З огляду на це, чорні ПЕТ-пляшки є найбільш підходящим варіантом для пакування 6-пентил- α -пірону.

Обравши матеріал, слід також врахувати розмір пакування. Загальний об'єм партії приблизно 5,3 л, його фактично можна розфасувати в п'ять 1 л пляшок, з зберіганням залишку та додаванням його до іншої партії. Даний механізм спрощує процес розливу, зменшує кількість необхідних операцій і мінімізує ризик проливання під час наповнення або помилок у дозуванні.

Крім того, вибір об'єму тари напряму пов'язаний із реальними потребами гідропонного виробництва. Відповідно до проведених розрахунків для теплиці площею 1250 м² при щільності висадки 2,5 рослини/м² (3125 рослин) та робочій концентрації 6-пентил- α -пірону 25 мг/л, загальний об'єм поживного розчину становить у середньому 40 000 л. Для підтримання цієї концентрації потрібно близько 1 л 6-пентил- α -пірону на один цикл заміни розчину, що орієнтовно відповідає обсягам внесення раз на 2–4 тижні. Такий режим роботи добре узгоджується з фасуванням у 1 л пляшки, оскільки це дозволяє гнучко дозувати препарат, а також точно розподіляти його на різні ділянки теплиці.

Пропонована 1 л ємність дозволяє зберігати та дозувати продукт відповідно до фактичного використання, усуваючи неефективність відкривання та використання великої кількості маленьких упаковок. Отже, 1 л об'єм тари забезпечує оптимальний баланс між експлуатаційною ефективністю, зручністю для користувача та реальним застосуванням у гідропонних системах.

Враховуючи вищезазначене, з розглянутих властивостей матеріалів, особливостей використання цільового продукту та економічних факторів можна

зробити висновок, що для пакування 6-пентил- α -пірону найкраще підходять чорні 1 л ПЕТ-пляшки. Такий вибір забезпечує належний захист продукту від світла та окислення, характеризується надійністю та зручністю використання, а також відрізняється доступною вартістю у порівнянні з альтернативними матеріалами, що робить його економічно доцільним при невеликих обсягах виробництва.

4.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Визначившись з стадіями технологічного процесу виділення та очищення 6-пентил- α -пірону, проведемо вибір технологічного обладнання необхідного для даних стадій, який наведено в табл. 4.1.

Вихідні дані:

Об'єм культуральної рідини за один цикл ферментації = 5,8 м³.

Концентрація 6-пентил- α -пірону в культуральній рідині = 1 г/л

Концентрація біомаси в культуральній рідині = 11,4 г/л

Вихід 6-пентил- α -пірону після стадій виділення та очищення =
 $= 5,8 \text{ м}^3 * 1 \text{ г/л} - 9 \% = 5,278 \text{ к}$

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях виділення та очищення 6-пентил- α -пірону

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ДР 1. Зберігання культуральної рідини						
1	ДР 1.1. Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	5,8 м ³		5,8 м ³	Реактор об'ємом 8 м ³
ТП 2. Видалення біомаси						
2	ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	5,8 м ³			Центрифуга з продуктивністю до 8 м ³ /год
		Біомаса	661 л (5,8 м ³ * 11,4 / 0,1)			
		Супернатант	5 139 л (5 800 – 661)	257 л (5 %)	4 882 л (5 139 – 257)	
ТП 3. Виділення 6-пентил-α-пірону						
3	ТП 3.1. Екстракція 6-пентил- α -пірону	Супернатант	4 882 л			Екстрактор об'ємом 10 м ³
		Етилацетат	4 882 л			
		Розчин	9,76 м ³ (4 882 л + 4 882 л)			
		Водна фаза	4,9 м ³			
		Екстракт I (Органічна фаза)	4,86 м ³	243 л (5 %)	4 617 л (4 860 – 243)	
4	ТП 3.2. Екстракція 6-пентил- α -пірону з водної фази	Водна фаза	4,9 м ³			Екстрактор об'ємом 10 м ³
		Етилацетат	2,45 м ³			
		Розчин	7,35 м ³ (4,9 м ³ + 2,45 м ³)			
		Водна фаза	4,95 м ³			
		Екстракт II (Органічна фаза)	2,4 м ³	120 л (5 %)	2 280 л (2 400 – 120)	

Завершення табл. 4.1

5	ТП 3.3. Зневоднення екстракту	Екстракт І	4 617 л			Реактор об'ємом 10 м ³
		Екстракт ІІ	2 280 л			
		Безводний сульфат натрію	1 100 кг			
		Розчин	8,0 м ³			Центрифуга з продуктивністю до 8 м ³ /год
		Осад	1,25 м ³			
	Супернатант	6 750 л (8 м ³ – 1,25 м ³)	270 л (4 %)	6 480 л (6 750 – 270)		
6	ТП 3.4. Концентрування екстракту	Супернатант	6 480 л			Вакуум-випарна установка, з продуктивністю по випареній волозі 2,2 т/год
		Випарений етилацетат	6 474 л			
		Концентрат	5,5 л	0,22 л (4 %)	5,28 л (5,5 – 0,22)	
ПМВ 6. Пакування та маркування						
7	ПМВ 4.1. Пакування та маркування 6-пентил- α -пірону	6-пентил- α -пірон	5,28 кг			Настільний поршневий дозатор рідин, з продуктивністю до 15 уп/хв
		Пляшки	1 шт			
		Кришки	1 шт			
		Фасований 6-пентил- α -пірон			5,28 / 5 л = 1 шт	

4.4. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання необхідного для виділення та очищення 6-пентил- α -пірон після виробничого біосинтезу наведено в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
P-1	Реактор	1	Реактор NWHM-F-8000L, об'ємом 8м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений перемішуючим пристроєм (до 65 об/хв), розміри 4600*3500*4800 мм [2]
H-2 H-5 H-11	Насос відцентровий	3	Насос відцентровий Leo, з продуктивністю 11,4 м ³ /год [11]
Ц-3	Центрифуга	1	Центрифуга LW360×1200, з продуктивністю до 8 м ³ /год, швидкість обертання 3500 об/хв, розміри 2600×1500×850 мм [5]
E-4	Екстрактор	1	Екстрактор TQ_Z об'ємом 10 м ³ , вироблений на замовлення з нержавіючої сталі [4]
P-6	Реактор	1	Реактор об'ємом 5 м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі оснащений перемішуючим пристроєм (до 60 об/хв), розміри 1800*2000 мм [3]
H-7	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Leo, з продуктивністю 5,4 м ³ /год [9]
P-8	Реактор	1	Реактор FYG, об'ємом 10 м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений перемішуючим пристроєм [1]
H-9	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний HD10, з продуктивністю до 18 м ³ /год [13]
P-10	Реактор	1	Реактор об'ємом 8 м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі оснащений перемішуючим пристроєм (до 60 об/хв), розміри 2060*2440 мм [3]
ВВУ-12	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарна установка LJV6000, з продуктивністю по випареній волозі 2220 кг/год, розміри 10800*1500*5800 мм [6]
H-13	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Wilo Initial Jet 3-4, з максимальною продуктивністю до 1 м ³ /год [12]

ПЗ-14	Пересувний збірник	1	Пересувний збірник об'ємом 5 л, оснащений коліщатами, виготовлений з нержавіючої сталі, розмір: 570*200*200 мм [8]
РМН-15	Ручна машина наповнення	1	Настільний поршневий дозатор рідин виготовлений з нержавіючої сталі, діапазон дозування 10 мл – 5 л, продуктивність до 40 уп/хв [7]

