

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.27.06.2017.В.38.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

АЗИМОВА НОДИРА ШОЙИМ ҚИЗИ

**ЦЕЛЛЮЛОЗАЛИ ХОМАШЁЛАРНИ *TRICHODERMA HARZIANUM*
МИЦЕЛИАЛ ЗАМБУРУҒИ ЁРДАМИДА МИКРОБИОЛОГИК
ҚАЙТА ИШЛАШ**

03.00.04– Микробиология ва вирусология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2017

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Азимова Нодира Шойим қизи

Целлюлозали хомашёларни *Trichoderma harzianum* мицелиал
замбуруғи ёрдамида микробиологик қайта ишлаш 3

Азимова Нодира Шойим кизи

Микробиологическая конверсия целлюлозосодержащего
сырья мицелиальным грибом *Trichoderma harzianum*. 23

Azimova Nodira Shoyim kizi

Microbial conversion of cellulose containing
raw materials by the filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. 43

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works 45

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.27.06.2017.В.38.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

АЗИМОВА НОДИРА ШОЙИМ ҚИЗИ

**ЦЕЛЛЮЛОЗАЛИ ХОМАШЁЛАРНИ *TRICHODERMA HARZIANUM*
МИЦЕЛИАЛ ЗАМБУРУҒИ ЁРДАМИДА МИКРОБИОЛОГИК
ҚАЙТА ИШЛАШ**

03.00.04– Микробиология ва вирусология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2017

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.1.PhD/B1 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Микробиология институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифасида (info@microbio.uz) ва «Ziyonet» Ахборот таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Хамидова Хуршеда Муминовна
биология фанлари номзоди

Расмий оппонентлар:

Ташмухамедова Шохиста Собировна
биология фанлари доктори, профессор

Хашимова Нигора Рустамовна
биология фанлари доктори

Етакчи ташкилот:

Тошкент давлат аграр университети

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги DSc.27.06.2017.B.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2017 йил «__» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100128, Тошкент шаҳри, Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7Б-уй, Микробиология институти мажлислар зали. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: info@microbio.uz).

Диссертация билан Микробиология институтининг Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (___ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100128, Тошкент шаҳри, Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7Б-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 3-қават, мажлислар зали. Тел.: (+99871) 241-92-28.

Диссертация автореферати 2017 йил «22» декабр куни тарқатилди.
(2017 йил «22» декабрдаги 4-рақамли реестр баённомаси)

Арипов Тахир Фатихович

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси,
б.ф.д., профессор, академик

Насметова Саодат Мамажановна

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.н.

Гулямова Ташхан Гафуровна

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги
илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Ҳозирги кунда бутун дунёда тўла қимматли озуқа оксили етишмовчилиги муаммосини ҳал этишда микробиологик усулда олинадиган ферментли препаратлардан кенг фойдаланиб келинмоқда. Жаҳон бозорида микроорганизмлар асосида олинадиган саноат ферментларининг умумий ҳажми 2020 йилда 6,2 млрд. АҚШ долларини ва бунда чорвачиликда кенг қўлланиладиган целлюлазалар улуши 15-20% ни ташкил этиши кутилмоқда. Шунга кўра, микроорганизмлар, хусусан микромицетлардан олинадиган целлюлоза парчаловчи ферментларни ажратиб олиш, улар асосида омихта-ем таркибини бойитувчи биопрепаратлар ишлаб чиқариш долзарб аҳамиятга эга.

Бугунги кунда жаҳон қишлоқ хўжалигида чорва моллари учун оксил-витаминли омихта-ем препаратлари ишлаб чиқариш, озуқасининг ҳазм бўлишини яхшилаш, силос ачитқиларини яратишда микромицетлар асосида турли хил ферментли препаратлар олишга катта эътибор қаратилмоқда. Айниқса, *Trichoderma* туркуми замбуруғ турлари ҳосил қиладиган целлюлаза ферментлар комплекси целлюлозали хомашёларни фаол парчалаш хусусиятига эга бўлиб, шу аснода чорвачиликда омихта-ем таркибини микробиологик усулда бойитиш ўсимлик қолдиқларини биоконверсияловчи фаол штаммларни ажратиб олиш ва уларни ишлаб чиқаришга йўналтиришни талаб этмоқда. Шунинг учун, целлюлаза ферментларини синтезловчи замбуруғ штаммларини танлаш ва улар учун оптимал озуқа муҳити ҳамда ўстириш шароитларини аниқлаш, саноатда фойдаланиладиган штаммларнинг стабиллигини ошириш, оксил-витаминли омихта-ем қўшимчаларини ишлаб чиқиш ва целлюлаза ферментларини ҳосил қилувчи микромицетлар асосида биопрепаратлар яратиш илмий-амалий аҳамият касб этади.

Республикамиз мустақилликка эришгач чорвачиликни ривожлантириш борасида кенг кўламдаги ислохотлар олиб борилди. Мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора-тадбирлар асосида муайян натижаларга, жумладан, чорвачилик озуқа базасини кенгайтириш, чорва ҳайвонларини балансланган юқори сифатли омихта-ем билан таъминлашни яхшилаш ҳамда уларни ишлаб чиқаришни ошириш борасида ютуқларга эришилди. Шунингдек, микромицетлар, хусусан *Trichoderma* туркуми замбуруғ турлари асосида омихта-ем сифатини оширувчи замонавий технологияларни ишлаб чиқаришга жорий этишга етарлича эътибор берилмаган. Ўзбекистон Республикасини ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида¹ «чорвачиликни сифатли озуқалар, биокўшимчалар, витаминлар ва бошқа озуқа бирликлари билан таъминлаш» вазифалари белгилаб берилган. Ушбу вазифалардан келиб чиққан ҳолда, жумладан, физиологик фаол бирикмалар ҳосил қилувчи микромицетларни ажратиб олиш ва улар асосида оксил-

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» Фармони.

витаминли омихта-ем қўшимчалари, биопрепаратлар, силос ачитқиларини ишлаб чиқариш биотехнологиясини яратиш борасидаги тадқиқотлар муҳим илмий-амалий аҳамиятга эга.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2008 йил 21 апрелдаги ПҚ-842-сон «Шахсий ёрдамчи, деҳқон ва фермер хўжаликларида чорва моллар кўпайтиришни рағбатлантиришни кучайтириш ҳамда чорвачилик маҳсулотлари ишлаб чиқаришни кенгайтириш борасидаги қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида»ги, 2017 йил 16 мартдаги ПҚ-2841-сон «Чорвачиликда иқтисодий ислохотларни чуқурлаштиришга доир қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида»ги Қарорлари ва 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Адабиётларда *Trichoderma* туркумига мансуб замбуруғларни ажратиб олиш, целлюлолитик фаол штаммларни скрининг қилиш (Алимова Ф.К., 2006; Мороз И.В. ва бошқ., 2013), целлюлаза комплекси ферментларининг синтезланиши, улардан спирт ва омихта-ем олишда фойдаланиш (Морозова Ю.А. ва бошқ., 2013; Садыкова В.С., 2012; Синицын А.П. ва бошқ., 2010; Кошаев А.Г. ва бошқ., 2013), қаттиқ ва суюқ озуқа муҳити шароитида ўсимлик қолдиқларини биоконверсиялаш (Lynd L. ва бошқ., 2005; Mojsov K., 2010; Kocher G. ва бошқ., 2008), целлюлозанинг ферментатив парчаланиш механизми (Рабинович М.Л. ва бошқ., 2000; Кармакар М. ва бошқ., 2011), целлюлаза ферментларини ажратиб олиш ва тозалаш (Yasmin S. ва бошқ., 2013; Irshad M. ва бошқ., 2013; Sonika P. ва бошқ., 2014) бўйича маълумотлар келтирилган.

Мамлакатимизда ўтказилган тадқиқотлар натижасида *Trichoderma* туркумига мансуб замбуруғларнинг тарқалиши, уларнинг морфологияси, ультраструктураси, цитологияси, целлюлозали озуқа муҳитларида ўстириш биотехнологияси, ёғзапоя, шоли сомони, маккажўхори пояси каби дағал ўсимлик қолдиқларини силослаш тўғрисида маълумотлар олинган (Ташпулатов Ж.Ж., 1987; Хамидова Х.М., 1991; Хамидова С.Х., 1990). Бироқ, илмий адабиётларда *Trichoderma* туркумига мансуб замбуруғларнинг ўсимлик хомашёси полисахаридларини чуқур биоконверсиялашга ёрдам бериб, бунда қанд, оксил, аминокислоталар ҳосил қилиш, ҳамда кенг спектрдаги целлюлаза комплекси ферментларини ва ксиланазани синтезлаш хусусияти тўғрисида, кенг спектрдаги ўсимлик қолдиқларини биоконверсиялаш хусусиятига эга *Trichoderma* туркумига мансуб

замбуруғларни суяқ озука муҳитида ўстириш асосида фаол ферментли препаратларни яратиш тўғрисидаги маълумотлар амалда учрамайди.

Бугунги кунда илмий асосланган чиқиндиларсиз технологиялар асосида қишлоқ хўжалиги ҳайвонлари озуқасининг сифатини яхшиловчи экологик тоза, ҳавфсиз, импорт ўрнини босувчи омихта-ем қўшимчалари ва биопрепаратларни яратиш катта илмий-амалий аҳамиятга эга бўлмоқда.

Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Микробиология институти амалий лойиҳалари: ФА-А6-Т127 «Қишлоқ хўжалик ва озиқ-овқат ишлаб чиқариш чиқиндиларини микробиологик қайта ишлаб оқсил-витаминли омихта-ем препаратларини тайёрлаш» (2009-2011), ФА-А6-Т216 «Физиологик фаол бирикмалар ҳосил қилувчи микроорганизмлар асосида омихта-ем қўшимчаларини олиш биотехнологияси» (2012-2014) илмий-тадқиқот ишлари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади целлюлаза комплекси ва ксиланаза ферментлари ҳосил қилувчи янги фаол маҳаллий микромицет штамmlарини ажратиб олиш, чорвачилик учун биопрепарат яратиш мақсадида ўсимлик субстратларини биоконверсиясини амалга оширувчи самарали штамmlни танлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари қуйидагилардан иборат:

турли хил табиий манбалардан целлюлозани фаол парчаловчи микромицетларни ажратиб олиш ва скрининг қилиш;

танлаб олинган штамmlнинг морфологик-культурал, физиологик-биокимёвий хусусиятларини аниқлаш, идентификациялаш, оптимал озука муҳити ва ўстириш шароитларини танлаш;

целлюлаза комплекси (эндо-1,4-β-глюканаза, экзо-1,4-β-глюканаза, β-глюкозидаза) ва ксиланаза ферментлари ҳосил қилувчи танлаб олинган микромицет ёрдамида целлюлозали субстратларни биоконверсиялаш, ҳамда уларни оқсил, углевод, аминокислоталар билан бойиган омихта-ем олиш мақсадида қўллаш имкониятларини тадқиқ этиш;

целлюлаза ферментларини тозалаш, комплекс ва тозаланган ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятларини аниқлаш;

танлаб олинган замбуруғ асосида биопрепарат яратиш ва ундан амалиётда фойдаланиш.

Тадқиқотнинг объекти маккажўхори ва буғдой ризосфераси, Республиканинг турли минтақаларидан олиб келинган тупроқ намуналари, терак, тол дарахтларининг, чириган ёғочлик қисми, буғдой сомони ғарами қолдиқлари, пахта далаларидан келтирилган зарарланган пахта намуналари каби турли хил табиий манбалардан ажратиб олинган микромицет штамmlлари, скрининг натижасида танлаб олинган *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғ штамmlи, целлюлозали ўсимлик субстратларидан иборат.

Тадқиқотнинг предмети целлюлаза продуцентлари бўлган микромицетларни ажратиб олиш ва скрининг қилиш, танлаб олинган

штаммнинг целлюлолитик фаоллигини аниқлаш, целлюлозали ўсимлик қолдиқларини биоконверсиялаш орқали осон ўзлаштириладиган углеводлар, оксил, аминокислоталар билан бойитиш, танлаб олинган штамм асосида биопрепарат яратиш ва уни амалий шароитда синовдан ўтказишдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотлар жараёнида микробиологик, биокимёвий ва микологик усуллардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

ажратиб олинган микроорганизмлар орасидан скрининг натижасида янги, тез ўсувчи, культурал суюқлигида кенг спектрдаги фаол целлюлаза ферментлари ва ксиланаза ҳосил қилувчи маҳаллий *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғ штамми танлаб олинган ва идентификацияланган;

T. harzianum UzCF-28 замбуруғи ёрдамида целлюлозали субстратларнинг биоконверсияланиши ва уларни ўзлаштириладиган углеводлар, оксил, аминокислоталар билан бойиши аниқланган;

T. harzianum UzCF-28 замбуруғининг культурал суюқлигидан молекуляр массалари 135 ва 75 кДа бўлган EG II ва EG III ферментлари ажратиб олинган ҳамда уларнинг физик-кимёвий хусусиятлари очиқ берилган;

илк бор республикамізда тез ўсувчи маҳаллий *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғ штамми асосида ўсимлик массаларини силослашда ва турли хил целлюлозали субстратларни бойитишда фойдаланиладиган «Трихостим» биопрепарати яратилган. Лаборатория ва ишлаб чиқариш шароитларида тайёрланган силоснинг микробиологик, биокимёвий, органолептик кўрсаткичлари аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат: ўсимлик субстратларини биоконверсиялашда ва чорвачилик учун омихта-ем сифатини оширишда муҳим аҳамиятга эга целлюлолитик ферментлар фаол комплекси ва ксиланаза ферментларини культурал суюқлигида ҳосил қилувчи янги маҳаллий *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғ штамми патентланган;

«Трихостим» биопрепарати Самарқанд вилояти Жомбой тумани «Элатон балиқ чорва» фермер хўжалигида беда ўсимлик массаларини силослашда ҳамда Қашқадарё вилояти Касби тумани «Қурбонов Ражабпўлат Қурбонович» фермер хўжалигида омихта-емни бойитиш учун ишлаб чиқариш шароитларида синовдан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги. Барча тажрибалар уч такрорий нисбатда олиб борилиб, қийматларнинг ўртачаси ва стандарт хатолик (SE) Microsoft Excel (Microsoft корпорацияси, АҚШ) дастурида ҳисобланган. Олинган натижаларнинг $P \leq 0,05$ да назорат қийматидан ишончли фарқ қилиши ANOVA дастурида таҳлил қилинган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти скрининг натижасида танлаб олинган *T. harzianum* UzCF-28 маҳаллий штаммининг культурал суюқлиги кенг спектрдаги ферментлар яъни эндо-1,4-β-глюканаза, экзо-1,4-β-глюканаза, β-глюкозидаза, ксиланаза фаоллигига эга эканлиги билан боғлиқ бўлиб, эришилган ютуқлар юртимизда қишлоқ хўжалиги ва саноатнинг

целлюлозали чиқиндилари ва ўсимлик қолдиқларини микробиологик қайта ишлашга йўналтирилган илмий тадқиқотларнинг ривожига катта ҳисса қўшади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти олинган фундаментал ва амалий натижаларнинг чорвачиликда қўлланилиши натижасида республикамиз қишлоқ хўжалигининг янада ривожланишида маълум даражада ҳисса қўшиши билан ифодаланади. Маҳаллий *T. harzianum* UzCF-28 штамми асосида яратилган «Трихостим» биопрепаратининг чорвачиликда тадбиқ этилиши омихта-ем препаратларини хилма-хиллигини оширишга ва қисман импорт ўрнини босишга ёрдам беради.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал суяқлигидан чорва озуқасидаги ўсимлик қолдиқларининг ҳазм бўлишини оширувчи ва таркибини бойитувчи биопрепарат олиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

целлюлаза ферментлари комплекси ва ксиланаза ҳосил қилувчи, ўсимлик қолдиқларини гидролизлаб, қандлар билан бойитувчи, оксил ва аминокислоталар ҳосил қилувчи *T. harzianum* UzCF-28 мицелиал замбуруғ штамми учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтиро патенти (20.05.2014 й. № IAP 04901) олинган. Натижада омихта-ем препарати ва силос ачитқиси сифатида тавсия этиладиган «Трихостим» биопрепаратини яратиш имконини берган;

«Трихостим» биопрепарати Самарқанд вилояти Жомбой туманининг «Элатон балиқ чорва» ва Қашқадарё вилояти Касби тумани «Қурбонов Ражабпўлат Қурбонович» фермер хўжаликларида жорий этилган (Қишлоқ ва сув хўжалиги вазирлигининг 2016 йил октябрдаги 02/12-1244 сон маълумотномаси). Натижада «Трихостим» биопрепарати таъсирида чорва молларининг сут бериш миқдори 15-20% гача ортишига имкон берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 5 та халқаро ва 6 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 20 та илмий иш нашр этилган. Шундан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертация асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 8 та мақола, жумладан, 7 таси республика ва 1 таси хорижий журналда нашр этилган ҳамда 1 та ихтиро патенти олинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, олти боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 120 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари асосланган, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «*Trichoderma* туркумига мансуб замбуруғларнинг целлюлозали хомашёларни парчалаши ва улардан омихта-ем таркибини бойитишда фойдаланиш тўғрисида адабиёт манбаларининг шархи» деб номланган биринчи бобида целлюлозали ўсимлик қолдиқларининг микроорганизмлар ёрдамида парчаланиши, уларнинг орасида *Trichoderma* туркуми замбуруғларининг тутган ўрни, *Trichoderma* туркуми микромицетларининг тарқалиши, таксономияси, целлюлозали хомашёларни биоконверсиялаши, целлюлаза, ксиланаза ферментлари, оксил, аминокислоталар ҳосил қилиши, ферментлар фаоллиги ва оксил ҳосил қилишига ташқи муҳит омилларининг таъсири, целлюлаза ферментларини тозалаш тўғрисида маълумотлар берилган. *Trichoderma* туркуми замбуруғлари асосида ферментли препаратлар ва омихта-ем қўшимчаларининг олиниши ҳамда уларнинг ўсимлик қолдиқларини силослашда қўлланилиши кенг ёритилган.

