

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

---

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**НАСМЕТОВА САОДАТ МАМАЖАНОВНА**

***ASPERGILLUS TERREUS* МАҲАЛЛИЙ ШТАММЛАРИ АСОСИДА  
СТАТИНЛАРНИ ОЛИШ БИОТЕХНОЛОГИЯСИ**

**03.00.12 – Биотехнология**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2019**

**Фан доктори (DSc) диссертацияси автореферати мундарижаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc)**

**Contents of dissertation abstract of doctor of science (DSc)**

<b>Насметова Саодат Мамажановна</b> <i>Aspergillus terreus</i> маҳаллий штаммлари асосида статинларни олиш биотехнологияси	3
<b>Насметова Саодат Мамажановна</b> Биотехнология получения статинов на основе местных штаммов <i>Aspergillus terreus</i>	28
<b>Nasmetova Saodat</b> Biotechnology of statins production by domestic strains of <i>Aspergillus terreus</i>	52
Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works	56

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

---

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**НАСМЕТОВА САОДАТ МАМАЖАНОВНА**

***ASPERGILLUS TERREUS* МАҲАЛЛИЙ ШТАММЛАРИ АСОСИДА  
СТАТИНЛАРНИ ОЛИШ БИОТЕХНОЛОГИЯСИ**

**03.00.12 – Биотехнология**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2019**

**Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.1.DSc/B25 рақам билан рўйхатга олинган.**

Диссертацияси Микробиология институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (microbio@academy.uz) ҳамда «ZiyoNet» ахборот-таълим портали (www.ziynet.uz) манзилларига жойлаштирилган.

**Илмий маслаҳатчи:**

**Гулямова Ташхан Гафуровна**  
биология фанлари доктори, профессор

**Расмий оппонентлар:**

**Давранов Кахрамон**  
биология фанлари доктори, профессор

**Далимова Сурайё Нугмановна**  
биология фанлари доктори, профессор

**Мухамедов Рустам Султанович**  
биология фанлари доктори, профессор

**Етакчи ташкилот:**

**Ботаника институти**

Диссертация ҳимояси Микробиология институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги DSc.27.06.2017.B.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2019 йил «\_\_\_» апрел соат 10:00 даги мажлисида бўлади (Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А Қодирий кўчаси 7 б-уй, Микробиология институти мажлислар зали. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71.e-mail: microbio@academy.uz.

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин («\_\_» рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А Қодирий кўчаси 7 б-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 3-қават, Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98).

Диссертация автореферати 2019 йил «\_\_\_\_\_» мартда тарқатилди.  
(2019 йил «\_\_\_\_\_» март № \_\_\_\_\_ рақамли реестр баённомаси)

**Арипов Тахир Фатихович**  
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси,  
б.ф.д., профессор, академик

**Жураева Роҳила Назаровна**  
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш  
илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

**Ахмедова Захро Раҳматовна**  
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги  
илмий семинар раиси, ўринбосари б.ф.д., профессор

## КИРИШ (фан доктори (DSc) диссертацияси аннотацияси)

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Дунёда гиперхолестеринемия ва атеросклероз ижтимоий аҳамиятга эга юрак томир касалликларининг асосий хавф солувчи омилларидан бўлиб ҳисобланади. Бугунги кунда мавжуд бўлган липид пасайтирувчи препаратлардан энг юқори самарадолик хусусиятларига эга статинлардир. Статинларнинг гипохолестеринемик таъсири биринчи ферменти ГМГ-КоА-редуктаза холестерининг биосинтезини ингибирланиши билан боғлиқ бўлиб, қондаги умумий холестериннинг пасайишига олиб келади. Табiiй статинлар ипсимон замбуруғларнинг турларидан олинади, лекин саноат миқёсида ловастатиннинг продуценти базаси *Aspergillus terreus* штаммлари ҳисобланади. Шу сабабли, аспергилларни маҳаллий штаммлар потенциалини аниқлашга йуналтирилган ва улар асосида янги препаратлар ишлаб чиқариш технологиясини яратиш муҳим аҳамиятга эга.

Жаҳонда статинларнинг клиник самарадорлиги исботланган. Жумладан, уларнинг асосий таъсир этиш механизмга боғлиқ бўлмаган, ўлим ва кардиоваскуляр касалликлар хавф-хатарини пасайтиришдан ташқари, статинлар плейотропик, тромбозга ва яллиғланишга қарши, антиоксидант ва антимикроб хусусиятларига эга. Ҳозирги вақтда замбуруғлар асосида олинган табiiй статинлар (ловастатин и турдош бирикмалари); симвастатин, ловастатиннинг полусинтетик ҳосилалари; синтетик статинлар (аторвастатин, флувастатин, розувастатин ва бошқ.) фойдаланилмоқда ва озик-овқат ва дори воситалари бўйича Администрация (FDA) томонидан мувофиқ деб топилган. Шунга кўра, маҳаллий *A. terreus* нинг истиқболли штаммларини танлашга йуналтирилган тадқиқотлар ва уларни юқори терапевтик фаоликка эга ва салбий таъсирга эга бўлмаган янги статинлар асосида гиполипидемик препаратларни яратиш муҳим илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Республикамиз аҳолисини сифатли ва юқори самарадор бўлган дори воситалари билан таъминлаш мақсадида, саноат учун муҳим бўлган маҳаллий штаммлардан биологик фаол қўшимчаларни ажратиб олиш ва амалиётга жорий қилишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Шунингдек, статинларни ҳосил қилувчи микроорганизмлар штаммларини аниқлашга йуналтирилган тадқиқотларга етарлича эътибор қаратилмаган. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «..дори воситаларни ишлаб чиқариш жараёнига инновацион технологияларни жорий этиш ва ички бозорни бойитишга қаратилган таклифлар ҳамда ишлаб чиқаришни маҳаллийлаштиришни амалга оширишни ташкиллаштириш»<sup>1</sup> вазифалари белгилаб берилган. Мазкур вазифаларни амалга оширишда, жумладан *Aspergillus terreus* замбуруғининг истиқболли маҳаллий штаммларини танлаб олиш, статин ҳосил қилиш хусусиятларини ўрганиш ва

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

улар асосида гипохолестеринимик препаратларни ишлаб чиқариш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 23 январдаги ПҚ-3489-сон «Дори воситалари ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқариш ҳамда олиб киришни янада тартибга солиш чора тадбирлари тўғрисида»ги қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Ўзбекистон Фармацевтика соҳасини жадал ривожлантириш тўғрисида қўшимча чоратадбирларда»ги қарори 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 VI. «Тиббиёт ва фармацевтика» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

**Диссертация мавзуси бўйича халқаро илмий тадқиқотлар шарҳи<sup>2</sup>.**

Статинлар хусусиятларни турли хил штамм-продуцентларда ўрганиш, ферментация шароитларини оптималлаштириш, ловастатин ҳосил бўлиш биокимёвий механизмларни, статинлар генларини молекуляр-генетик тахлинини идентификациялаш бўйича изланишлар дунёнинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of California (АҚШ); Department of Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo Noko University (Япония), Institute of Chemical Technology, Food Engineering and Technology Department (Ҳиндистон); Department of Applied Biotechnology and Food Sciences, Department of Chemical Engineering, University (Испания), Budapest University of Technology and Economics (Венгрия); Бутун Россия фитопатология илмий-тадқиқотлар институтида олиб борилмоқда.

Статин ҳосил қилувчи микроорганизмлар штаммларини ўрганиш соҳасида олиб борилган тадқиқотлар асосида бир қатор муҳим илмий натижалар олинган, жумладан: *A. terreus* АТСС20542 штаммининг статинлар ишлаб чиқариш усуллари асосланган ҳамда ферментация шароитларини оптималлаштириш, ловастатин ҳосил бўлиши биокимёвий механизмлари аниқланган (Department of Chemical Engineering, University, Испания), *A. terreus* рекомбинант штаммларининг статинлар синтези генлари молекуляр-генетик идентификацияланган (Institute for Systems Biology, Вашингтон, АҚШ), *A. terreus* статинларининг биосинтези ген экспрессияси ва регуляцияси орқали ферментатив кинетикаси ўрганилган ва генларнинг кўп қисми ловастатин ферментлари биосинтези идентификацияланган (University of

---

<sup>2</sup>Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи <https://www.sciencedirect.com>; <https://www.researchgate.net>; <https://www.unboundmedicine.com>; <https://www.ajol.info>, index; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Alberta, Канада), актиномицетлар ва замбуруғларнинг табиий бирикмалар комплексида синтез қилувчи турли хил статинларда гиполипидемик, антимиқроб, вирусларга қарши ва антифунгал фаоллиги аниқланган (Бутун Россия фитопатология илмий-тадқиқотлар институти, Россия).

Дунёда замбуруғлар асосида олинган статинларнинг холестерин синтезини сусайтириш ва метаболизмини бошқариш хусусиятига эга бўлган табиий препаратларини олиш бўйича қатор, жумладан қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: статин маҳсулотларини кодловчи генларни трансформация қилиш йўли орқали микроорганизмларнинг рекомбинант штамmlарини яратиш; гиполипидемик бирикмаларнинг принципиал янги синфларини аниқлаш; уларнинг липид алмашинувига жавоб берувчи генларидан маҳрум бўлган трансген ҳайвонларнинг липидлар метаболизмига таъсирини аниқлаш; плеотроп, яъни статинларнинг асосий таъсир механизмига боғлиқ бўлмаган кўшимча эффектларини асослаш.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Мазкур йўналиш амалий ва саноат ишланмаларида муваффақият қозонган бўлиб, кўпроқ ривожланган фундаментал тадқиқотларда кенг ёритилган. Таъкидлаш жоизки, бир қатор статинларни микроорганизмларнинг сўнги иккиламчи метаболизм маҳсулотлари сифатида олиш имкониятини, шу билан бирга биотрансформация жараёни маҳсулотлари ловастатин ва унинг оралик фаол метаболитлари биосинтези механизмларини аниқлаш, жумладан, правастатин ва мевастатин турли аспектларини чуқурроқ тушинишга олиб келди, ҳамда турли штамм-продуцентлар ферментацияси, ловастатинни ажратиб олиш ва тозалаш усуллари бўйича тадқиқотлар олиб борилган, ловастатиннинг симвастатинга трансформацияси усуллари, ловастатинни ажратиб олиш ва тозалаш усуллари таклиф қилинган (Manzoni et al., 2002; Xie et al., 2009; Shaligram et al., 2009; Savitha et al., 2016., Lee et al., 2017).

Бундан ташқари, ловастатинини кенг кўламда синтез бўлишини таъминлашда, асосан, *A. terreus* нинг фаол штамmlари қўлланилади ва аксарият адабиётлар айнан шу тур билан боғлиқдир. Жумладан, ловастатинни ишлаб чиқариш саноат штамmlари *A. terreus* ATCC20542, *A. terreus* ATCC74135, *A. terreus* NRRL 265 ферментацияси асосида амалга оширилади (Bizukoje et al., 2009; Mohammad et al., 2012; Mukhtar et al., 2014). Лекин шунга қарамаздан ловастатинга бўлган қизиқиш пасаймасдан келмоқда, яъни илмий адабиётлардаги маълумотларга кўра, ёввойи штамmlар дастлабки маҳсулдорлигининг турли-туманлигига сабабли табиий статинларнинг манбаи ҳисобланган ловастатиннинг янги продуцентларини излаб топишни тақозо этмоқда.

Шуни таъкидлаш лозимки, ҳозирги вақтда МДХ мамлакатлари, жумладан, Ўзбекистонда статинлар ишлаб чиқариш йўлга қўйилмаган фақат хориждан келтирилади (тижорат номлари «Мевакор», «Зокор», «Липостат» ва бошқалар). Шу сабабли, Ўзбекистонда статинларни ишлаб чиқариш технологияси мавжуд эмаслиги ва антиатеросклеротик препаратларга бўлган эҳтиёжнинг тобора ортиб бораётганлиги сабабли фаол штамм-

продуцентларидан статинларни ажратиб олиш ва амалиётга жорий этиш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

**Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган институтнинг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Микробиология институтининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-А11-Т129 «Маҳаллий мицелиал замбуруғларда статинлар маҳсулотини» (2009 – 2011йй.), ФА-А6-Т210 «*Aspergillus terreus* маҳаллий штаммларида ловастатин ишлаб чиқариш шароитларини оптималлаштириш» (2012-2014 йй.) мавзуларидаги фундаментал лойиҳалар доирасида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** янги гипохолестеринемик препаратларни ишлаб чиқариш учун истиқболли продуцент сифатида *A. terreus* маҳаллий штаммларининг потенциалини аниқлашдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

статин синтез қилиш фаоллигига кўра *A. terreus* маҳаллий штаммларининг скрининги ва энг самарадор штаммларни танлаб олиш;

танлаб олинган штаммларда статинларнинг таркиби ва миқдорини аниқлаш;

скринингланган штаммларда статинлар маҳсулотини ошишига олиб келувчи ферментация ва ўстириш шароитларини оптималлаштириш усулларини танлаш;

фаол штамм-продуцентлар экстрактдан статинларни ажратиб олиш ва тозалаш усулларини танлаб олиш;

статинларнинг фаол штамм-продуцентлари асосида янги гипохолестеринемик препарат тайёрлаш регламентини ишлаб чиқиш;

янги препаратнинг антимикроб ва гипохолестеринемик хусусиятларини ўрганиш;

гипохолестеринемик кўрсатмага эга янги препаратни серияли ишлаб чиқариш бўйича норматив-техник ҳужжатларни ишлаб чиқиш ва тасдиқлаш.

**Тадқиқотнинг объекти** микробиология институти саноат учун муҳим микроорганизмлар коллекциясида сақланиб келаётган *A. terreus* маҳаллий штаммлари ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг предмети** аспергиллар статинлари, улар асосида гипохолестеринемик препаратни яратиш ҳамда унинг антимикроб ва терапевтик хусусиятларини аниқлаш ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Микробиологик, биокимёвий, спектрофотометрик, молекуляр биологик, доривор препаратларнинг клиник давригача бўлган усуллари ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

илк бор *A. terreus* маҳаллий штаммларининг статин ҳосил қилиш хусусиятлари исботланган;

маҳаллий штаммлар синтез қилувчи бир неча биофаол поликетидларни: правастатин, симвастатин, монаколин L ва уч хил



ловастатинни (лактон, гидроксикислота, метил эфири) ўз ичига олган статин табиатга эга метаболитлар таркиби аниқланган;

илк бор *A. terreus* маҳаллий штаммларининг ярим синтетик синтезга муқобил экзоген ловастатиндан ферментация жараёнининг охириги маҳсулоти бўлган симвастатин синтезлаш қобилияти исботланган;

озуқа муҳити асосий компонентларининг оптимал нисбатлари (озуқанинг углерод ва азот манбалари), *A. terreus* 20 културасини чуқур ўстириш параметрлари (фойдаланилган инокулюмнинг миқдори, типи ва ёши, ўстириш даври, озуқанинг рН кўрсаткичи) танлаб олинган, натижада дастлабки кўрсаткичларга нисбатан ловастатиннинг даражаси 2-3 марта ва симвастатиннинг даражаси 12 марта ошиши аниқланган;

ғалла-дон субстратларда қаттиқ фазали ферментациянинг чуқур ўстиришга нисбатан афзаллиги кўрсатилган ва ўстиришнинг оптимал параметрлари (инокуляция усули, ҳарорат, озуқа муҳитининг рН кўрсаткичи, субстратни намлантирилиши ва субстрат миқдори) аниқланган бўлиб, бу эса маҳсулотнинг максимал тўпланиш вақтини 11 сутка қисқартирилишига ва маҳсулдорлик специфик кўпайишини 10-15 марта ошишига олиб келиши асосланган;

тозаланган ловастатин препаратининг референтли ловастатинга тенг бўлган *B. subtilis* бактериялари ва *C. albicans*, *V. dahliae* ҳамда *A. alternata* замбуруғларига нисбатан антибактериал ва антифунгал фаоллиги аниқланган;

биологик фаол қушимча «Атерис» гипохолестеринемик таъсири *in vivo* ҳайвонлар модели экспериментал дислиппротеинемияда исботланган, қуйи зичликдаги липопротеинларнинг самарали камайиш ва захарли таъсирининг йўқолиш даражаси баҳоланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** қуйидагилардан иборат:

янги, импорт ўрнини боса олувчи гипохолестеринемик таъсирга эга бўлган препаратларни яратиш учун турли статинлар ишлаб чиқарувчи *A. terreus-4* ва *A. terreus-20* маҳаллий штаммларидан фойдаланиш имконияти изоҳланган;

*A. terreus-20* штаммидан қаттиқ фазали ферментация усули ёрдамида тозаланган статинларни - ловастатин ва симвастатинларни олиш лаборатория – технологик регламенти ишлаб чиқилган;

*V. dahliae* РКМУз-224 коллекция штамми ловастатин-ишлаб чиқарувчи култураларнинг бирламчи микробиологик скринингини ўтказиш учун янги тест-култура сифатида қўллаш мумкинлиги асосланган;

*A. terreus-20* штаммининг тозаланган ловастатини асосида зайтун мойи кўшилган холда «Атерис» биологик фаол қўшимча таркиби ишлаб чиқилган ва унинг антимикроб хусусияти ва ҳайвонлар моделида клиник самарадорлиги исботланган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончилиги.** Тадқиқот натижаларининг ишончилиги экспериментал маълумотларни замонавий микробиологик, биокимёвий ва физикавий усуллари орқали олинганлиги ва уларни назарий

маълумотларга мос келиши, натижаларга Стюдент мезонлари ва Фишер дисперсион таҳлили (ANOVA) ёрдамида статистик ишлов берилганлиги, диссертация натижаларини етакчи хорижий журналларда chop этилганлиги ҳамда амалиётга жорий этилганлиги билан изоҳланади.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти илк бор юқори даражада статин синтез қилиш фаоллигига кўра, бир вақтнинг ўзида статин табиатига ҳамда тижорат аҳамиятига эга учта биофаол поликетидлар - ловастатин, правастатин ва симвастатин синтезловчи *A. terreus* табиий штаммлари аниқланган. Илк бор *A. terreus* маҳаллий штаммлари мисолида кўрсатилган *A. terreus* замбуруғларининг симавастатин синтезлаш қобилияти, статинларнинг ярим синтетик синтезига муқобил асос бўлган юқори фаол продуцентлар сифатида аспергилларда симвастатинлар синтезининг регуляциясини ўрганиш фундаментал масаласи билан изоҳланган.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти танлаб олинган ҳар бир штаммнинг статин табиатига эга турли хил мақсадли маҳсулотлар ишлаб чиқаришда объект сифатида хизмат қилиши, натижада истиқболда гипохолестеринемик препаратлар рўйхатини кенгайтириш бўйича маҳаллий фармацевтик ишлаб чиқариш имкониятларини сезиларли даражада ошишига хизмат қилиши билан изоҳланади. *A. terreus-20* маҳаллий штамми асосида липид алмашинувини мўътадиллаштирувчи ва атероген липопротеинларнинг (“ёмон” холестерин) ортиқча ҳосил бўлиш хавфини пасайтирувчи «Атерис» биологик фаол кўшимчасини олиш технологияси ишлаб чиқилганлиги ва илмий асосланган таркиби танлаб олинганлиги билан асосланади.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** *A. terreus* маҳаллий штаммлари асосида статинлар олиш биотехнологиясига оид илмий тадқиқотлар натижалар асосида:

ловастатин ҳосил қилувчи *Aspergillus terreus-20* замбуруғи штамми учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлиги томонидан ихтиро патенти (№ IAP 05086, 2013) олинган. Натижада ловастатиннинг ингибитори 3-гидрокси 3-метилглутарил-кофермент А (HMG-CoA) редуктазининг микробиологик синтезига боғлиқлигини ва ловастатиннинг продуцент штаммини намоён этиш имконни берган;

озуқага биологик фаол кўшимча «Атерис» препарати учун ташкилот стандарти «Ўзстандарт» агентлигида рўйхатдан ўтказилган (Ts15011021-011:2018). Натижада табиий зайтун мойи ва *A. terreus-20* замбуруғини экстрактидан тозаланган ловастатин комплексини ўзида ифодаладиган «Атерис» препарати озуқага биологик фаол моддалар кўшимчасини ишлаб чиқариш имконини берган;

*A. terreus* маҳаллий штаммларида статинларни идентификация қилиш ва энг фаол штаммларнинг статин синтезлаш бўйича олинган маълумотлардан юқори импакт факторли (IF) 4 та хорижий журналларда қаттиқ фазали ферментация усули ёрдамида тозаланган статинларни-ловастатин ва симвастатинларни олиш учун фойдаланилган (Journal of

Microbial and Biochemical Technology Vol 7(6), (2016); 334-337, IF-4.09, ResearchGate; Asian Pacific journal of cancer prevention Vol 17., 2016, 3797-3803, IF 2.39, Research Gate; Current Microbiology 75(1), 2017, 84-91, IF-1.92, Research Gate; American Journal of Pharmacy and Health Research 3(7), 2015, 116-126, IF 0.865, Global. Натижада *A.terreus* маҳаллий штаммларининг статин ишлаб чиқариш хусусиятларини аниқлаш имконини берган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Мазкур тадқиқот натижалари 7 та халқаро ва 5 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши.** Диссертация мавзуси бўйича 26 та илмий иш чоп этилган, шулардан 13 та илмий мақола бўлиб, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда, жумладан, 9 таси республика нашрларида, 4 таси хорижий журналларда нашр этилган, 1 та ихтиро патенти олинган.

**Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши.** Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ҳамда иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 165 бетни ташкил этган.

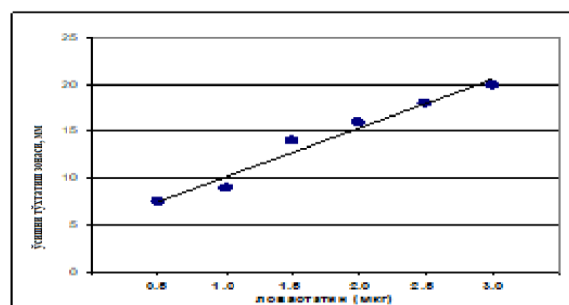
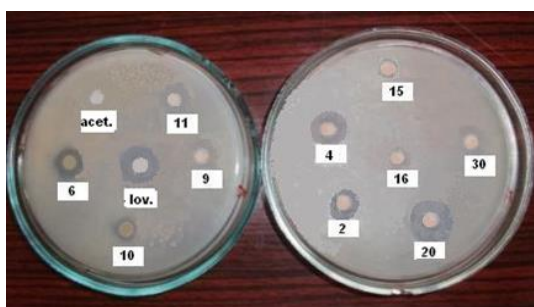
## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

**Кириш** қисмида ишнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва асосий вазифалари тавсифланган, Ўзбекистон Республикаси фан ва технологияси тараққиётининг устувор йўналишларига мослиги, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий этиш, чоп этилган илмий ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Статинлар: хусусияти ва ажратиб олиш усуллари**» деб номланган биринчи бобида статинларнинг организмга биологик таъсири, ловастатин биосинтезининг биокимёвий йўллари, ловастатин ва симвастатинни ферментацияси ҳамда ишлаб чиқариш усуллари, статинларни ажратиб олиш ва тозалаш йўллари масалалари бўйича замонавий изланишларнинг шарҳи келтирилган. Чоп этилган кўплаб мақолалардаги натижаларнинг критик таҳлили мазкур ишнинг асосий мақсади ва вазифаларини шаклланишига имкон берди.

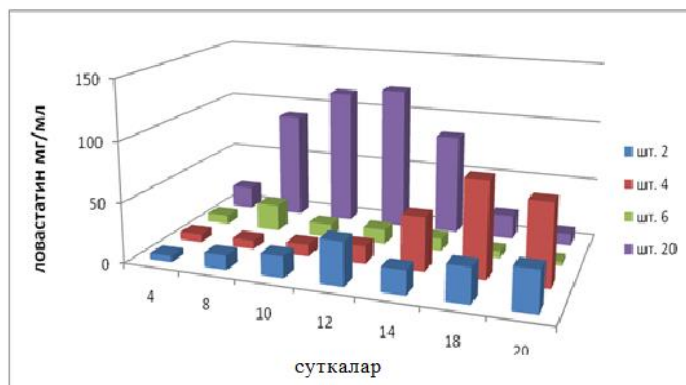
Диссертациянинг «**Ловастатин-продуцентини ҳосил қилувчи фаол *A. terreus* штаммларининг скрининги**» деб номланган иккинчи бобида объект, шунингдек материал ва тадқиқот услублари кенг тавсифланган. Тадқиқот услублари. *A.terreus* маҳаллий штаммларининг статин синтезлаш фаоллигига кўра скрининг усуллари, статинларни экстракция усуллари, экстрактлардаги статинлар таркибининг сифати ва миқдорини ЮҚХ, СЭСХ, ТПС-хроматография, масс-спектрал таҳлил усуллари, истиқболли штаммларни чуқур ва каттик фазали ўстириш усулларида фойдаланилган.

Диссертациянинг «*A. terreus* штаммларининг скрининги ва чуқур ўстириш шароитида статин ҳосил қилиш фаоллиги ўрганиш» деб номланган учинчи бобида маҳаллий штаммларнинг статин ҳосил қилиш хусусияти бўйича танлаб олиш натижалари ва истиқболли штаммлар томонидан статинлар ишлаб чиқарилишини ошириш учун оптимал шароитларни танлаб олиш бўйича тадқиқот натижалари келтирилган. Статин ҳосил қилиш хусусиятига кўра, бирламчи скринингда агарга диффузияланиш микробиологик усулидан фойдаланилган бўлиб, 30 та ўрганилган штаммлар экстрактларида учрайдиган статинларнинг *Neurospora crassa* тест-культураси фунгицид фаоллигига асосланиб олиб борилган. Скрининг натижасида 10 та изолят тест-културани 5 дан 19 мм гача ўсиш зонасини тўхтатиб қўйишига кўра танлаб олинган бўлиб, у қолиблараш эгри чизиғида ловастатиннинг 1,0 мкг/мл дан 2,8 мкг/мл экстракт концентрациясига мос келган. Лизис зонасининг максимал кўрсаткичи 12, 13, 17 и 19 мм бўлиб, *A. terreus* 6, *A. terreus* 2, *A. terreus* 4 и *A. terreus* 20 4 та штаммида ловастатиннинг мос равишда 3 мкг/мл, 1,5 мкг/мл, 2,4 мкг/мл и 2,8 мкг/мл экстракти миқдорига тўғри келиши кузатилган (1-расм).



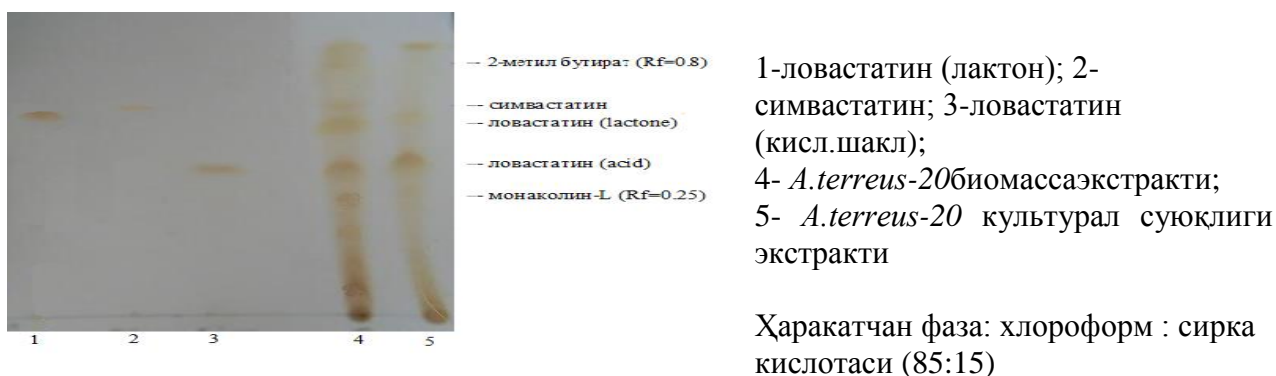
1-расм. а) *A. terreus* изолятлари томонидан *Neurospora crassa*нинг ўсиш зоналарини ингибирланиши; б) референтли ловастатинларнинг *Neurospora crassa*ни тўхтатиш эгри чизиғи.

4 та энг фаол штамми глюкозасакловчи озуқа муҳитида дастлабки ўстиришнинг 12- ва 18- суткаларида *A. terreus*-4 ва *A. terreus*-20 штаммларида ловастатин энг юқори миқдори мос равишда 80 мг/л и 121 мг/л муҳит бўлганлиги кўрсатилган (2-расм).



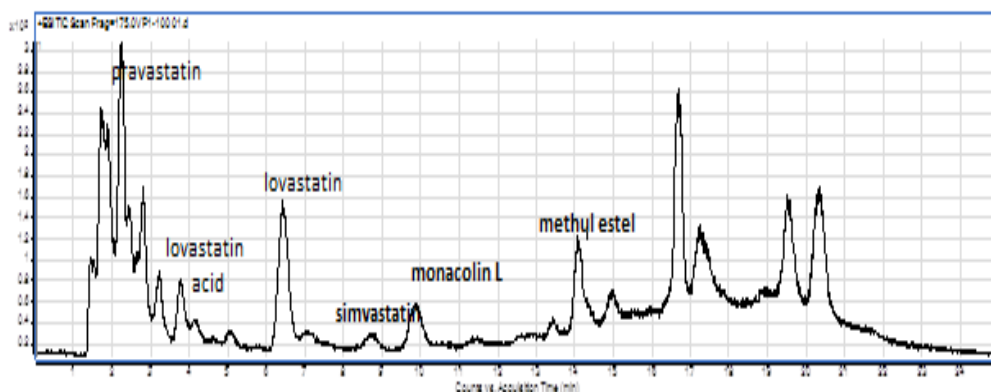
2-расм. Танлаб олинган штаммларда картошка-глюкозали озуқа муҳитида ловастатин тўпланиши динамикаси

*A.terreus 20* бирмунча фаол штамми културал суюқлиги ва биомассаси метаболитлари экстракти сифат таркибини ЮҚХ усулида ўрганиш натижалари Rf ва монаколинL, кислотали ва лактон шаклдаги ловастатин, ловастатиннинг метил эфири ва симвастатинга мос келадиган моддалар борлигини кўрсатди. Културал суюқликда асосан, ловастатин кислотали шаклда секреция қилиниши, лекин унинг миқдори яхлит културал суюқликдаги статинларнинг умумий миқдорига нисбатан 17% дан ошмаслиги қайд этилди (3-расм).



**3-расм. ЮҚХ да *A.terreus-20* штаммининг биомассаси ва културал суюқлиги экстрактининг ажралиш профили**

Статинларнинг ЮҚХ ва масс-спектрал таҳлиллар асосидаги идентификацияси ЎЗРФА БОКИ ходимлари билан ҳамкорликда амалга оширилди. *A.terreus 20* мицелийси биомассаси экстрактида молекуляр массалари бўйича правастатин (425,1159 m/z), ловастатин (405,2208 m/z), ловастатин гидроксикислотаси (422,2468 m/z), симвастатин (419,2362 m/z), монаколин L (305,1173 m/z) ва ловастатиннинг метил эфири (436.3890 m/z) бирикмалари аниқланди ( 4-расм, 1-жадвал).

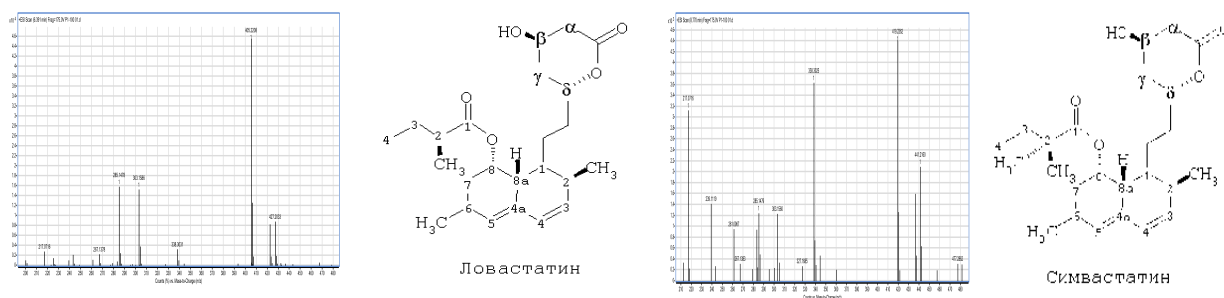


**4-расм. *A.terreus-20* штамми биомасса экстракти TIC- (Total Ion Chromatogram) маълумоти.**

*A.terreus-20* экстракти масс-спектрал таҳлили

Модданинг номи	Молекуляр иони (M <sup>+</sup> )	Чиқиш вақти (мин)
Pravastatin	425,1159 m/z	2,25
Lovastatin	405,2208 m/z	6,4
Lovastatin acid (LA)	422,2469 m/z	3,8
Simvastatin	419,2362 m/z	8,7
Monacolin L	305,1173 m/z	9,8
Methyl ester (LM)	436,3890 m/z	14,0

Шуни алоҳида қайд этиш жоизки, биз томонимиздан илк бор *A.terreus-20* маҳаллий штаммида ферментациянинг охирги маҳсулоти сифатида симвастатинни аккумуляциялаши аниқланди. Ҳозирги вақтда симвастатин синтез қилиши хусусиятига эга рекомбинант штаммлар олиш бўйича бир қатор тадқиқотлар олиб борилмоқда. Илмий адабиётлардаги маълумотлардан маълумки, симвастатин экзоген ловастатиндан тегишли трансформация фаоллигига эга культуралар ёрдамида қиммат турадиган полисинтетик йўл билан ишлаб чиқарилади, чунки *Aspergillus* туркумига мансуб замбуруғларда симвастатиннинг ён занжиридаги иккинчи метил радикали донори метилмалонил-СоА ҳосил бўлмайди. Масс-спектрал таҳлил натижасида исботланган ферментацияда симвастатиннинг тўғридан-тўғри синтезига оид далил *A.terreus* маҳаллий штаммларида симвастатин ҳосил бўлиш занжиридаги етишмайдиган босқичнинг мавжудлигини мутлақо тасдиқлайди (5-расм).

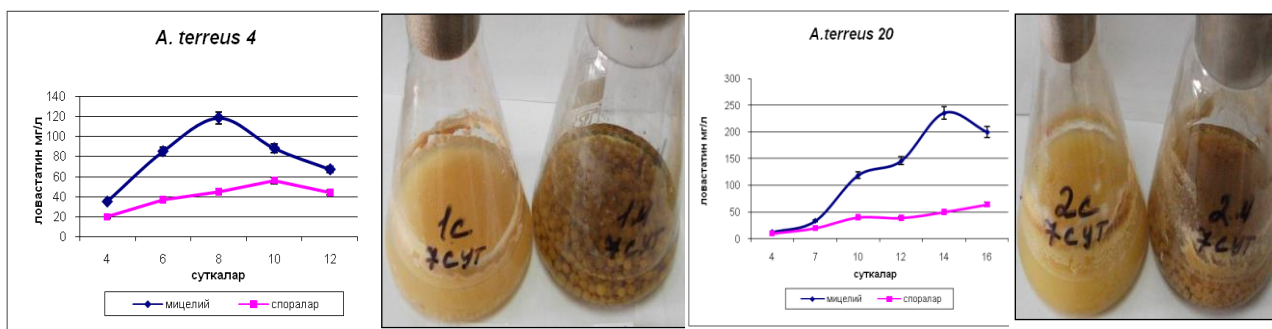


5-расм. *A.terreus-20* экстрактидаги ловастатин ва симвастатиннинг масс-спектрал таҳлили

Танлаб олинган *A. terreus - 4* ва *A. terreus - 20* штаммларида статинлар ишлаб чиқарилиши маҳсулдорлигининг ортишида ловастатин ишлаб чиқарилиши морфологик-културал хусусиятларга боғлиқлиги, ловастатин ва симвастатин маҳсулоти ажралиб чиқиши динамикаси озуқа муҳитларининг углерод ва азот манбаларига боғлиқлигига чуқур ферментация асосий омилларининг таъсири ўрганилган.

Озуқа муҳитини инокуляция қилиш усуллари маҳсулотнинг чиқарилишига сезиларли таъсир кўрсатади. *A.terreus-4* и *A.terreus-20* штаммларида ловастатин ишлаб чиқарилишини қиёсий ўрганиш натижасида

озуқа муҳитига споралар ва мицелий билан инокуляция қилиш натижасида дисперс мицелийси қўлланилганда културада диаметри бирмунча 8 мм қадар катта бўлган макроколонияларнинг шаклланганлиги қайд этилди. Бу ҳолда, ловастатин ҳосил бўлиши *A.terreus-4* да 240,2 мг/л, ва *A.terreus-20* да мос равишда 118,4 мг / л ни ташкил этади. Споралар билан инокуляция қилишда ловастатиннинг даражаси анча паст бўлиб, 60 мг/л, културалар морфологияси дисперслиги, пигментацияси анча ёрқинлиги кузатилган (6-расм). Шу асосда кейинги тадқиқотларда мицелий инокуляцидан фойдаланилди.



**6-расм.** Спора ва мицелий билан инокуляция қилинган *A.terreus-4* ва *A. terreus-20* културасида да ловастатин тўпланиши динамикаси (Casas Lopez ва ҳаммуаллиф. бўйича №6 озуқа муҳити).

Штаммаларнинг маҳсулдорлигига озуқа муҳитлари таркибининг таъсирини ўрганиш учун экспериментал тадқиқотларда аксарият қўлланиладиган ва саноат миқёсида статинларни ишлаб чиқарилишида кўпинча қўлланиладиган чуқур ферментация шароити апробация қилинди.