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: 1) Custom High Quality Stainless Steel Reactor for Industrial and Laboratory Chemical Processing Reliable Supplier [Електронний ресурс:] <https://www.alibaba.com/suppliersubdomainalibabacom/product-detail/Custom-High-Quality-Stainless-Steel-Reactor-1601462405929.html?spm=a2700.7724857.0.0.21063041gCfT4u>; 2) Henwi 300-8000 Liters Chemical Mixing Equipment Food Liquid Soap Reactor Liquid Detergent Making Machine Laundry Mixing Tank [Електронний ресурс:] <https://www.alibaba.com/product-detail/Henwi-300-8000-Liters-Chemical-Mixing-1601217032224.html?spm=a2700.7724857.0.0.3a80304dO6GILa>; 3) Stainless Steel Sanitary Grade Mixing Tank for Beverage Industry, Food Industry, Pharmaceutical Industry, etc [Електронний ресурс:] https://wzlihong.en.made-in-china.com/product/ZeJQGKmLbLVP/China-Stainless-Steel-Sanitary-Grade-Mixing-Tank-for-Beverage-Industry-Food-Industry-Pharmaceutical-Industry-etc.html?pv_id=1j6bpdjh653a&faw_id=1j6bpdkb7a43&bv_id=1j6bpdulo265&pbv_id=1j6bpdia66c4u; 4) Manufacturing Equipment Percolation Extractor Tank Liquid Detergent Extractor Tank Machinery for Medical Applications [Електронний ресурс:] <https://www.alibaba.com/product-detail/Manufacturing-Equipment-Percolation-Extractor-Tank-Liquid-1601422749490.html>; 5) Decanter Centrifuge Horizontal Screw Decanter Centrifuge Industrial Centrifuge [Електронний ресурс:] https://dlreyes.en.made-in-china.com/product/aKbQWwSxqJGE/China-Decanter-Centrifuge-Horizontal-Screw-Decanter-Centrifuge-Industrial-Centrifuge.html?pv_id=1iu3ttf8idfe&faw_id=1iu3ttli2bcd; 6) CE/ASME Certified Chemical/Food/Medical Standard Vacuum Evaporator Concentrator Equipment [Електронний ресурс:] <https://www.alibaba.com/product-detail/CE-ASME-Certified-Chemical-Food-Medical-1601166418638.html?spm=a2700.7724857.0.0.63d53bbbKBKhZK>; 7) Поршневий дозатор для розливу рідин 10-5000 мл [Електронний ресурс:] <https://agro-teh.com.ua/ua/p640139764-porshnevoj-dozator-dlya.html>; 8) 5 Litre stainless steel tank [Електронний ресурс:] <https://www.surpluselect.eu/tanks-silos/stainless-steel-tanks/5-litre-stainless-steel-tank-1-3-bar/3.8a3763>; 9) Насос відцентровий самовсмоктувальний Leo 1.1 кВт Нмах 55 м Qмах 90 л/хв [Електронний ресурс:] https://rozetka.com.ua/ua/leo_775325/p2240117/; 10) Насос відцентровий Leo 0.75 кВт Нмах 21.5 м Qмах 190 л/хвил [Електронний ресурс:] https://rozetka.com.ua/ua/leo_775991/p2233637/; 11) Відцентровий насос Wilo Initial Jet 3-4 [Електронний ресурс:] <https://teploradost.com.ua/ua/centrobezhnyj-nasos-wilo-initial-jet-34>; 12) Відцентровий насос Wilo Initial Jet 3-4 [Електронний ресурс:] <https://teploradost.com.ua/ua/centrobezhnyj-nasos-wilo-initial-jet-34>; 13) Промислові перистальтичні насоси в Україні [Електронний ресурс:] <https://prytec.com.ua/other/promyshlennye-perystaltycheskye-nasosy-v-ukrayne/>

4.5 Обґрунтування вибору аерозольної форми 6-пентил-2-пірону

Розроблення аерозольної форми 6-пентил-2-пірону (6PP) потребує врахування фізико-хімічних властивостей сполуки, її леткості, гідрофобності та стабільності у різних середовищах. Проведений аналіз можливих підходів до створення аерозольних препаратів показав, що найбільш доцільним є використання емульсійної системи, у якій 6PP розчиняється в олійній фазі та стабілізується за допомогою поверхнево-активних речовин. Такий варіант узгоджується з гідрофобною природою 6PP, оскільки олія є оптимальним середовищем для повного розчинення та рівномірного розподілення діючої речовини, що дозволяє мінімізувати втрати під час застосування та забезпечує пролонговане збереження активності після нанесення. На відміну від водних дисперсій, які потребують високих концентрацій ПАР і характеризуються схильністю до коалесценції, або спиртових форм, що можуть спричиняти надмірно швидке випаровування та ризик фітотоксичності, емульсійний підхід забезпечує оптимальну стабільність, контроль розміру крапель та високу адгезію до рослинної поверхні. Крім того, така система дозволяє включати до складу прилипачі та антиоксиданти, що додатково знижує леткість 6PP і підвищує тривалість його дії. Важливою перевагою є й технологічна простота: емульгування є добре відпрацьованою операцією, не потребує спеціалізованого обладнання та легко масштабується для промислового виробництва з використанням стандартних аерозольних балонів. З урахуванням поєднання високої хімічної сумісності, стабільності, здатності до тонкодисперсного розпилення, економічної доцільності та найвищої придатності для 6PP згідно з порівняльною таблицею, емульсійний аерозоль (варіант 1, таблиця 1.1) є найбільш раціональним і перспективним рішенням для створення ефективної аерозольної форми препарату.

Порівняльні підходи до створення аерозольної форми 6PP

Підхід	Принцип	Переваги	Недоліки	Допоміжні речовини	Типові концентрації	Придатність
1. Емульсійний аерозоль(олійна фаза + ПАР)	Розчинення 6PP в олійній фазі та стабілізація емульсії ПАР	Підходить для гідрофобних речовин; стабільність; контроль розміру крапель	Потребує підбору ПАР; можлива нестабільність при зберіганні	Tween-20, Tween-80, лецитин, ізопропілміристат, рослинні олії	6PP 0.1–1%; ПАР 0.5–3%; олія 1–10%	Висока
2. Мікро-/наноінкапсуляція(полімери, циклодекстрини)	Інкапсуляція 6PP для контрольованого вивільнення	Зменшує леткість; висока стабільність; пролонгована дія	Складність та вища вартість	β -/ γ -циклодекстрин, альгінат, хітозан, ПЛА/ПГА	6PP 0.05–0.5%; полімер 0.5–2%; циклодекстрин 1–5%	Висока
3. Спиртовий аерозоль(етанол/ізопропанол)	Розчинення 6PP у спирті з наступним розпиленням	Простота; добра розчинність; швидке висихання	Ризик фітотоксичності; швидке випаровування	Етанол, ПС, гліцерин, сорбітанові ПАР	6PP 0.05–0.3%; спирт 20–70%; добавки 0.5–3%	Середня
4. Водна дисперсія(ПАР + ко-солвенти)	Створення водної колоїдної системи 6PP	Безпечна; проста аплікація	Потрібно багато ПАР; низька стабільність	Tween-20/80, пропіленгліколь, PEG-400, Cremophor EL	6PP 0.05–0.2%; ПАР 2–8%; ко-солвенти 5–15%	Низька–середня

Розробка технології отримання наноемульсійної аерозольної форми 6-пентил- α -пірону

Розроблення ефективної аерозольної форми 6-пентил- α -пірону (6-PP) потребує створення стабільної дисперсної системи, здатної забезпечити рівномірне

розпилення, високу біодоступність діючої речовини та стійкість під час зберігання і дії пропеленту. Враховуючи гідрофобну природу 6-PP та його леткість, оптимальним вибором є наноемульсійна система типу «олія у воді» (O/W), сформована методом низькоенергетичного емульгування, що відповідає рекомендаціям сучасних наукових оглядів щодо створення наноемульсійних лікарських і агрохімічних форм. Зокрема, за даними Preeti et al. (*Scientifica*, 2023) та Gupta et al. (*Soft Matter*, 2016), низькоенергетичні методи формування наноемульсій (EIP, PIC) дозволяють отримувати нанорозмірні краплини за рахунок термодинамічно зумовленої інверсії фаз без застосування високого тиску чи ультразвукової кавітації. Такий підхід забезпечує однорідність системи, низьку міжфазну напругу та високу стабільність кінцевого продукту.

З урахуванням цільової концентрації 6-PP 50 мл/л, обсяг діючої речовини для одного аерозольного балона із 300 мл рідкої фази становить 15 мл. Далі було сформовано рецептуру O/W наноемульсії з оптимізованим співвідношенням емульгаторів і ко-емульгаторів, що забезпечують формування інтерфейсного шару з мінімальною міжфазною напругою. Як основні ПАР застосовано комбінацію Tween-80 та Span-80, відому своєю високою стабілізаційною здатністю щодо наноемульсій. Ко-емульгатором виступає пропіленгліколь, який регулює полярність міжфазного шару. Для розчинення гідрофобної діючої речовини використано суміш MCT-олії та метильованої олії насіння (MSO), що додатково покращує проникнення та адгезію на рослинній поверхні. Прилипач СМС підвищує стійкість нанесення на листову поверхню.

Технологія одержання наноемульсії ґрунтується на низькоенергетичному механізмі композиційної інверсії (PIC), який полягає у поступовому змінюванні складу системи шляхом повільного додавання води до масляно-емульгаторної суміші. На першому етапі готують масляну фазу, у якій повністю розчиняють 6-PP у суміші MCT та MSO. Паралельно формується емульгаторна суміш (Smix), що містить Tween-80, Span-80 та пропіленгліколь. Після введення масляної фази в Smix отримують попередню концентровану емульсійну пасту. На наступному етапі при інтенсивному перемішуванні повільно додають приблизно дві третини

необхідного об'єму води, досягаючи точки інверсії, у якій міжфазна напруга мінімальна, а система переходить у термодинамічно вигідний стан з формуванням нанорозмірних краплин. Решту води додають після інверсії, а емульсію перемішують до однорідності. На завершальному етапі у систему вводять розчин СМС та проводять остаточне вирівнювання за параметрами. Таким чином отримують стабільну O/W наноемульсію, у якій середній розмір частинок становить 50–200 нм, що відповідає вимогам до сучасних наноемульсійних систем.

Для забезпечення стабільності наноемульсії передбачено контрольні випробування: визначення розміру частинок методом DLS (цільовий діапазон – 50–200 нм, $PDI \leq 0,30$), візуальна оцінка однорідності, визначення рН, відсутність фазового розшарування після центрифугування та циклічного температурного впливу (4–40 °C). Після підтвердження показників якості наноемульсію фасують у аерозольні балони об'ємом 450 мл, закупорюють клапанною системою та заряджають пропелентом (диметилловим етером або сумішшю пропан-бутану) у кількості 60–100 г на балон.

Прилипачі у складі запропонованої форми препарату:

Tween-80 - основний прилипач завдяки поверхнево-активним властивостям, забезпечує змочуваність і стабільність розчину.

Span-80 - ПАР для масляної фази; самотійно не дуже ефективний у водних системах, але в парі з Tween-80 утворює змішану систему ПАР, що підсилює прилипання.