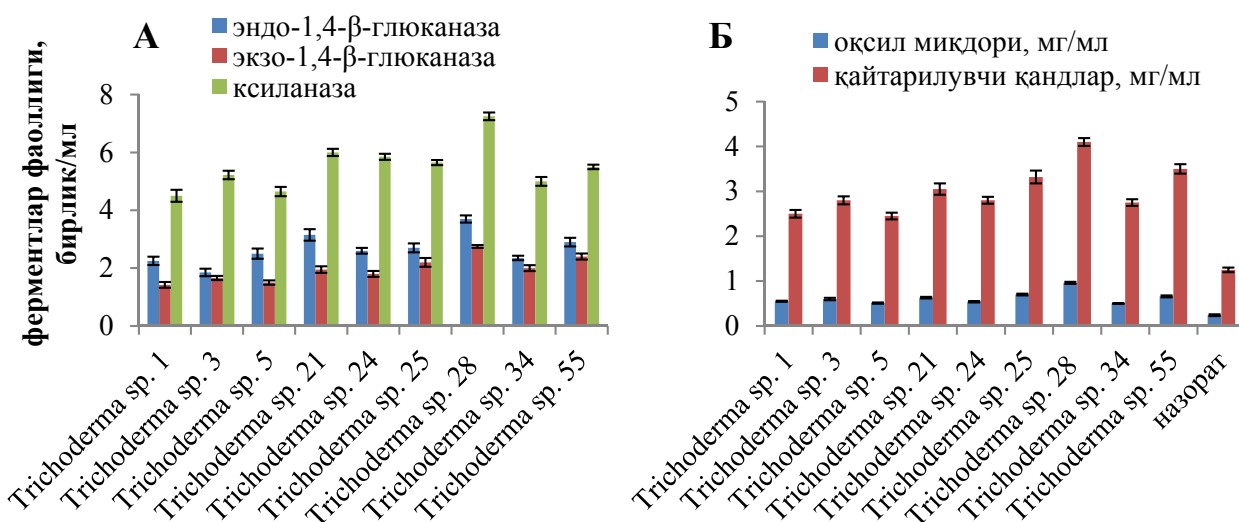
Диссертациянинг «**Табиий манбалардан целлюлоза парчаловчи микромицетларни ажратиб олиш, танлаб олинган штаммнинг хусусиятларини ўрганиш, биопрепарат тайёрлаш ва амалиётда қўллаш усуллари**» деб номланган иккинчи бобида тупроқ ва ўсимлик намуналаридан целлюлоза парчаловчи микромицетларни ажратиб олиш, скрининг натижасида танлаб олинган энг фаол *Trichoderma* sp. 28 замбуруғининг морфологик-культурал хусусиятларини ўрганиш, оптимал озуқа муҳити ва ўстириш шароитларини танлаш усуллари кўрсатиб ўтилган. *T. harzianum* UzCF-28 штаммининг целлюлозали ўсимлик қолдиқларини биоконверсиялаши, культурал суяқликдаги целлюлаза, ксиланаза ва қўшимча ферментларининг фаоллиги, оксил, аминокислоталар миқдорини аниқлаш, целлюлаза ферментларини тозалаш, силос тайёрлаш, силоснинг микрофлораси, биокимёвий хусусиятларини ўрганиш ва *T. harzianum* UzCF-28 штаммининг қорамол ичак микрофлорасидаги фойдали микроорганизмлар билан ўзаро муносабатини аниқлаш усуллари баён қилинган.

Диссертациянинг «**Целлюлоза парчаловчи микромицетларни ажратиб олиш, скрининг қилиш, танлаб олинган штамм учун оптимал озуқа муҳити ва ўстириш шароитларни танлаш**» деб номланган учинчи бобида турли хил табиий манбалардан микромицетларни ажратиб олиш, уларнинг целлюлоза парчалаш хусусияти бўйича скрининг ўтказиш, энг фаол

штаммни танлаш, унинг морфологик-культурал, физиологик-биокимёвий хусусиятларини ўрганиш, оптимал озуқа муҳити ва ўстириш шароитларини танлаш бўйича олиб борилган тадқиқот натижалари келтирилган.

Тупроқ ва ўсимлик намуналаридан 60 та микромицет штаммлари ажратиб олинди, уларнинг 9 та туркумга мансублиги аниқланган. Ажратиб олинган замбуруғларнинг аксарияти *Trichoderma* (14 штамм), *Aspergillus* (11 штамм) ва *Fusarium* (10 штамм) туркумларига мансублиги белгиланган. Ажратиб олинган штаммларнинг целлюлоза парчалаш хусусиятлари филтр қоғозида ўстириш орқали аниқланган. Бирламчи танлов натижасида ўрганилган 60 та замбуруғ штаммлари орасидан 44 та штамм филтр қоғозининг структурасини маълум даражада ўзгартирган.

Танлаб олинган замбуруғларни Мандельс озуқа муҳити билан намланган филтр қоғозида ўстириб, целлюлолитик фаоллигини кейинги такқослаб ўрганиш, филтр қоғозини энг фаол парчалаган *Trichoderma* туркумига мансуб 9 та замбуруғ штаммини танлаш имконини берган. Замбуруғларни батафсилроқ тадқиқ этиш учун улар 2% буғдой кепаги қўшилган Мандельс суюқ озуқа муҳитида ўстирилган ҳамда целлюлолитик, ксиланолитик фаоллиги, субстратни қандлантириш хусусияти ва оксил ҳосил қилиши аниқланган (1-расм).



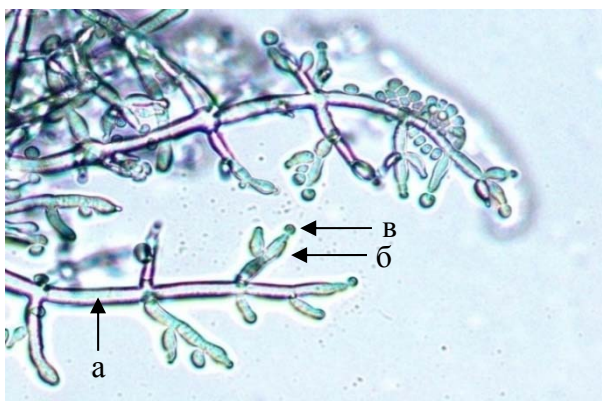
1-расм. *Trichoderma* туркумига мансуб замбуруғларнинг ферментатив фаоллиги (А), оксил ва қайтарилувчи қандлар миқдори (Б)

Олинган натижалардан терак дарахтининг чириган ёғочлик қисмидан ажратиб олинган *Trichoderma* sp. 28 замбуруғининг культурал суюқлигида 4-кунда целлюлаза ва ксиланаза ферментлари фаоллигининг энг юқори эканлиги, оксил кўп миқдорда ҳосил бўлганлиги ҳамда субстратни юқори даражада қандлар билан бойитганлиги аниқланган. Маккажўхори ўсимлигининг ризосферасидан ажратилган *Trichoderma* sp. 55, Тошкент вилояти пахта даласидан келтирилган пахта намунасидан ажратилган *Trichoderma* sp. 25 ва буғдой сомони ғарами қолдиқларидан ажратилган

Trichoderma sp. 21 штамлари целлюлолитик ва ксиланолитик фаолликлари бўйича кейинги ўринни эгаллаган (1-расм).

Кейинги тадқиқотлар учун *Trichoderma* sp. 28 штамми танлаб олинган. Морфологик-культурал хусусиятларини ўрганиш асосида штамм *Trichoderma harzianum* (Rifai) 28 сифатида идентификацияланган. Янги классификацияга кўра у Ascomycota бўлими, Sordariomycetes синфи, Нуроcreales тартиби, Нуроcreaceae оиласи, *Trichoderma* туркуми ва *harzianum* турига мансублиги белгиланган.

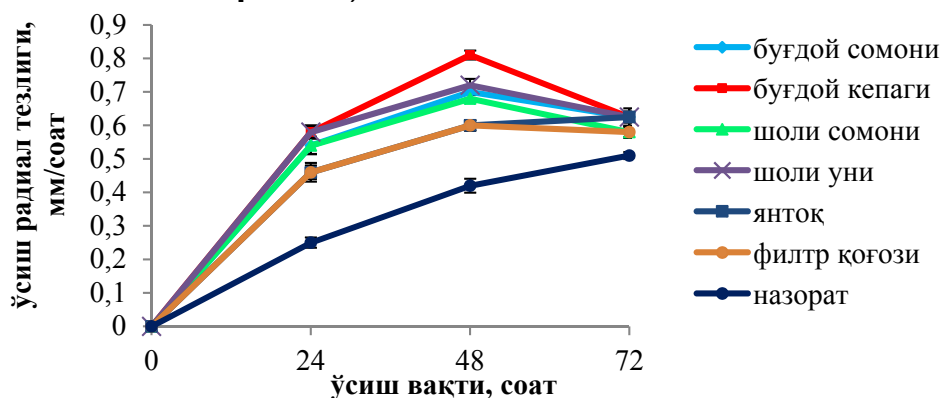
T. harzianum 28 штамми микроскоп остида ўрганилганда гифалари қарама-қарши шохланганлиги, фиалидалари бутилкасимон, конидиялари шарсимон эканлиги аниқланган (2-расм).



2-расм. *T. harzianum* 28 штаммининг морфологияси (Мандельс озуқа муҳити билан намлантирилган филтр қоғозида); а-конидиофора, б-фиалида, в-конидия (10×40 марта катталаштирилган)



3-расм. Шоли уни қўшилган Мандельс озуқа муҳитидаги *T. harzianum* 28 замбуруғининг колонияси (3-кун)



4-расм. Турли хил углерод манбалари қўшилган Мандельс озуқа муҳитларида *T. harzianum* 28 замбуруғи колонияларининг ўсиш радиал тезлиги

Классик усулда тайёрланган Чапека, сусло-агар, картошка-декстрозали-агар, Мандельс озуқа муҳитларида ҳамда ягона углерод манбаи сифатида целлюлозали субстратлар қўшилган Мандельс озуқа муҳитларида мазкур штамм колонияларининг морфологияси ва радиал ўсиш тезлиги ўрганилган.

Колониядаги донатор мицелийларнинг радиал нур ва халқа ҳосил қилиб ўсиши ушбу штамм учун хос бўлган морфологик хусусият эканлиги маълум бўлган (3-расм).

Тадқиқот натижасида колонияларнинг целлюлозали субстратлар қўшилган барча озуқа муҳитларида назоратга нисбатан юқори тезлик билан ўсиши ва 3-кунда Петри чашкаси юзасини қоплаб олиши аниқланган. 48 соатда буғдой кепаги қўшилган озуқа муҳитида колониянинг радиал ўсиш тезлиги 0,81 мм/соат га етган (4-расм). Бу тадқиқот *T. harzianum* 28 штаммининг қийин гидролизланувчи углерод манбаларини парчалаш ва ўзлаштириш хусусиятига эга эканлигини кўрсатади.

T. harzianum 28 штамми учун озуқа муҳити ва оптимал ўстириш шароитлари танланган. *Trichoderma* туркуми замбуруғларини ўстиришда оптимал озуқа муҳити бўлиб ҳисобланадиган Мандельс минерал озуқа муҳити асосида ўзгартирилган озуқа муҳити тайёрланган. Озуқа муҳитини арзонлаштириш учун Мандельс озуқа муҳити таркибидаги пептон ва мочевина қўшилмаган. 2% сахароза ўрнига ягона углерод манбаи сифатида целлюлозали субстратлардан фойдаланилган. Азот манбаи сифатида $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ўрнига ферментлар фаоллиги ва оксил ҳосил бўлишига ижобий таъсир кўрсатувчи $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ тавсия этилган.

Озуқа муҳитининг бошланғич pH қиймати 5,0-5,5, ўстириш ҳарорати 28-30°C оралиғида бўлиши, экув материали учун 6 кунли *T. harzianum* 28 штаммининг 2% микдорда 10^{6-7} спора/мл концентрациядаги суспензиясидан ёки 1 кунли вегетатив мицелийларидан 3-4% микдорда фойдаланиш оптимал деб белгиланган.

Танлаб олинган штаммнинг культурал суюқлигида ҳосил бўладиган целлюлаза ва ксиланаза ферментлари фаоллигининг юқори бўлиши ва оксил кўп микдори тўпланиши учун оптимал ўстириш вақти аниқланган. Буғдой кепаги қўшилган суюқ ва қаттиқ озуқа муҳитларида 10 кун давомида тадқиқот олиб борилган. *T. harzianum* 28 штаммининг ўсиши давомида муҳит pH қийматининг ишқорий томонга ўсиб бориши, ферментларнинг энг фаол даври асосан, суюқ озуқа муҳитида 3-кунга, қаттиқ озуқа муҳитида эса 2-кунга тўғри келиши аниқланган. Оксил суюқ озуқа муҳитида 4-кунда, қаттиқ озуқа муҳитида 1-2 кунларда кўп микдорда тўпланиши кузатилган.