Маҳаллий штаммларнинг глюкоза ва лактоза сақловчи озуқа муҳитларида ловастатини ҳосил қилиши таққосланадиган даражада фарқли ёки ловастатинни саноат миқёсида ишлаб чиқаришда кенг қўлланилиб келинаётган маълум бўлган *A.terreus* ATCC20542 ва *A.terreus* ATCC74135 экспериментал штаммларидан ҳам юқори бўлганлиги қайд этилган.

Лактоза, соя уни ва ачитки экстракти сақловчи №6, №7 ва №9 озуқа муҳитларида ўстиришнинг 14-, 22- ва 12-суткаларида *A.terreus-4* ва *A.terreus-20* штаммларида ловастатиннинг юқори кўрсаткичи мос равишда 240,2 мг/л, 276,7 мг/л ва 325,3 мг/л қайд этилган №9 озуқа муҳитида *A. terreus - 20* штамми ўстиришнинг 10 суткасида симвастатиннинг маҳсулдорлиги нисбатан юқори бўлиши, яъни 9,45 мг/л қайд этилган (2-жадвал).

Шундай қилиб, озуқа муҳитлари скрининги натижасида статинлар ҳосил бўлишининг юқори миқдорини таъминлайдиган лактоза сақловчи озуқа муҳитлари асос сифатида танлаб олинган. Бунда, *A.terreus-20* ловастатин ва симвастатинларининг максимал маҳсулдорлиги №9 муҳитда содир бўлади.

**Турли хил озуқа муҳитларида маҳаллий ва маълум штаммларнинг ловастатин бўйича  
нисбий маҳсулдорлиги**

Озуқа муҳитлари №	Углерод манбаи	Азот манбаи	Штаммлар	Ловаста-тин мг/л	Вақт (суткалар)	Симва-статин	Вақт (суткалар)	Илмий манбалар
1.	глюкоза (10 г/л)	МШ (5г/л) ТП – 40 Сули – (10г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> <i>ATCC20542</i>	66 17 120	16 10 12	- - -	- - -	Monaghan et al.,1980
2.	глюкоза (20 г/л), карто-фель 300 г/л	АЭ (2г/л) СЭ (5 г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> <i>ATCC20542</i>	80 121 140	24 16 8	0,002 0,001	20 22	Bizukojs M. et al. 2009.
3.	глюкоза (30 г/л) глицерин (70 г/л)	РЕ (8г/л) ЁСУ (30г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreusA1</i>	61 51 244	8 12 14	0,005 0,002 -	14 - -	Manzoni M et al. 1998
4.	глюкоза (45 г/л) глицерин (2,5г/л)	АЭ (2,5г/л) ПС (24 г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> <i>ATCC74135</i>	72 30 240	12 14 12	- 0,001 -	- 20 -	Hajjaj H. et al, 2001.
5.	глюкоза (45 г/л)	На-глутамат (12,5г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> <i>ATCC74135</i>	137,6 72,3 120	14 14 20	0,003 - -	20 - -	Hajjaj H. et al, 2001.
6.	лактоза (20 г/л)	АЭ (8г/л) Биотин (0,04г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> <i>ATCC20542</i>	118,4 240,2 230	8 14 12	0,015 0,030 -	4 4 -	Casas Lopez JI et al, 2004.
7.	лактоза (70г/л)	ЁСУ (0,5 г/л) ДЭ(8 г/л) ПЭГ(0,5 г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> <i>ATCC20542</i>	214 276,7 873	20 22 10	0,110 0,092 -	4 22 -	Lai, L.S. T., et al, 2007.
8.	лактоза (114 г/л)	СУ (1г/л) биотин (0,04г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> <i>ATCC20542</i>	64 40 120	10 12 14	0,490 1,3 -	10 22 -	Casas Lopez JI et al, 2005.
9.	лактоза (30 г/л)	ДЭ (6г/л) NaNO3- (1г/л)	<i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> TUB F-514	325,3 256	12 7	9,45 -	10 -	Szakacs G. et al. (1998)
10.	лактоза (20 г/л)	ДЭ (4г/л)	<i>A.terreus-4</i> <i>A.terreus-20</i> <i>A.terreus</i> <i>ATCC20542</i>	27,5 40 60	22 24 7,2	0,23 0,09 -	24 22 -	Bizukojs M. et al., 2007.

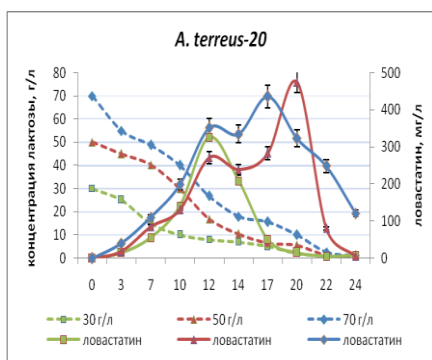
Қисқартмалар: МШ-маккажўхори шарбати, ТП-томат пастаси, СУ-сули уни, ЁСУ- ёғсизлантирилган соя уни, КУ- картошка уни, ПС-петонизирланган сут, На-Глу – На-глутамат, АЭ- ачитки экстракти, СЭ-солод экстракти, СУ- соя уни, ПЭГ- полиэтиленгликоль.

Статинлар ҳосил бўлишига таъсир этадиган асосий омиллардан бири озуқа муҳитлари таркибидаги углероднинг азотга нисбати (C/N)

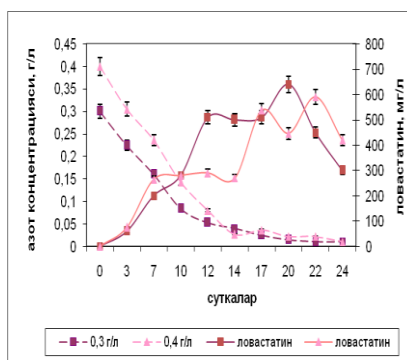


ҳисобланади. Мазкур субстратларнинг ловастатин ҳосил бўлишига таъсирини ўрганиш учун, хусусан, фаол бўлган *A.terreus-20* штаммида углероднинг ягона манбаи сифатида лактоза ва ачитқи экстракти ҳамда органик ва ноорганик азот манбаи бўлган минерал азот сақлайдиган №9 озуқа муҳитидан фойдаланилган. Озуқа муҳитидаги лактозанинг турли-концентрациялари- 30 г/л, 50 г/л, 70 г/л ва ачитқи экстрактининг дастлабки концентрацияси - 6 г/л бўлганда, лактоза концентрациясининг ошиб бориши ловастатин синтезининг ортишига олиб келмаслиги қайд этилган. Шундай қилиб, лактозанинг 50 г/л концентрациясида ўстиришнинг 20-суткасида маҳсулот ажралиб чиқишининг максимал миқдори 470,3 мг/л ни ташкил этган. Келтирилган маълумотларга кўра, ловастатиннинг синтези озуқа муҳитида углерод манбаининг деярли тўлиқ тугашидан кейин бошланиши бошланади (7а-расм).

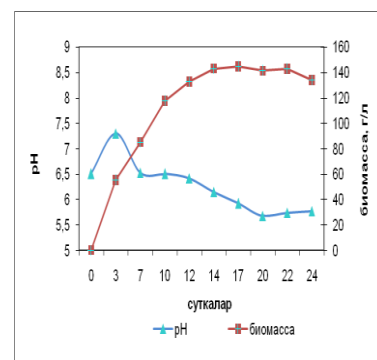
Ловастатин синтезининг азот манбалари концентрациясига (3,0г/л, 4,0г/л ва 6,0 г/л) боғлиқ равишда синтезланишини ўрганиш натижасида озуқа муҳитида органик азотнинг бирмунча қуйи концентрацияларида ловастатин даражасининг ортиши кўрсатилган. Ловастатиннинг кўтарилиб ортиб чиқиши озуқа муҳити таркибида 3г/л ачитқи экстракти (0,3 г/л азот) ва 50 г/л лактоза бўлганда кузатилган. Бунда штаммининг ловастатин бўйича маҳсулдорлиги 20-суткада деярли 2 марта ошиб, 640,3 мг/л ни ташкил этган (7б - расм). Ловастатин синтезининг озуқа муҳити рН кўрсаткичига ва биомасса тўпланишига боғлиқ бўлишида ловастатин даражаси кучайиши озуқа муҳити рН нинг дастлабки кўрсаткичларини 6,5 дан 5,7 гача камайишида ва културанинг стационар ўсиш фазасига ўтиш даврида қайд этилган (7в -расм).



**а**



**б**



**в**

Озуқа муҳитлари таркиби: (г/л): лактоза –(30,50,70); ачитқи экстракти –(3,0;4,0;6,0);  $\text{NaNO}_3$ -1,0;  $\text{KNO}_3$ -1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{NaCl}$  – 0,5;  $\text{MnSO}_4$ –1,6  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –3,4;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  –2,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -излар; рН 6.5

**7-расм.** Озуқа муҳитидаги углерод ва азот манбаларининг турли хил бошланғич концентрацияларида *A.terreus 20* штамми томонидан ловастатин синтези динамикаси; а) лактоза; б) ачитқи экстракти; в) муҳит рН нинг ўзгариши ва биомассанинг ўсиш динамикаси

Айнан ушбу озуқа муҳитида *A.terreus-20* штамми томонидан симвастатин ҳосил бўлишига оид тадқиқотларда олиб борилган барча тажрибалар давомида углероднинг азотга нисбати ифодаланганда симвастатин тўпланишининг сезиларли даражада, яъни 9,6 мг/л дан 120 мг/л

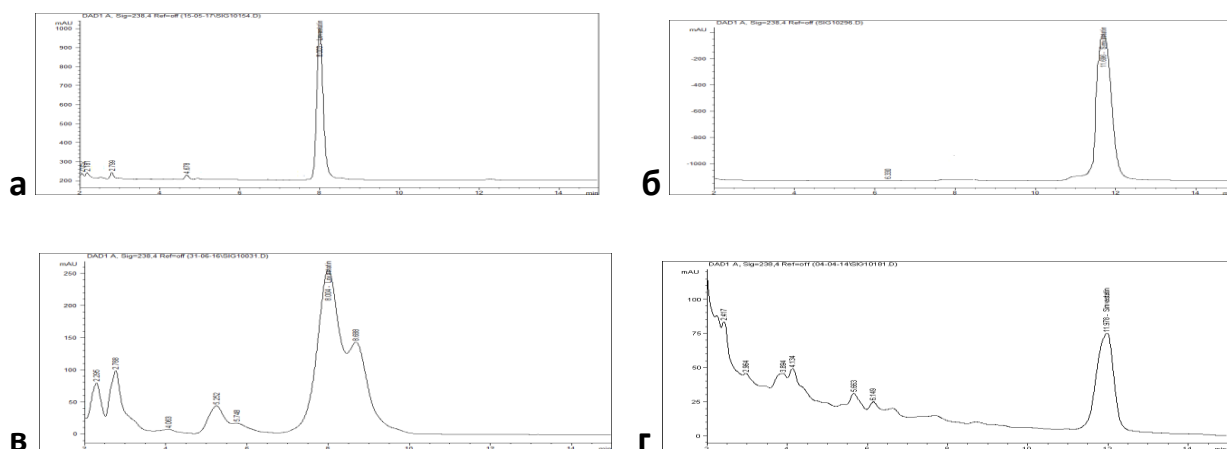
мухитгача ортиши қайд этилган. Бунда симвастатиннинг энг юқори миқдори 70 г/л лактоза ва 3,0 г/л ачитқи экстракти сақловчи озуқа муҳитида намоён бўлган (3-жадвал).

3 -жадвал

Углерод ва азот манбаи бўйича оптималлаштирилган ўстириш шароитларида *A.terreus 20* да симвастатин ҳосил бўлиши

Озуқа муҳити таркиби г/л	Озуқа муҳитида C/N турли хил нисбати			
	№1	№2	№3	№4
Лактоза	3,0%	5,0%	7,0%	7,0%
Ачитқи экстракти	0,6%	0,6%	0,6%	0,3%
NaNO <sub>3</sub>	0,1%	0,1%	0,1%	0,2%
Симвастатиннинг титри, мг/л	9,45±0,35	9,66±0,25	84,5±5,5	120±5,0
<b>Озуқа муҳити таркибида қуйидагилар бўлган:</b> (%) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,2; MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O – 0,05; NaCl – 0,05; MnSO <sub>4</sub> – 0,16 ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O – 0,34; CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O – 0,2; FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O; pH 6.5				

8-расмда иккала статинларнинг ҳосил бўлишидан далолат берувчи ловастатинва симвастатин ҳосил бўлишининг юқори даражаси *A.terreus-20* экстрактининг ССХЭ профили намоён этилган.



8-расм. ССХЭ профили: а- ловастатин (стандарт); б-симвастатин (стандарт); в,г- *A.terreus-20* штамми экстрактлари

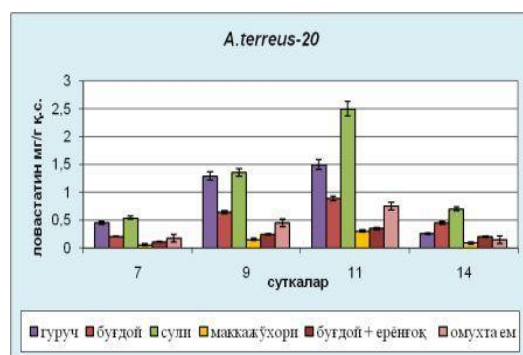
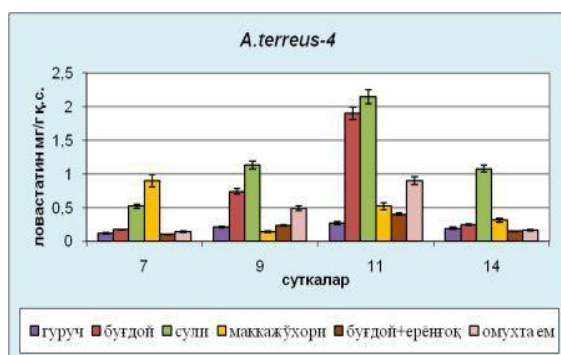
Шундай қилиб, олинган тажриба натижалари асосида чуқур ўстириш шароитларини оптималлаштириш иккала штаммда ловастатин ва симвастатин тўпланишини оптималлаштирилмаган озуқа муҳитларидаги дастлабки маҳсулдорликка нисбатан мос равишда 3 марта ва 90 марта ортишига имкон беради.

Диссертациянинг «Қаттиқ фазали ферментация усулида *A. terreus 4* ва *A. terreus - 20* да статинлар ҳосил бўлиши» деб номланган тўртинчи бобида *A. terreus 4* ва *A. terreus 20* дан статинлар олиш учун қаттиқ фазали ўстириш имконияти ўрганилган. Штаммларни қаттиқ фазали ўстириш 5 г

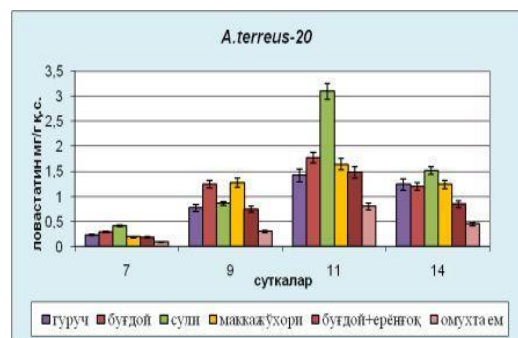
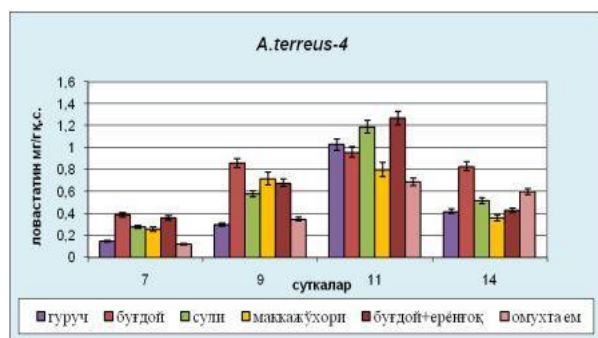
каттиқ субстрат сақловчи Петри ликобчаларида амалга оширилди. Мувофиқ келадиган субстратни скрининг қилишда тадқиқ этиладиган субстратлар қаторини буғдой ва ерёнғоқ аралашмаси, буғдой, гуруч, сули, маккажўхорининг майдаланган донлари ва донли экинларнинг майдаланган чиқиндиларидан ташкил топган омукта емлар ўз ичига олди.

Статинларни ферментатив субстратлардан экстракция қилиш учун турли хил эритмалар: ацетонитрил, этилацетат ва метанолдан фойдаланилди. 9-11-расмларда келтирилган маълумотлардан кўриниб турибдики, ловастатин ажралиб чиқиш даражасига эритувчини тўғри танлаб олиш жиддий таъсир кўрсатади. 9-расмда сулида *A.terreus-20* ферментацион субстрати экстракциясида ацетонитрил қўлланилганда ловастатиннинг максимал ажралиб чиқиши 3,1 мг/г куруқ субстратдан ташкил этган. Сулида *A.terreus-20* дан ловастатинни этилацетат билан экстракция қилиб олишда 2,5 мг/ г қ.с. ни ташкил этган бўлса, метанол билан экстракция қилишда 2,3 мг/ г қ.с. га тенг бўлган.

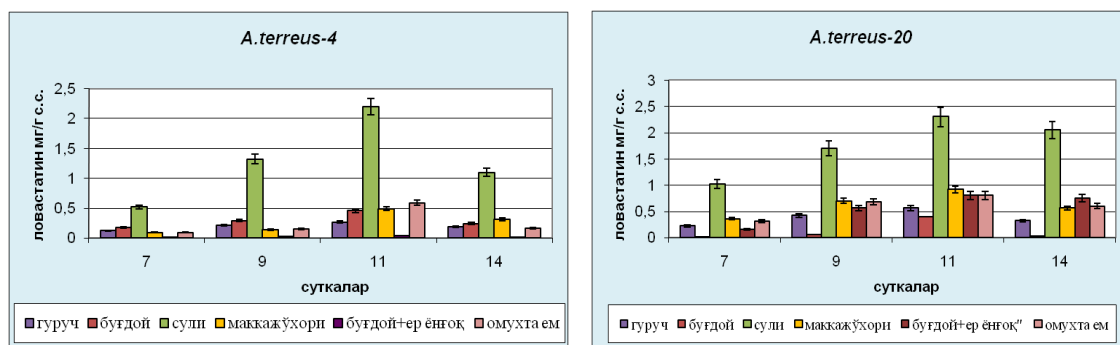
Фойдаланилган эритувчига боғлиқ равишда *A.terreus-4* штаммида максимал даражада маҳсулот ажралиб чиқиши сулида ацетонитрил билан – 2,15 мг/г қ.с., буғдойда этилацетат билан – 1,2 мг/г қ.с. ва сулида метанол билан – 2,1 мг/г қ.с. экстракция қилиш давомида ҳосил бўлган. Бошқа субстратларда (гуруч, маккажўхори, омукта ем) иккала штаммда ҳам ловастатин даражаси қуйи бўлиши ва эритувчига боғлиқ равишда 0,01 мг/г қ.с. дан 1,9 мг/г қ.с. гача ташкил топган.