Розрахуємо об'єм компонентів

Вміст компонентів у відсотках

- 6-пентил- α -пірон (6-PP) – 5 %
- МСТ-олія – 4 %
- метильована олія насіння (MSO) – 3%
- Tween-80 – 9%
- Span-80 – 1%
- пропіленгліколь – 5 %;

– карбоксиметилцелюлоза (СМС), розчинена у невеликому об'ємі води – 0,3 %

– дистильована вода – 72,7%

Знаючи доступний об'єм 6-PP розрахуємо загальний об'єм наноемульсії:

$$3720 \text{ мл} / 0,05 = 74\,400 \text{ мл}$$

Знаючи загальний об'єм наноемульсії та знаючи відсотковий вміст компонентів розрахуємо вміст кожного компоненту:

– МСТ-олія – 4 % = $74\,400 \text{ мл} * 4 \% = 2\,976 \text{ мл}$

– метильована олія насіння (MSO) – 3% = $74\,400 \text{ мл} * 3 \% = 2\,232 \text{ мл}$

– Tween-80 – 9% = $74\,400 \text{ мл} * 9 \% = 6\,696 \text{ мл}$

– Span-80 – 1% = $74\,400 \text{ мл} * 1 \% = 744 \text{ мл}$

– пропіленгліколь – 5 % = $74\,400 \text{ мл} * 5 \% = 3\,720 \text{ мл}$

– карбоксиметилцелюлоза (СМС), розчинена у невеликому об'ємі води – 0,3 % = $74\,400 \text{ мл} * 0,3 \% = 223,2 \text{ мл}$

– дистильована вода – 72,7% = $74\,400 \text{ мл} * 72,7 \% = 54\,088,8 \text{ мл}$

Матеріальний баланс на партію 6-пп в балонах по 300 мл наведено в табл.4.4.

Таблиця 4.4

Матеріальний баланс на партію 6-пп

Завантажено за цикл			Одержано за цикл		
<i>1. Стадія формування наважок для приготування олійної фази</i>					
№	Компонент	мл	№	Компонент	мл
1	6-пентил- α -пірон (6-PP)	3 720	1	Наважка 6-пентил- α -пірону (6-PP)	3 720
2	МСТ-олія	2 976		Наважка МСТ-олії	2 976
3	Метильована олія насіння (MSO)	2 232		Наважка метильованої олії насіння (MSO)	2 232
4	Tween-80	6 696		Наважка Tween-80	6 696
5	Span-80	744		Наважка Span-80	744
6	Пропіленгліколь	3 720		Наважка пропіленгліколю	3 720
Разом		20 088	Разом		20 088
<i>2. Стадія приготування олійної фази</i>					
№	Компонент	мл	№	Компонент	мл
1	Наважка 6-пентил- α -пірону (6-PP)	3 720	1	Олійна фаза	20 088
2	Наважка МСТ-олії	2 976			
3	Наважка метильованої олії насіння (MSO)	2 232			
4	Наважка Tween-80	6 696			
5	Наважка Span-80	744			
6	Наважка пропіленгліколю	3 720			
Разом		20 088	Разом		20 088
<i>3. Стадія формування наважок для приготування водної фази</i>					
№	Компонент	мл	№	Компонент	мл
1	Карбоксиметилцелюлоза	2,3 (г)		Наважка карбоксиметилцелюлози	2,3 (г)
2	Дистильована вода	54 309,7		Наважка дистильованої води	54 309,7
Разом		57 312	Разом		57 312

4. Стадія приготування водної фази					
№	Компонент	мл	№	Компонент	мл
1	Наважка карбоксиметилцелюлози	2,3 (г)	1	Водна фаза	57 312
2	Наважка дистильованої води	54 309,7			
Разом		57 312	Разом		57 312
5. Стадія формування пре-емulsії					
№	Компонент	мл	№	Компонент	кг
1	Олійна фаза	20 088	1	Пре-емulsія	77 400
2	Водна фаза	57 312			
Разом		77 400	Разом		77 400
6. Стадія гомогенізації					
№	Компонент	мл	№	Компонент	мл
1	Пре-емulsія	77 400	1	Наноемulsія	77 013
2	Втрати, %	0,05	2	Втрати	387
Разом		77 400	Разом		77 400
7. Стадія фасування					
№	Компонент	мл	№	Компонент	мл
1	Наноемulsія	77 013	1	Готовий продукт	115 655 (257 балонів)
2	Диметилловий етер	38 700	2	Втрати	58
3	Балони	257			
4	Втрати, %	0,05			
Разом		115 713	Разом		115 713

4.6 Специфікація обладнання альтернативної форми випускі

Специфікація обладнання необхідного для формування аерозольної форми 6-пентил- α -пірону після виробничого біосинтезу наведено в табл. 4.5.

Таблиця 4.5

Специфікація обладнання для аерозольної форми 6-PP

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
P-1	Реактор	1	Реактор SS-30L, об'ємом 30 л виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений перемішувачим пристроєм, габаритні розміри 350*350*350 мм [0]

Н-2	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний MP-3086.9 з продуктивністю 78 л/год [4]
Р-3	Реактор	1	Реактор SS-60L, об'ємом 60 л виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений перемішувачем пристроєм, габаритні розміри 400*400*500 мм [0]
Н-4	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Optima JET150-PL, з продуктивністю 216 л/год [6]
Р-5 Р-10	Реактор	2	Реактор SS-80L, об'ємом 80 л виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений перемішувачем пристроєм, габаритні розміри 450*450*500 мм [0]
ЛЗ-6	Лінійний змішувач	1	Лінійний міксер 150 UHS Ultra Sanitary, з швидкістю обертання 3600 об/хв та продуктивністю 50 л/год [2].
Н-7 Н-9 Н-11	Насос перистальтичний	3	Насос перистальтичний MP-6118.12 з продуктивністю 226 л/год [5]
Г-8	Гомогенізатор	1	Гомогенізатор високого тиску M815 виготовлений з нержавіючої сталі, з максимальним тиском 2068 бар та продуктивністю 72 л/год [1]
ФУ-12	Фасувальна установка	1	Напівавтоматична фасувальна установка аерозолів, виготовлена з нержавіючої сталі, з продуктивністю до 900 балонів/год, максимальний об'єм наповнення 450 мл [3].

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: 0) Stainless Steel Chemical Reaction Tank Reactor [Електронний ресурс:] <https://www.alibaba.com/suppliersubdomainalibabacom/product-detail/Lab-Reactor-60L-Stainless-Steel-Chemical-62323262457.html> ; 1) M815 Microfluidizer® Processor [Електронний ресурс:] <https://www.microfluidics-mpt.com/microfluidizers/pilot-scale-m815> ; 2) Small-Scale In-Line Mixers [Електронний ресурс:] <https://www.silverson.com/us/products/small-scale-inline-mixers/#mixer-options> ; 3) Напівавтоматична машина для фасування аерозолів [Електронний ресурс:] <https://www.aileaerosol.com/uk/product-semi-automatic-body-spray-filling-machine-aerosol-4-in-1-spray-paint-filling-machine> ; 4) Перистальтичний насос MP-3 [Електронний ресурс:] https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-3/ ; 5) Насос перистальтичний MP-6 [Електронний ресурс:] https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-6/ ; 6) Насос відцентровий Optima JET150-PL [Електронний ресурс:] <https://rozetka.com.ua/ua/pogrugnie-nasosi-optima-153201577/p552703410/>

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ 6-ПЕНТИЛ- α -ПІРОНУ

Післяферментаційне виділення та очищення 6-пентил- α -пірону складається з допоміжних етапів (зберігання культуральної рідини та приготування елюентів на стадію очищення 6-пентил- α -пірону), технологічного процесу (видалення біомаси, виділення 6-пентил- α -пірону та очищення 6-пентил- α -пірону), а також пакування та маркування готового продукту. Процес виділення та очищення 6-пентил- α -пірону наведено в графічній частині проекту на апаратурній та технологічній схемах.

ДР 1. Зберігання культуральної рідини

ДР 1.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину, об'ємом 5,8 м³, після виробничого біосинтезу зберігаються в реакторі об'ємом 8 м³ (Р-1), під час зберігання відбувається періодичне перемішування (20 об/хв), температура при якій відбувається зберігання в реакторі становить 4 °С.

ТП 2. Видалення біомаси

ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину (від ДР 1.1) за допомогою насоса (Н-2) направляють в центрифугу (Ц-3), де впродовж 15 хв при 3500 об/хв, відбувається осадження біомаси. Отриманий супернатант подається в екстрактор об'ємом 10 м³ (Е-4), де відбувається зберігання до моменту використання на наступному етапі.

ТП 3. Виділення 6-пентил- α -пірону

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андрєв Б.В.				РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ 6- ПЕНТИЛ-α-ПІРОНУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.						116	5
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

ТП 3.1. Екстракція 6-пентил- α -пірону

В екстрактор (Е-4) з супернатантом через лічильник вносять 4,88 м³ етилацетату, в подальшому в екстракторі вмикають перемішуючий пристрій (20 об/хв) та нагрівають розчин до 40 °С, через 1 год перемішування в екстракторі вмикають перемішуючий пристрій та в подальшому відбувається відстоювання розчину впродовж 24 год. По завершенню відстоювання з екстрактора за допомогою насоса (Н-5) поступово зливають водну фазу яку направляють в реактор (Р-6). Після відбору водної фази, з екстрактора за допомогою насоса (Н-5) зливають органічну фазу, яку направляють в реактор об'ємом 10 м³ (Р-8), де відбувається зберігання до моменту використання на наступному етапі.