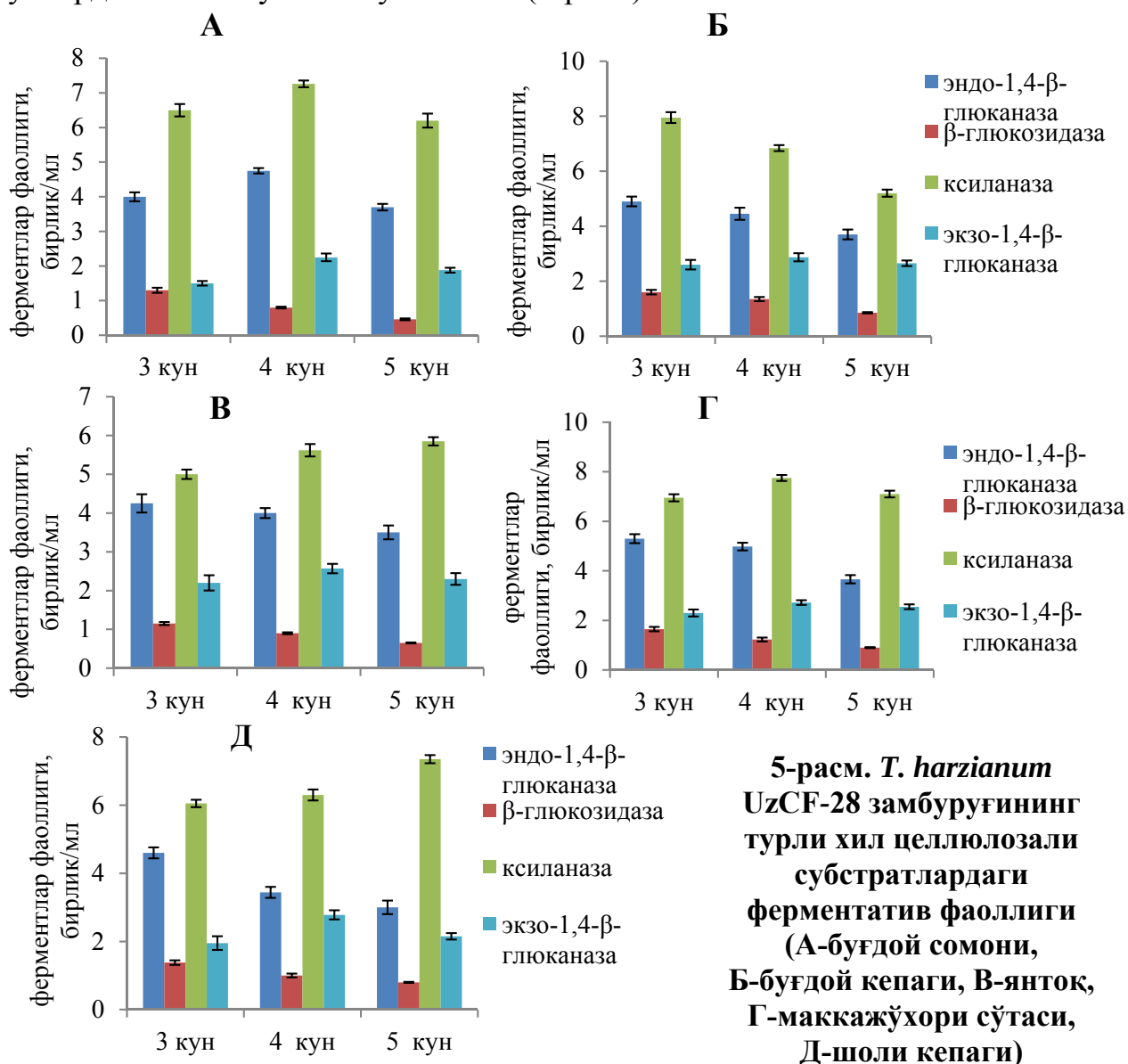
Тадқиқотлар давомида *T. harzianum* 28 замбуруғи патентланган ва *T. harzianum* UzCF-28 штамми деб номланган.

Ажратиб олинган микромицетлардан *T. harzianum* 28 штамми фаол целлюлоза парчалаш, кенг спектрда ва фаол целлюлаза ферментлари комплекси ва ксиланаза ҳосил қилиш, субстратни кўп микдорда қайтариловчи қанд ва оксилга бойитиш хусусиятлари билан устунлик қилган. Ушбу штаммни 2% микдорда целлюлозали субстратлар қўшилган, ўзгартирилган Мандельс озуқа муҳитида, 28-30°C ҳароратда 3-4 кун давомида ўстириш оптималдир.

Диссертациянинг «*T. harzianum* UzCF-28 штаммининг ўсимликлар қолдиғини биоконверсиялаши» деб номланган тўртинчи бобида асосан

чорва молларига озуқа сифатида бериладиган ўсимлик қолдиқларининг суюқ ва қаттиқ озуқа муҳити шароитларида *T. harzianum* UzCF-28 штамми томонидан биоконверсияланиши, субстратларнинг қандлар, оксиллар ва аминокислоталар билан бойиши тўғрисидаги натижалар баён қилинган.

Суюқ озуқа муҳити шароитида буғдой сомони, кепаги, янтоқ ўсимлигининг майдаланган ер устки қисми, маккажўхори сўтаси ва шоли кепаги каби қийин парчаланувчи субстратлар *T. harzianum* UzCF-28 штамми ёрдамида биоконверсияланганда культурал суюқликдаги ферментлар фаоллиги куйидаги кетма-кетликни эгаллаши аниқланган: ксиланаза >эндо-1,4-β-глюканаза >экзо-1,4-β-глюканаза >β-глюкозидаза. Шунингдек, ферментларнинг максимал фаоллиги субстратларга боғлиқ равишда турли кунларда намоён бўлиши кузатилган (5-расм).



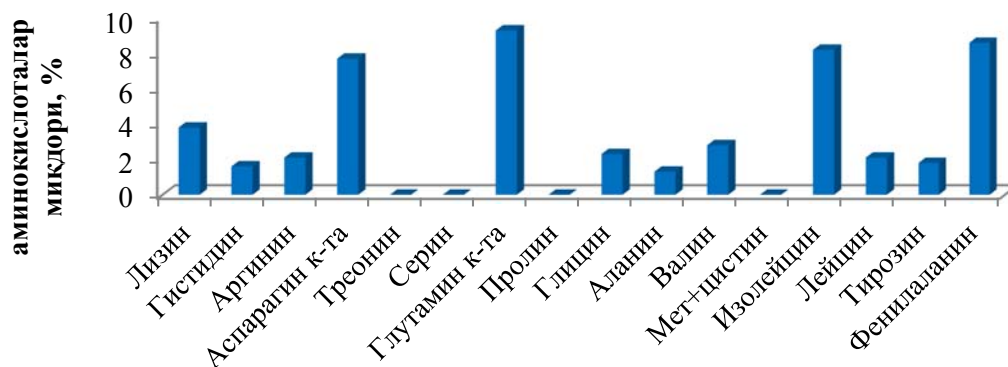
Суюқ озуқа муҳити шароитида ўсимлик қолдиқлари *T. harzianum* UzCF-28 штамми томонидан фаол гидролизланиб, қайтариловчи қандларнинг энг кўп миқдори 3-кунда, буғдой кепаги қўшилган озуқа муҳитида ҳосил бўлган

ва 4,6 мг/мл ни ташкил қилган. Назоратда яъни штамм экилмаган озуқа муҳитида 1,26 мг/мл миқдорда қанд борлиги аниқланган. Шунингдек, ушбу озуқа муҳитларида назоратга нисбатан оксил миқдорининг ортганлиги кузатилган. Хусусан, маккажўхори сўтаси қўшилган озуқа муҳитида назоратга нисбатан 4,2 марта, буғдой кепагида 3,2, янтоқда 3,6, буғдой сомонида 4,7, шоли кепагида 3,2 марта оксил миқдори ортиши аниқланган.

Қаттиқ озуқа муҳити шароитида *T. harzianum* UzCF-28 штаммининг янтоқ, шоли сомони, кипиғи ва шоли уни каби субстратларни биоконверсиялаш хусусияти 10 кун давомида ўрганилганда, штамм ҳосил қилган ферментларнинг энг фаол нуқтаси асосан 2 ва 5 кун оралиқларига тўғри келиши ва эндо-1,4-β-глюканаза, сўнгра ксиланаза ферментининг фаоллиги устунлик қилиши аниқланган. Жумладан, шоли кипиғидан иборат муҳитда эндо-1,4-β-глюканаза фаоллиги – 58,5 бирлик/г, ксиланаза – 22,5, экзо-1,4-β-глюканаза – 7,75 ва β-глюкозидаза – 19,5 бирлик/г ни ташкил этган.

Қаттиқ озуқа муҳити шароитида *T. harzianum* UzCF-28 штамми биоконверсиялаган ўсимлик қолдиқларида оксил ва қайтарилувчи қандлар асосан 1 ва 4 кунлар оралиғида кўп миқдорда ҳосил бўлиши кузатилган. Бу вақтда шоли сомонида назоратга нисбатан 2,7 марта, шоли кипиғида 3,4, шоли унида 1,84 ва янтоқда 1,96 марта кўп миқдорда оксил тўпланиши аниқланган. Тажрибанинг 1-кунида шоли кипиғидаги қайтарилувчи қандлар миқдори назоратга нисбатан 2,52, шоли унида 1,73, янтоқда 1,64, 3-кунда шоли сомонида 2,35 марта кўп миқдорни ташкил қилган.

T. harzianum UzCF-28 замбуруғининг биомассаси ва культурал суюқлигидаги аминокислоталарнинг миқдори ва сифат таркиби ўрганилиб, замбуруғдан ўсимликлар қолдиқларида ўстириш орқали омихта-ем оксили олиш мақсадида самарали фойдаланиш мумкин эканлиги аниқланган. Мицелийдаги жами аминокислоталар миқдори 41,6% ни, шу жумладан, алмашинмайдиган аминокислоталар 17,3% ни ташкил қилган. Аминокислоталар миқдорий таркибининг таҳлили аспарагин ва глутамин кислоталари, изолейцин ва фенилаланиннинг устунлик қилишини кўрсатган (6-расм).



6-расм. *T. harzianum* UzCF-28 биомассасидаги аминокислоталар таркиби

T. harzianum UzCF-28 штаммининг культурал суюқлигида алмашинмайдиган аминокислоталарнинг максимал миқдори углерод манбаи

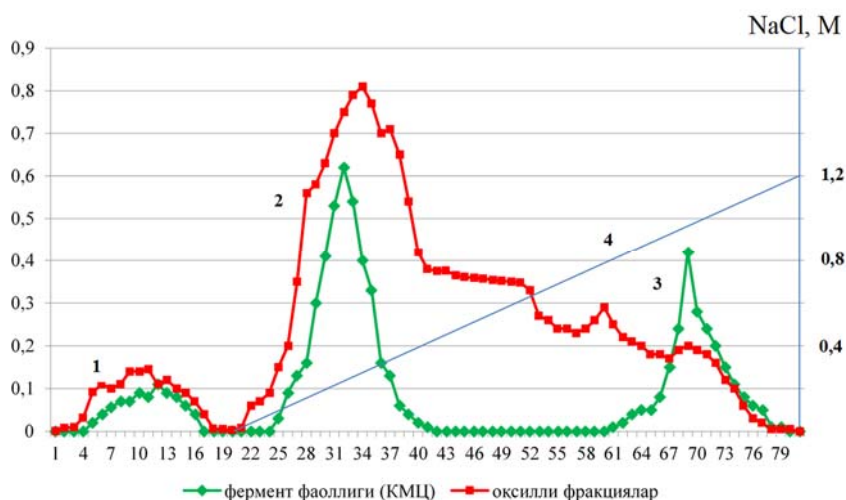
сифатида 2% микдорда янтотдан фойдаланилганда 4-кунда қайд қилинган. Алмашинмайдиган аминокислоталар таркиби бўйича аргинин (0,37%), лизин (0,32%) ва фенилаланин (0,26%) устунлик қилган.

T. harzianum UzCF-28 штаммининг культурал суюқлигида α -амилаза ва протеаза каби қўшимча ферментларнинг фаоллиги аниқланган. 3-кунда α -амилаза фаоллиги буғдой кепаси қўшилган суюқ озуқа муҳитида 0,45 бирлик/мл ва қаттиқ озуқа муҳитида 0,23 бирлик/г, протеаза фаоллиги суюқ озуқа муҳитида 0,033 бирлик/мл, қаттиқ муҳитда 0,083 бирлик/г ни ташкил қилган.

Тадқиқот натижаларидан маълум бўлганидек, *T. harzianum* UzCF-28 штамми ўрганилган барча ўсимлик қолдиқларини фаол гидролизлаб, юқори ферментатив фаолликни намоён қилган ҳамда субстратларни қайтариловчи қандлар, оксил ва аминокислоталарга бойитган.

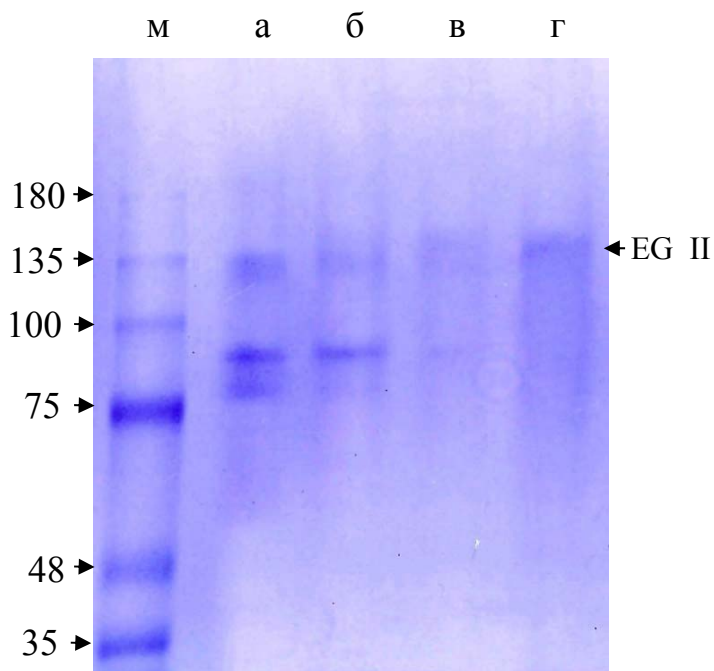
Диссертациянинг «*T. harzianum* UzCF-28 штаммининг целлюлаза ферментларини хусусиятлари» деб номланган бешинчи боби *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғи целлюлолитик ферментларининг хусусиятларини ўрганишга бағишланган.

Комплекс ҳолдаги эндо-, экзо- 1,4- β -глюканаза ва ксиланаза ферментларининг физик-кимёвий хусусиятлари ўрганилганда, учала фермент ҳам катта диапазондаги рН муҳитида фаолликка эга бўлиб, рН 5,0 да эндо-1,4- β -глюканаза ва ксиланаза ферментлари, рН 5,5 да экзо-1,4- β -глюканаза максимал фаолликни намоён қилган. Инкубация даврида ҳароратнинг 50°C бўлиши, инкубация вақти эндо-1,4- β -глюканаза ва ксиланаза ферментлари учун 30 минут, экзо-1,4- β -глюканаза учун 60 минут бўлиши оптимал эканлиги маълум бўлган. Ферментлар фаоллигининг турли ҳароратларда барқарорлиги ўрганилганда, уларнинг 70°C гача маълум даражада фаолликни сақлаб қолиши, 80°C да эса тўлиқ инактивацияга учраши аниқланган. 1% ли Na-КМЦ ва ксилан субстратлари эндо-1,4- β -глюканаза ва ксиланаза ферментларининг, 50 мг микдоридаги филтёр қоғози экзо-1,4- β -глюканаза фаоллигининг максимал даражада бўлишини таъминлаган.

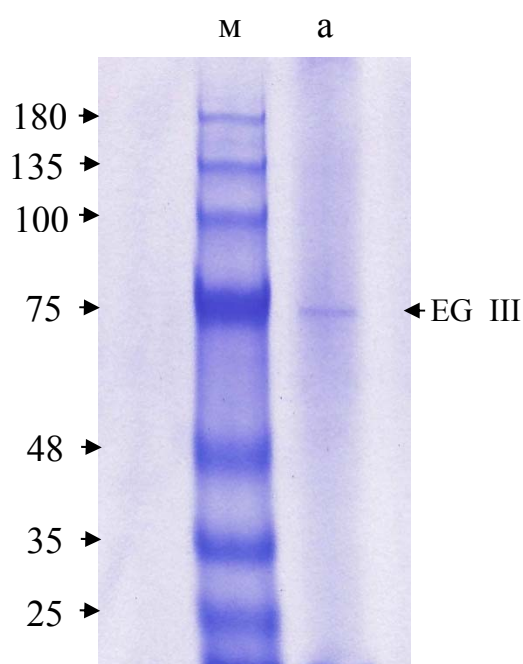


7-расм. *T. harzianum* UzCF-28 эндо-1,4- β -глюканазасининг DEAE- Toyopearl[®] 650 M даги ионалмашинув хроматографияси, рН 7,0 : 1- EG I, 2- EG II, 3- EG III, 4-градиент – NaCl

Диализланган, қисман тозаланган ферментнинг ДЕАЕ-Тоуорpearl[®] 650 М да ион алмашинув хроматография усулида тозаланиши куйидаги фракцияларни олишга имкон берган: гел билан боғланмаган EG I, 0,2 М концентрациясидаги NaCl да элюцияланган EG II ва юқори электр зарядлари ҳисобига гел билан мустаҳкам боғланган, фақат юқори концентрациядаги 0,96 М NaCl эритмаси билан элюцияланган EG III фракциялари (7-расм).