9-расм. Ацетонитрил билан экстракция қилишда турли субстратларда *A.terreus 4* ва *A.terreus20* штаммлари томонидан ловастатин тўпланиши динамикаси



**10 - расм. Этилацетат билан экстракция қилинган *A.terreus* 4 ва *A.terreus* 20 штаммлари ўсиш динамикасида ловастатин даражаси**



**11-расм. Метанол билан экстракция қилинган *A.terreus* 4 ва *A.terreus* 20 штаммлари ўсиш динамикасида ловастатин даражаси**

Умуман, ҳар иккала штаммдаги ловастатин миқдорини қиёсий ўрганиш натижасида, сулида ҚФФ (қаттиқ фазали ферментация) да кўпроқ тўпланиши кузатилиб, ажратиб олиш даражасини камайиб боришини эса ацетонитрил-этилацетат-метанолда фойдаланиш мумкин. Бунда қўлланилган барча субстратларда ловастатиннинг максимал миқдорда тўпланиши ферментациянинг 11 суткасида кузатилган бўлса, ЧФ да эса (чуқур ферментация) фарқли 14-20 сутка давомида кузатилади.

*A. terreus-4* ва *A. terreus-20* штаммларида симвастатин ҳосил бўлишини ўрганишга оид тадқиқотлар айнан ўша қаттиқ субстратларда олиб борилган. Симвастатиннинг энг юқори миқдори ферментацион сули, гуручни ва омухтаемни этилацетат ёрдамида экстракция қилишда ва ўстиришнинг 11- ва 14 суткаларида 1,0 мг/г.қ.с., 0,5 мг/г.қ.с. ва 0,2 мг/г.қ.с. ташкил этган (4-жадвал).

4 -жадвал

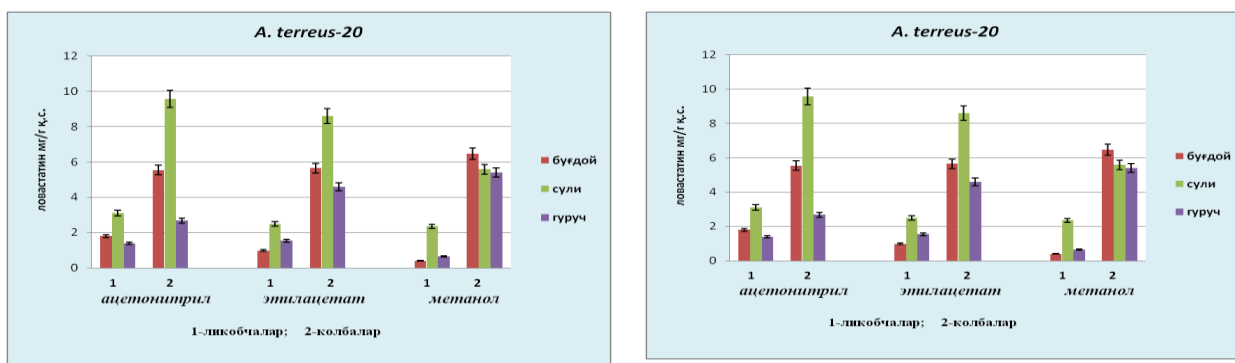
***A.terreus* нинг танлаб олинган штаммларида ҚФ натижасида симвастатин ҳосил бўлиш маҳсулдорлиги**

Штамм	Субстрат	Суткалар	Симвастатин, мг/г куруқ субстратга
<i>A. terreus-4</i>	гуруч	14	1,0
	буғдой	11	$0,93 \times 10^{-2}$
	сули	9	$0,31 \times 10^{-2}$
	маккажўхори	9	$0,12 \times 10^{-3}$
	омухтаем	11	$0,25 \times 10^{-1}$
<i>A. terreus-20</i>	гуруч	11	0,17
	буғдой	9	$0,81 \times 10^{-1}$
	сули	11	0,5
	маккажўхори	9	$0,1 \times 10^{-2}$
	омухтаем	14	0,2

Қаттиқ фазали ўстириш самарадорлигини аниқловчи қўплаб омиллар мавжуд: экиш усули, инокулятнинг ҳажми, ферментация ҳарорати, қаттиқ субстратни намлантириш ва баландлиги. Маҳсулотнинг максимал тўпланиши

спорали инокуляция концентрацияси  $10^8$  мл<sup>-1</sup> бўлганда, субстрат 65% намлантирилганда, дастлабки рН 6 ва оптимал харорат 28°C ни ташкил этганда қайд этилган.

Қаттиқ фазали ўстириш шароитлари ўзгартирилганда сезилари натижалар олинган. *A. terreus* - 4 ва *A. terreus* - 20 штаммларини колбаларда ҚФФ сида барча субстратларда ловастатиннинг миқдори ортган. Бунда ловастатиннинг максимал миқдори буғдой ва сулида ацетонитрил билан экстракция қилинганда 9,7 мг/г қ.с. ва 9,6 мг/г қ.с. ни ташкил этган бўлиб, бу маҳсулот миқдорининг ликобчаларда ўстирилганга нисбатан уч – беш карра кўпроқ бўлишига мувофиқ келган (12-расм).



12-расм. Петри ликобчаларида ва колбалардаги ҚФФ да *A. terreus* 4 ва *A. terreus* 20 ловастатинининг қиёсий самарадорлиги

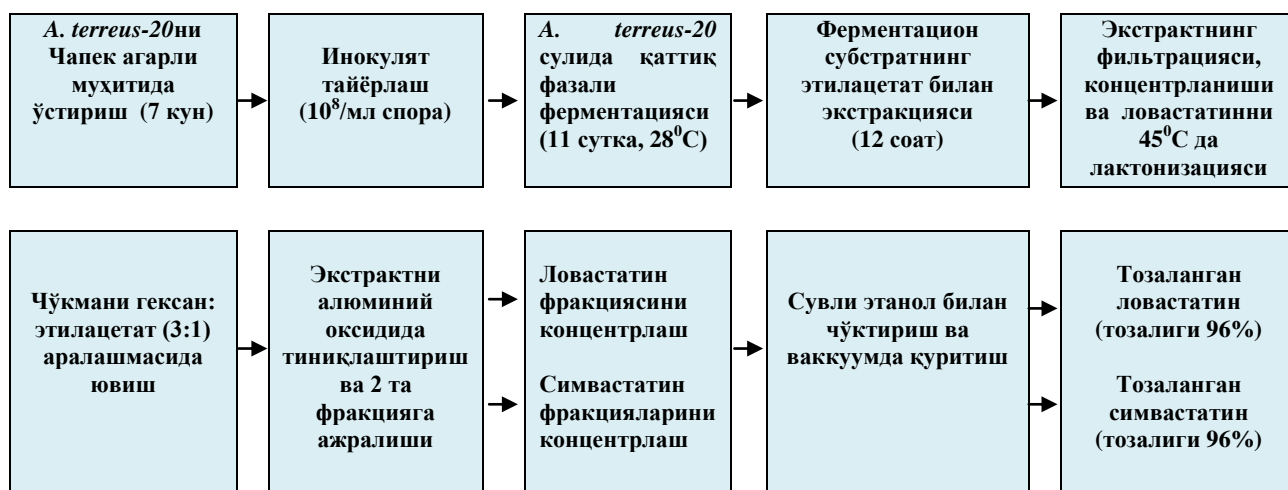
Шундай қилиб, тадқиқот натижаларининг кўрсатишича, *A. terreus* - 4 ва *A. terreus* - 20 штаммларини нисбатан арзон донли экинлар субстратларидаги қаттиқ фазали ферментацияси чуқур ферментациясига нисбатан бир неча марта кўп миқдорда ловастатин ва симвастатин ҳосил бўлишига олиб келади.

Олинган натижаларнинг тўлиқ миқдорий таҳлилини ўтказишнинг иложи бўлмаса ҳам 1,0 литр суюқ ферментацион муҳит ва 1,0 кг ферментация қилинган қаттиқ озуқа муҳитидан ажралиб чиққан маҳсулотни абсолют катталикларда ҳисоблаганда ҚФФ да маҳсулот унуми 10 мартадан кам бўлмаган даражани ташкил этади. Бундан ташқари ҚФФ ўстириш даврини қарийиб икки марта қисқартирилишига, озуқа муҳитлари ва аэрация учун кетадиган энергияга сарфланадиган харажатларни камайтириш имконини беради.

Диссертациянинг «Статин олиш ва антимикроб ва гипохолестеринимик хусусиятлар ўрганиш» деб номланган бешинчи бобида экстракция усуллари танлаш, статинларни ажратиб олиш ва тозалаш, *Aspergillus terreus*-20 нинг тозаланган ловастатини асосида олинган янги препаратнинг антимикроб ва гипополидемик хусусиятларини ўрганишга бағишланган.

Турли гидрофоб ва гидрофил органик эритувчилар: ацетонитрил, этилацетат, метанол, бутилацетат ва толуол билан статинларни ажратиб олиш шароитларини танлаш бўйича ўтказилган тадқиқотлар ҳар бир

эритувчининг статинларни ажратиб олиш учун мувофиқ келишини кўрсатди. 4-хил усулда ўтказилган тажриба синовлари орасидан статинларни ферментацион субстратдан тозалашнинг анча юқори самарадор ва иқтисодий жиҳатдан фойдали битта усули, яъни сулида *Aspergillus terreus*-20 ни қаттиқ фазали ферментация йўли билан олиш афзал деб топилди. Мазкур усулга асосланган холда, тозаланган статинлар – ловастатин ва симвастатин олишнинг лаборатория-технологик регламенти ва уларни ишлаб чиқаришнинг технологик чизмаси ишлаб чиқилди (13 -расм).



13–расм. *A. terreus*-20 нинг ферментатив субстратидан статинлар олишнинг технологик чизмаси

8,6 мг/г қ.с. ловастатин ва 0,5 мг/г қ.с. симвастатин сақловчи 1,0 кг ферментацион субстратни этилацетат билан экстракция қилиш натижасида ва кейинги тозалаш босқичларида симвастатин ва ловастатин сақловчи 2 та фракция танлаб олинди. Фракцияларни тозалашнинг кейинги босқичларида 5,2 г ловастатин (чиқими 60 вазндан %) ва 0,25 г симвастатин (чиқими 50 вазндан %) олинди, хроматографик тозалиги бўйича 96% ва 98% ни ташкил этади.

Адабиётлардан маълумки, статинлар антимикроб хусусиятига эга. Шу сабабли, тозаланган ловастатиннинг антибактериал ва замбуруғларга қарши фаолиги аниқлаш бўйича тадқиқотлар олиб борилди.

Шу нуқтаи назардан тозаланган ловастатиннинг коллекцион тест-культуралар *Pseudomonas aeruginosa* RKMUz-225, *Escherichia coli* RKMUz-221, *Bacillus subtilis* RKMUz-5, *Staphylococcus aureus* RKMUz-91, *Candida albicans* RKMUz-241 ларга нисбатан антибактериал фаоллиги ўрганилди. Тадқиқ этилган ва референсли ловастатин фақат *B. subtilis* ва *C. albicans* ўсишини тўхтатиб қўя олади. Бунда олинган ловастатиннинг тажриба намунаси ловастатиннинг миқдори 50 мкг, концентрацияси 1 мг/мл бўлиши культуралар ўсишининг ингибирланиш зонаси 20,3 мм ва 8,6 мм ни ташкил этиши, референсли ловастатин билан таққосланганда мос равишда 20 мм ва 10 мм ни ташкил этди.

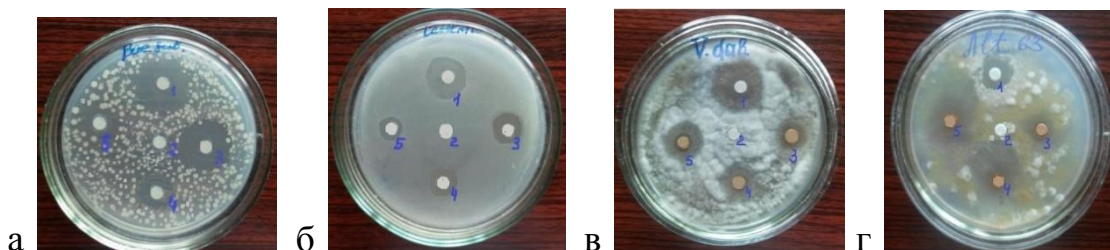


Тозаланган ловастатиннинг *Candida albicans* ва *Alternaria alternata* RKMUz-415, *Verticillium dahliae* RKMUz-224, *Fusarium oxysporum* RKMUz-172, *Fusarium solani* RKMUz-169, *Rhizoctonia solani* фитопатоген замбуруғларига нисбатан фунгицид фаоллигини аниқлаш натижасида, тажриба ловастатини референсли ловастатин билан деярли бир хил фаолликка эга эканлиги қайд этилди ва уч хил концентрацияларда тадқиқ этилган бешта фитопатогеннинг иккитасини, яъни *V. Dahliae* ва *A. alternata* нинг ўсишини тўхтатади. Бунда унинг фаоллиги референсли ловастатиннинг *V. Dahliae* нисбатан фаоллигидан қуйи (16 мм ва 22,3 мм) ва *A. alternata* га қарши юқори (20,2 мм ва 12,6 мм). Бундан ташқари тажриба ловастатинининг фаоллиги *A. alternata* га нисбатан қуйи концентрацияларда ҳам етарлича юқори бўлганлиги қайд этилди (5-жадвал, 14-расм).

5 –жадвал

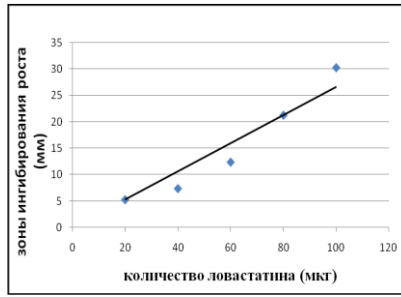
#### Тозаланган ловастатининг антибактериал ва антифунгал фаоллиги

Ловастатин концентрацияси, мг/мл	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Alternaria alternata</i>
	Ўсиш зонасини тўхтатиш диаметри, мм			
Назорат - 1,0	20,0±0,3	10,0±0,6	22,3±0,5	12,6±0,8
Тажриба :- 1,0	20,3±0,6	8,6±0,3	16,6±0,7	20,2±0,9
0,5	16,6±0,5	5,3±0,5	13,0±0,4	20,0±0,5
0,25	15,0±0,4	3,0±0,3	10,3±0,5	11,6±0,3



14-расм. Тозаланган ловастатин билан бактерия ва замбуруғларнинг ингибирланиш зоналари: а) *B. subtilis*; б) *C.albicans*; в) *V.dahliae*; г) *A. alternata*. 1- референсли ловастатин (1,0 мг/мл); 2 – этилацетат; 3 – тажриба ловастатини; 4 суюлтириш (1:2); 5 - суюлтириш (1:4)

Илк бор, *Verticillium dahliae* RKMUz-224 коллекцион штаммининг референс ловастатинга таъсирчанлиги анча сезгир эканлиги қайд этилди ва гипополидемик бирикмаларни аниқлаш учун қўлланиладиган янги-тест култура сифатида баҳолаш мумкин. Қуйидаги 15-расмда ловастатиннинг турли хил концентрацияларида *Verticillium dahliae* нинг ингибирланиш зоналари ва ловастатин концентрациясининг ошиб бориши билан туғридан-туғри културалар ўсишнинг тўхтатилишига боғлиқ бўлган колибирлаш эгри чизиғи келтирилган (15-расм).



**15-расм. а) референтли ловастатин билан *Verticillium dahliae*нинг ингибирланиш зоналари б) *Verticillium dahliae* қарши ловастатининг стандарт эгри чизиғи**

*A. terreus-20* штамми томонидан олинган тозаланган ловастатин асосида «Атерис» препарати яратилди, ўз навбатида ушбу препарат 1,0 мг/мл концентрацияли зайтун мойида эритилган ловастатиндан ташкил топган. Тадқиқ этилган ловастатининг гипополипидемик фаоллиги ЎзРФАЎМКИ ходимлари (проф. Азимова Ш.С. раҳбарлигида) билан ҳамкорликда ҳайвонлар моделида алкохол ва твин лидислипопротеинемияда, қорин бўшлиғига бир марта Твин – 80 ни юбориш йўли орқали амалга оширилган. Тажрибалар тана вазни 220 – 250г бўлган каламушларда олиб борилган. Таққослаш учун «Ловастатин» (KRKA, Словения) препаратидан фойдаланилган.

Синовларда «Атерис» ва таққослаш учун «Ловастатин» препаратлари каламушларга 10 кун давомида перорал (қабул қилинишидан олдин ва бир вақтда Твин-80 юборилиши билан) 8 мг/кг дозада юборилди. 10 соат ўтгандан сўнг қон зардобида ХС ва ТГ кўрсаткичининг катталигига кўра ДЛП нинг ривожланиш даражаси аниқланди. 6-жадвалда келтирилган маълумотларга кўра Твин-80 юборилган каламушлар гуруҳи қон зардобида ХС, ЛПНП ва ЛПВП даражаси деярли 1,3-1,6 марта ошганлиги аниқланди.

Тадқиқ этилаётган препаратни твинли ДЛП шароитида юборилганда, ТГ ва ХС юқори даражасининг назоратга нисбатан камайиши, яъни ТГ учун деярли 2 марта ва ХС учун эса 1,4 марта пасайганлиги аниқланган. «Ловастатин» препаратини перорал юборилганда қон таркибидаги липидлар миқдорининг ўзгаришида ҳам аналогик натижалар олиниши кузатилди: ТГ ва ХС нинг миқдори мос равишда 2 ва 0,5 марта камайган. «Атерис» препаратининг таъсирида ЛПНП нинг 2 марта камайиши кузатилди. Айни вақтда «Ловастатин» ДЛПли каламуш қон зардобидаги ЛПНП нинг миқдorigа деярли таъсир кўрсатмади. Аксинча янги препарат ЛПВП нинг миқдорини 2 марта камайтирди, таққословчи препарат эса ушбу липидларнинг миқдorigа жуда кам таъсир этишини кўрсатди (6-жадв.).