ТП 3.2. Екстракція 6-пентил- α -пірону з водної фази

Водну фазу після екстракції об'ємом 4,9 м³ з реактора (Р-6) за допомогою насоса (Н-7) направляють в екстрактор об'ємом 10 м³ (Е-4), після внесення водної фази в екстрактор через лічильник вносять 2,45 м³ етилацетату, в подальшому в екстракторі вмикають перемішуючий пристрій (20 об/хв) та нагрівають розчин до 40 °С, через 1 год перемішування в екстракторі вмикають перемішуючий пристрій та в подальшому відбувається відстоювання розчину впродовж 24 год. По завершенню часу відстоювання з екстрактора за допомогою насоса (Н-5) спочатку зливають водну фазу в реактор (Р-6) з якого в подальшому вона направляється на знешкодження, та в подальшому зливають органічну фазу яка направляється до реактора об'ємом 10 м³ (Р-8) де відбувається зберігання до моменту використання на наступному етапі.

ТП 3.3. Зневоднення екстракту

В реактор (Р-8) з екстрактом (від ТП 3.1 та ТП 3.2.) за допомогою вагового дозатора вносять 1 100 кг безводного сульфату натрію. Додавши сіль в реактор, в ньому вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв), перемішування проводять впродовж 2 год. Отриманий розчин за допомогою перистальтичного насоса (Н-9) направляють в центрифугу (Ц-3) де відбувається осадження солі при 3500 об/хв впродовж 15 хв. Осад солі направляють на відновлення, а супернатнат в реактор об'ємом 8 м³ (Р-10).

ТП 3.4. Концентрування екстракту

Супернатант об'ємом 6 480 л з реактора (Р-10) за допомогою насоса (Н-11) направляють в вакуум-випарну установку (ВВУ-12), де відбувається видалення етилацетату, при 37 °С та 0,02 МПа. Випарений етилацетат направляють на відновлення з метою подальшого використання, а концентрат (6-пентил- α -пірон) направляють в пересувний збірник об'ємом 5 л (ПЗ-14), де відбувається зберігання до моменту використання на наступному етапі.

ПМВ 4. Пакування та маркування

ПМВ 4.1. Пакування та маркування 6-пентил- α -пірону

Очищений 6-пентил- α -пірон (від ТП 3.4) направляють в настільний апарат для наповнення рідини (РМН-15), за допомогою якого вручну відбувається фасування очищеного 6-пентил- α -пірону в ПЕТ пляшки чорного кольору по 1 л. Після наповнення пляшки вони вручну закриваються та поміщаються в картонні коробки, в яких упакований продукт направляється на склад для зберігання до реалізації.

5.1 Опис технологічної схеми приготування аерозольної форми 6-пентил- α -пірону

Процес приготування аерозольної форми 6-пентил- α -пірону складається з допоміжних етапів (зберігання 6-пентил- α -пірону та приготування фаз емульсійної системи), технологічного процесу (наноемульсифікація), а також пакування та маркування готового продукту. Процес приготування аерозольної форми 6-пентил- α -пірону наведено в графічній частині проекту на апаратурній та технологічній схемах.

ДР 1. Зберігання 6-пентил- α -пірону

ДР 1.1. Зберігання 6-пентил- α -пірону

Розчин 6-пентил- α -пірону зберігають в герметично закритих непрзорих ПЕТ-пляшках об'ємом 5 л, при температурі 5 °С, без механічного перемішування та без доступу світла.

ДР 2. Приготування фаз емульсійної системи

ДР 2.1. Приготування олійної фази

В реактор об'ємом 30 л (Р-1) вносять 3 720 мл 6-пентил- α -пірон (від ДР 1.1), 2 976 мл МСТ-олії, 2 232 мл метильованої олії насіння, 6 696 мл Tween-80, 744 мл Span-80 та 3 720 мл пропіленгліколю, компоненти попередньо відміряні за допомогою мірного циліндра. Помістивши компоненти в реактор в сорочку реактора подають пару для нагрівання вмісту компонентів до 40 °С а також вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв, 20 хв) для отримання однорідної суміші. Приготувавши олійну фазу, вона зберігається в даному реакторі до використання на подальших стадіях.

ДР 2.2. Приготування водної фази

В реактор об'ємом 60 л (Р-3) вносять наважку карбоксиметилцелюлози масою 2,3 г, попередньо сформовану за допомогою технічних ваг, а також за допомогою об'ємно вагового дозатора вносять 54,31 л дистильованої води. Помістивши компоненти в реактор в сорочку реактора подають пару для нагрівання вмісту компонентів до 40 °С, а також вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв, 20 хв) для повного розчинення компоненту. Приготувавши водну фазу, її зберігають в даному реакторі до використання на подальших стадіях.

ТП 3. Наноемульсифікація

ТП 3.1. Формування пре-емulsії

В реактор об'ємом 80 л (Р-5) за допомогою відцентрового насоса (Н-4) вносять 57,3 л водної фази (від ДР 2.2), а також за допомогою перистальтичного насоса (Н-2) вносять 20,1 л олійної фази (від ДР 2.1). Помістивши компоненти в реактор в сорочку реактора подають пару для нагрівання вмісту компонентів до 40 °С а також вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів впродовж 10 хв, в подальшому вміст реактора направляють до лінійного змішувача (ЛЗ-6) який при 3600 об/хв дозволяє сформувати необхідну пре-емulsію. Після проходження вміст повертається в реактор (Р=5) де зберігається до подальшого використання.

ТП 3.2. Гомогенізація

Готову пре-емульсію з реактора (Р-5) (від ТП 3.1) за допомогою перистальтичного насоса (Н-7) подають в гомогенізатор (Г-8), в якому відбувається гомогенізація при тиску 1000 бар, отриманий розчин направляють в реактор об'ємом 80 л (Р-10). В подальшому отриманий розчин з реактора за допомогою перистальтичного насоса (Н-11) повторно направляють в гомогенізатор (Г-8) та повторюють процес ще 4 рази для отримання наноемульсії з розміром часок 45 нм. Готовий розчин зберігають в реакторі (Р-10) до подальшого використання.

ПМВ 4. Фасування готового продукту

ПМВ 4.1. Фасування та пакування готового продукту

Приготовану наноемульсію (від ТП 3.2) за допомогою перистальтичного насоса (Н-11) направляють в напівавтоматичну фасувальну установку аерозолів (ФУ-12) в якій відбувається дозування в аерозольні балони об'ємом 450 мл по 300 мл наноемульсії. Після внесення в балон наноемульсії далі по лінії в балон вносять 150 мл диметилового етеру. Готові аерозольні балони поміщаються в картонні коробки, в яких упакований продукт направляється на склад для зберігання при 15-25 °С.

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

6.1 Методи контролю рідкої форми 6-пентил- α -пірону

6.1.1 Кількісний та якісний аналіз

Для кількісного аналізу 6-пентил-альфа-пірону використовували газовий хроматограф Hewlett-Packard із полум'яно-іонізаційним детектором (FID). **Пробопідготовка:** 1 мл органічного екстракту змішували з 10 мкл внутрішнього стандарту (γ -ундеканолактон, 99%). Зразки вводили в колонку Carbowax (30 м \times 0,32 мм, 0,25 мкм). Інжектор — 200°C, детектор — 300°C, піч — 180°C. Кількісний аналіз — внутрішня калібровка. Якісна ідентифікація — за часом утримування порівняно з еталоном. Ароматичні компоненти розділяли на капілярній колонці Carbowax (внутрішній діаметр: 0,32 мм, довжина: 30 м, товщина плівки: 0,25 мм). Температура безроздільного інжектора та детектора становили 200 та 300°C відповідно. Температура печі була запрограмована на постійну температуру 180°C. Кількісний аналіз 6- PP проводився за допомогою методу внутрішньої калібровки, з γ -ундеканолактоном (99%, Aldrich) як внутрішнім стандартом. Ismaiel et al. (2018)

6.1.2 Аналіз протигрибкової активності

Для контролю біологічної активності 6-PP використовували чашки Петрі з поживним середовищем PDA, на які висівали тест-культуру *Fusarium oxysporum* HF-26. На поверхні середовища розставляли стерильні циліндри діаметром 6 мм, у які наносили 50 мкл зразка з концентрацією 25 мг/л.

Після внесення зразка чашки інкубували протягом 7 діб при температурі 25°C. По завершенні інкубації вимірювали діаметр зони затримки росту міцелію (в мм) за межами циліндра. Біологічну активність вважали підтвердженою у разі утворення зони діаметром ≥ 10 мм Nao et al. (2023)

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андреев Б.В.				РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінко В.О.						121	7
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

6.1.3 Визначення залишкової вологості методом Карла Фішера

Контроль залишкової вологи у 6-пентил-альфа-піроні проводили прямим титрувальним методом Карла Фішера. У герметичну кювету титратора EVA KF Titrator (Mettler-Toledo, Делавер, США) вводили 1 мл зразка шприцом. Ендпоінт визначали за електронним методом. Вологість вважалася прийнятною при $\leq 5\%$.