8-расм. ДЕАЕ- Тоуорpearl[®] 650М да бўлинганидан сўнг SDS-PAGE оқсиллар: м- маркер (кДа да), а – 10-фракция, б – 11-фракция, в – 12-фракция, г - тозаланган 135 кДа EG II



9-расм. SDS-PAGE: м-маркер (кДа да), а-тозаланган 75 кДа EG III

EG II ва EG III ларни сақловчи фракциялар ДЕАЕ-Тоуорpearl[®] 650 М, рН 7,0 да такрорий хроматография қилиниб, молекуляр массалари мос равишда 135 ва 75 кДа га тенг EG II ва EG III га ўхшаш ферментлар олинган (8, 9-расм). Таъкидлаб ўтиш жоизки, олинган молекуляр ҳолдаги ферментлар адабиётда маълум бўлган, молекуляр массаси 70 кДа дан ошмайдиган целлюлазалардан фарқ қилган. Гомоген ҳолда ажратиб олинган ферментларнинг физик-кимёвий хусусиятлари ўрганилган. Фойдаланилган субстратларга боғлиқ бўлмаган ҳолда EG I ва EG III ферментлар учун оптимал рН 4,5 га, EG II фермент учун оптимал рН 4,7 га тенг эканлиги, эндо-1,4-β-глюканаза учун оптимал ҳарорат 50°C ни ташкил қилиши аниқланган. EG I, EG II ва EG III ларнинг термик турғунлиги аниқланган. EG I ва EG II 40°C гача қиздирилганда фаолликларини мос равишда 14% ва 39% га йўқотиши, EG III 40°C гача қиздирилганда, инактивацияга учрамасдан, аксинча, унинг фаоллиги ферментнинг бошланғич фаоллигига нисбатан уч марта ортиши кузатилган.

Инкубация вақти 60 минутгача узайтирилиши билан субстратларга (Na-

КМЦ ва фильтр қоғози) боғлиқ бўлмаган ҳолда EG I ва EG II ферментларининг фаоллиги мос равишда ортиши аниқланган. Михаэлис Км константаси Na-КМЦ бўйича EG I ва EG II учун мос равишда 2 мг ва 2,5 мг, ватман фильтр қоғози бўйича EG I ва EG II учун Км қиймати 38 мг ва 31 мг га тенг эканлиги маълум бўлган.

5, 10, 15, 20 mM концентрациядаги Ca^{2+} ионларининг EG I ва EG II ферментларига таъсири ўрганилганда, EG I ферментига Ca^{2+} ионининг 15 mM концентрацияси, EG II ферментига 10 mM концентрацияси оптимал бўлиб, уларнинг фаоллиги мос равишда назоратга нисбатан 46% ва 43% га ортиши кузатилган.

Шундай қилиб, олинган натижалар *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг эндо-1,4-β-глюканаза молекуляр ҳолдаги ферментлари бир-биридан нафақат молекуляр оғирлиги ва фаоллик даражаси билан, шунингдек, физик-кимёвий хусусиятлари билан фарқланишини кўрсатган. Бу фарқланишлар эҳтимол турли хил қисм хужайраларида синтезланган ушбу ферментларнинг структурасидаги хилма-хилликдан келиб чиққан.

Ўрганилган ферментларнинг pH 4,0 дан 6,0 гача бўлган диапазонда ва 60-70°C гача бўлган ҳароратларда ўз фаоллигини сақлаб қолишдек муҳим хусусиятлари мазкур ферментлардан республикамизнинг иссиқ иқлим шароитида қишлоқ хўжалиги чиқиндиларини қайта ишлашда самарали фойдаланиш мумкин эканлигини тасдиқлайди.

Диссертациянинг «**Сифатли омикта-ем олишда *T. harzianum* UzCF-28 штаммидан фойдаланиш**» деб номланган олтинчи боби *T. harzianum* UzCF-28 штаммининг культурал суюқлиги иштирокида ўсимлик қолдиқларини силослаш, силоснинг микрофлораси, органолептик ва биокимёвий хусусиятларига таъсирини аниқлаш, чорва моллари ичак микрофлорасидаги фойдали микроорганизмлар билан ўзаро муносабатини аниқлаш, лаборатория шароитида биопрепарат олиш, олинган тадқиқот натижаларининг амалиётга тадбиқ этилиши ва синов натижалари тўғрисидаги маълумотлар келтирилган.

Лаборатория шароитида 0,2-0,5 см гача майдаланган буғдой сомони ва маккажўхори пояси ҳамда, 1:1 нисбатда иккала ўсимлик қолдиқларининг аралашмаси *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал суюқлиги иштирокида силосланган. Сўнгра силоснинг органолептик, микробиологик ва биокимёвий таҳлили ўтказилган.

3-, 10- ва 30-кунларда силос намуналарида органолептик хусусиятлар бўйича фарқланишлар кузатилган. Буғдой сомонидан тайёрланган силос сариқ рангда, маккажўхори поясидан тайёрланган силос сарғиш-яшил ва сарғиш-жигарранг, иккала субстратнинг аралашмасидан тайёрланган силос сарғиш-жигаррангда бўлиши билан тавсифланган. *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал суюқлиги аралаштириб тайёрланган силос вариантларининг ҳиди нордон мева ва ўтсимон ёқимли ҳидга, назорат вариантининг айниган мева, кислотали ўткир ҳидга эга бўлиши маълум бўлган. Тажриба вариантларидаги силос намуналарининг pH муҳити

кислотали томонга ўзгариб бориб, 30-кунда pH қиймати 4,4 гача пасайиши аниқланган.

Маълумки, консерваловчи хусусиятга эга бўлган сут кислоталарининг маълум миқдорда силосда тўпланиши ўсимлик массасини бузилишдан сақлайди. Тадқиқот натижаларига кўра, сут кислоталарининг энг кўп миқдори 3-кунда *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал суюқлиги иштирокида буғдой сомони ва маккажўхори поясидан тайёрланган силосда эркин сут кислоталар ҳолатида 1,02% миқдорда ҳосил бўлган. 10-кунда эса *T. harzianum* UzCF-28 культурал суюқлиги қўшилган маккажўхори поясидан тайёрланган вариантда эркин сут кислоталар 0,51% ни, боғланган сут кислоталар 0,50% ни, 30-кунда *T. harzianum* UzCF-28 культурал суюқлиги қўшилган буғдой сомони ва маккажўхори поясидан иборат силос вариантыда эркин ва боғланган сут кислоталар 0,45 – 0,50% ни ташкил қилган.

Силоснинг тажриба вариантларидаги ферментларнинг фаоллиги назоратга нисбатан яққол устунлик қилган. Эндо-1,4-β-глюканаза ферментининг максимал фаоллиги маккажўхори поясидан тайёрланган силосда 3-кунда аниқланган (19 бирлик/г). Ксиланаза ва экзо-1,4-β-глюканаза ферментлари ҳам маккажўхори поясидан тайёрланган силосда, 30-кунда мос равишда 51 бирлик/г ва 12,5 бирлик/г га тенг бўлган юқори фаолликни намоён қилган. Буғдой сомони ва маккажўхори пояси аралашмасидан (1:1 нисбатда) тайёрланган силосда буғдой сомонидан иборат силосга нисбатан ферментлар фаоллигининг бироз юқори бўлиши кузатилган. Шу тариқа, *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал суюқлигидаги фаол целлюлаза ферментлари комплекси ва ксиланаза ферментларининг таъсири натижасида силосланаётган ўсимлик қолдиқларидаги полисахаридлар моносахаридларгача гидролизланиб, ҳосил бўлган қандлар силоснинг сифатли бўлишини таъминловчи эпифит микрофлорадаги сут кислотали бактерияларнинг ривожланишини фаоллаштирган.

T. harzianum UzCF-28 замбуруғининг культурал суюқлиги иштирокида тайёрланган силоснинг барча вариантларида умумий азот ва хом протеин миқдори назоратга нисбатан кўп бўлган. 30-кунда маккажўхори поясидан тайёрланган силосдаги умумий азот ва хом протеин миқдори барча вариантларга нисбатан максимал кўрсаткичга эга бўлган. Бунда умумий азот миқдори 0,78%, хом протеин 4,89 мг ни ташкил қилган.

Тажриба ва назорат вариантларидаги силос намуналарининг микрофлораси динамикада ўрганилган. Назорат ва тажриба вариантларида силоснинг сифатига салбий таъсир кўрсатувчи микроорганизмлар ҳужайра титрининг камайиб бориши кузатилган. Назоратга нисбатан солиштирилганда силоснинг тажриба вариантыда 3-кундан бошлаб чиритувчи бактериялар ҳужайра титрининг $6,0 \times 10^5$ кхб/г гача камайиши аниқланиб, 30-кунда ўсиши кузатилмаган. Сут кислотали бактерияларнинг энг кўп миқдори ($6,0 \times 10^8$ кхб/г) 3-кунда аниқланиб, 10-кунда ҳужайра титри $1,2 \times 10^6$ кхб/г, 30-кунда эса $4,0 \times 10^5$ кхб/г ни ташкил қилган.

Шундай қилиб, *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал

суюқлиги иштирокида тайёрланган силоснинг микробиологик ва биокимёвий таҳлили унинг юқори сифатли силос эканлигидан далолат беради.

T. harzianum UzCF-28 замбуруғининг чорва моллари ошқозон-ичак йўллари табиий микрофлорасидаги фойдали микроорганизмларга таъсирини аниқлаш учун 1-3 ойлик бузоқларнинг гўнғидан ажратиб олинган, чорва моллари ошқозон-ичак йўли табиий микрофлорасининг бир қисми ҳисобланадиган *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium* sp. 5, *Bifidobacterium* sp. 6, *Bacillus subtilis* 8, *Bacillus licheniformis* 9 пробиотик культуралар билан ўзаро муносабати ўрганилган. Ўтказилган тажриба натижасида *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг ушбу культураларга нисбатан антагонистик таъсири кузатилмаган.

Лаборатория шароитида *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал суёқлиги иштирокида буғдой сомони ва майдаланган маккажўхори поясидан силос тайёрлаш бўйича ўтказилган тадқиқот натижалари ишлаб чиқариш шароитида синовдан ўтказиш учун асос бўлиб хизмат қилган.

T. harzianum UzCF-28 замбуруғини суёқ озуқа муҳитида ўстириш асосида «Трихостим» биопрепарати олишнинг лаборатория регламенти ишлаб чиқилган. Биоорганик кимё институтида умумий токсикология бўйича тадқиқот ўтказилиб, биопрепаратнинг зарарсизлиги аниқланган.

Самарқанд вилояти Жомбой тумани «Элатон балиқ чорва» фермер хўжалигида 100 т микдордаги беда ўсимлик массаларидан *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғи асосида олинган «Трихостим» биопрепарати билан ишлов берилиб силос тайёрланган. Тайёрланган силос ёқимли ҳидга эга, юмшоқ ва серсув бўлиб, голланд зотли қорамоллар томонидан тўлиқ истеъмол қилинган. 40 кун давомида ўтказилган кузатувга кўра, қорамоллар соғлиги яхшиланганлиги, сут маҳсулдорлиги эса 15-20% га ошганлиги маълум бўлган.

Қашқадарё вилояти Касби тумани «Қурбонов Ражабпўлат Қурбонович» фермер хўжалигида жайдари зотли қорамоллар озуқасига 0,01% микдорда «Трихостим» биопрепарати билан ишлов берилган. 2 ҳафта давомида кунига икки марта (эрталаб ва кечкурун) озиқлантирилганда, сигирларнинг сут маҳсулдорлиги 12-16% га ортиши кузатилган.

«Трихостим» биопрепаратининг иқтисодий самарадорлиги аниқланган. Назорат вариантыдаги 14 бош голланд зотли сигирларнинг сут маҳсулдорлиги 1 кунда 150 л ни ташкил қилган бўлса, тажриба вариантыда «Трихостим» биопрепарати билан ишлов бериб, тайёрланган силос билан озиқлантирилган сигирларнинг сут маҳсулдорлиги 178 л ни ташкил қилган, яъни назоратга нисбатан 28 л га ортиқ бўлган. Соф фойда 40,875 минг сўмни (33,5%) ташкил қилган.

Шундай қилиб, *T. harzianum* UzCF-28 штаммининг культурал суёқлиги асосида олинган «Трихостим» биопрепарати ўсимлик массаларини силослаш ва омихта-ем препарати сифатида фойдаланилганда, омихта-ем сифатини ва ҳазм бўлишини ошириш, омихта-ем базасини кенгайтириш, ҳамда экологик тоза маҳсулот олиш имконини беради.

ХУЛОСА

«Целлюлозали хомашёларни *Trichoderma harzianum* мицелиал замбуруғи ёрдамида микробиологик қайта ишлаш» мавзусидаги диссертация бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Турли хил табиий манбалардан ажратиб олинган 60 та штамм орасидан скрининг натижасида танлаб олинган, тез ўсувчи, фаол целлюлолитик ферментлар комплекси ва ксиланаза ҳосил қилувчи маҳаллий *Trichoderma* sp. 28 замбуруғ штамми *T. harzianum* UzCF-28 сифатида идентификацияланган бўлиб, чорвачиликда биопрепарат яратиш учун истиқболли продуцент бўлиб хизмат қилади.

2. Фаол целлюлолитик ферментлар комплекси, қанд ва оксил олиш мақсадида продуцентни суюқ озуқа муҳитида ўстириш учун таркибида азот манбаи сифатида $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, углерод манбаи ўрнида 2% целлюлозали субстрат тутган, ўзгартирилган Мандельс озуқа муҳити тавсия қилинган. Озуқа муҳитининг бошланғич pH 5,0-5,5, 10^{6-7} спора/мл концентрацияли инокулумдан 2% миқдорда фойдаланиш, ўстириш ҳарорати 28-30°C бўлиши қулайдир. Қаттиқ озуқа муҳитида ўстириш учун қуйидаги параметрлар ўрнатилган: бошланғич намлик 45-50% бўлиши, 10^{6-7} спор/мл концентрациясидаги 6 кунли инокулумдан 3-5% миқдорда фойдаланиш зарур деб белгиланган.

3. Озуқавийлик сифати паст бўлган буғдой сомони ва бошқа целлюлозали субстратлар *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал суюқлиги билан ишлов берилганда оксил, қанд ва аминокислоталар билан бойитилган қимматли озуқа маҳсулотига айланади. *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг мицелийсида аминокислоталарнинг умумий миқдори 41,6% ни, алмашинмайдиган аминокислоталар 17,3% ни ташкил қилган. Культурал суюқликда озуқа ем таркибидаги миқдори чегараланган аргинин – 0,37%, лизин – 0,32%, фенилаланин – 0,26% каби аминокислоталар устунлик қилган.

4. *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғининг культурал суюқлигидан маълум продуцентлардан молекуляр массалари мос равишда 135 ва 75 кДа га тенг бўлиши билан фарқланадиган эндо-1,4-β-глюканазанинг иккита молекуляр шакли - EG II ва EG III ферментларини ажратиб олиш ва гомоген ҳолатигача тозалаш шароитлари ишлаб чиқилган. Улар физик-кимёвий хусусиятлари билан фарқланиши аниқланган. Ушбу ферментларнинг 60-70°C ҳароратгача, pH 4,0 дан 6,0 гача диапазонда фаоллигини сақлаш хусусияти уларни республикаимизнинг иссиқ иқлим шароитида қишлоқ хўжалиги чиқиндиларини қайта ишлашда фойдаланиш учун муҳим жиҳати бўлиб ҳисобланади.

5. *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғини ёш бузоқларнинг гўнғидан ажратилган пробиотик микроорганизмларга муносабати бўйича антагонистик фаоллик намоён қилмаслиги белгиланган.