**Твин-80 билан гиперлипидемия чақирилган каламушларнинг липид алмашинуви кўрсаткичларига мойли препаратнинг таъсири**

Экспериментал гуруҳлар/доза	Триглицеридлар, ммоль/л	Умумий холестерин, ммоль/л	Холестерин ЛПНП, ммоль/л	Холестерин ЛПВП, ммоль/л
Интакти	0,53±0,03	1,2±0,3	0,6±0,07	0,49±0,04
Назорат (гиперлипидемия)	0,84±0,05*	1,72±0,20*	0,9±0,06*	0,65±0,04*
Таққослаш препарати «Ловастатин» (8 мг/кг)	0,34±0,02**	1,24±0,07**	0,83±0,06**	0,34±0,04**
БФК «Атерис» (8 мг/кг)	0,48±0,04**	1,27±0,05**	0,46±0,04**	0,71±0,06**
* - P<0,05 интакт ҳайвонларга нисбатан; ** - P<0,05 назоратдаги ҳайвонларга нисбатан. n=4				

Алкоголли ДЛП яратиш учун этанолнинг 40% ли эритмасини 6 г/кг дозада 3 кун давомида уч марта такрорийлик билан перорал юборишга асосланган услубдан фойдаланилди. Алкоголли ДЛП моделида каламушлардан мойли препаратни олдиндан перорал 2 мг дозада 5 кун давомида ва этанол билан бирга 3 кун давомида олинган. «Ловастатин» референт-назорат сифатида перорал айнан ушбу шароитларда қўлланилди. Мазкур тажриба сериялари натижалари 7-жадвалда келтирилган

Жадвалдаги маълумотлардан кўриниб турибдики, этанол қабул қилган каламушлар гуруҳида қон зардобидаги ХС, ЛПНП ва ЛПВП миқдори деярли 2-2,5 марта ошган. «Ловастатин» тадқиқ этилаётган концентрацияларда ТГ, ХС ва ЛПВП ни 2 мартагача, ЛПНП ни эса 0,3 марта пасайтирган. «Атерис» ХС ва ЛПНП даражасини 1,5 марта, ЛПВП ни 1,2 марта ва ТГ ни 1,1 мартагача пасайишига олиб келган.

**50% ли этанол билан гиперлипидемия чақирилган каламушларнинг липид алмашинуви кўрсаткичларига мойли препаратнинг таъсири**

Экспериментал гуруҳлар /доза	Триглицеридлар, ммоль/л	Умумий холестерин, ммоль/л	Холестерин ЛПНП, ммоль/л	Холестерин ЛПВП, ммоль/л
Интакти	0,53±0,03	1,2±0,3	0,6±0,07	0,49±0,04
Назорат (гиперлипидемия)	0,71±0,06*	2,67±0,2*	1,31±0,02*	1,12±0,04*
Таққослаш препарати «Ловахол» (8 мг/кг)	0,42±0,05**	1,6±0,09**	1,12±0,06**	0,39±0,09**
Тажриба препарати (8 мг/кг)	0,61±0,09**	1,83±0,03**	0,82±0,02**	0,88±0,05**
* - P<0,05 интакт ҳайвонларга нисбатан; ** - P<0,05 назоратдаги ҳайвонларга нисбатан. n=4				

Тадқиқ этилган препаратнинг гипополидемик фаоллигини ўрганиш бўйича икки хил ДЛП чақирилган ҳайвонлар моделида тадқиқотларнинг барчаси ТГ ва ХС кўрсаткичлари бўйича референтли препарат билан деярли ўхшаш фаолликни намоён қилган.

Айни вақтнинг ўзида мазкур биологик фаол қушимчанинг ЛПВП ва ЛПНП га таъсири самарали фарқ қилиб, иккала моделда ҳам «ёмон холестерин» ЛПНП даражасининг унумли камайишига олиб келган ва ЛПВП сезиларсиз даражада ўзгарган, бунда назорат препарат ЛПНП даражасини жуда сезиларсиз камайтирган ва ЛПВП ни пасайтирган.

Шундай қилиб, ўтказилган тадқиқот натижалари *in vivo* олинган «Атерис» тижорат препаратига нисбатан таққослаб бўладиган даражада гипополидемик фаолликка эга ва уни гипохолестеринемик кўрсатмага эга янги восита сифатида ҳисобламоқ мумкиндир.

## ХУЛОСАЛАР

«*Aspergillus terreus* маҳаллий штаммлари асосида статинларни олиш биотехнологияси» мавзусидаги докторлик диссертацияси доирасида олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Илк бор *A.terreus* нинг 30 та маҳаллий коллекцион штампларининг статин ҳосил қилиш хусусияти бўйича скрининги ўтказилиб, иккита энг истиқболли *A.terreus 20* ва *A.terreus 4* штамми танлаб олинди.
2. СЭСХ ва масс-спектрал таҳлиллар натижасида *A.terreus* маҳаллий штаммлари ҳосил қиладиган статин табиатга эга метаболитлари таркибига уч хил шаклдаги ловастатин - лактон, гидроксикислота ва метил эфири, правастатин, монаколин L ва симвастатин кириши қайд этилди.
3. Илк бор *A. terreus* маҳаллий штампларининг симвастатин синтез қилиш хусусияти қайд этилиб, *Aspergillus* туркуми замбуруғларида симвастатиннинг ўтмишдоши сифатида диметилмалонил-СоАнинг эндоген синтези мавжудлигини тасдиқлайди. Бу эса экзоген ловастатиндан ярим синтез қилишга муқобил равишда симвастатинни штамми тўғридан тўғри ферментацияси охириги маҳсулоти сифатида олишга имкон берди.
4. Чуқур ферментация учун озуқа муҳитларини скрининг қилишда *A.terreus 20* дан 325,3 мг/л гача ҳужайрада ловастатин ва 9,45 мг/л симвастатинини олишни таъминлайдиган асос сифатида лактоза сақловчи озуқа муҳитлари танлаб олинган. Чуқур ўстириш шароитларини оптималлаштириш, озуқа муҳитининг асосий компонентлари нисбати (лактоза ва ачитқи экстракти), инокуляция усуллари танлаш ҳосил бўладиган ловастатин даражасини *A.terreus 20* да 640 мг/л гача, симвастатиннинг эса 120 мг/л гача ошиши билан изоҳланади.
5. Донли экинлар субстратларидаги (гуруч, буғдой, сули, буғдой+ерёнғок, омухта ем) қаттиқ фазали ферментациянинг чуқур ўстиришга нисбатан

афзаллиги қайд этилган. Қаттиқ фазали ферментациянинг оптимал параметрлари (инокуляция усули, харорат, озук муҳити рН кўрсаткичи, субстратнинг намлиги) ва экстрагентлари танлаб олиниб, буғдойдаги *A. terreus* 4 да ловастатин ажралиб чиқиши 1,9 дан 9,7 мг/г қ.с. гача, сулидаги *A. terreus* 20 да эса 3,1 дан 9,56 мг/г қ.с. гача ошган. Бунда ҚФФ да маҳсулотларнинг максимал тўпланиш вақти 11 суткага қадар қисқариб, хусусий маҳсулдорлик 10-15 марта ортишига олиб келади.

6. Лаборатория-технологик регламенти ишлаб чиқилган, бунда сулидаги *A. terreus* - 20 нинг ферментацион субстратидан ловастатин ва симвастатинни тозалаб олишнинг оддий технологик схемаси таклиф этилган ва қўлланилган. Натижада тозаланган ловастатиннинг 96% ва 98% дан юқори хроматографик тозаликдаги 60 вазндаги % ва симвастатиннинг 50 вазндаги % (вазн/вазн; W/W) олиш имконини беради.
7. Тозаланган ловастатин *B. subtilis*, *C. albicans*, *V. dahliae* ҳамда *A. alternate* нисбатан фаоллиги референсли ловастатин препаратига тенг бўлган антибактериал ва антифунгал фаолликка эга эканлиги қайд этилган. *Verticillium dahliae* RKMUz-224 тўғридан – тўғри ловастатин концентрациялари билан корреляцияланади, ва статин хосил қилувчи култура-продуцентларни дастлабки скрининггида янги тест-култура сифатида қараш мумкинлигидан далолат беради.
8. *in vivo* ҳайвонлар икки хил моделида экспериментал дислипидотеинемия қўлланганда «Атерис» препаратининг гиполлипидемик таъсири кўрсатилган. ЛПНП - «ёмон холестерин» ва триглицеридларнинг 2-қарра ва умумий холестериннинг 1,5 марта пасайиши ҳамда ЛПВП даражасининг сақланиб қолиши қайд этилган бўлиб, бу янги биологик фаол кўшимчанинг фаоллигини тижорат ловастатин билан таққослаганда юқори эканлиги билан изоҳланади.

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

**НАСМЕТОВА САОДАТ МАМАЖАНОВНА**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТАТИНОВ НА ОСНОВЕ  
МЕСТНЫХ ШТАММОВ *ASPERGILLUS TERREUS***

**03.00.12 – Биотехнология**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА  
(DSc) БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК**

**Ташкент – 2019**

**Тема диссертации доктора наук (DSc) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером B2017.1.DSc/B25**

Диссертация выполнена в Институте микробиологии.

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

**Научный консультант:** **Гулямова Ташхан Гафуровна**  
доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Давранов Кахрамон**  
доктор биологических наук, профессор

**Далимова Сурайё Нугмановна**  
доктор биологических наук, профессор

**Мухамедов Рустам Султанович**  
доктор биологических наук, профессор

**Ведущая организация:** **Институт ботаники**

Защита диссертации состоится «\_\_\_» марта 2019 года в 10:00 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: e-mail: microbio@academy.uz.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистровано под № \_\_\_). Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий 7б, Административное здание Института микробиологии,

Автореферат диссертации разослан: «\_\_\_» марта 2019 г.  
(реестр протокола рассылки № «\_\_\_» от «\_\_\_» марта 2019).

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

**Жураева Рохилия Назаровна**  
Ученый секретарь Научного совета по присуждению  
ученых степеней, к.б.н. старший научный сотрудник

**Ахмедова Захро Рахматовна**  
Зам. председателя Научного семинара при Научном  
совете по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

## ВВЕДЕНИЕ (Аннотация диссертации)

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** Гиперхолестеринемия и атеросклероз являются важнейшими факторами риска при коронарных заболеваниях и относятся к социально-значимым болезням во всем мире. Среди существующих на сегодняшний день липидснижающих препаратов наибольшей эффективностью обладают статины. Гипохолестеринемическое действие статинов основано на ингибировании первого ключевого фермента биосинтеза холестерина ГМГ-КоА-редуктазы, что приводит к снижению общего холестерина в плазме крови. Природные статины получают из различных видов нитчатых грибов, но основным промышленным продуцентом статинов являются микромицеты *Aspergillus terreus*. В этой связи, исследования, направленные на выявление потенциала местных штаммов аспергиллов и разработке новых технологий производства препаратов на их основе имеют важное практическое значение.

Во всем мире доказана клиническая эффективность статинов. В частности, кроме снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний и смертности, статины имеют плеiotропные эффекты, не зависящие от их основного механизма действия, обладают противотромбозными и противовоспалительными эффектами, антиоксидантными и антимикробными свойствами. В настоящее время применяются природные статины грибного происхождения (ловастатин и правастатин); симвастатин, полусинтетическое производное ловастатина; синтетические статины (аторвастатин, флувастатин, розувастатин), одобренные Администрацией по пищевым и лекарственным препаратам (FDA). В связи с этим, исследования, направленные на отбор перспективных местных штаммов *A. terreus* и получение на их основе статинов будут способствовать созданию новых гиполипидемических препаратов, отличающихся высокой терапевтической активностью и не обладающих побочным действием, имеют научное и практическое значение.

В Республике, в целях обеспечения населения качественными и высокоэффективными лекарственными средствами, уделяется особое внимание производству биологически активных добавок на основе местных штаммов микроорганизмов и их практическому применению. Однако, не было уделено достаточно внимания исследованиям, направленным на изучение штаммов микроорганизмов, продуцирующих статины. В Стратегии дальнейшего развития Республики Узбекистан намечены задачи «..по организации проведения научно-исследовательских работ для дальнейшего внедрения инновационных технологий в процессы производства лекарственных средств и выработке предложений по насыщению внутреннего рынка и локализации производства лекарственных средств»<sup>3</sup> Исходя из поставленных задач, исследования по отбору перспективных

---

<sup>3</sup> Указ Президента Республики Узбекистан № ПУ-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии дальнейших действий по развитию Республики Узбекистан»

штаммов *Aspergillus terreus*, изучение их статинпродуцирующих свойств и разработка на их основе гипохолестеринемических препаратов имеют важное практическое значение.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан № ПУ-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии дальнейших действий по развитию Республики Узбекистан», Постановлении Президента Республики Узбекистан № ПП-3489 от 23 января 2018 года «О мерах по дальнейшему упорядочению производства и ввоза лекарственных средств и изделий медицинского назначения», Постановлении Президента Республики Узбекистан № ПП-3532 от 14 февраля 2018 года «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли», 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 – VI. «Медицина и фармакология».

#### **Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации<sup>4</sup>.**

Исследования по изучению особенностей продукции статинов в различных штаммах-продуцентах, оптимизации условий ферментации, биохимических механизмов образования ловастатина, молекулярно-генетической идентификации генов синтеза статинов, проводятся во многих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе: Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of California (США); Department of Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo Noko University (Япония), Institute of Chemical Technology (Индия); Institute of Bioscience, Universiti Putra (Малайзия), Department of Chemical Engineering, University (Испания), Budapest University of Technology and Economics (Венгрия); Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии (Россия), и др. проводят многочисленные исследования.

В результате проведенных исследований в области изучения статинпродуцирующих штаммов микроорганизмов получен ряд важных научных результатов, в том числе: определены условия оптимизации ферментации и исследованы биохимические механизмы продукция статинов в штаммах *A. terreus* ATCC20542 (Department of Chemical Engineering, University, Испания), молекулярно-генетическими методами идентифицированы гены синтеза статинов рекомбинантных штаммов *A. terreus* ATCC74135 (Institute for Systems Biology, Вашингтон, США); установлена ферментативная кинетика и генная регуляция при биосинтезе статинов *A. terreus* (University of Alberta, Канада), определена гипополипидемическая, антимикробная, противовирусная и антифунгальная активность различных статинов, продуцируемых

---

<sup>4</sup>Обзор по теме диссертации разработан на основе зарубежных источников: <https://www.sciencedirect.com> ; <https://www.researchgate.net>; <https://www.unboundmedicine.com>; <https://www.ajol.info>, index; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>..

актиномицетами и грибами (Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Россия).

В мире, наряду с исследованиями по получению природных препаратов на основе грибных статинов, способных ингибировать синтез и регулировать метаболизм холестерина, проводится ряд исследований по приоритетным направлениям, в частности: создание рекомбинантных штаммов микроорганизмов трансформацией генов, кодирующих продукцию статинов; поиск принципиально новых классов гиполипидемических соединений; определение их воздействия на метаболизм липидов у трансгенных животных, лишенных генов отвечающих за липидный обмен; установлении плеотропных, т.е. дополнительных эффектов статинов, не зависящих от их основного механизма действия.

**Степень изученности проблемы.** Данное направление относится к одному из наиболее развитых фундаментальных исследований, получивших успешное развитие в прикладных и промышленных разработках. Показана возможность получения ряда статинов как конечных продуктов вторичного метаболизма микроорганизмов, равно как и продуктов процесса биотрансформации, которые привели к более глубокому пониманию различных аспектов механизма биосинтеза ловастатина и его промежуточных активных метаболитов, в частности, правастатина и мевастатина, проведены биотехнологические исследования по ферментации различных штаммов-продуцентов, предложены методы трансформации ловастатина в симвастатин, методы извлечения и очистки ловастатина (Manzoni et al., 2002; Xie et al., 2009; Shaligram et al., 2009; Savitha et al., 2016; Lee et al., 2017).

Для масштабированного синтеза ловастатина в основном используются улучшенные штаммы *A.terreus* и большинство литературы связано именно с этим видом. В частности, производство ловастатина осуществляется ферментацией промышленных штаммов *A.terreus* ATCC20542, *A.terreus* ATCC74135, *A. terreus* NRRL 265 (Bizukoje et al., 2009; Mohammad et al., 2012; Mukhtar et al., 2014). Тем не менее, интерес к ловастатину не ослабевает, так как существующие литературные данные свидетельствуют о крайней вариабельности исходной продуктивности диких штаммов и необходимости поиска новых продуцентов ловастатина, как основного природного статина.

Следует отметить, что в странах СНГ, в том числе и Республике Узбекистан, статины в настоящее время не производятся и ввозятся из-за границы (торговые названия «Мевакор», «Зокор», «Липостат» и др). По причине отсутствия в нашей Республике отечественного производства статинов и возрастающего спроса на антиатеросклеротические препараты получение статинов из активных статин-продуцирующих штаммов и их применение в практику имеет важное научно-практическое значение.

**Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ учреждений, где выполнена диссертация.** Диссертационная работа выполнена в лаборатории биохимии и биотехнологии физиологически



активных соединений Института микробиологии АН РУз, в рамках проектов ГНТП ФА-А11-Т129 «Продукция статинов в местных мицелиальных грибах» (2009 – 2011 гг.) и ФА-А6-Т210 «Оптимизация условий продукции ловастатина местными штаммами *Aspergillus terreus*» (2012-2014 гг.).

**Целью исследования** является выявление потенциала местных штаммов *Aspergillus terreus* как перспективных продуцентов статинов для разработки новых гипохолестеринемических препаратов.

**Задачи исследования:**

скрининг местных штаммов *A.terreus* по статинсинтезирующей активности и отбор наиболее перспективных штаммов;

изучение состава и количественного содержания статинов, синтезируемых отобранными штаммами;

подбор методов ферментации и оптимизации условий культивирования, способствующих увеличению продукции статинов отобранными штаммами;

подбор методов экстракции, выделения и очистки статинов из экстрактов активных штаммов-продуцентов;

разработка регламента изготовления нового гипохолестеринемического препарата на основе штаммов - активных продуцентов статинов;

изучение антимикробных и гипохолестеринемических свойств нового препарата;

разработка и утверждение нормативно-технической документации по серийному производству нового препарата гиполипидемического назначения.

**Объектом исследования** являются местные штаммы микромицетов *A. terreus*, поддерживаемые в коллекции промышленно важных микроорганизмов Института микробиологии.

**Предметом исследования** являются статины аспергилл, создание на их основе гипохолестеринемического препарата и изучение его антимикробных и гиполипидемических свойств.

**Методы исследования** микробиологические, биохимические, методы молекулярной биологии, методы доклинического исследования новых фармакологических веществ.

**Научная новизна исследования:**

впервые доказаны статинообразующие свойства местных коллекционных штаммов *A.terreus*;

установлен состав метаболитов статиновой природы, продуцируемых местными штаммами, включающий несколько биоактивных поликетидов: правастатин, симвастатин, монаколин L и ловастатин в трех формах (лактон, гидроксикислота, метиловый эфир);

впервые доказана способность штаммов *A. terreus* синтезировать симвастатин как конечный продукт ферментации, альтернативной полусинтетическому синтезу из экзогенного ловастатина;

подобраны оптимальные соотношения основных компонентов питательных сред (источников углеродного и азотного питания), параметры глубинного культивирования *A. terreus 20* (количество, тип и возраст использованного инокулюма, продолжительность культивирования, pH среды), вследствие чего уровень ловастатиона повышен в 2-3 раза, а симвастатиона в 12 раз;

выявлено преимущество твердофазной ферментации на зерновых субстратах перед глубинным культивированием и установлены оптимальные параметры культивирования (метод инокуляции, температура, pH среды, увлажненность и количество субстрата), позволившие сократить время максимального накопления продуктов до 11 суток и увеличить специфическую продуктивность в 10-15 раз.