Умови проведення дослідів:

Температура в кімнаті: 20–25 °C

Вологість у приміщенні: $\leq 50\%$

Перемішування: Безперервне в реакційній кюветі

Тривалість аналізу: 2–5 хвилин

Проведення процедури:

Визначення залишкової вологи у зразках 6-пентил-альфа-пірону здійснювали за прямим титриметричним методом Карла Фішера з використанням автоматичного титратора (наприклад, Mettler-Toledo EVA KF або еквівалентного приладу, призначеного для волюметричного аналізу). Метод базується на окисно-відновній реакції йоду з водою в присутності сірчистого ангідриду та спиртового середовища, в якій кількість витраченого йоду є еквівалентною кількості води у зразку.

Перед проведенням аналізу титратор приводили у робочий стан відповідно до інструкції виробника: заповнювали титраційну комірку свіжим реактивом Карла Фішера (типу Hydranal®-Composite 5), активували систему перемішування та проводили автоматичне кондиціонування. Після стабілізації нульової лінії виконували титрування холостого зразка (бланк) з метою компенсації фонові вологості системи.

Для аналізу зразок 6-пентил-альфа-пірону (об'ємом 0,5–1,0 мл) відбирали в сухий герметичний шприц з металевою голкою та вводили безпосередньо у титраційну комірку через тefлонову мембрану. Зразки перед аналізом зберігали у

герметичному контейнері з осушувачем для запобігання адсорбції атмосферної вологи. Температура у лабораторному приміщенні під час аналізу підтримувалася в межах 20–25 °С при відносній вологості не вище 50 %.

Після введення зразка автоматично запускалося титрування. Реакція супроводжувалась безперервним амперометричним контролем ендпоінту, після досягнення якого титратор обчислював вміст вологи у зразку, виражений у відсотках масової частки або в ppm. Аналіз кожного зразка проводили щонайменше у двох технічних повтореннях для забезпечення достовірності результату.

Допустимим вважали вміст залишкової вологи, що не перевищує 5,0 % мас. Частка вологи, вища за встановлений норматив, свідчила про недостатню ефективність етапу зневоднення або порушення умов зберігання. За потреби партію продукту повертали на доочищення або відбраковували. Fischer (2025)

6.2 Методи контролю наноемульсійної аерозольної форми 6-пентил- α -пірону

6.2.1. Органолептичний контроль наноемульсії

Органолептичну оцінку наноемульсійної системи проводили після етапу її приготування та стабілізації при кімнатній температурі протягом щонайменше однієї години. Огляд здійснювали в прозорій мірній колбі на білому та темному фоні за температури 20–25 °С, що забезпечувало оптимальні умови візуалізації дисперсної системи. Наноемульсію перевіряли на однорідність, відсутність фазового розшарування, механічних включень, випадіння осаду та утворення агрегатів. Характерна для наноемульсій легка опалесценція розцінювалася як нормальна ознака (Amin & Das, 2019; Verma et al., 2019). Після первинного огляду зразок залишали нерухомим на 5 хвилин для виявлення можливих ознак дестабілізації, після чого повторювали візуальну оцінку. Наноемульсія вважалася якісною за умови збереження гомогенної структури, рівномірної консистенції та відсутності ознак коалесценції.

6.2.2. Визначення кислотності (рН)

Кислотність наноемульсії визначали потенціометричним методом за допомогою лабораторного рН-метра, який попередньо калібрували стандартними буферними розчинами при значеннях рН 4,00; 6,86 та 9,18. Пробу об'ємом 20 мл переносили у чистий хімічний стакан і занурювали комбінований електрод так, щоб мембрана була повністю занурена у рідину та не містила повітряних включень. Після стабілізації показника при температурі 25 ± 1 °С реєстрували значення рН. Межі 5,0–7,0 розглядалися як оптимальні для наноемульсійної форми, оскільки вони забезпечували хімічну стабільність емульгаторів, відсутність гідролітичного розпаду активної речовини та відповідали вимогам для водних дисперсних систем із неіоногенними поверхнево-активними речовинами (Kumar, 2017; Amin & Das, 2019).

6.2.3. Визначення розміру частинок та полідисперсності методом DLS

Розмір частинок наноемульсії визначали методом динамічного розсіювання світла (Dynamic Light Scattering, DLS), що ґрунтується на аналізі флуктуацій інтенсивності розсіяного лазерного сигналу, спричинених броунівським рухом наночастинок. Для досліду зразок розводили дистильованою водою до концентрації, придатної для аналізу (1:10 або 1:20), після чого суміш дегазували легким постукуванням для усунення повітряних бульбашок і переносили у кварцову кювету. Вимірювання проводили при температурі 25 °С у три технічні повторення. Аналізатор автоматично розраховував середній гідродинамічний діаметр частинок та індекс полідисперсності (PDI). Система розцінювалася як стабільна за умови, що середній діаметр перебував у межах 50–200 нм, а PDI не перевищував 0,30, що відповідало вузькому дисперсному розподілу (Amin & Das, 2019; Verma et al., 2019; Kumar, 2017).

6.2.4. Визначення в'язкості наноемульсії

В'язкість наноемульсії визначали на ротаційному віскозиметрі типу Brookfield з використанням відповідного шпінделя низького рівня чутливості. Аналіз проводили за температури 25 °С після короткого м'якого перемішування зразка, що дозволяло зберегти структуру наноемульсії та уникнути надмірного включення

повітря. Стабілізоване значення в'язкості реєстрували після декількох секунд рівномірного обертання шпінделя. Показники в межах 5–20 мПа·с вважалися оптимальними, оскільки забезпечували стабільність структури наноемульсії та формування рівномірного аерозольного факела при розпиленні (Verma et al., 2019; Amin & Das, 2019).

6.2.5. Оцінка фізичної стабільності (центрифугування та температурні цикли)

Фізичну стабільність наноемульсії оцінювали за допомогою прискорених методів штучної дестабілізації: центрифугування та температурного циклування. Для центрифужної оцінки 10 мл зразка поміщали у поліпропіленову кювету та обробляли при 5000 об/хв протягом 15 хв. Стійкою вважали наноемульсію, яка після центрифугування не проявляла ознак розшарування або коалесценції (Verma et al., 2019). Термостійкість визначали шляхом почергового витримування зразків при 4 °С і 40 °С, кожен етап тривалістю 24 год, загалом шість циклів. Після завершення циклічного тесту оцінювали візуальні властивості, рН та повторно визначали розмір частинок. Зростання частинок більше ніж на 10 %, поява масляної фази або каламутності свідчили про нестабільність системи (Amin & Das, 2019).

6.2.6. Визначення вмісту 6-пентил- α -пірону методом газової хроматографії

Кількісне визначення активної речовини здійснювали методом газової хроматографії з полум'яно-іонізаційним детектором. Для цього пробу екстрагували органічним розчинником (хлороформом або гексаном), здійснюючи кількахвилинне перемішування і відстоювання до розділення фаз. Органічний шар переносили у хроматографічний шприц і вводили в інжектор газового хроматографа. Вихідні сигнали детектора порівнювали з калібрувальною кривою, побудованою на основі стандартних розчинів 6-ПП. Допустиме відхилення не перевищувало ± 5 % від номінального вмісту, що відповідало вимогам до точності визначення активних інгредієнтів у рідких системах (Kumar, 2017; Amin & Das, 2019).

6.2.7. Оцінка піноутворення

Схильність наноемульсії до піноутворення оцінювали шляхом інтенсивного струшування 50 мл зразка у мірному циліндрі протягом 30 секунд та подальшого вимірювання висоти піни одразу після струшування, а також через 1 та 5 хвилин. Нормативом відповідності вважали висоту піни не більше 10 % від об'єму зразка, оскільки надмірна пінність може негативно впливати на роботу клапанної системи балона та порушувати рівномірність формування аерозольної хмари (Verma et al., 2019).

6.2.8. Контроль герметичності та тиску аерозольного балона

Герметичність наповнених аерозольних балонів перевіряли методом занурення у водяну баню, нагріту до 50 °С. Поява бульбашок газу під час витримання протягом 3–5 хвилин свідчила про негерметичність клапана або порушення цілісності корпусу балона. Тиск у балоні вимірювали каліброваним манометром для аерозолів шляхом приєднання його до клапанної системи. Для балонів, заряджених диметиловим етером, робочий тиск мав лежати в межах 3,5–5,5 бар, а для пропан-бутанової суміші — 2,5–4,0 бар. Ці показники гарантували безпечне зберігання та нормальну роботу аерозольного розпилювача (Amin & Das, 2019).

6.2.9. Визначення виходу аерозольного факела

Вихід аерозольної продукції оцінювали шляхом зважування балона до та після 10-секундного розпилення у витяжній шафі. Різниця у масі давала можливість обчислити реальну витрату суміші та перевірити рівномірність подачі наноемульсії через клапан. Стабільною вважали подачу, за якої факел був рівномірним, без «плювання» великими краплями, а середня витрата не мала значних коливань між повторними вимірюваннями (Verma et al., 2019).

6.2.10. Оцінка адгезії препарату на листковій поверхні

Адгезію визначали за допомогою тесту утримання краплі на рослинному листку. На поверхню листка наносили стандартний об'єм наноемульсії, після чого листок нахиляли під кутами 45° та 90°, оцінюючи частку рідини, що залишалася

після стікання. Аналіз проводили за температури 22–25 °С, використовуючи листки однакової площі та структури. Здатність утримувати не менше 80 % нанесеної кількості вважалася показником достатньої адгезивності та підтверджувала коректність вибору поверхнево-активних речовин і плівкоутворювачів у рецептурі наноемульсії (Amin & Das, 2019).