6. Маҳаллий *T. harzianum* UzCF-28 замбуруғ штамми асосида

чорвачиликда фойдаланиш учун тавсия қилинадиган «Трихостим» биопрепарати яратилган. Биопрепарат Самарқанд вилояти Жомбой тумани «Элатон балиқ чорва» фермер хўжалигида 100 тонна миқдорда беда ўсимлигидан силос тайёрлашда синовдан ўтказилган. Биокимёвий ва микробиологик хусусиятлари яхши, 23638-90 ГОСТ га мувофиқ бўлган силос олинган. «Трихостим» биопрепаратининг сут маҳсулдорлиги ортишига ижобий таъсир этиши кўрсатилган.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.27.06.2017.B.38.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ МИКРОБИОЛОГИИ
И НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

АЗИМОВА НОДИРА ШОЙИМ КИЗИ

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ МИЦЕЛИАЛЬНЫМ
ГРИБОМ *TRICHODERMA HARZIANUM***

03.00.04 – Микробиология и вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент- 2017

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.1.PhD/B1.

Диссертация выполнена в Институте микробиологии.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (info@microbio.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziynet» (www.ziynet.uz).

Научный руководитель: **Хамидова Хуршеда Муминовна**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Ташмухамедова Шохиста Собировна**
доктор биологических наук, профессор
Хашимова Нигора Рустамовна
доктор биологических наук

Ведущая организация: **Ташкентский государственный аграрный университет**

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 года в «__» часов на заседании Научного совета DSc.27.06.2017.B.38.01 при Институте микробиологии и Национальном университете Узбекистана (Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А.Кадырий 7Б, конференц-зал Института микробиологии. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: info@microbio.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистрирована за №____). Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А.Кадырий 7Б, Административное здание Института микробиологии, 3-й этаж, конференц-зал Института микробиологии Тел.: (+99871) 241-92-28.

Автореферат диссертации разослан «22» декабря 2017 года.
(реестр протокола рассылки № 4 от «22» декабря 2017 года)

Арипов Тахир Фатихович
Председатель научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик

Насметова Саодат Мамажановна
Ученый секретарь научного совета по присуждению
ученых степеней, к.б.н.

Гулямова Ташхан Гафуровна
Председатель научного семинара при научном совете по
присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время во всем мире для решения проблемы дефицита полноценного кормового белка широко используются ферментные препараты микробиологического происхождения. Ожидается, что в 2020 году общий объем продаж промышленных ферментов на основе микроорганизмов на мировом рынке составит 6,2 млрд. долларов США, при этом на долю широко используемых в животноводстве целлюлаз придется 15-20%. Следовательно, выделение целлюлозоразлагающих ферментов из микроорганизмов, в частности, микромицетов, производство на их основе биопрепаратов, обогащающих состав кормов, имеет актуальное значение.

В настоящее время в мировом сельском хозяйстве уделяется большое внимание созданию белково-витаминизированных кормовых препаратов для животных, улучшению перевариваемости кормов, получению различных ферментных препаратов на основе микромицетов для создания силосных заквасок. Комплекс целлюлолитических ферментов, продуцируемых грибами, особенно рода *Trichoderma*, обладают свойством активно разлагать целлюлозосодержащее сырье, в связи с чем, обогащение состава кормов в животноводстве микробиологическим способом требует выделения активных штаммов, участвующих в биоконверсии растительных отходов, и направления их на производство. Поэтому, отбор штаммов грибов, продуцирующих целлюлолитические ферменты, подбор оптимальных питательных сред и условий их культивирования, повышение стабильности используемых в промышленности микроорганизмов, разработка белково-витаминизированных кормовых добавок и биопрепаратов на основе микромицетов, продуцирующих целлюлолитические ферменты, имеют научно-практическое значение.

После приобретения независимости нашей Республикой были проведены многочисленные реформы в сфереразвития животноводства. На основе программных мер, организованных в данном направлении, были достигнуты определенные результаты, в частности, расширена кормовая база животноводства, улучшено обеспечение сельскохозяйственных животных сбалансированными высококачественными кормами, а также увеличено их производство. Кроме того, не уделялось должного внимания внедрению в производство современных технологий, повышающих качество комбикормов на основе микромицетов, в частности, грибов рода *Trichoderma*. В стратегии действий по развитию Республики Узбекистан¹ отмечена задача «обеспечить животноводство качественными кормами, биодобавками, витаминами и другими кормовыми единицами». Исходя из поставленных задач, важное научно-практическое значение имеет, в частности, выделение микромицетов, продуцирующих физиологически активные соединения и создание на их

¹ Указ Президента Республики Узбекистан № УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан».

основе биотехнологий производства белково-витаминизированных кормовых добавок, биопрепаратов и силосных заквасок.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Постановлениях Президента Республики Узбекистан №ПП-842 от 21 апреля 2008 года «О дополнительных мерах по усилению стимулирования увеличения поголовья скота в личных подсобных, дехканских и фермерских хозяйствах и расширению производства животноводческой продукции», № ПП-2841 от 16 марта 2017 года «О дополнительных мерах по углублению экономических реформ в животноводстве» и Указе Президента №УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», а также других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики: V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды».

Степень изученности проблемы. В литературе приведены сведения о выделении грибов рода *Trichoderma*, скрининге целлюлолитически активных штаммов (Алимова Ф.К., 2006; Мороз И.В. и др., 2013), синтезе ферментов целлюлазного комплекса и их использовании для получения спирта и кормов (Морозова Ю.А. и др., 2013; Садыкова В.С., 2012; Сеницын А.П. и др., 2010; Кошаев А.Г. и др., 2013), биоконверсии растительных отходов в условиях твердофазного и глубинного культивирования (Lynd L. и др., 2005; Mojsov K., 2010; Kocher G. и др., 2008), механизме ферментативного расщепления целлюлозы (Рабинович М.Л. и др., 2000; Karmakar M. и др., 2011), выделении и очистке целлюлазных ферментов (Yasmin S. и др., 2013; Irshad M. и др., 2013; Sonika P. и др., 2014).

В результате проведенных в нашей стране исследований были получены сведения о распространении грибов рода *Trichoderma*, их морфологии, ультраструктуре, цитологии, биотехнологии культивирования на целлюлозосодержащих питательных средах, силосовании таких твердых растительных отходов, как гузапоа, рисовая солома, кукурузные стебли (Ташпулатов Ж.Ж., 1987; Хамидова Х.М., 1991; Хамидова С.Х., 1990). Однако, в научной литературе практически отсутствуют сведения о свойствах грибов рода *Trichoderma* синтезировать широкий спектр ферментов целлюлазного комплекса и ксиланазу, способствуя осуществлению глубокой конверсии полисахаридов растительного сырья с получением сахаров, белка, аминокислот, о создании активных ферментных препаратов на основе глубинного культивирования грибов рода *Trichoderma*, способных к биоконверсии широкого спектра растительных отходов.

Большую научно-практическую значимость на сегодняшний день представляет создание экологически чистых, безопасных

импортозамещающих кормовых добавок и биопрепаратов, улучшающих качество кормов сельскохозяйственных животных на основе научно обоснованных безотходных технологий.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских работ прикладных проектов Института микробиологии: ФА-А6-Т127 «Создание белково-витаминизированных кормовых препаратов биоконверсией отходов сельскохозяйственного и пищевого производства» (2009-2011), ФА-А6-Т216 «Биотехнология получения кормовой добавки на основе микроорганизмов, синтезирующих физиологически активные соединения» (2012-2014).

Целью исследования является выделение новых активных местных штаммов микромицетов, образующих ферменты целлюлолитического комплекса и ксиланазу, отбор эффективного штамма, осуществляющего биоконверсию растительных субстратов с целью создания биопрепарата для животноводства.

Задачами исследования являются:

выделение и скрининг микромицетов – активных деструкторов целлюлозы из различных природных источников;

определение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств, идентификация отобранного штамма, подбор оптимальной питательной среды и условий культивирования;

биоконверсия целлюлозных субстратов отобранном микромицетом, продуцирующим ферменты целлюлазного комплекса (эндо-1,4-β-глюканазы, экзо-1,4-β-глюканазы, β-глюкозидазы) и ксиланазу, а также исследование возможностей их применения в целях получения кормов, обогащенных белками, углеводами, аминокислотами;

очистка целлюлазных ферментов, определение физико-химических свойств комплексных и очищенных ферментов;

создание биопрепарата на основе отобранного гриба и его практическое использование.

Объектом исследования служили штаммы микромицетов, выделенные из различных естественных источников, таких как ризосфера кукурузы и пшеницы, образцы почвы, гниющей древесины тополя, ивы, привезенных из различных регионов Республики, отходы скирды пшеничной соломы, образцы поврежденного хлопка с хлопковых полей, отобранный в результате скрининга штамм гриба *T. harzianum* UzCF-28, целлюлозосодержащие растительные субстраты.

Предметом исследования являлось выделение и скрининг микромицетов – продуцентов целлюлаз, определение целлюлолитической активности, обогащение легко усвояемыми углеводами, белками, аминокислотами целлюлозосодержащих растительных отходов путем их

био конверсии, создание биопрепарата на основе отобранного штамма и его испытание в производственных условиях.

Методы исследования. При проведении исследований использованы микробиологические, биохимические и микологические методы.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

отобран и идентифицирован в результате скрининга среди выделенных микроорганизмов новый быстрорастущий местный штамм гриба *T. harzianum* UzCF-28, образующий в культуральной жидкости широкий спектр активных целлюлолитических ферментов и ксиланазу;

определена био конверсия целлюлозных субстратов грибом *T. harzianum* UzCF-28 и обогащение их усвояемыми углеводами, белками, аминокислотами;

выделены из культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28 ферменты EG II и EG III с молекулярной массой 135 и 75 кДа, описаны их физико-химические свойства;

создан впервые в республике на основе быстрорастущего местного штамма гриба *T. harzianum* UzCF-28 биопрепарат «Трихостим», используемый для силосования растительной массы и обогащения различных целлюлозосодержащих субстратов. Определены микробиологические, биохимические, органолептические показатели силоса, приготовленного в лабораторных и производственных условиях.

Практические результаты исследования заключаются в следующем: запатентован новый местный штамм гриба *T. harzianum* UzCF-28, образующий в культуральной жидкости активный комплекс целлюлолитических ферментов и ксиланазу, имеющих важное значение при био конверсии растительных субстратов и повышения качества кормов для животноводства;

биопрепарат «Трихостим» успешно апробирован в производственных условиях при силосовании клевера в фермерском хозяйстве «Элатон балик чорва» Жомбойского района Самаркандской области, а также испытан для обогащения кормов в фермерском хозяйстве «Курбонов Ражабпулат Курбонович» Касбийского района Кашкадарьинской области.

Достоверность результатов исследования. Все выполненные эксперименты проведены в трех повторностях, для расчета среднего значения и стандартной ошибки (SE) трех репликаций использована программа Microsoft Excel (Корпорация Microsoft, США). Все результаты, представленные в виде значений, проанализированы с помощью программы (ANOVA) для достоверной разницы с контрольным значением при $P \leq 0,05$.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования связана с образованием широкого спектра ферментов, т.е. эндо-1,4-β-глюканазы, экзо-1,4-β-глюканазы, β-глюкозидазы и ксиланазы в культуральной жидкости местного штамма *T. harzianum* UzCF-28, достигнутые в ходе исследования результаты будут способствовать развитию в нашей стране исследований, направленных

на микробиологическую переработку растительных и целлюлозных отходов сельского хозяйства и промышленности.

Практическая значимость результатов исследования заключается в их содействии дальнейшему развитию сельского хозяйства республики в результате применения полученных фундаментальных и практических результатов в животноводстве. Внедрение в животноводство биопрепарата «Трихостим», созданного на основе местного штамма *T. harzianum* UzCF-28 позволит расширить ассортимент кормовых препаратов и частично заменить импорт.

Внедрение результатов исследования. На основе полученных научных результатов по созданию биопрепарата, повышающего перевариваемость растительных отходов и обогащающего состав животных кормов с использованием культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28:

на штамм мицелиального гриба *T. harzianum* UzCF-28, синтезирующего комплекс целлюлазных ферментов и ксиланазы, гидролизующего растительные отходы с образованием сахаров, белков и аминокислот получен патент на изобретение (20.05.2014 г. № IAP 04901) Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан. В результате создан биопрепарат «Трихостим», рекомендованный для использования в качестве силосной закваски и кормового препарата;

биопрепарат «Трихостим» внедрен в фермерском хозяйстве «Элатон балик чорва» Жомбойского района Самаркандской области и «Курбонов Ражабпулат Курбонович» Касбийского района Кашкадарьинской области (Справка Министерства сельского и водного хозяйства №02/12-1244 от октября 2016 года). Использование биопрепарата «Трихостим» дало возможность повысить удои молока коров на 15-20%.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 5 международных и 6 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ. Из них 8 научных статей, в том числе, 7 в республиканских, 1 в зарубежном журнале, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций, 1 патент.

Структура и объём диссертации. Структура диссертации состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 120 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная

новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Обзор литературных данных об использовании грибов рода *Trichoderma* в расщеплении целлюлозосодержащего сырья и их использовании в обогащении кормов»** приведены сведения о расщеплении целлюлозных растительных отходов микроорганизмами, роли грибов рода *Trichoderma*, распространении микромицетов рода *Trichoderma*, их таксономии, биоконверсии целлюлозосодержащего сырья, синтезе целлюлазных ферментов, белка, аминокислот, влиянии внешних факторов на активность ферментов и синтез белка, очистке целлюлазных ферментов. Подробно описано получение ферментных препаратов и кормовых добавок на основе грибов рода *Trichoderma*, а также их применение в силосовании растительных отходов.

Во второй главе диссертации **«Методы выделения целлюлозоразлагающих микромицетов из природных источников, изучение свойств отобранного штамма, приготовление и практическое применение биопрепарата»** приведены методы по выделению целлюлозоразлагающих микромицетов из образцов почвы и растений, изучению морфолого-культуральных свойств отобранного в результате скрининга активного штамма *Trichoderma* sp. 28, подбору оптимальной питательной среды и условий культивирования. Описаны методы биоконверсии целлюлозосодержащих растительных отходов штаммом *T. harzianum* UzCF-28, определения активностей целлюлаз, ксиланазы и сопутствующих ферментов в культуральной жидкости, количество белков и аминокислот, очистки целлюлазных ферментов, приготовления силоса, изучения микрофлоры и биохимических свойств силоса, а также определения взаимоотношений штамма *T. harzianum* UzCF-28 с полезными микроорганизмами кишечной микрофлоры КРС.

В третьей главе диссертации **«Выделение целлюлозоразлагающих микромицетов, их скрининг, подбор оптимальной питательной среды и условий культивирования для отобранного штамма»** приведены результаты исследований по выделению микромицетов из различных природных источников, их скринингу по целлюлозоразлагающим свойствам, отбору наиболее активного штамма, изучению его морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств, подбору оптимальной питательной среды и условий культивирования.

Из почвенных и растительных образцов выделено 60 штаммов микромицетов, установлена их принадлежность к 9 родам. Наибольшее количество выделенных грибов отнесено к родам *Trichoderma* - 14, *Aspergillus* - 11 и *Fusarium* - 10 штаммов. Целлюлозоразлагающую способность выделенных штаммов проверяли выращиванием на фильтровальной бумаге. В результате первичного отбора среди

исследованных 60 штаммов грибов, 44 штамма в различной степени изменяли структуру фильтровальной бумаги.

Дальнейшее сравнительное изучение целлюлолитической активности отобранных грибов, культивированием на среде Мандельса с фильтровальной бумагой, позволило отобрать 9 штаммов грибов рода *Trichoderma*, наиболее активно разлагавших фильтровальную бумагу. Для более детального исследования грибы выращивали в глубинных условиях культивирования на питательной среде Мандельса, содержащей 2% пшеничных отрубей для изучения их целлюлолитической и ксиланолитической активности и способности к осахариванию субстрата и образованию белка (рис. 1).