установлена антибактериальная и антифунгальная активность очищенного ловастатиона, равная референтному ловастатину, по отношению к бактериям *B. subtilis* и грибам *C. albicans*, *V. dahliae* и *A. alternata*.

*in vivo* доказано гипохолестеринемическое действие биологически активной добавки «Атерис» на моделях животных с экспериментальной дислипидемией; установлено эффективное снижение уровня липопротеинов низкой плотности и отсутствие токсического действия.

**Практические результаты исследования** заключаются в следующем:

обосновано использование отобранных местных штаммов микромицетов *A. terreus-4* и *A. terreus-20*, продуцирующих различные статины, для создания новых, импортозамещающих препаратов гипохолестеринемического назначения;

разработан лабораторно-технологический регламент получения очищенных статинов - ловастатиона и симвастатиона, полученных методом твердофазной ферментации штамма *A. terreus-20*;

установлено, что коллекционный штамм *V. dahliae RKMUZ-224* может служить новой тест-культурой для проведения первичного микробиологического скрининга ловастатин-продуцирующих культур;

разработан состав биологически активной добавки «Атерис» на основе очищенного ловастатиона штамма *A. terreus-20* с добавлением оливкового масла и доказана его клиническая эффективность на моделях животных и антимикробные свойства.

**Достоверность результатов исследования** подтверждается тем, что экспериментальные данные получены с применением современных микробиологических, биохимических и физических методов, статистическую обработку результатов производили при помощи критерия Стьюдента и дисперсионного анализа Фишера (ANOVA), а также опубликованностью результатов диссертации в ведущих зарубежных журналах и практическим внедрением результатов.

**Теоретическая и практическая значимость результатов исследования** заключается в том, что впервые выявлены природные штаммы *A. terreus* с исходно высокой статин-продуцирующей активностью,

синтезирующие одновременно три биоактивных поликетидов статиновой природы, имеющих коммерческое значение – ловастатин, правастатин и симвастатин. Способность грибов *A.terreus* синтезировать симвастатин, впервые установленная нами на примере местных штаммов *A. terreus*, выдвигает фундаментальную задачу изучения регуляции синтеза симвастатина в аспергиллах для получения высокоактивных продуцентов как альтернативной основы полусинтетическому синтезу этого статина.

Практическая значимость работы заключается в том, что каждый из отобранных местных штаммов может быть объектом для разработки разных целевых продуктов статиновой природы, что в перспективе может существенно увеличить возможности местного фармацевтического производства по расширению перечня гиполипидемических препаратов. На основе местного штамма *A.terreus-20* разработана технология и подобран научно-обоснованный состав биологически активной добавки «Атерис», нормализующей липидный обмен и снижающей риск избыточного образования атерогенных липопротеидов («плохого холестерина»).

**Внедрение результатов исследования.** В результате научных исследований по биотехнологии получения статинов на основе местных штаммов *Aspergillus terreus*:

получен патент на изобретение со стороны агентства Интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (№ IAP 05086, 2013) на гриб *Aspergillus terreus-20* – продуцент ловастатина. Изобретение касается микробиологического синтеза ловастатина - ингибитора 3-гидрокси 3-метилглутарил-кофермент А (ГМГ-КоА) редуктазы и представляет собой штамм продуцент ловастатина.

проект стандарта организации (Ts15011021-011:2018) «Биологически активная добавка к пище «Атерис», Технические условия» зарегистрированы в Агентстве «Узстандарт». В результате получена биологически активная добавка к пище «Атерис», представляющая собой комплекс очищенного ловастатина из экстракта гриба *A.terreus-20* и натурального оливкового масла.

результаты научных исследований по идентификации статинов в местных штаммах *A.terreus* и статинсинтезирующей активности наиболее активных штаммов при глубинной и твердофазной ферментации цитируются в публикациях 4-х ведущих научных зарубежных журналах с высоким импакт фактором (IF): *Journal of Microbial and Biochemical Technology* Vol 7(6), 2016, 334-337, IF-4.09, Research Gate; *Asian Pacific journal of cancer prevention* Vol 17., 2016, 3797-3803, IF 2.39, Research Gate; *Current Microbiology* 75(1), 2017, 84-91, IF-1.92, Research Gate; *American Journal of Pharmacy and Health Research* 3(7), 2015, 116-126, IF 0.865, Global. В результате, эти данные способствовали выявлению статин-продуцирующих свойств в местных штаммах *A.terreus*.

**Апробация результатов исследования.** Материалы диссертации были представлены и обсуждены на 5-ти республиканских и 7-ми международных конгрессах и конференциях.

**Опубликованность результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 26 научных работ, из них – 1 патент, 13 научных статей, 4 в зарубежных и 9 в республиканских журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы, приложений. Объем диссертации составляет 165 страниц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

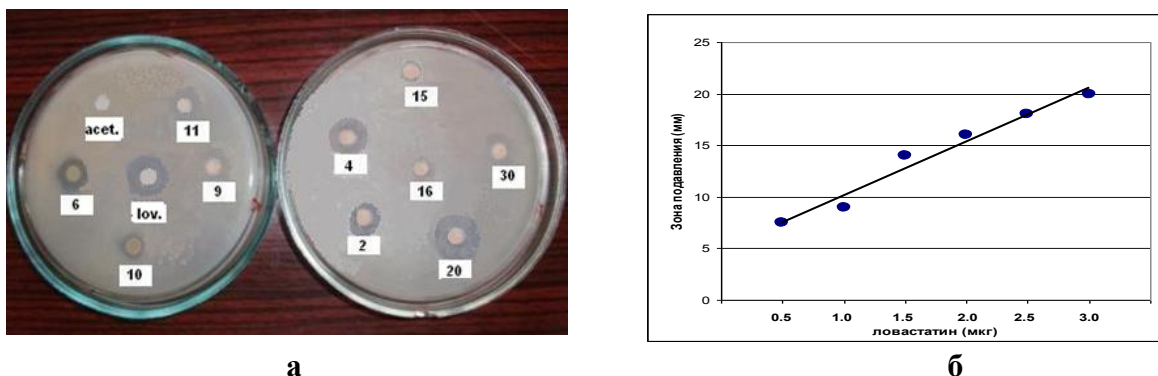
**Во введении** обосновывается актуальность и востребованность проведенных исследований, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрывается научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Статины: свойства и методы получения»** раскрываются вопросы биологического действия статинов на организм, биохимических путей синтеза ловастатина, методах ферментации, производства ловастатина и симвастатина, способах выделения и очистки статинов.

Во второй главе **«Скрининг штаммов *A. terreus* по ловастатин-продуцирующей активности»** описаны методы скрининга местных штаммов *A. terreus* по статинсинтезирующей активности; методы экстракции статинов; анализ качественного и количественного состава статинов в экстрактах методами ТСХ, ВЭЖХ, ТС-хроматографии и масс-спектрального анализа; методы глубинного и твердофазного культивирования перспективных штаммов.

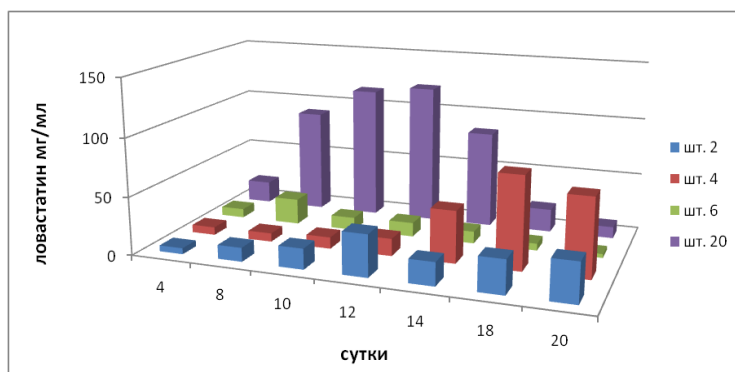
В третьей главе диссертации **«Скрининг штаммов *A. terreus* и изучение их статин-продуцирующей активности в условиях глубинного культивирования»** приведены собственные результаты скрининга местных штаммов по статинообразующей способности и исследования по подбору оптимальных условий культивирования для повышения продукции статинов перспективными штаммами. При первичном скрининге по статинообразующей способности использовался микробиологический метод диффузии в агар, основанный на фунгицидной активности статинов, присутствующих в экстрактах 30-ти исследуемых штаммов, по отношению к тест-культуре *Neurospora crassa*. В результате скрининга отобрано 10 изолятов с зоной подавления роста тест-культуры от 5 до 19 мм, что соответствует по калибровочной кривой концентрации ловастатина от 1,0

мкг/мл до 2,8 мкг/мл экстракта. Максимальный показатель зоны лизиса – 12, 13, 17 и 19 мм, наблюдается у 4-х штаммов - *A.terreus*- 6, *A.terreus*- 2, *A.terreus*- 4 и *A.terreus*- 20 с содержанием ловастатина 1,3 мкг/мл, 1,5 мкг/мл, 2,4 мкг/мл и 2,8 мкг/мл экстракта, соответственно (рис.1).



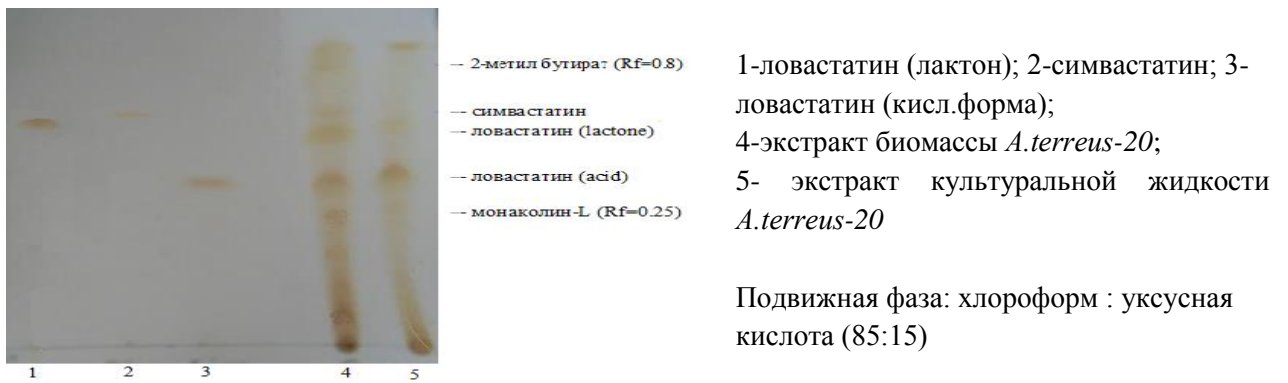
**Рис.1. а) зоны ингибирования роста *Neurospora crassa* изолятами *A. terreus*; б) кривая подавления *Neurospora crassa* референтным ловастатином**

Первоначальное культивирование 4-х активных штаммов на глюкозосодержащей среде показало относительно высокое количественное содержание ловастатина в штаммах *A. terreus*-4 и *A. terreus*-20, составляющее на 18-е и 12-е сутки роста 80 мг/л и 121 мг/л среды, соответственно (рис.2).



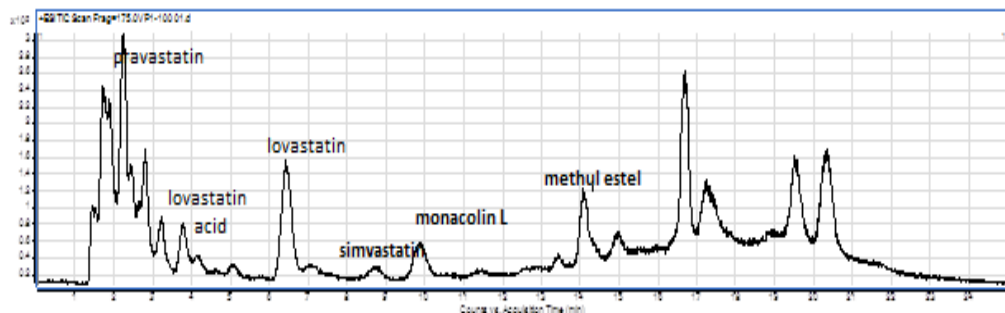
**Рис.2. Динамика продукции ловастатина отобранными штаммами при культивировании на картофельно-глюкозной среде.**

Исследование качественного состава метаболитов экстракта биомассы и культуральной жидкости наиболее активного штамма *A.terreus*- 20 методом ТСХ показало присутствие веществ, по величине  $R_f$ , соответствующих монаколину L, ловастатину в кислотной и лактонной форме, метиловому эфиру ловастатина и симвастатину. Установлено, что в культуральную жидкость секретируется в основном ловастатин в кислотной форме, но его количество составляет не более 17% от суммы статинов в культуральной суспензии (рис.3).



**Рис.3. Профиль разделения ТСХ экстрактов биомассы и культуральной жидкости штамма *A.terreus-20***

Идентификацию статинов ТИС-хроматографией и масс-спектральным анализом проводили совместно с сотрудниками ИБОХ АНРУз. В экстракте биомассы мицелия *A.terreus 20* обнаружены соединения с молекулярными массами правастатина (425,1159 m/z), ловастатина (405,2208 m/z), гидроксикислоты ловастатина (422,2468 m/z), симвастатина (419,2362 m/z), монаколина L (305,1173 m/z) и метилового эфира ловастатина (436.3890 m/z) (рис.4., табл.1).



**Рис. 4. ТИС- (Total Ion Chromatogram) экстракта биомассы штамма *A.terreus-20***

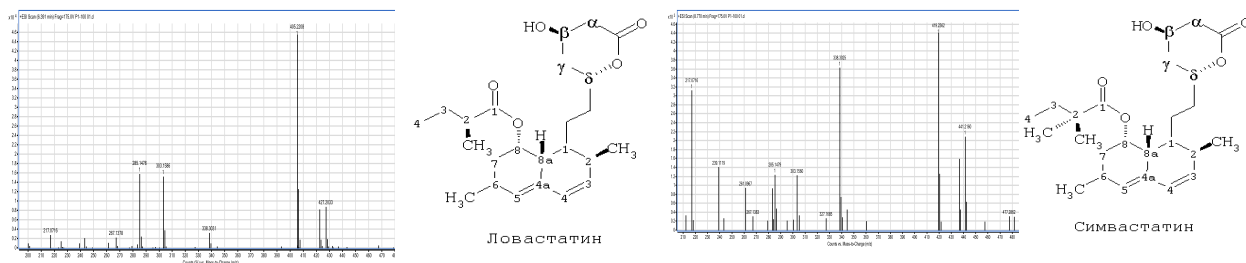
**Таблица 1.**

**Масс-спектральный анализ экстракта *A.terreus-20***

Наименование вещества	Молекулярный ион (M+)	Время выхода (мин)
Pravastatin	425,1159 m/z	2,25
Lovastatin	405,2208 m/z	6,4
Lovastatin acid (LA)	422,2469 m/z	3,8
Simvastatin	419,2362 m/z	8,7
Monacolin L	305,1173 m/z	9,8
Methyl ester (LM)	436.3890 m/z	14,0

Следует особо отметить, что нами впервые выявлена способность местного штамма *A.terreus 20* аккумулировать симвастатин как конечный продукт ферментации. В настоящее время проводится целый ряд исследований в попытке получения рекомбинантных штаммов, способных синтезировать симвастатин. Из литературных источников известно, что симвастатин производится дорогостоящим полусинтетическим путем из экзогенного ловастатина с помощью культур с соответствующей трансформирующей активностью, поскольку в грибах рода *Aspergillus* не

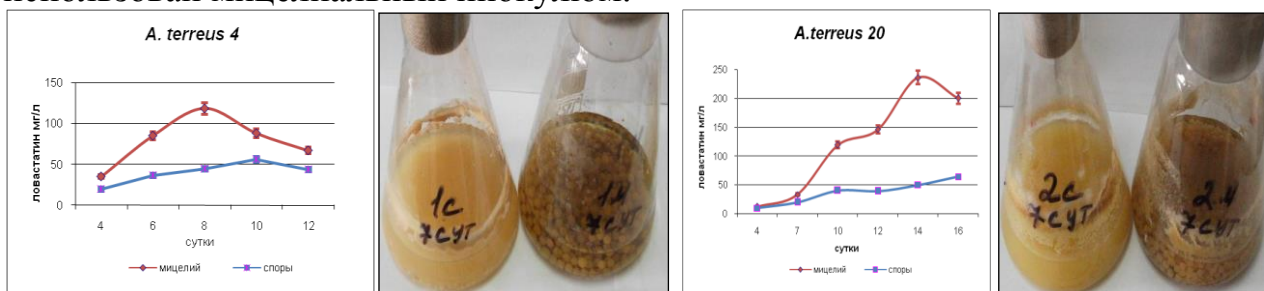
образуется метилмалонил-КоА, донор второго метильного радикала в боковой цепи симвастатина. Обнаруженный нами факт прямого синтеза симвастатина при ферментации штаммов, доказанный масс-спектральным анализом, безусловно свидетельствует о существовании в местных штаммах *A.terreus* недостающей стадии в цепи образования симвастатина (рис.5).



**Рис.5. Масс-спектральный анализ ловастатина и симвастатина из экстракта *A.terreus-20***

Изучены основные факторы глубинной ферментации, влияющие на повышение продуктивности статинов в *A.terreus-4* и *A.terreus-20*, включающие зависимость продукции ловастатина от морфолого-культуральных свойств культуры, динамики продукции ловастатина и симвастатина при оптимизации питательных сред по источникам углеродного и азотного питания.

Установлено, что способ инокуляции питательной среды существенно влияет на выход продукта. При сравнительном исследовании продукции ловастатина *A.terreus-4* и *A.terreus-20* после инокуляции питательной среды спорами и мицелием показано, что при использовании дисперсного мицелия культура формирует более крупные макроколонии диаметром до 8 мм. При этом выход ловастатина в *A.terreus-4* составляет в 118,4 мг/л, а в *A.terreus-20* - 240,2 мг/л, соответственно. При инокуляции спорами уровень ловастатина гораздо ниже – 60 мг/л, морфология культур мелкодисперсная, пигментация более светлая (рис.6). На этом основании в дальнейших исследованиях был использован мицелиальный инокулюм.



**Рис.6. Динамика накопления ловастатина в культуре *A.terreus-4* и *A. terreus-20*, инокулированной спорами и мицелием (среда №6 по Casas Lopez и соавт.)**

При изучении влияния состава питательных сред на продуктивность штаммов апробированы среды, наиболее часто применяемые в экспериментальных исследованиях и часто используемые для промышленного производства статинов (табл.2).