РОЗДІЛ 7. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

7.1. Опис до деклараційного патенту на корисну модель БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ 6-ПЕНТИЛ- α -ПІРОНУ

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до мікробіологічних способів отримання летких органічних сполук природного походження, що мають антимікробні та антифітопатогенні.

Запропонований спосіб може бути використаний сільськогосподарській промисловості.

6-Пентил- α -пірон (6-PP) — це вторинний метаболіт грибів роду *Trichoderma*, зокрема штаму *Trichoderma viride* IMB TV 4.89, який проявляє широкий спектр біологічної активності: пригнічення росту фітопатогенів, стимуляція росту рослин, що забезпечує перспективність використання як біопрепарату.

Відомі методи отримання 6-PP шляхом хімічного синтезу є енергоємними, малорентабельними й екологічно шкідливими. Біотехнологічне виробництво з використанням мікроорганізмів є економічно вигіднішим, але вимагає вдосконалення етапів виділення продукту.

Запропонований спосіб дозволяє ефективно одержати 6-пентил- α -пірон з культуральної рідини грибів *Trichoderma viride* IMB TV 4.89 без застосування токсичних розчинників та колонкових методів очищення — лише за рахунок подвійної екстракції, зневоднення і вакуумного концентрування.

Процес одержання 6-пентил- α -пірону включає такі стадії:

Стадія 1. Біосинтез 6-пентил- α -пірону здійснюють шляхом ферментації штаму *Trichoderma viride* IMB TV 4.89 у рідкому живильному середовищі до концентрації 1 г/л.

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Андрєєв Б.В.			РОЗДІЛ 7. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					128	3
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Стадія 2. Біомасу видаляють центрифугуванням культуральної рідини при 5000 об/хв протягом 15 хв.

Стадія 3. Первинну екстракцію супернатанту проводять етилацетатом у співвідношенні 1:1 (об'єм/об'єм) при 40 °С і перемішуванні 20 об/хв протягом 30 хвилин. [1]

Стадія 4. Після розділення фаз здійснюють другу екстракцію водної фази етилацетатом у співвідношенні 1:0,5 при тих самих умовах (40 °С, 20 об/хв). Отримані органічні фази об'єднують.

Стадія 5. Об'єднаний екстракт зневоднюють додаванням безводного сульфату натрію у 10-кратному надлишку до теоретично необхідної кількості (приблизно 550 кг на 70 кг води).

Стадія 6. Осад з Na₂SO₄ видаляють центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 15 хвилин.

Стадія 7. Зневоднений екстракт концентрують у вакуум-випарній установці при температурі 37–40 °С і тиску 0,02 МПа до отримання концентрованого рідкого продукту.

Стадія 8. Готовий продукт фасують у чорні ПЕТ-пляшки об'ємом 1 л для забезпечення світлозахисту та стабільності при зберіганні.

Склад і форма випуску продукту:

- **Активна речовина:** 6-пентил- α -пірон — 1 г/л
- **Форма випуску:** рідкий концентрат у чорних світлонепроникних ПЕТ-пляшках 1 л

7.2. Реферат до деклараційного патенту №

Біотехнологічний спосіб одержання 6-пентил- α -пірону включає ферментацію штаму *Trichoderma viride* IMB TV 4.89, двоетапну екстракцію етилацетатом, зневоднення безводним сульфатом натрію, концентрування у вакуумі та фасування готового продукту у чорні ПЕТ-пляшки.

Відмінністю способу є введення подвійної екстракції водної фази, що підвищує вихід 6-пентил- α -пірону на 10–15 % і забезпечує більш повне вилучення леткої сполуки з культуральної рідини. [2-5] Відсутність колонкових методів очищення робить процес економічнішим, швидшим і придатним для масштабування.

Отриманий продукт — стабільний рідкий концентрат з високим рівнем чистоти, який може бути використаний як активна субстанція у біопрепаратах або стимуляторах росту рослин.

7.3. Формула винаходу

1. Біотехнологічний спосіб одержання 6-пентил- α -пірону, що включає біосинтез із використанням гриба *Trichoderma viride*, видалення біомаси, екстрагування, зневоднення, концентрування та фасування, який відрізняється тим, що як продуцент використовують штам *Trichoderma viride* *IMB TV 4.89*, екстрагування проводять двічі етилацетатом при 40 °С (перше у співвідношенні 1:1, друге — 1:0,5 до об'єму водної фази), зневоднення здійснюють безводним сульфатом натрію, а концентрування виконують у вакуумі при 37–40 °С і тиску 0,02 МПа, після чого готовий продукт фасують у чорні ПЕТ-пляшки об'ємом 1 л.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що отриманий 6-пентил- α -пірон використовують як біоактивну речовину у складі екологічних біопрепаратів для захисту рослин від *Fusarium oxysporum* у гідропонних системах.

7.4. Висновки

Введення другої екстракції водної фази після первинного вилучення етилацетатом дозволило збільшити загальний вихід 6-пентил- α -пірону на 10–15 %.

Оптимізований процес без стадії колонкової хроматографії є економічним, екологічним і придатним для промислового масштабування. Отриманий 6-пентил- α -пірон є стабільним, високоочищеним рідким концентратом, який може бути використаний у біотехнологічних виробництвах.

ВИСНОВОК

Магістерська кваліфікаційна робота є комплексним дослідженням, спрямованим на аналіз, розроблення та вдосконалення біотехнологічного процесу одержання і виділення леткого грибного метаболіту 6-пентил- α -пірону (6-PP). Робота виконана з метою створення ефективної, екологічно безпечної та технологічно обґрунтованої схеми виробництва біоактивної сполуки природного походження.

В результаті аналізу літератури було з'ясовано, що грибні метаболіти проявляють широкий спектр біологічної активності. Найбільш перспективним є використання грибних метаболітів для боротьби з біотичними та абіотичними факторами стресу у рослин.

Також було виявлено, що деякі грибні метаболіти здатні проявляти цитотоксичну, протівірусну та протизапальну дію, що робить їх перспективними для використання в медицині та фармації.

Розроблено біотехнологічний процес одержання 6-пентил- α -пірону, який охоплює всі етапи післяферментаційної обробки: екстракцію етилацетатом, зневоднення безводним сульфатом натрію, концентрування у вакуумі та регенерацію розчинника. Запропонована технологічна схема забезпечує високу чистоту продукту, зменшує втрати леткої сполуки та сприяє підвищенню економічної ефективності виробництва.

					НУХТ БТЕК 02.01.18 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андрєєв Б.В.				ВИСНОВОК	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.						131	2
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Обґрунтовано вибір рідкої форми випуску 6-пентил- α -пірону, що гарантує стабільність речовини, збереження біологічної активності та зручність під час транспортування. Розроблено рекомендації щодо пакування продукту з урахуванням вимог до герметичності, світлозахисту та довготривалого зберігання.

Проведено техніко-економічну оцінку запропонованої технології, яка підтвердила доцільність її впровадження у виробничі процеси біотехнологічної промисловості.

Отримані результати мають важливе наукове і практичне значення для розвитку промислової біотехнології. Впровадження запропонованого процесу сприятиме створенню екологічно безпечних, ефективних і конкурентоспроможних біопрепаратів на основі 6-пентил- α -пірону, придатних для застосування у рослинництві.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 6-Pentyl-2H-pyran-2-one [Електронний ресурс:]
<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0031085>
2. Afiyatulloev, S. S., Zhuravleva, O. I., Antonov, A. S., Berdyshev, D. V., Pivkin, M. V., Denisenko, V. A., ... & Yurchenko, A. N. (2018). Prenylated indole alkaloids from co-culture of marine-derived fungi *Aspergillus sulphureus* and *Isaria felina*. *The Journal of Antibiotics*, 71(10), 846-853.
3. Bengtson, G., Bdeker, K. W., Hanssen, H. P., & Urbasch, I. (1992). Recovery of 6-pentyl- α -pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by preevaporation. *Biotechnology techniques*, 6(1), 23-26.
4. Cao, F., Liu, X. M., Wang, X., Zhang, Y. H., Yang, J., Li, W., ... & Liu, Y. F. (2023). Structural diversity and biological activities of indole-diterpenoids from *Penicillium janthinellum* by co-culture with *Paecilomyces formosus*. *Bioorganic Chemistry*, 141, 106863.
5. Cao, H. Y., Yi, C., Sun, S. F., Li, Y., & Liu, Y. B. (2022). Anti-inflammatory dimeric tetrahydroxanones from an endophytic *Muyocopron laterale*. *Journal of Natural Products*, 85(1), 148-161.
6. Cerracchio, C., Del Sorbo, L., Serra, F., Staropoli, A., Amoroso, M. G., Vinale, F., & Fiorito, F. (2024). Fungal metabolite 6-pentyl- α -pyrone reduces canine coronavirus infection. *Heliyon*, 10(6).
7. Chang, J. L., Gan, Y. T., Peng, X. G., Ouyang, Q. X., Pei, J., & Ruan, H. L. (2023). Peniandranoids AE: Meroterpenoids with Antiviral and Immunosuppressive Activity from a *Penicillium* sp. *Journal of Natural Products*, 86(1), 66-75.
8. Chapla, V. M., Zeraik, M. L., Cafeu, M. C., Silva, G. H., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., ... & Araujo, A. R. (2018). Griseofulvin, diketopiperazines and cytochalasins from endophytic fungi *Colletotrichum crassipes* and *Xylaria* sp., and their antifungal, antioxidant and anticholinesterase activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(8), 1707-1713.
9. Chinthanom, P., Vichai, V., Rachtawee, P., Boonpratuang, T., & Isaka, M. (2023). Antimalarial lanostane dimers from artificially cultivated fruiting bodies of *Ganoderma weberianum*. *Journal of Natural Products*, 86(10), 2304-2314.
10. Ding, Z., Wang, X., Kong, F. D., Huang, H. M., Zhao, Y. N., Liu, M., ... & Han, J. (2020). Overexpression of global regulator *talae1* leads to the discovery of new antifungal polyketides from endophytic fungus *Trichoderma afroharzianum*. *Frontiers in microbiology*, 11, 622785.
11. Elias, L. M., Fortkamp, D., Sartori, S. B., Ferreira, M. C., Gomes, L. H., Azevedo, J. L., ... & Lira, S. P. (2018). The potential of compounds isolated from *Xylaria*