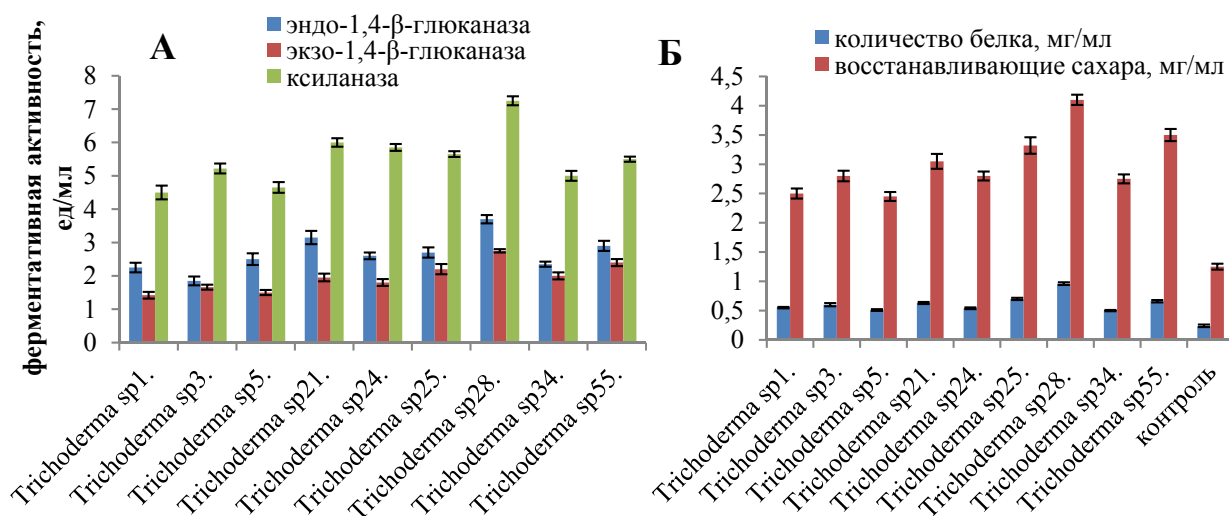


Рис. 1. Ферментативная активность (А), количество белка и восстанавливающих сахаров (Б) грибами рода *Trichoderma*

Полученные результаты показали, что на 4 сутки выращивания в культуральной жидкости гриба *Trichoderma* sp. 28, выделенного из гниющей части древесины тополя, была выявлена наибольшая активность ферментов целлюлаз и ксиланазы, высокое содержание белка, а также достаточно высокая осахаривающая способность. Далее по целлюлолитической и ксиланолитической активностям следовали местные штаммы *Trichoderma* sp. 55, выделенный из ризосферы кукурузы, *Trichoderma* sp. 25, выделенный из образца хлопчатника хлопкового поля Ташкентской области и *Trichoderma* sp. 21, выделенный из отходов скирды пшеничной соломы (рис.1).

Таким образом, для дальнейших исследований был отобран штамм *Trichoderma* sp. 28. На основании изучения морфолого-культуральных свойств штамм идентифицирован как *Trichoderma harzianum* (Rifai) 28. Согласно новой классификации он принадлежит отделу Ascomycota, классу Sordariomycetes, порядку Hypocreales, семейству Hypocreaceae, роду *Trichoderma*, виду *harzianum*.

При микроскопировании штамма *T. harzianum* 28 установлено, что главные стволы конидиофоров дают параллельные друг другу несколько

боковых ответвлений, фиалиды бутылкообразные, конидии шаровидные (рис.2).

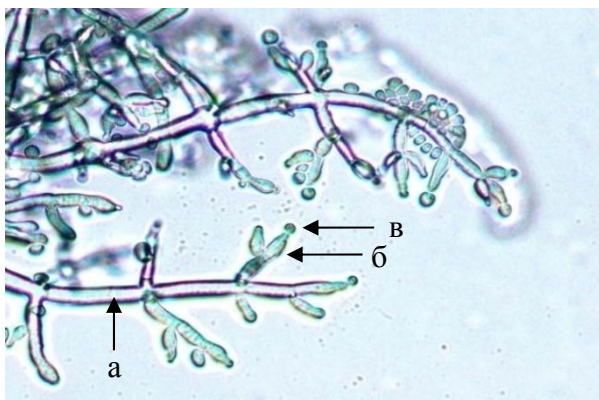


Рис.2. Морфология штамма *T. harzianum* 28 на фильтровальной бумаге, увлажненной средой Мандельса; а-конидиофора, б-фиалида, в-конидия, (ув. 10×40)



Рис.3. Колония гриба *T. harzianum* 28 на среде Мандельса с рисовой мучкой (3-сутки)

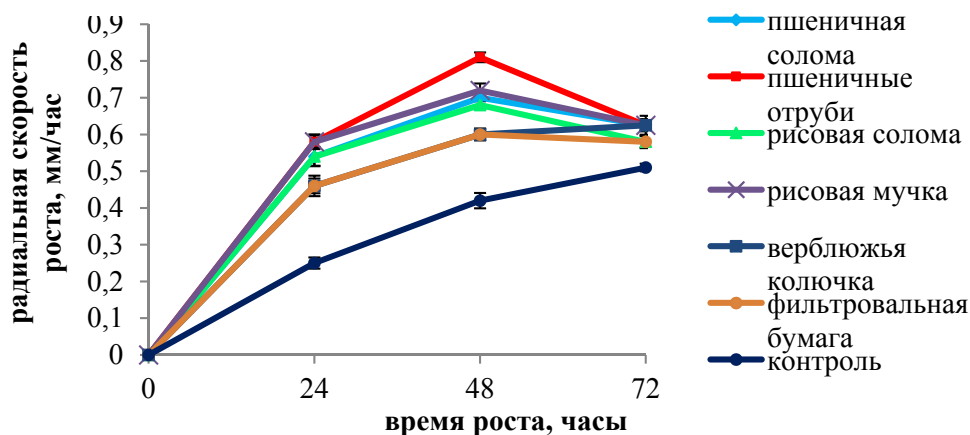


Рис.4. Радиальная скорость роста колоний гриба *T. harzianum* 28 на среде Мандельса с различными источниками углерода

Изучена морфология и скорость радиального роста колоний штамма на классической питательной среде Чапека, сусло-агаре, картофельно-декстрозном агаре, среде Мандельса, а также среде Мандельса, содержащей целлюлозный субстрат в качестве единственного источника углерода. Установлено, что рост колоний гриба с образованием радиальной оси с зернистым мицелием является свойственным данному штамму морфологическим признаком (рис. 3).

В результате исследований было установлено, что на всех питательных средах, содержащих целлюлозный субстрат, скорость роста колоний была выше, чем в контроле, они заполняли поверхность чашки Петри на 3-сутки роста. На питательной среде с добавлением пшеничных отрубей скорость радиального роста колоний составила 0,81 мм/ч через 48 ч (рис. 4). Данное исследование показывает, что штамм *T. harzianum* 28 способен разлагать и усваивать трудногидролизуемые углеродсодержащие источники.

Подобрана питательная среда и оптимизированы условия культивирования для штамма *T. harzianum* 28. За основу была взята среда Мандельса, которая считается оптимальной для выращивания грибов рода *Trichoderma*. С целью удешевления питательной среды из состава среды Мандельса были исключены пептон и мочевины. Целлюлозосодержащие субстраты были использованы в качестве единственного источника углерода вместо 2% сахарозы. В качестве источника азота вместо $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ был рекомендован $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, оказавший положительное влияние на активность ферментов и образование белка.

Установлено, что оптимальными являются исходное значение питательной среды pH 5,0-5,5, диапазон температуры 28-30°C, использование инокулюма 6-суточной суспензии штамма *T. harzianum* 28 в количестве 2% концентрации 10^{6-7} спор/мл или 1-суточного вегетативного мицелия в количестве 3-4%.

Определено оптимальное время культивирования отобранного штамма для получения наибольшей активности ферментов целлюлаз и ксиланазы, а также максимального количества белка, образующихся в культуральной жидкости. Исследование проводилось в жидкой и твердой питательных средах с добавлением пшеничных отрубей в течение 10 суток в динамике роста. Установлено, что при выращивании штамма *T. harzianum* 28, pH среды увеличивается в щелочную сторону, наибольшая активность ферментов приходится, в основном, на 3-сутки при глубинном и на 2-сутки при твердофазном культивировании. Наибольшее количество белка образовывалось на 4-сутки при глубинном и 1-2-сутки при твердофазном культивировании.

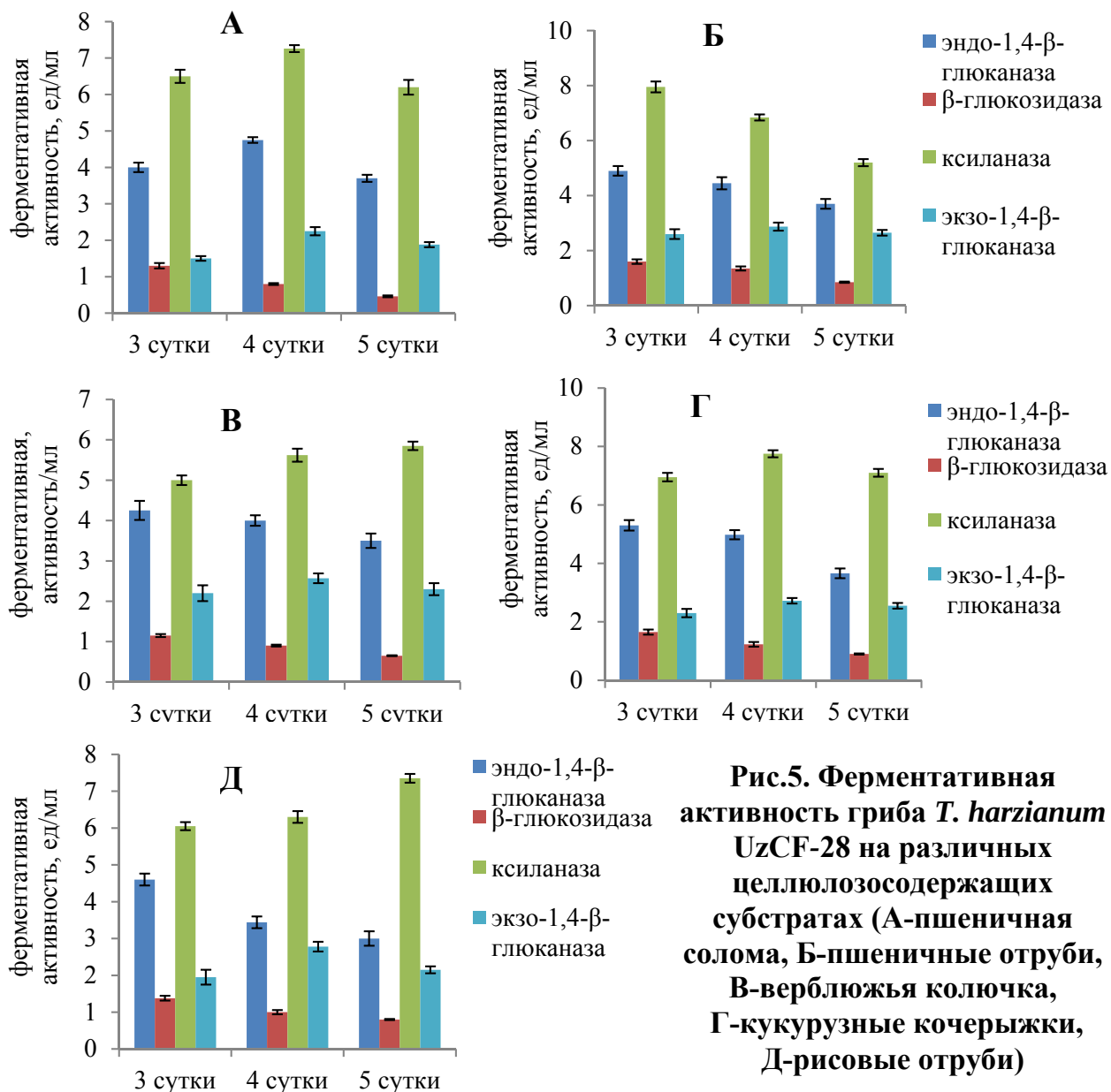
В ходе исследований штамм *T. harzianum* 28 запатентован и назван штаммом *T. harzianum* UzCF-28.

Отобранный штамм *T. harzianum* 28 характеризовался образованием широкого спектра активных ферментов целлюлазного комплекса и ксиланазы, а также способностью обогащения субстрата белком и восстанавливающими сахарами. Выращивание данного штамма на видоизмененной питательной среде Мандельса с добавлением в качестве источника углерода 2% целлюлозосодержащего субстрата при температуре 28-30°C в течение 3-4 суток является оптимальным.

В четвертой главе диссертации «**Биоконверсия растительных отходов штаммом *T. harzianum* UzCF-28**» описаны результаты исследований по биоконверсии различных растительных отходов, используемых в качестве корма для животных, обогащению субстратов сахарами, белками и аминокислотами штаммом *T. harzianum* UzCF-28 в жидкой и твердой питательных средах.

При биоконверсии таких трудноразлагающихся субстратов, как пшеничная солома, отруби, измельченная надземная часть верблюжьей колючки, кукурузные кочерыжки и рисовые отруби штаммом *T. harzianum* UzCF-28 в условиях глубинного культивирования установлено, что

активность ферментов в культуральной жидкости располагается в следующей последовательности: ксиланаза > эндо-1,4-β-глюканаза > экзо-1,4-β-глюканаза > β-глюкозидаза. Отмечено, что максимальная активность изучаемых ферментов изменялась по времени культивирования в зависимости от субстрата (рис. 5).



Исследованные растительные отходы подвергались активному гидролизу штаммом *T. harzianum* UzCF-28 при глубинном культивировании, при этом наибольшее количество восстанавливающих сахаров образовывалось на 3-сутки в среде с добавлением пшеничных отрубей и составляло 4,6 мг/мл. Количество сахаров в контроле, т.е. в среде без посева составило 1,26 мг/мл. Выявлено увеличение содержания белка в испытуемых питательных средах по сравнению с контролем. На среде с добавлением кукурузных кочерыжек количество белка увеличилось в 4,2

раза, пшеничных отрубей – 3,2, верблюжьей колючки – 3,6, пшеничной соломы – 4,7, рисовых отрубей – 3,2 раза по сравнению с контролем.

При изучении биоконверсии таких субстратов, как верблюжья колючка, рисовая солома, рисовая лузга и рисовая мука, штаммом *T. harzianum* UzCF-28 при твердофазном культивировании в течение 10 суток, было установлено, что наибольшая активность ферментов приходилась на 2-5 сутки, при этом преобладала активность эндо-1,4-β-глюканазы, и далее – ксиланазы. На среде с рисовой лузгой активность эндо-1,4-β-глюканазы составляла 58,5 ед/г, ксиланазы – 22,5 ед/г, экзо-1,4-β-глюканазы – 7,75 ед/г и β-глюкозидазы – 19,5 ед/г.

В результате биоконверсии растительных отходов штаммом *T. harzianum* UzCF-28 при твердофазном культивировании наблюдалось образование белка и восстанавливающих сахаров в большом количестве на 1-4 сутки. Установлено, что при выращивании на рисовой соломе синтез белка увеличивался в 2,7 раза, рисовой лузге – 3,4, рисовой муке – 1,84 и верблюжьей колючке – 1,96 раз по сравнению с контролем. Количество восстанавливающих сахаров в среде с рисовой лузгой увеличивалось в 2,52 раза по сравнению с контролем, с рисовой мукой – 1,73, с верблюжьей колючкой – в 1,64 раза уже на первые сутки, на среде с рисовой соломой – в 2,35 раз на 3-сутки культивирования.

Исследования по изучению качественного и количественного состава аминокислот в составе биомассы и культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28, показали, что гриб может быть эффективно использован для обогащения кормов путем его выращивания на растительных отходах. Общее количество аминокислот в мицелии составляло 41,6%, в том числе незаменимых – 17,3%. Определение количественного содержания аминокислот показало преобладание аспарагиновой и глутаминовой кислот, изолейцина и фенилаланина (рис.6).