**Таблица 2**

**Сравнительная продуктивность по ловастатину и симвастатину в местных и производственных штаммах на различных питательных средах**

№ сред	Источник углерода	Источник азота	Штаммы	Ловастатин мг/л	Культуры вирование, (сутки)	Симвастатин	Культуры вирование, (сутки)	Источники
1.	глюкоза (10 г/л)	КС (5г/л) ТП – 40 ОМ – (10г/л)	<i>A.terreus-4</i>	66	16	-	-	Monaghan et al.,1980.
			<i>A.terreus-20</i>	17	10	-		
			<i>A.terreus ATCC20542</i>	120	12	-		
2.	глюкоза (20 г/л), картофель 300 г/л	ДЭ (2г/л) СЭ (5 г/л)	<i>A.terreus-4</i>	80	24	0,002	20	Bizukoje M., et al. 2009.
			<i>A.terreus-20</i>	121	16	0,001	22	
			<i>A.terreus ATCC20542</i>	140	8	-	-	
3.	глюкоза (30 г/л) глицерин (70 г/л)	РЕ (8г/л) ОСМ (30г/л)	<i>A.terreus-4</i>	61	8	0,005	14	Manzoni M., et al. 1998.
			<i>A.terreus-20</i>	51	12	0,002	16	
			<i>A.terreusA1</i>	244	14	-	-	
4.	глюкоза (45 г/л) глицерин (2,5г/л)	ДЭ (2,5г/л) ПМ (24 г/л)	<i>A.terreus-4</i>	72	12	-	-	Hajjaj H., et al, 2001.
			<i>A.terreus-20A.terreus</i>	30	14	0,001	20	
			<i>ATCC74135</i>	240	12	-	-	
5.	глюкоза (45 г/л)	На-глутамат (12,5г/л)	<i>A.terreus-4</i>	137.6	14	0,003	20	Hajjaj H., et al, 2001.
			<i>A.terreus-20</i>	72.3	14	-	-	
			<i>A.terreus ATCC74135</i>	120	20	-	-	
6.	лактоза (20 г/л)	ДЭ (8г/л) Биотин (0,04г/л)	<i>A.terreus-4</i>	118,4	7	0,015	4	Casas L., et al, 2004.
			<i>A.terreus20</i>	<b>240,2</b>	14	0,030	4	
			<i>A.terreus ATCC20542</i>	230	12	-	-	
7.	лактоза (70г/л)	ОСМ (0.5 г/л) ДЭ(8 г/л) ПЭГ(0.5 г/л)	<i>A.terreus-4</i>	214	20	0,110	4	Lai L., et al, 2007.
			<i>A.terreus-20A.terreus</i>	<b>276.7</b>	22	0,092	22	
			<i>ATCC20542</i>	873	10	-	-	
8.	лактоза (114 г/л)	СМ (1г/л) биотин (0,04г/л)	<i>A.terreus-4</i>	64	10	0,490	10	Casas L., et al, 2005.
			<i>A.terreus-20</i>	40	12	<b>1,3</b>	22	
			<i>A.terreus ATCC20542</i>	40-120	14	-	-	
9.	лактоза (30 г/л)	ДЭ (6г/л) NaNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (1г/л)	<i>A.terreus-20</i>	<b>325,3</b>	12	<b>9,45</b>	10	Szakacs G., et al. 1998.
			<i>A.terreus TUB F-514</i>	256	7	-	-	
10.	лактоза (20 г/л)	ДЭ (4г/л)	<i>A.terreus-4</i>	27,5	22	<b>0,23</b>	24	Bizukoje M. et al., 2007.
			<i>A.terreus-20</i>	40	24	<b>0,09</b>	22	
			<i>A.terreus ATCC20542</i>	60	7,5	-	-	

Сокращения: КС-кукурузный сироп,ТП-томатная паста, ОМ-овсяная мука, ОСМ-обезжиренная соевая мука, КМ- картофельная мука, ПМ-петонизированное молоко, На-Глу – На-глутамат, ДЭ-дрожжевой экстракт, СЭ-солодовый экстракт, СМ- соевая мука, ПЭГ- полиэтиленгликоль.



Установлено, что продукция ловастатина в местных штаммах на глюкозосодержащих и лактозосодержащих средах сравнима или даже выше продуктивности известных экспериментальных штаммов *A. terreus* ATCC20542 и *A. terreus* ATCC74135, также широко используемых в промышленном производстве ловастатина.

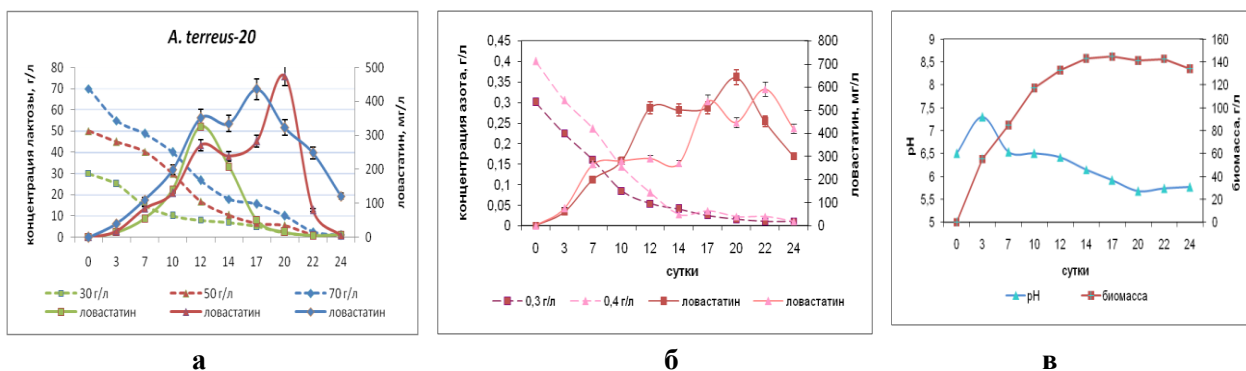
При этом, наиболее высокое значение ловастатина отмечено в штаммах *A. terreus-4* – 240,2 мг/л, а в *A. terreus-20* – 276,7 мг/л и 325,3 мг/л на средах №6, №7 и №9, содержащих лактозу, соевую муку или дрожжевой экстракт, на 14-е, 22-е и 12-е сутки культивирования. Относительно высокая продуктивность по симвастатину - 9,45 мг/л наблюдается в штамме *A. terreus-20* на среде №9, на 10-е сутки культивирования.

Таким образом, в результате проведенного скрининга сред в качестве базовых отобраны лактозосодержащие среды, обеспечивающие наиболее высокий выход статинов. При этом, максимальная продуктивность по ловастатину и симвастатину происходит в *A. terreus-20* на среде №9.

Одним из важнейших факторов, влияющих на образование статинов, является соотношение углерода к азоту (C/N) в составе питательных сред. Для изучения эффекта этих субстратов на продукцию ловастатина в наиболее активном штамме *A. terreus-20* использовали среду №9 с лактозой, как единственным источником углерода, с дрожжевым экстрактом и минеральным азотом, как органическим и неорганическим источниками азота.

При изучении различных концентраций лактозы в составе среды - 30 г/л, 50 г/л, 70 г/л и исходной концентрации дрожжевого экстракта - 6 г/л установлено, что увеличение концентрации лактозы не ведет к повышению синтеза ловастатина. Так, максимальный выход продукта наблюдается при концентрации лактозы 50 г/л и на 20-е сутки культивирования составляет 470,3 мг/л. Из представленных данных следует, что синтез ловастатина начинается при почти полном истощении источника углерода в среде (рис.7а).

Изучение зависимости синтеза ловастатина от концентрации источников азота (3,0г/л, 4,0г/л и 6,0 г/л) показало увеличение уровня ловастатина при использовании более низких концентраций органического азота в среде. Так, всплеск выхода ловастатина наблюдается при содержании в составе среды 3,0 г/л дрожжевого экстракта (0,3 г/л азота) и 50 г/л лактозы. При этом продуктивность штамма по ловастатину возрастает почти в 2 раза и на 20-е сутки составляет 640,3 мг/л (рис.7б). При исследовании зависимости синтеза ловастатина от изменений рН среды и накопления биомассы установлено, что на этой среде уровень ловастатина увеличивается при снижении первоначального значения рН среды от 6,5 до 5,7 и при переходе культуры в стационарную фазу роста (рис.7в).



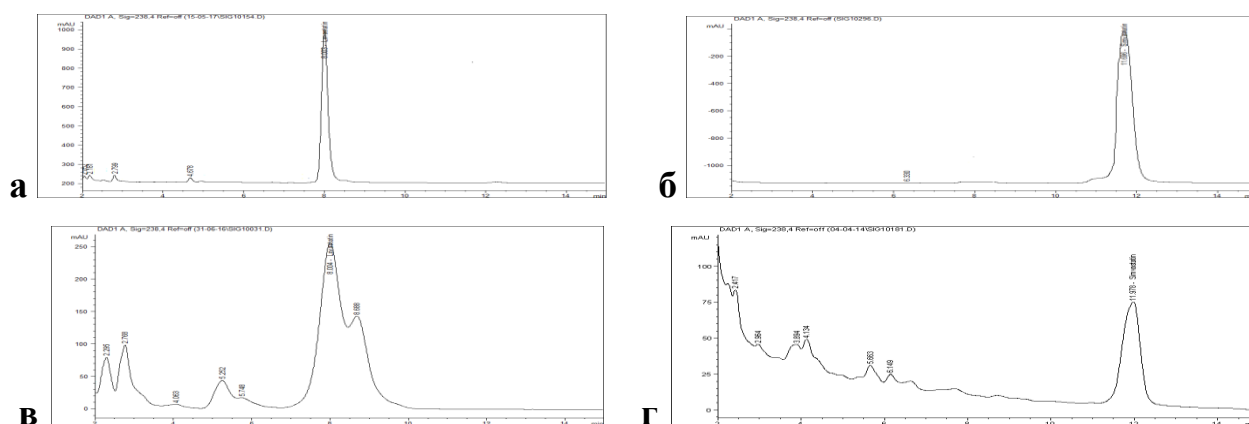
**Рис.7.** Динамика накопления ловастатина штаммом *A.terreus-20* при различных начальных концентрациях источников углерода и азота в среде; а) лактозы; б) дрожжевого экстракта; в) динамика изменения pH среды и накопления биомассы.

При исследовании продукции симвастатина штаммом *A. terreus-20* на той же питательной среде №9, установлено, что во всех представленных в эксперименте соотношениях углерода к азоту, накопление симвастатина значительно возрастает - от 9,6 мг/л до 120 мг/л среды. При этом наиболее высокий выход симвастатина происходит на среде с содержанием 70 г/л лактозы и 3,0 г/л дрожжевого экстракта (табл.3).

**Таблица 3**  
**Продукция симвастатина в *A.terreus- 20* при оптимизации условий культивирования по источникам углерода и азота**

Состав среды (г/л)	Среды с различным соотношением C/N			
	№1	№2	№3	№4
Лактоза	30	50	70	70
Дрожжевой экстракт	6,0	6,0	6,0	3,0
NaNO <sub>3</sub>	1,0	1,0	1,0	2,0
Титр симвастатина, мг/л	9,45±0,35	9,66±0,25	84,5±5,5	120±5,0
Среда содержала: (г/л) KН <sub>2</sub> РO <sub>4</sub> - 2,0; MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O – 0,5; NaCl – 0,5; MnSO <sub>4</sub> -1,6; ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O –3,4; CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O –2,0; FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O-следы; pH 6.5				

На рисунке 8 представлен профиль ВЭЖХ экстракта *A.terreus-20*, с более высоким уровнем накопления ловастатина и симвастатина, свидетельствующий о продукции обоих статинов.



**Рис.8. Профиль ВЭЖХ: а- ловастатин (стандарт); б-симвастатин (стандарт); в,г-экстракты штамма *A.terreus-20***

Таким образом, из полученных экспериментальных данных следует, что оптимизация условий глубинного культивирования позволяет увеличить продуктивность обоих штаммов по уровню накопления ловастатина в 2-3 раза, а симвастатина в 12 раз, по сравнению с исходной продуктивностью на неоптимизированных средах.

В четвертой главе диссертации «**Продукция статинов в условиях твердофазной ферментации**» изучена возможность твердофазного культивирования *A.terreus-4* и *A.terreus-20* для получения статинов. Твердофазное культивирование штаммов проводили в чашках Петри с содержанием 5 г твердого субстрата. При скрининге подходящего твердого субстрата в число испытуемых субстратов были включены измельченные зерна пшеницы, рис, овес, кукуруза, пшеница с арахисом и комбикорм, составленный из дробленых отходов зерновых.

Для экстракции статинов из ферментационного субстрата использовали различные растворители: ацетонитрил, этилацетат и метанол. Как видно из данных, приведенных на рисунках 9-11, выбор растворителя критически влияет на степень извлечения ловастатина. Так, на рисунке 9 показано, что максимальный выход ловастатина происходит при экстракции ацетонитрилом ферментационного субстрата *A.terreus-20* на овсе и составляет 3,1 мг/г сухого субстрата. При экстракции этилацетатом извлечение ловастатина в *A.terreus-20* на овсе максимально составляет 2,5 мг/г с.с., а при экстракции метанолом 2,3 мг/г с.с.

В *A.terreus-4*, в зависимости от используемого растворителя, выход продукта максимально происходит при экстракции ацетонитрилом на овсе – 2,15 мг/г с.с., этилацетатом на пшенице – 1,2 мг/г с.с. и метанолом на овсе – 2,1 мг/г. На других субстратах (рис, кукуруза, комбикорм) уровень ловастатина в двух штаммах ниже и, в зависимости от растворителя, составляет от 0,1 мг/г с.с. до 1,9 мг/г с.с.

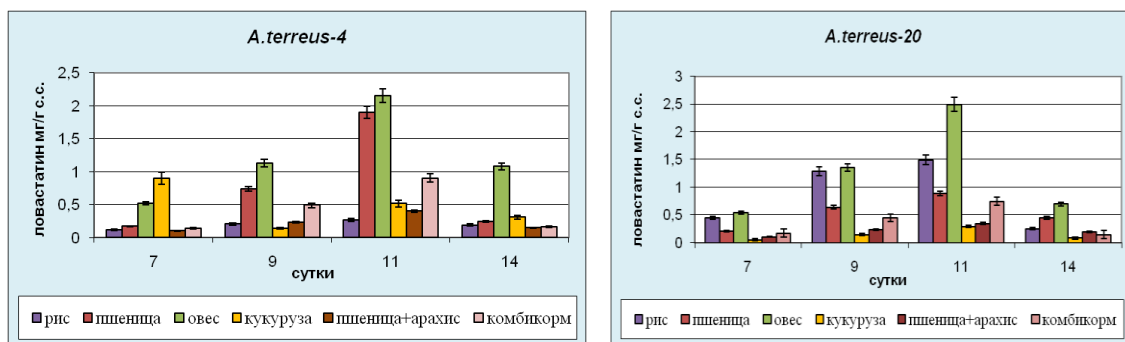


Рис 9. Динамика продукции ловастатина штаммами *A.terreus* 4 и *A.terreus* 20 на различных субстратах при экстракции ацетонитрилом.

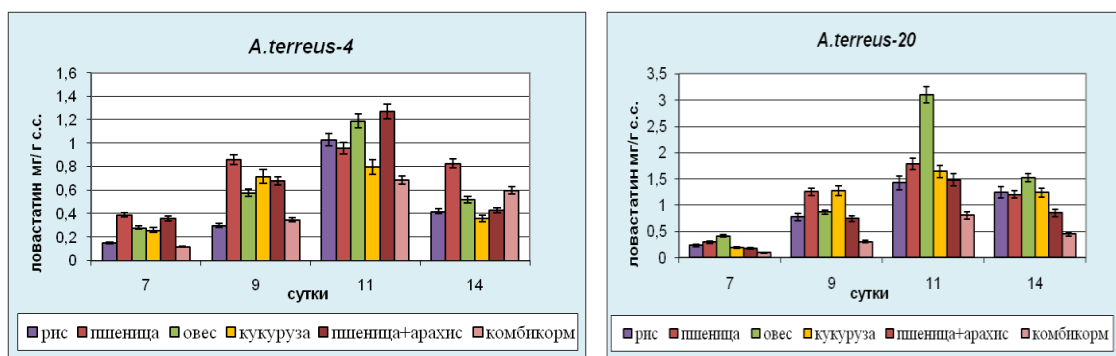


Рис 10. Динамика продукции ловастатина штаммами *A.terreus* 4 и *A.terreus* 20 на различных субстратах при экстракции этилацетатом.

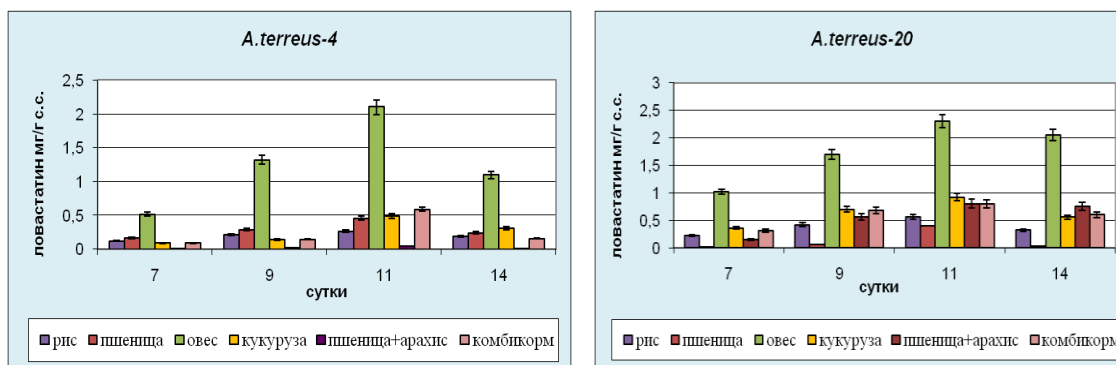


Рис 11. Динамика продукции ловастатина штаммами *A.terreus* 4 и *A.terreus* 20 на различных субстратах при экстракции метанолом.

В целом, сравнительная оценка содержания ловастатина в обоих штаммах показывает, что наибольшее накопление происходит при ТФФ на овсе, а степень извлечения можно выразить по убывающей как ацетонитрил-этилацетат-метанол. При этом, на всех использованных субстратах максимальное накопление ловастатина наблюдается на 11-е сутки ферментации, в отличие от ГФ, длящейся до 24-х суток.

При проведении исследований продукции симвастатина *A.terreus*-4 и *A.terreus*-20 на тех же твердых субстратах установлено, что наиболее высокий выход симвастатина наблюдается при экстракции этилацетатом

ферментационного риса, овса, комбикорма и составляет на 11-е и 14-е сутки роста - 1,0 мг/г с.с. , 0,5 мг/г с.с. и 0,2 мг/г с.с. (табл.4).