- spp. as antifungal agents against anthracnose. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 840-847.
12. Esparza-Reynoso, S., Ruíz-Herrera, L. F., Pelagio-Flores, R., Macías-Rodríguez, L. I., Martínez-Trujillo, M., López-Coria, M., ... & López-Bucio, J. (2021). *Trichoderma atroviride*-emitted volatiles improve growth of *Arabidopsis* seedlings through modulation of sucrose transport and metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 44(6), 1961-1976.
 13. Esquivel-Naranjo, E. U., Mancilla-Díaz, H., Marquez-Mazlin, R., Alizadeh, H., Kandula, D., Hampton, J., & Mendoza-Mendoza, A. (2024). Light Regulates Secreted Metabolite Production and Antagonistic Activity in *Trichoderma*. *Journal of Fungi*, 11(1), 9.
 14. *Frontiers in Chemistry*, "Microencapsulation of volatile bioactive compounds: Techniques and applications," 2024.
 15. Fu, P., Zhang, Y., Wang, C., Si, S., Liu, X., & Che, Y. (2023). Altersteroids A–D, 9, 11-Secosteroid-Derived γ -Lactones from an *Alternaria* sp. *Journal of Natural Products*, 86(3), 604-611.
 16. Gao, Y. Q., Du, S. T., Xiao, J., Wang, D. C., Han, W. B., Zhang, Q., & Gao, J. M. (2020). Isolation and characterization of antifungal metabolites from the *Melia azedarach*-associated fungus *Diaporthe eucalyptorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(8), 2418-2425.
 17. Guo, X. W., Yu, Z. Q., Xi, J., Ren, H., Xiang, X. Y., Wu, J., ... & Wu, Q. X. (2023). Isolation and identification of novel antioxidant polyketides from an endophytic fungus *Ophiobolus cirsii* LZU-1509. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(3), 1593-1606.
 18. Hao J., Zhang Z., Zhang X., et al. "Application of 6-Pentyl- α -Pyrone in the Nutrient Solution for Control of Fusarium Wilt in Tomato." *Agronomy*. 2023;13(5):1210.
 19. Hao, J., Wuyun, D., Xi, X., Dong, B., Wang, D., Quan, W., ... & Zhou, H. (2023). Application of 6-pentyl- α -pyrone in the nutrient solution used in tomato soilless cultivation to inhibit *Fusarium oxysporum* HF-26 growth and development. *Agronomy*, 13(5), 1210.
 20. Harwoko, H., Daletos, G., Stuhldreier, F., Lee, J., Wesselborg, S., Feldbrgge, M., ... & Proksch, P. (2021). Dithiodiketopiperazine derivatives from endophytic fungi *Trichoderma harzianum* and *Epicoccum nigrum*. *Natural product research*, 35(2), 257-265.
 21. Hu, Z., Tao, Y., Tao, X., Su, Q., Cai, J., Qin, C., ... & Li, C. (2019). Sesquiterpenes with phytopathogenic fungi inhibitory activities from fungus

- Trichoderma virens from Litchi chinensis Sonn. Journal of agricultural and food chemistry, 67(38), 10646-10652.
22. Ismaiel, A. A., & Ali, A. A. (2018). Antimicrobial properties of 6-pentyl- α -pyrone produced by endophytic strains of Trichoderma koningii and its effect on aflatoxin B1 production. *Biologia*, 73(1), 59-71.
 23. Ismaiel, A. A., & Ali, D. M. (2017). Antimicrobial properties of 6-pentyl- α -pyrone produced by endophytic strains of Trichoderma koningii and its effect on aflatoxin B1 production. *Biologia*, 72(12), 1403-1415.
 24. Jin, X., Chi, J., Zhao, Y., Jiang, R., Wei, J., Dong, N., ... & Zhang, Y. (2023). Indoloquinazoline alkaloids with cardiomyocyte protective activity against cold ischemic injury from *Aspergillus clavatonanicus*. *Bioorganic Chemistry*, 135, 106482.
 25. Jin, X., Guo, L., Jin, B., Zhu, S., Mei, X., Wu, J., ... & He, X. (2020). Inhibitory mechanism of 6-Pentyl-2H-pyran-2-one secreted by *Trichoderma atroviride* T2 against *Cylindrocarpus destructans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104683.
 26. Kalyani A., Prapulla S.G., Karanth N.G. "Study on the production of 6-pentyl- α -pyrone using two methods of fermentation." *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000;53(5):619–624.
 27. Kalyani, A., Prapulla, S. G., & Karanth, N. G. (2000). Study on the production of 6-pentyl- α -pyrone using two methods of fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 610-612.
 28. Karl Fischer Titration Guide to Water Determination.
[Електронний ресурс] https://www.mt.com/au/en/home/library/know-how/lab-analytical-instruments/moisture_determination_by_karl_fischer.html
 29. Khan, B., Zhao, S., Wang, Z., Ye, Y., Ahmed Rajput, N., & Yan, W. (2021). Eremophilane sesquiterpenes and benzene derivatives from the endophyte *Microdiplodia* sp. WGHS5. *Chemistry & Biodiversity*, 18(4), e2000949.
 30. Khruengsai, S., Pripdeevech, P., D'Souza, P. E., & Panuwet, P. (2021). Biofumigation activities of volatile compounds from two *Trichoderma afroharzianum* strains against *Fusarium* infections in fresh chilies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(14), 5861-5871.
 31. Khruengsai, S., Pripdeevech, P., Tanapichatsakul, C., Srisuwannapa, C., DSouza, P. E., & Panuwet, P. (2021). Antifungal properties of volatile organic compounds produced by *Daldinia eschscholtzii* MFLUCC 19-0493 isolated from *Barleria prionitis* leaves against *Colletotrichum acutatum* and its post-harvest infections on strawberry fruits. *PeerJ*, 9, e11242.

32. Kikuchi T., Mimura T., Harimaya K., Yano H., Arimoto T., Masada Y., Inoue T. "Volatile metabolite of aquatic fungi. Identification of 6-pentyl-alpha-pyrone from *Trichoderma* and *Aspergillus* species." *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1974;22(8):1946–1948.
33. Liang, Y., Li, Q., Li, Y., Zheng, Y., Shen, Y., Yang, H., Lu, Y., Liu, J., Zhou, Q., Li, D., Sun, W., Zhu, H., Chen, C., & Zhang, Y. (2023). Lasiodiplodiapyrones A and B, Pyrone-Preussomerin Adducts with Highly Strained Polycyclic Ring Systems from *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. *Journal of natural products*, 86(1), 1823.
34. Lou, J., Yu, R., Wang, X., Mao, Z., Fu, L., Liu, Y., & Zhou, L. (2016). Alternariol 9-methyl ether from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01 and its bioactivities. *brazilian journal of microbiology*, 47(1), 96-101.
35. Luo, H., Qing, Z., Deng, Y., Deng, Z., Tang, X. A., Feng, B., & Lin, W. (2019). Two polyketides produced by endophytic *Penicillium citrinum* DBR-9 from medicinal plant *Stephania kwangsiensis* and their antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Natural product communications*, 14(5), 1934578X19846795.
36. Ma, Y. M., Qiao, K., Kong, Y., Li, M. Y., Guo, L. X., Miao, Z., & Fan, C. (2017). A new isoquinolone alkaloid from an endophytic fungus R22 of *Nerium indicum*. *Natural product research*, 31(8), 951-958.
37. Miao, C., Wang, J., Huang, R., Liu, S., Zheng, K., Liu, C., ... & Wu, S. (2020). Antifungal xanthenes produced by the endophytic fungus *Paraconionthyrium* sp. YM 311593. *Folia Microbiologica*, 65, 567-572.
38. Morales-Snchez, V., Daz, C. E., Trujillo, E., Olmeda, S. A., Valcarcel, F., Muoz, R., ... & Gonzalez-Coloma, A. (2021). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. SPH2. *Journal of Fungi*, 7(2), 109.
39. Narayana, K. J., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M. U. V. V. A., Venkateswarlu, Y., & Krishna, P. S. (2007). Biological activity of phenylpropionic acid isolated from a terrestrial *Streptomyces*. *Polish journal of microbiology*, 56(3), 191.
40. National Center for Biotechnology Information. (2025). PubChem Compound Summary for CID 33960, 5-Hydroxy-2,4-decadienoic acid delta-lactone.
[Электронный ресурс:] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Hydroxy-2_4-decadienoic-acid-delta-lactone
41. Nederhoff, E., & Stanghellini, C. (2010). Water use efficiency of tomatoes. *Practical Hydroponics and Greenhouses*, (115), 52-59.
42. Nunes da Silva, M., Cardoso, A. R., Ferreira, D., Brito, M., Pintado, M. E., & Vasconcelos, M. W. (2014). Chitosan as a biocontrol agent against the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Forest pathology*, 44(5), 420-423.