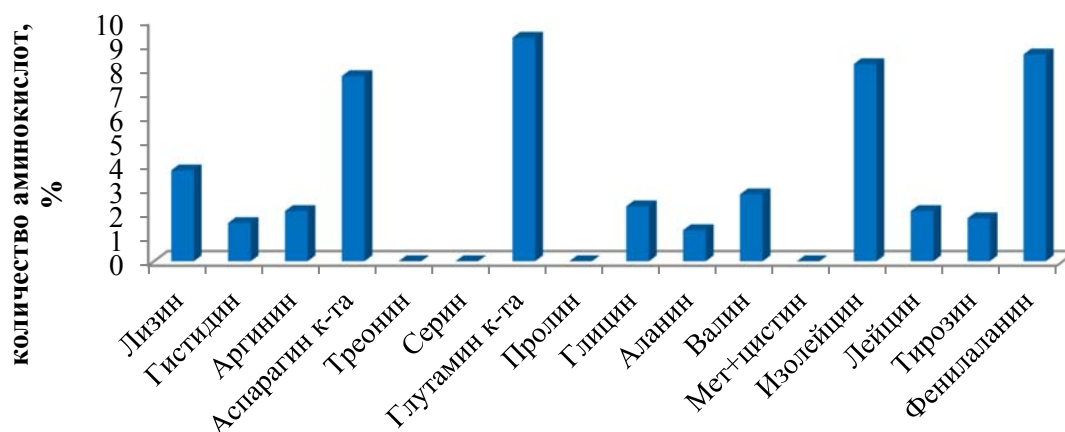


Рис.6. Аминокислотный состав биомассы *T. harzianum* UzCF-28

Максимальное количество незаменимых аминокислот в культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28 выявлено при использовании 2% верблюжьей колючки в качестве источника углерода на 4 сутки

культивирования. По содержанию незаменимых аминокислот преобладали аргинин – 0,37%, лизин – 0,32% и фенилаланин – 0,26%.

Определение активности сопутствующих ферментов α -амилаза и протеаза в культуральной жидкости штамма *T. harzianum* UzCF-28 показало, что активность α -амилазы составляла 0,45 ед/мл при глубинных условиях и 0,23 ед/г при поверхностных условиях выращивания гриба, активность протеазы была равна 0,033 ед/мл в жидкой питательной среде и 0,083 ед/г – на твердой среде с добавлением пшеничных отрубей на 3-сутки культивирования.

Таким образом показано, что верблюжья колючка, рисовая солома, рисовая лузга и рисовая мучка, имеющие низкие кормовые качества в исходном виде, при обработке культуральной жидкостью гриба *T. harzianum* UzCF-28 превращаются в обогащенный сахарами, белками и аминокислотами кормовой продукт.

Пятая глава диссертации «Свойства целлюлолитических ферментов штамма *T. harzianum* UzCF-28» посвящена всестороннему изучению свойств целлюлолитических ферментов гриба *T. harzianum* UzCF-28.

При изучении физико-химических свойств комплексных ферментов эндо-, экзо- 1,4- β -глюканазы и ксиланазы, установлено, что все три фермента проявляли активность в широком диапазоне pH, при этом максимальная активность эндо-1,4- β -глюканазы и ксиланазы выявлена при pH 5,0, экзо-1,4- β -глюканазы – при pH 5,5. Оптимальная температура инкубации составляла 50°C, оптимальное время инкубации – 30 минут для эндо-1,4- β -глюканазы и ксиланазы, 60 минут – для экзо-1,4- β -глюканазы. При определении стабильности ферментов при различной температуре обнаружено, что они в определенной степени сохраняли активность при температуре до 70°C, а при 80°C полностью инактивировались. Субстраты Na-КМЦ и ксилан в количестве 1% обеспечивали максимальный уровень активности эндо-1,4- β -глюканазы, ксиланазы, а 50 мг фильтровальной бумаги – активность экзо-1,4- β -глюканазы.

Очистка диализированного частично очищенного фермента ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-Toyopearl^R 650 M позволила получить следующие фракции: EG I – не связанную с гелем, EG II – элюированную 0,2 M NaCl и EG III – крепко связанную с гелем за счет высокого электрического заряда, элюированного раствором NaCl высокой концентрации (0,96 M) (рис. 7).

При проведении повторной хроматографии фракций, содержащих EG II и EG III, на ДЕАЕ-Toyopearl^R 650 M при pH 7,0 были получены ферменты, схожие с EG II и EG III, молекулярная масса которых составляла 135 и 75 кДа, соответственно (рис. 8, 9). Необходимо отметить, что полученные нами молекулярные формы фермента значительно отличались от известных в литературе целлюлаз, молекулярная масса которых не превышала 70 кДа. Изучены физико-химические свойства гомогенно выделенных ферментов. Установлено, что оптимум pH для EG I и EG III составлял 4,5, а для EG II –

4,7, оптимальная температура действия эндо-1,4-β-глюканазы составляла 50°C независимо от использованных субстратов. Определена термическая стабильность EG I, EG II и EG III. Показано, что молекулярные формы EG I и II EG после нагревания до 40°C теряли свою активность на 14% и 39%, соответственно, однако нагревание EG III до 40°C не привело к инактивации, а наоборот активность увеличилась более чем в три раза по сравнению с исходной активностью фермента.

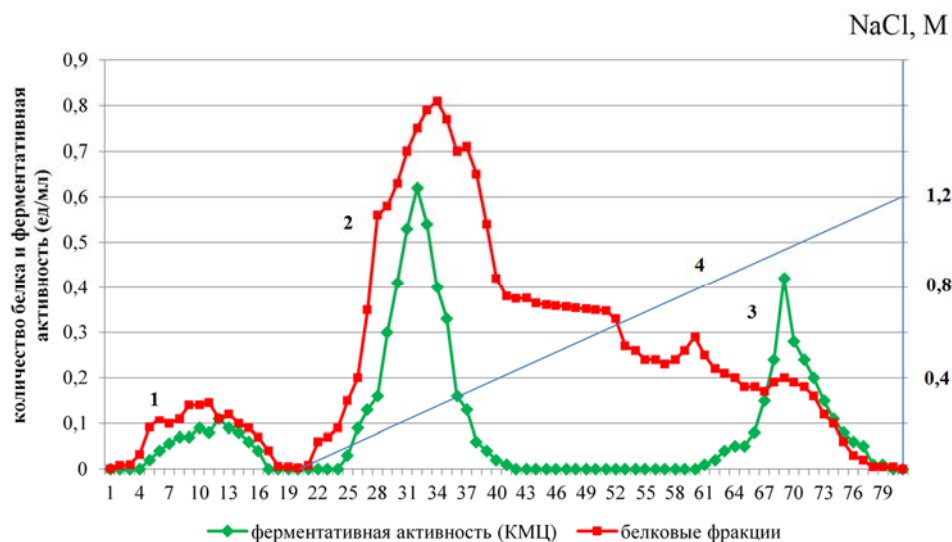


Рис.7. Ионообменная хроматография эндо-1,4-β-глюканазы *T. harzianum* UzCF-28 на DEAE- Toyopearl[®] 650 M при pH 7,0: 1- EG I, 2- EG II, 3- EG III, 4-градиент – NaCl

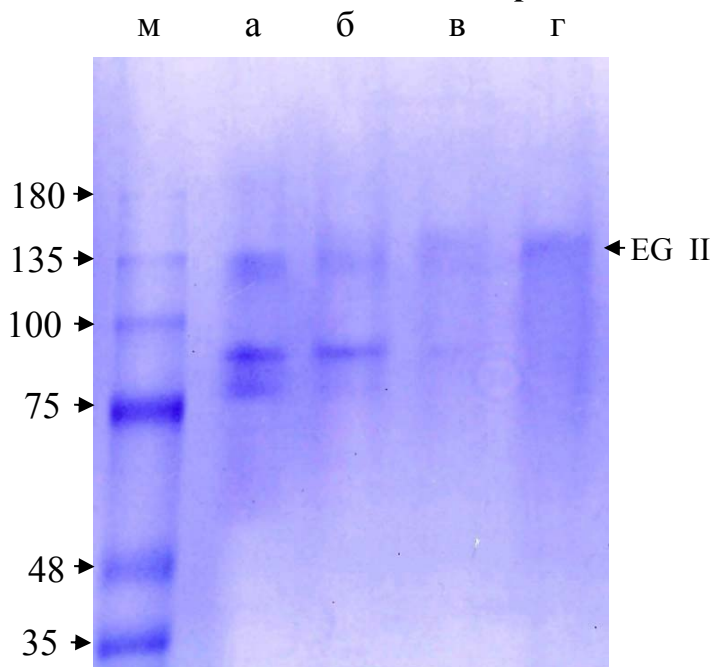


Рис.8. Белки SDS-PAGE после разделения на DEAE- Toyopearl[®] 650M: м- маркер (в кДа), а – 10-фракция, б – 11-фракция, в – 12-фракция, г - очищенный EG II (135кДа)

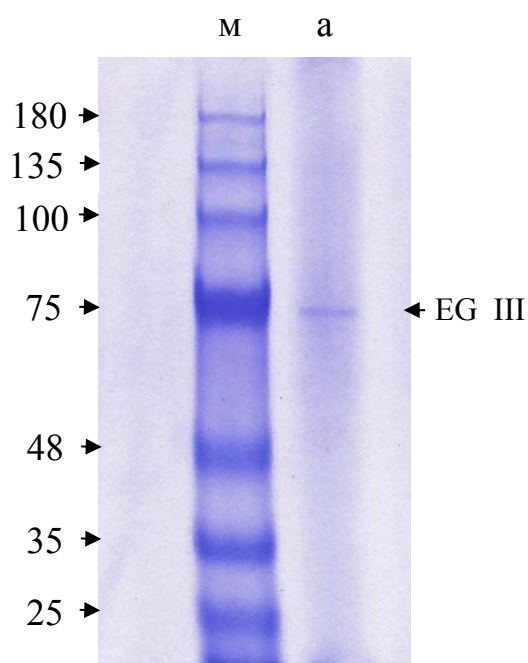


Рис.9. SDS-PAGE: м- маркер (в кДа), а-очищенный EG III (75 кДа)

С увеличением времени инкубации до 60 мин, активность EG I и EG II повышалась независимо от используемого субстрата (Na-КМЦ, фильтровальная бумага). Константы Михаэлиса K_m относительно Na-КМЦ составляли 2 мг и 2,5 мг для EG I и EG II, а фильтровальной бумаги – 38 мг и 31 мг для EG I и EG II, соответственно.

Определение влияния ионов Ca^{2+} на активность ферментов EG I и EG II в концентрации 5, 10, 15, 20 мМ показало, что количество ионов Ca^{2+} в концентрации 15 мМ, оказалось оптимальным для фермента EG I, а 10 мМ – для EG II, при этом их активность увеличилась на 46% и 43%, соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что молекулярные формы эндо-1,4-β-глюканазы гриба *T. harzianum* UzCF-28 различались не только по молекулярному весу и уровню активности, но и по физико-химическим свойствам. Эти различия, возможно, являются следствием структурных отличий данных ферментов, синтезируемых в различных участках клетки.

Способность данных ферментов сохранять свою активность при температуре до 60-70°C и в диапазоне pH от 4,0 до 6,0, является важнейшей характеристикой для их использования при переработке сельскохозяйственных отходов в условиях жаркого климата республики.

В шестой главе диссертации «**Использование штамма *T. harzianum* UzCF-28 для получения качественных кормов**» приведены данные исследований по использованию культуральной жидкости штамма *T. harzianum* UzCF-28 для силосования растительных отходов, её влиянию на микрофлору, органолептические и биохимические свойства силоса, определению взаимоотношений с полезными микроорганизмами кишечной микрофлоры животных, получению биопрепарата в лабораторных условиях, практическому использованию полученных результатов исследований.

В лабораторных условиях проведено силосование пшеничной соломы, кукурузных стеблей, а также смеси этих растительных отходов в соотношении 1:1, измельченных до 0,2-0,5 см, с использованием культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28. Проведен органолептический, микробиологический и биохимический анализ силоса.

Отмечены различия по органолептическим характеристикам 3-, 10- и 30-суточных вариантов силоса. Образцы силоса, приготовленного из пшеничной соломы были желтого цвета, силос из кукурузных стеблей от желто-зеленого до желто-коричневого, силос, приготовленный из смеси субстратов - был желто-коричневого цвета. Силос, приготовленный с добавлением культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28 обладал приятным травянистым, молочнокислым или фруктовым запахом, в отличие от испорченного фруктового, резко кислотного запаха (контрольный вариант). Значение pH силоса в опытных образцах изменялось в кислотную сторону и снижалось до 4,4 на 30-сутки хранения.

Известно, что накопление в определенном количестве молочной

кислоты, обладающей консервирующим свойством в силосе, предотвращает порчу растительной массы. Согласно результатам исследований, наибольшее количество молочной кислоты (1,02%) отмечено в виде свободной молочной кислоты в силосе, приготовленном из пшеничной соломы и кукурузных стеблей с использованием культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28 на 3 сутки. В варианте силоса из кукурузных стеблей с добавлением культуральной жидкости *T.harzianum* UzCF-28 количество свободной молочной кислоты составляло 0,51%, а связанной – 0,50% на 10-сутки, в то время как в силосе из пшеничной соломы и кукурузных стеблей, приготовленном с использованием культуральной жидкости *T. harzianum* UzCF-28 количество свободной и связанной молочной кислоты составляло 0,45 – 0,50%.

Ферментативная активность опытных образцов значительно превосходила по активности контрольные варианты. Максимальная активность эндо-1,4-β-глюканазы (19 ед/г) обнаружена в силосе, приготовленном из кукурузных стеблей на 3-сутки. Ксиланаза и экзо-1,4-β-глюканаза также проявляли максимальную активность - 51 и 12,5 ед/г, соответственно, в силосе из кукурузных стеблей (на 30-сутки опыта). Показатели активности ферментов в силосе, приготовленном из смеси пшеничной соломы и кукурузных стеблей (в соотношении 1:1), немного превышали значения активности силоса, приготовленного из пшеничной соломы. Благодаря влиянию целлюлолитических и ксиланолитических ферментов, образующихся в культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28, полисахариды силосуемых растительных отходов расщепляются до моносахаридов, полученные в результате сахара активизируют действие молочнокислых бактерий в составе эпифитной микрофлоры, благоприятно влияющих на созревание силоса.

Во всех образцах силоса, приготовленного с добавлением культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28 отмечено высокое содержание общего азота и сырого протеина по сравнению с контролем. Максимальное количество общего азота и протеина среди всех вариантов выявлено в силосе, приготовленном из кукурузных стеблей на 30-сутки хранения. Так, количество общего азота составляло 0,78%, сырого протеина – 4,89 мг.

Изучена микрофлора силоса опытных и контрольных образцов в динамике. Отмечено снижение титра клеток микроорганизмов, негативно влияющих на качество силоса, как в контрольных, так и опытных образцах. В опытных образцах по сравнению с контрольными, начиная с 3-суток отмечено снижение титра гнилостных бактерий до $6,0 \times 10^5$ КОЕ/г, а на 30-сутки они не были обнаружены. Наибольшее количество молочнокислых бактерий ($6,0 \times 10^8$ КОЕ/г) обнаружено на 3-сутки, на 10-сутки титр клеток составлял $1,2 \times 10^6$ КОЕ/г, на 30 суток – $4,0 \times 10^5$ КОЕ/г.

Таким образом, проведенный анализ микрофлоры и биохимических характеристик свидетельствует о высоком качестве силоса, приготовленного с внесением культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28.

Для определения влияния гриба *T. harzianum* UzCF-28 на полезную микрофлору, являющуюся частью естественной микрофлоры желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных, изучено совместное культивирование гриба *T. harzianum* UzCF-28 с пробиотическими культурами *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium* sp. 5, *Bifidobacterium* sp. 6, *Bacillus subtilis* 8, *Bacillus licheniformis* 9, ранее выделенными из фекалий телят 1-3-х месячного возраста. В результате проведенных экспериментов, антагонистического действия гриба *T. harzianum* UzCF-28 по отношению к данным культурам не наблюдалось.

Результаты исследований по силосованию пшеничной соломы и измельченных стеблей кукурузы с добавлением культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28 в лабораторных условиях послужили основанием для апробации в производственных условиях.

На основе глубинного культивирования гриба *T. harzianum* UzCF-28 разработан лабораторный регламент получения биопрепарата «Трихостим», проведены исследования по общей токсикологии в Институте Биоорганической химии на безвредность биопрепарата.

С использованием «Трихостим» проведено силосование 100 т растительной массы клевера в фермерском хозяйстве «Элатон балик чорва» Жомбойского района Самаркандской области. Приготовленный силос обладал приятным запахом, мягкостью и сочностью и полностью поедался крупнорогатым скотом голландской породы. Согласно проведенным в течение 40 дней наблюдениям, улучшилось состояние здоровья коров и увеличился удой молока на 15-20% с поголовья.

В фермерском хозяйстве «Курбонов Ражабпулат Курбонович» Касбийского района Кашкадарьинской области биопрепарат «Трихостим» был использован в качестве кормовой добавки к основному рациону кормов в количестве 0,01%. При двухразовом (утром и вечером) кормлении коров приготовленным кормом в течение 2 недель наблюдалось увеличение удоя молока коров на 12-16%.

Определена экономическая эффективность биопрепарата «Трихостим». В контрольной группе ежедневный удой молока 14 голов коров голландской породы составил 150 л, в то время как в опытной группе, употреблявшей силос, приготовленный с добавлением биопрепарата «Трихостим» 178 л, т.е. на 28 л молока больше контроля. Чистая прибыль составила 40,875 тыс. сум (33,5%).

Таким образом, использование биопрепарата «Трихостим», полученного на основе культивирования гриба *T. harzianum* UzCF-28, в качестве силосной закваски для растительной массы и кормового препарата позволит повысить качество и усвояемость кормов, расширить кормовую базу, а также способствовать получению экологически чистой продукции.

ВЫВОДЫ

На основе исследований, проведенных в рамках диссертации на тему «Микробиологическая конверсия целлюлозосодержащего сырья мицелиальным грибом *Trichoderma harzianum*», представлены следующие выводы:

1. Отобранный в результате скрининга, среди выделенных из различных природных источников 60 штаммов микромицетов, быстрорастущий местный штамм гриба *Trichoderma* sp. 28, активно продуцирующий комплекс целлюлолитических ферментов и ксиланазу, идентифицированный как *T. harzianum* UzCF-28, служит перспективным продуцентом для создания биопрепарата для животноводства.

2. Для глубинного культивирования продуцента с целью получения активных ферментов целлюлолитического комплекса, сахаров и белка рекомендована видоизмененная среда Мандельса с использованием в качестве источника азота $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, углерода – 2% целлюлозосодержащих субстратов. Исходное значение pH среды 5,0-5,5, температура культивирования 28-30°C, с использованием инокулюма в количестве 2% с концентрацией 10^{6-7} спор/мл. Установлены параметры для твердофазного культивирования: начальная влажность 45-50%, с использованием инокулюма 6-суточного возраста в количестве 3-5% с концентрацией 10^{6-7} спор/мл.

3. Показано, что пшеничная солома и другие целлюлозосодержащие субстраты, имеющие низкие кормовые качества при обработке культуральной жидкостью гриба *T. harzianum* UzCF-28 могут быть превращены в ценный кормовой продукт, обогащенный белками, сахарами и аминокислотами. Общее количество аминокислот в мицелии гриба *T. harzianum* UzCF-28 составило 41,6%, в том числе незаменимых аминокислот – 17,3%. В культуральной жидкости преобладали такие аминокислоты, как аргинин – 0,37%, лизин – 0,32%, фенилаланин – 0,26%, являющиеся лимитированными в кормах.

4. Разработаны условия выделения из культуральной жидкости гриба *T. harzianum* UzCF-28 и очистки до гомогенного состояния двух молекулярных форм эндо-1,4-β-глюканазы EG II и EG III, отличающихся от известных продуцентов молекулярными массами равными 135 и 75 кДа, соответственно. Установлено, что они различаются по физико-химическим свойствам. Способность данных ферментов сохранять свою активность при температуре до 60-70°C в диапазоне pH от 4,0 до 6,0 является важнейшей характеристикой для их использования при переработке сельскохозяйственных отходов в условиях жаркого климата республики.

5. Установлено, что гриб *T. harzianum* UzCF-28 не проявляет антагонистической активности по отношению к пробиотическим микроорганизмам, выделенных из фекалий молодых телят.

6. На основе местного штамма гриба *T. harzianum* UzCF-28, создан биопрепарат «Трихостим», рекомендованный для использования в животноводстве. В фермерском хозяйстве «Элатон балик чорва» Жомбойского района Самаркандской области проведены испытания биопрепарата при приготовлении силоса из клевера в количестве 100 тонн. Получен силос с хорошими биохимическими и микробиологическими характеристиками, соответствующий ГОСТУ 23638-90. Показано положительное влияние биопрепарата «Трихостим» на увеличение удоя молока.

**SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.27.06.2017.B.38.01 AT INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND
NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

AZIMOVA NODIRA SHOYIM KIZI

**MICROBIOLOGICAL CONVERSION OF CELLULOSE-CONTAINING
RAW MATERIALS BY THE FILAMENTOUS FUNGUS
*TRICHODERMA HARZIANUM***

03.00.04 – Microbiology and virology

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD)
OF BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent - 2017

This dissertation of doctor of philosophy (PhD) has been registered with the number B2017.1.PhD/B1 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.

The dissertation has been carried out at the Institute of Microbiology.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (info@microbio.uz) and on the website of «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific supervisor: **Khamidova Khursheda Muminovna**
candidate of biological sciences

Official opponents: **Tashmukhamedova Shoxista Sobirovna**
doctor of biological sciences, professor
Khashimova Nigora Rustamovna
doctor of biological sciences

Leading organization: **Tashkent state agrarian university**

The defence of the dissertation will take place on «__» _____ 2017 at ____ at the meeting of the Scientific council DSc.27.06.2017.B.38.01 on award of scientific degrees at the Institute of Microbiology and National University of Uzbekistan (Address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Conference hall of the palace of the Institute of Microbiology. Phone: (+99871)241-92-28, (+99871)241-71-98, Fax: (+99871)241-92-71.

The dissertation has been registered at the Informational Resource Centre of Institute of the Microbiology under №____ (Address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28).

The abstract of the dissertation has been distributed on «22» of December, 2017.
(Protocol at the register № 4 dated by «22» of December, 2017)

Aripov Takhir Fatikhovich
Chairman of the scientific council
awarding scientific degrees,
D.B.Sc., professor, academician

Nasmetova Saodat Mamajanovna
Scientific secretary of the scientific council
awarding scientific degrees, PhD, senior researcher

Gulyamova Tashkhan Gafurovna
Chairman of the academic seminar under the
scientific council awarding scientific degrees,
D.B.Sc., professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the research work is isolation of new active local strains of microorganisms producing enzymes of the cellulolytic complex and xylanase, selection of an effective strain for bioconversion of plant substrates in order to create a biopreparation for livestock.

The object of the research work is strains of micromycetes isolated from various natural sources, such as corn and wheat rhizosphere, soil samples, rotting poplar, willow, imported from various regions of the Republic, scraps of wheat straw, samples of damaged cotton from cotton fields, strain of fungus *T. harzianum* UzCF-28 selected via screening, as well as cellulose-containing plant substrates.

Scientific novelty of the research work:

a new rapidly growing local strain of the fungus *T. harzianum* forming a wide range of active cellulolytic enzymes and xylanase in the culture liquid was selected and identified as a result of screening among the isolated microorganisms. The strain has been patented, the bioconversion of cellulosic substrates by fungus *T. harzianum* UzCF-28 and enrichment with digestible carbohydrates, proteins, amino acids were determined;

EG II and EG III enzymes with molecular weight of 135 and 75 kDa were isolated from cultural liquid of *T. harzianum* UzCF-28 as well as their physical-chemical and kinetic properties were characterized;

for the first time biopreparation «Trichostim» used for siloing the plant mass was created on the basis of rapidly growing local strain of fungus *T. harzianum* UzCF-28. The composition of microorganisms, biochemical, organoleptic parameters of silage prepared with addition of the created preparation in laboratory and production conditions were determined.

Implementation of the research results. Based on the submerged cultivation of fungus *T. harzianum* UzCF-28, which synthesizes the active enzymes of the cellulolytic complex and xylanase and is capable of bioconversion of plant substrates with the formation of sugars, protein, amino acids, including irreplaceable ones, the biopreparation increasing the amount of assimilable substances in feed was created;

the patent (20.05.2014 y. № IAP 04901) for the invention of the Agency for Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan for the strain of filamentous fungus *T. harzianum* UzCF-28 synthesizing a complex of cellulase enzymes, xylanase with the formation of sugars, proteins and amino acids was obtained;

biopreparation «Trichostim» was created and recommended for ensilage of cellulose-containing raw materials;

biopreparation «Trichostim» was successfully applied in agricultural farms.

The structure and volume of the thesis. Containing 120 pages of text, the dissertation has introduction, six chapters, conclusions and list of references.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Азимова Н.Ш., Зухритдинова Н.Ю., Хамидова Х.М. Қишлоқ хўжалиги чиқиндиларининг *Trichoderma harzianum* (Rifai) замбуруғи иштирокидаги биоконверсияси // ЎЗМУ хабарлари, Махсус сон: Биология туркуми, -Тошкент, 2013. -№4/2. 152-154-б. (03.00.00., №9).

2. Тохтахунова А.К., Азимова Н.Ш., Хамидова Х.М. Антагонистические свойства гриба *Trichoderma harzianum* (Rifai) // ЎЗМУ хабарлари, Махсус сон: Биология туркуми, -Тошкент, 2013. -№4/2. 241-243-б. (03.00.00., №9).

3. Азимова Н.Ш., Хамидова Х.М. Турли хил углерод манбаили озук мухитларида *Trichoderma harzianum* UzCF-28 замбуруғининг морфологик-културал хусусиятлари //Ўзб. биол. журн. – Тошкент, 2015. - № 2. 18-21-б. (03.00.00., №5).

4. Азимова Н.Ш. Выделение и скрининг микромицетов – продуцентов целлюлолитических ферментов. Вестник Каракалпакского отделения АН РУз.– Нукус, 2015. - № 3. -С. 41-44. (03.00.00., №10).

5. Тохтахунова А.К., Азимова Н.Ш., Черкасова Г.В., Зухритдинова Н.Ю., Хамидова Х.М. Микробиологический анализ силоса, приготовленного с внесением микроорганизмов // Вестник Каракалпакского отделения АН РУз. – Нукус, 2015. - № 3. -С. 44-48. (03.00.00., №10).

6. Азимова Н.Ш., Тохтахунова А.К., Хамидова Х.М. *Trichoderma harzianum* UzCF-28 замбуруғининг ксиланолитик фаоллиги // Кар ДУ хабарлари – Қарши, 2016. -№ 1 (27). 31-37-б. (03.00.00., №11).

7. Азимова Н.Ш. *Trichoderma harzianum* UzCF-28 замбуруғи иштирокида тайёрланган силоснинг баъзи бир биокимёвий хусусиятларини ўрганиш // ГулДУ Ахборотномаси - Гулистон, 2016. - №1. 33-37-б. (03.00.00., №3).

8. Azimova N.Sh., Khamidov D.M., Djumagulov M.B., Shakirov Z.S. Purification and Some Properties of Endo-1,4-β-Glucanases of *Trichoderma harzianum* UzCF-28 // Open Journal of Applied Sciences (OJAppS), USA, 2016, 6, P. 514-523 (№40. Research Gate, IF – 0,31).

9. Хамидова Х.М., Байбаев Б.Г., Хамидов Д.М., Зухритдинова Н.Ю., Азимова Н.Ш. Штамм мицелиального гриба *Trichoderma harzianum* UzCF-28, синтезирующий ферменты целлюлитического комплекса, белок, лизин, метионин и витамины группы В. Патент. № IAP 04901 20. 05. 2014 г.

II бўлим (II часть; II part)

10. Зухритдинова Н.Ю., Хамидов Д.М., Азимова Н.Ш., Хамидова Х.М. Микробиологическое обогащение кормов //Современное экологическое состояние Приаралья, перспективы решения проблем: Сборник статей

Междунар. науч.-практич.конф.–Кызылорда, 2011.- С. 283-287.

11. Хамидова Х.М., Азимова Н.Ш., Байбаев Б.Г., Абдуллаев Т., Зухритдинова Н.Ю. Силосование верблюжьей колючки и багарного сена с использованием микроорганизмов // «Наука, образование, производство в решении экологических проблем» (Экология-2011): Сборник научных статей VIII-й Международной научно-технической конф. -Россия, Уфа, 2011. Том II. -С. 57-62.

12. Азимова Н.Ш., Хамидова Х.М. *Trichoderma harzianum* замбуруғининг целлюлаза биосинтезига озуқа мухити таркибининг таъсири //Сборник тезисов докладов V съезда микробиологов Узбекистана. Ташкент, 2012.-С. -62.

13. Азимова Н.Ш. Биоконверсия целлюлозосодержащих субстратов в корма //«Научный прогресс и инновационное развитие экономики» Республиканская научно-практическая конференция молодых учёных. Ташкент, 2012. –С.104-105.

14. Khamidova Kh., Azimova N., Baybaev B., Zukhritdinova N. Siloing of wheat straw while using of enzymes of mycelial fungi // The V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology – Bio Micro World. Spain. 2013. p. 65.

15. Азимова Н.Ш., Байбаев Б.Г., Зухритдинова Н.Ю., Тохтахунова А.К., Юнусова Н.С., Хамидова Х.М. Целлюлаза ферментлари фаоллигининг мавсумий ўзгаришини кузатилиши //Материалы Республиканской научно-практической конференции молодых ученых.Ташкент, 2013. –С. -23.

16. Азимова Н.Ш., Байбаев Б.Г., Бердиев Н.Ш., Хушвактов Ғ.Д., Хамидова Х.М. *Trichoderma harzianum* UzCF-28 замбуруғининг целлюлолитик ферментлари ва оксил биосинтезига азот манбаларининг таъсири //«Проблемы рационального использования и охрана биологических ресурсов Южного Приаралья» V Межд. науч. прак. конф. – Нукус, 2014. -С. 4-6.

17. Хамидова Х.М., Байбаев Б.Г., Зухритдинова Н.Ю., Абдуллаев Т., Азимова Н.Ш., Умарова Г.Б. Изучение некоторых микробиологических и биохимических показателей в ферментированном силосе из пшеничной соломы // Сборник стат. по материалам XIV межд. народ.прак. конф. Наука вчера, сегодня, завтра. - Новосибирск, 2014. -№ 7 (14). -С. 17-24.

18. Тохтахунова А.К.,Черкасова Г.В., Азимова Н.Ш., Хамидова Х.М. Использование микроорганизмов для приготовления силоса из пшеничной соломы //Биотехнология: Состояние и перспективы развития VIII Московской международной конгресс, 2015. Часть 2, -С. 131- 132.

19. Азимова Н.Ш., Черкасова Г.В., Хамидова Х.М. *Trichoderma harzianum* UzCF-28 мицелиал замбуруғининг ривожланиш циклини ўрганиш // Международный симпозиум “Микроорганизмы и биосфера” Микробиос – 2015. Ташкент, 2015. 23-24-б.

20. Азимова Н.Ш., Зухритдинова Н.Ю., Абдуллаев Т., Юнусова Н.С., Хамидова Х.М. *Trichoderma harzianum* UzCF-28 штаммидан фаол целлюлаза олиш учун оптимал шароитни танлаш // Международный симпозиум “Микроорганизмы и биосфера” Микробиос – 2015. Ташкент, 2015. 117-118-б.

Автореферат «ЎзМУ хабарлари» журнали
тахририятида таҳрирдан ўтказилди

Бичими: 84x60 ¹/₁₆. «Times New Roman» гарнитура рақамли босма усулда босилди.
Шартли босма табағи: 2,5. Адади 100. Буюртма №34.

«ЎзР Фанлар академияси Асосий кутубхонаси» босмахонасида чоп этилди.
100170, Тошкент, Зиёлилар кўчаси, 13-уй.