43. Obana, H., Okihashi, M., Akutsu, K., Taguchi, S., & Hori, S. (2001). Drying ability of anhydrous sodium sulfate on wet organic solvents after liquid-liquid partition. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 42(2), 148-153.
44. Papaianni, M., Ricciardelli, A., Fulgione, A., dErrico, G., Zoina, A., Lorito, M., ... & Capparelli, R. (2020). Antibiofilm Activity of a *Trichoderma* Metabolite against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Alone and in Association with a Phage. *Microorganisms*, 8(5), 620.
45. Pena, L. C., Jung, L. F., Savi, D. C., Serviensi, A., Aluizio, R., Goulin, E. H., ... & Kava, V. (2017). A *Muscodor* strain isolated from *Citrus sinensis* and its production of volatile organic compounds inhibiting *Phyllosticta citricarpa* growth. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(4), 349-360.
46. Pena, L. C., Jungklaus, G. H., Savi, D. C., Ferreira-Maba, L., Serviensi, A., Maia, B. H., ... & Kava, V. (2019). *Muscodor brasiliensis* sp. nov. produces volatile organic compounds with activity against *Penicillium digitatum*. *Microbiological research*, 221, 28-35.
47. Pinto, M. M. M., Sousa, M. E., & Nascimento, M. S. J. (2005). Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Current medicinal chemistry*, 12(21), 2517-2538.
48. Shi, B. B., Tian, C., Lv, X., Schinnerl, J., Ye, K., Guo, H., ... & Liu, J. K. (2023). Boerelasins A–D, four unprecedented cytochalasins from the endophytic fungus *Boeremia exigua*. *The Journal of Organic Chemistry*, 88(19), 13926-13933.
49. Staropoli, A., Iacomino, G., De Cicco, P., Woo, S. L., Di Costanzo, L., & Vinale, F. (2023). Induced secondary metabolites of the beneficial fungus *Trichoderma harzianum* M10 through OSMAC approach. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 28.
50. Swamy, M. K., & Sinniah, U. R. (2015). A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: an aromatic medicinal plant of industrial importance. *Molecules*, 20(5), 8521-8547.
51. Taha, M. A., Ismaiel, A. A., & Ahmed, R. M. (2021). 6-pentyl- α -pyrone from *Trichoderma koningii* induces systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. *European Journal of Plant Pathology*, 159(1), 81-93.
52. Tanapichatsakul, C., Pansanit, A., Monggoot, S., Brooks, S., Prachya, S., Kittakoop, P., ... & Pripdeevech, P. (2020). Antifungal activity of 8-methoxynaphthalen-1-ol isolated from the endophytic fungus *Diatrype palmicola* MFLUCC 17-0313 against the plant pathogenic fungus *Athelia rolfsii* on tomatoes. *PeerJ*, 8, e9103.

53. Torres-Rodriguez, J. A., Reyes-Prez, J. J., Carranza-Patino, M. S., Gaibor-Fernandez, R. R., Rivas-Garcia, T., & Rueda-Puente, E. O. (2024). Chitosan: Biocontrol agent of *Fusarium oxysporum* in tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 36, 1-9.
54. Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. L., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in applied microbiology*, 43(2), 143-148.
55. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., ... & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and molecular plant pathology*, 72(1-3), 80-86.
56. Wang, L., He, W., Wang, X., Li, G., Wang, D., Xu, Y., & Zhu, W. (2023). Asteriquinones from *Aspergillus* sp. GZWMJZ-258 and their derivatives. *Journal of Natural Products*, 86(11), 2522-2528.
57. Wei, M., Huang, L., Li, Q., Qiao, X., Zhao, Z., Yin, J., ... & Zhang, Y. (2023). Spectasterols, Aromatic Ergosterols with 6/6/6/5/5, 6/6/6/6, and 6/6/6/5 Ring Systems from *Aspergillus spectabilis*. *Journal of Natural Products*, 86(6), 1385-1391.
58. Wu, Y. M., Yang, X. Q., Zhao, T. D., Shi, W. Z., Sun, L. J., Cen, R. H., ... & Ding, Z. T. (2022). Antifeedant and antifungal activities of metabolites isolated from the coculture of endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* S1120 with red ginseng. *Chemistry & Biodiversity*, 19(1), e202100608.
59. Xing, M., Zhao, J., Zhang, J., Wu, Y., Khan, RAA, Li, X., ... & Liu, T. (2023). 6-Пентил-2 Н-піран-2-он з *Trichoderma erinaceum* є фунгіцидним проти збудника лічі *Peronophythora litchii* та збереження лічі. *Журнал сільськогосподарської та харчової хімії*, 71 (49), 19488-19500.
60. Yan, W., Zhao, S., Gu, C., Tian, K., Wang, Z., Liu, F., & Ye, Y. (2021). Antifungal meroterpenes and dioxolanone derivatives from plant-associated endophytic fungus *Phyllosticta* sp. WGHL2. *Fitoterapia*, 148, 104778.
61. Yang, H. X., Ai, H. L., Feng, T., Wang, W. X., Wu, B., Zheng, Y. S., ... & Liu, J. K. (2018). Trichothecrotocins AC, antiphytopathogenic agents from potato endophytic fungus *Trichothecium crotocinigenum*. *Organic letters*, 20(24), 8069-8072.
62. Yang, L. J., Peng, X. Y., Zhang, Y. H., Liu, Z. Q., Li, X., Gu, Y. C., ... & Wang, C. Y. (2020). Antimicrobial and antioxidant polyketides from a deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor* SH0105. *Marine drugs*, 18(12), 636.
63. Yang, Y., Chen, Y., Cai, J., Liu, X., & Huang, G. (2021). Antifungal activity of volatile compounds generated by endophytic fungi *Sarocladium brachiariae* HND5 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *PloS one*, 16(12), e0260747.

64. Yang, Z., Dan, W. J., Li, Y. X., Peng, G. R., Zhang, A. L., & Gao, J. M. (2019). Antifungal metabolites from *Alternaria atrans*: an endophytic fungus in *Psidium guajava*. *Natural Product Communications*, 14(5), 1934578X19844116.

65. Yehia, R. S., Osman, G. H., Assaggaf, H., Salem, R., & Mohamed, M. S. (2020). Isolation of potential antimicrobial metabolites from endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* from endemic plant *Zygophyllum mandavillei*. *South African Journal of Botany*, 134, 296-302.

66. Yin, C., Liu, H., Shan, Y., Gupta, V. K., Jiang, Y., Zhang, W., ... & Gong, L. (2019). Cytosporone B as a biological preservative: Purification, fungicidal activity and mechanism of action against *Geotrichum citri-aurantii*. *Biomolecules*, 9(4), 125.

67. Zhao, M., Guo, D. L., Liu, G. H., Fu, X., Gu, Y. C., Ding, L. S., & Zhou, Y. (2019). Antifungal halogenated cyclopentenones from the endophytic fungus *Saccharicola bicolor* of *Bergenia purpurascens* by the one strain-many compounds strategy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(1), 185-192.

68. Zhao, T. D., Yang, X. Q., Zhou, J., Yang, Y. B., & Ding, Z. T. (2023). Antibiotic guanacastane diterpenoids with two new skeletons from *Psathyrella candolleana* uncovered by semisolid and liquid media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(4), 2006-2013.

69. Zheng, M., Xiao, Y., Li, Q., Lai, Y., Dai, B., Zhang, M., ... & Zhang, Y. (2023). Cytotoxic ergosteroids from a strain of the fungus *Talaromyces adpressus*. *Journal of Natural Products*, 86(9), 2081-2090.

70. Дихлорметан

[Електронний ресурс:] <https://tdph.com.ua/ua/p1620241238-metilenhlorid-dihlormetan.html>

71. Дозатор для розливання рідин NPLL-100

[Електронний ресурс:] https://prom.ua/ua/p1832470735-dozator-dlya-razliva.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1_5297199152&gad_source=1&gad_campaignid=20983226771&g_braid=0AAAAADBxJSWTbwra-JsxfE-uhIhzj2WmI&gclid=CjwKCAjw6s7CBhACEiwAuHQckl1Yj6j-ZFvf72aiVfm9KH7Yuz-EhbcRo0NRuX0jtGqElgD1sXEuahoC-5MQAvD_BwE

72. Етилацетат

[Електронний ресурс:] <https://prom.ua/ua/p2567581137-etilatsetat-180-kitaj.html>

73. Хареба, О. (2021). Ефективність сорто-підщепних комбінуваних нових індетермінантних гібридів F1 помідора за вирощування способом малооб'ємної гідропоніки у скляних теплицях. *Вісник аграрної науки*, 99(10), 82-87.