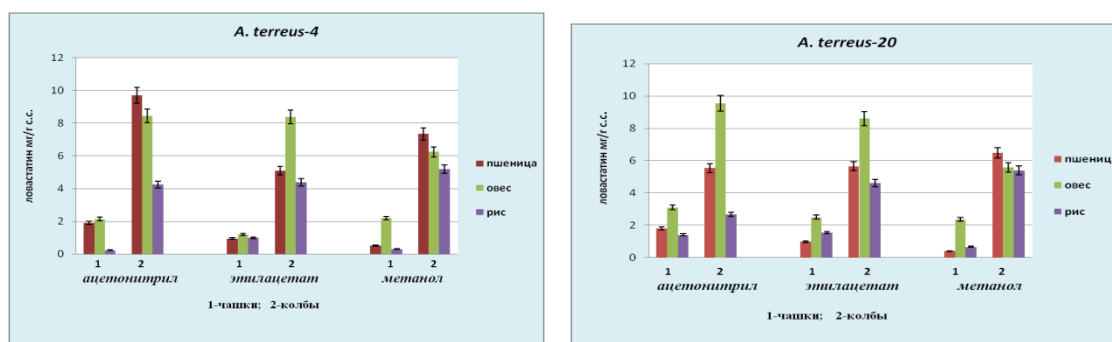
Таблица 4

**Продукция симвастатина в *A.terreus* и *A.terreus-20* при ТФФ**

Штамм	Субстрат	Сутки	Симвастатин, мг/г сухого субстрата
<i>A.terreus-4</i>	рис	14	1,0
	пшеница	11	$0,93 \times 10^{-2}$
	овес	9	$0,31 \times 10^{-2}$
	кукуруза	9	$0,12 \times 10^{-3}$
	комбикорм	11	$0,25 \times 10^{-1}$
<i>A.terreus-20</i>	рис	11	0,17
	пшеница	9	$0,81 \times 10^{-1}$
	овес	11	0,5
	кукуруза	9	$0,1 \times 10^{-2}$
	комбикорм	14	0,2

Известны многие факторы, определяющие эффективность твердофазного культивирования: метод посева, объем инокулята, температура ферментации, увлажнение и высота твердого субстрата. Установлено, что максимальное накопление продукта наблюдается при посеве спорным инокулюмом с концентрацией  $10^8$  мл<sup>-1</sup>, 65%-ой увлажненности субстрата, при начальном рН 6 и температурном оптимуме 28°C.

Значимые результаты были получены при изменении условий твердофазного культивирования. Так, при ТФФ *A.terreus 4* и *A.terreus 20* в колбах, при десятикратном увеличении количества твердого субстрата, содержание ловастатина значительно возрастает на всех субстратах. При этом, максимальное содержание ловастатина составляет 9,7 мг/г с.с. и 9,6 мг/г с.с. на пшенице и овсе при экстракции ацетонитрилом, что соответствует трех- и пятикратному увеличению количества продукта, по сравнению с культивированием в чашках (рис.12).



**Рис.12. Сравнительная продуктивность ловастатина *A. terreus 4* и *A. terreus 20* при ТФФ в чашках Петри и в колбах.**

Таким образом, результаты экспериментальных данных показывают, что твердофазная ферментация штаммов *A.terreus 4* и *A.terreus 20* на относительно дешевых зерновых субстратах способствует продукции высоких количеств ловастатина и симвастатина, гораздо превышающих продукцию при глубинном культивировании.

Хотя количественное сравнение полученных данных не представляется вполне возможным, тем не менее, если сравнивать продукцию в 1,0 литре жидкой ферментационной среды и 1,0 кг ферментированного твердого субстрата в абсолютных величинах, уровень продукции при ТФФ будет выше более, чем в 10 раз. Кроме того, ТФФ позволяет также почти вдвое сократить время культивирования при меньших затратах на питательные среды и энергозатраты, связанные с необходимостью аэрации.

Пятая глава диссертации «**Получение биологически активной добавки и изучение ее антимикробных и гипохолистеринемических свойств**» посвящена подбору методов экстракции, разделения и очистки статинов, изучению антимикробных и гиполипидемических свойств новой биологически активной добавки, полученной на основе очищенного ловастатина *Aspergillus terreus-20*.

Проведенные исследования по подбору условий извлечения статинов различными гидрофобными и гидрофильными органическими растворителями - ацетонитрилом, этилацетатом, метанолом, бутилацетатом и толуолом показали, что каждый из использованных растворителей пригоден для извлечения статинов.

Из 4-х апробированных методов предпочтение было отдано одному наиболее эффективному и экономически выгодному способу очистки статинов из ферментационного субстрата, полученного методом твердофазной ферментацией *Aspergillus terreus-20* на овсе. На основании этого метода разработан лабораторно-технологический регламент получения очищенных статинов – ловастатина и симвастатина и технологическая схема на их производство (рис.13).

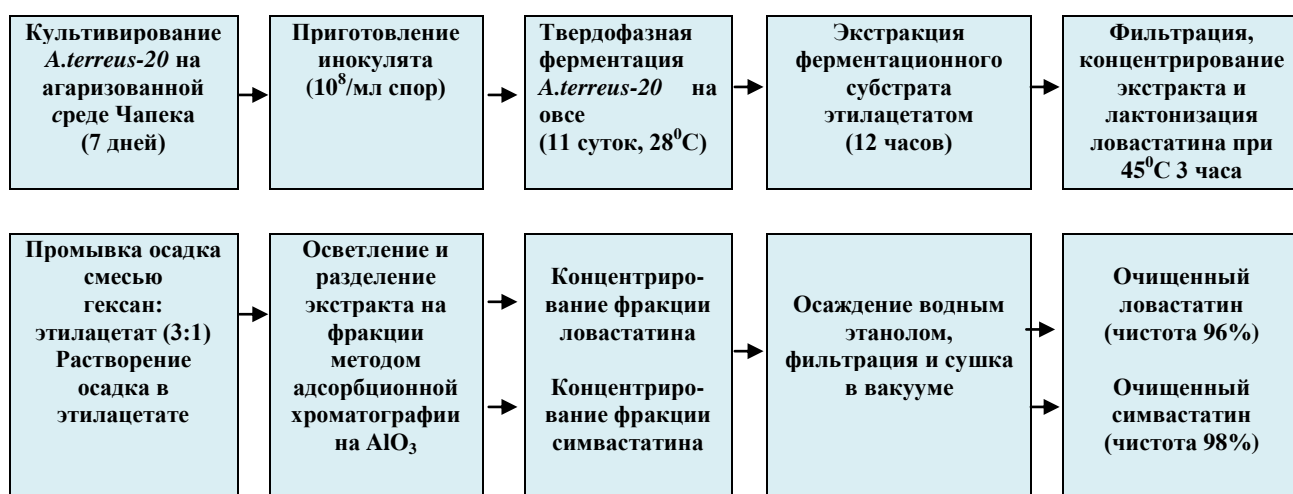


Рисунок 13. Технологическая схема получения очищенных статинов из ферментационного субстрата *A. terreus-20*.

В результате экстрагирования этилацетатом 1,0 кг ферментационного субстрата, содержащего 8,6 г ловастатина и 0,5 г симвастатина, и последовательных этапов очистки были отобраны 2 фракции, содержащие симвастатин и ловастатин. После дальнейших этапов очистки фракций получено - 5,2 г ловастатина (выход 60 весовых %) и 0,25 г симвастатина (выход 50 весовых %), с хроматографической чистотой более 96%. и 98%.

Из литературных источников известно, что статины обладают антимикробными свойствами. В этой связи, проводились исследования по определению антибактериальной и антигрибковой активности очищенного ловастатина.

Исследования антибактериальной активности проводили по отношению к коллекционным тест-культурам: *Pseudomonas aeruginosa* RKMUz-225, *Escherichia coli* RKMUz-221, *Bacillus subtilis* RKMUz-5, *Staphylococcus aureus* RKMUz-91. Установлено, что исследуемый и референтный ловастатин подавляют рост только *B. subtilis*. При этом, уровень ингибирования роста культур опытным образцом ловастатина в количестве 50 мкг, при концентрации 1 мг/мл, составляет 20,3 мм, что сравнимо с референтным ловастатином – 20,0 мм.

При определении антигрибковой активности очищенного ловастатина по отношению к *Candida albicans* RKMUz-241 и фитопатогенным грибам *Alternaria alternata* RKMUz-415, *Verticillium dahliae* RKMUz-224, *Fusarium oxysporum* RKMUz-172, *Fusarium solani* RKMUz-169, *Rhizoctonia solani*, показано, что опытный ловастатин имеет практически сходную активность с референтным ловастатином и в трех концентрациях подавляет рост трех из пяти исследованных грибов – *C. albicans*, *V. dahliae* и *A. alternata*. При этом, его активность ниже референтного ловастатина против *V. dahliae* (16,6 мм и 22,3 мм,) и *C. albicans* (8,6 мм и 10,0 мм), и выше референтного ловастатина против *A. alternata* (20,2 мм и 12,6 мм). Более того, в отношении *A. alternata* активность опытного ловастатина достаточно высокая и при более низкой концентрации (табл.5, рис.14).

**Таблица 5**

**Антибактериальная и антифунгальная активность очищенного ловастатина**

Концентрация ловастатина, мг/мл	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Alternaria alternata</i>
	Диаметр зоны подавления роста, мм			
контроль – 1,0	20,0±0,3	10,0±0,6	22,3±0,5	12,6±0,8
опыт: 1,0	20,3±0,6	8,6±0,3	16,6±0,7	20,2±0,9
0,5	16,6±0,5	5,3±0,5	13,0±0,4	20,0±0,5
0,25	15,0±0,4	3,0±0,3	10,3±0,5	11,6±0,3



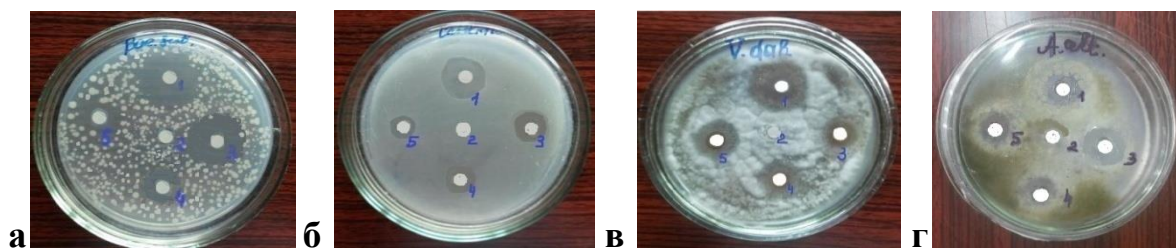


Рис.14. Зоны ингибирования роста бактерий и грибов очищенным ловастатином: а) *B. subtilis*; б) *C. albicans*; в) *V. dahliae*; г) *A. alternata*. 1-референтный ловастатин (1,0 мг/мл); 2 – этилацетат; 3 – опытный ловастатин; 4 – разведение (1:2); 5 - разведение (1:4).

Впервые установлено, что коллекционный штамм *Verticillium dahliae* RKMUZ-224 наиболее чувствителен к воздействию референтного ловастатина и может рассматриваться как новая тест-культура, применяемая для выявления продуцентов гиполипидемических соединений. На рисунке представлены зоны ингибирования роста *Verticillium dahliae* при воздействии различных концентраций ловастатина и калибровочная кривая, отражающая прямую зависимость подавления роста культуры от возрастающей концентрации ловастатина (рис.15).

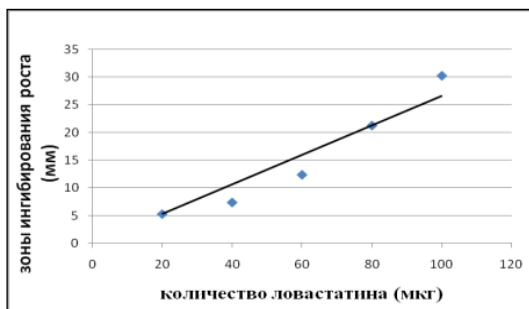


Рис.15. а) зоны ингибирования роста *Verticillium dahliae* референтным ловастатином б) стандартная кривая для ловастатина против *Verticillium dahliae*

На основе очищенного ловастатина штамма *A. terreus-20* была создана биологически активная добавка «Атерис», состоящая из очищенного ловастатина, растворенного в оливковом масле, концентрацией 1,0 мг/мл.

Гиполипидемическую активность БАД изучали совместно с сотрудниками ИХРВ АН РУз (под руководством проф. Азимовой Ш.С.) на модели животных с алкогольной и твиновой дислипидемией (ДЛП), вызванной однократным внутрибрюшинным введением Твин – 80. Эксперименты проводили на крысах самцах, массой тела 220 – 250 г. Для сравнения использовали препарат сравнения «Ловастатин» (KRKA, Словения).

Для испытаний «Атерис» и препарат сравнения «Ловастатин» вводили крысам в дозах 8 мг/кг перорально в течении 10 дней (до введения и одновременно с введением Твин-80). Спустя 10 часов по величине ХС и ТГ в сыворотке крови определяли степень развития ДЛП. Из данных таблицы 5 следует, что в группе крыс после введения детергента Твин-80 увеличивался уровень ХС, ЛПНП и ЛПВП в сыворотке крови почти в 1,3-1,6 раз. При введении исследуемого БАД в условиях твиновой ДЛП наблюдалось



достоверное снижение повышенных уровней ТГ и ХС: для ТГ – почти в 2 раза и для ХС - в 1,4 раза, по сравнению с контролем. Аналогичные изменения в содержании липидов крови наблюдались и при пероральном введении препарата «Ловастатин»: уровень ТГ и ХС снижается в 2 раза и 0,5 раза соответственно. Под воздействием «Атерис» было обнаружено снижение ЛПНП в 2 раза, в то время как «Ловастатин» практически не повлиял на уровень ЛПНП в сыворотках крыс с ДЛП. И наоборот «Атерис» снизил в 2 раза уровень ЛПВП, а препарат сравнения показал очень слабое влияние на уровень данных липидов (табл. 6).

**Таблица 6**

**Влияние масляного препарата на показатели липидного обмена у крыс при гиперлипидемии, вызванной твином-80**

Экспериментальные группы/доза	Триглицериды, ммоль/л	Общий холестерин, ммоль/л	Холестерин ЛПНП, ммоль/л	Холестерин ЛПВП, ммоль/л
Интактные	0,53±0,03	1,2±0,3	0,6±0,07	0,49±0,04
Контроль (гиперлипидемия)	0,84±0,05*	1,72±0,20*	0,9±0,06*	0,65±0,04*
Препарат сравнения «Ловастатин» (8 мг/кг)	0,34±0,02**	1,24±0,07**	0,83±0,06**	0,34±0,04**
БАД «Атерис» (8 мг/кг)	0,48±0,04**	1,27±0,05**	0,46±0,04**	0,71±0,06**
* - P<0,05 по сравнению с интактными животными; ** - P<0,05 по сравнению с контрольными животными. n=4				

Для создания алкогольной ДЛП был использован метод, который заключается в трехкратном пероральном введении 40% раствора этанола в дозе 6 г/кг в течение 3-х дней. На модели алкогольной ДЛП «Атерис» крысы получали предварительно в дозе 2 мг перорально в течение 5 дней и совместно с этанолом в течение 3-х дней. «Ловастатин» как контроль использовали перорально в тех же условиях. Результаты данной серии опытов представлены в таблице 7.

**Таблица 7**

**Влияние масляного препарата на показатели липидного обмена у крыс при гиперлипидемии, вызванной введением 50% этанола**

Экспериментальные группы/доза	Триглицериды, ммоль/л	Общий холестерин, ммоль/л	Холестерин ЛПНП, ммоль/л	Холестерин ЛПВП, ммоль/л
Интактные	0,53±0,03	1,2±0,3	0,6±0,07	0,49±0,04
Контроль (гиперлипидемия)	0,71±0,06*	2,67±0,2*	1,31±0,02*	1,12±0,04*
Препарат сравнения «Ловастатин» (8 мг/кг)	0,42±0,05**	1,6±0,09**	1,12±0,06**	0,39±0,09**
БАД «Атерис» (8 мг/кг)	0,61±0,09**	1,83±0,03**	0,82±0,02**	0,88±0,05**
* - P<0,05 по сравнению с интактными животными; ** - P<0,05 по сравнению с контрольными животными n=4				

Из данных таблицы видно, что в группе крыс, получавших этанол, увеличивался уровень ХС, ЛПНП и ЛПВП в сыворотке крови почти в 2-2,5 раза. «Ловастатин» в исследуемой концентрации снижал ТГ, ХС и ЛПВП в 2 раза, а ЛПНП в 0,3 раза. «Атерис» снижал уровень ХС и ЛПНП в 1,5 раза, ЛПВП в 1,2 раза и ТГ в 1,1 раза.

Совокупность исследований гипополипидемической активности «Атерис» на двух моделях животных с ДЛП показало практически сходную активность с препаратом «Ловастатин» по таким показателям как ТГ и ХС. В то же время действие БАД на ЛПВП и ЛПНП выгодно отличается, поскольку в обеих моделях более эффективно снижается уровень «плохого холестерина» - ЛПНП и мало меняется уровень ЛПВП, в то время как контрольный препарат незначительно уменьшает уровень ЛПНП и снижает ЛПВП.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что полученный нами БАД «Атерис» *in vivo* обладает гипополипидемической активностью, сравнимой с коммерческим препаратом ловастатина и может рассматриваться как новое средство гипохолестеринемического назначения.

## ВЫВОДЫ

В результате исследований, проведенных в рамках докторской диссертационной работы «Биотехнология получения статинов на основе местных штаммов *Aspergillus terreus*» представлены следующие выводы:

1. Впервые проведен скрининг 30-ти местных коллекционных штаммов *A.terreus* по статинообразующей способности и отобраны два наиболее перспективных штамма *A.terreus*- 20 и *A.terreus*- 4.

2. Методом ВЭЖХ и масс-спектрального анализа установлено, что в состав метаболитов статиновой природы, продуцируемых местными штаммами *A.terreus*, входят ловастатин в 3-х формах - лактон, гидроксикислота и метиловый эфир, правастатин, монаколин L и симвастатин.

3. Впервые установлена способность местных штаммов *A. terreus* синтезировать симвастатин, указывающая на существование в грибах *p. Aspergillus* эндогенного синтеза диметилмалонил- КоА как предшественника симвастатина. Это предполагает возможность получения симвастатина как конечного продукта прямой ферментацией штамма, альтернативной полусинтетическому синтезу из экзогенного ловастатина.

4. При скрининге сред для глубоинной ферментации в качестве базовых выбраны лактозосодержащие среды, обеспечивающие в *A.terreus*- 20 до 325,0 мг/л внутриклеточного ловастатина и 9,45 мг/л симвастатина. Оптимизацией питательных сред, условий ферментации (тип и возраст инокулюма) и подбором соотношений источников углеродного и азотного питания удалось повысить уровень продуцируемого ловастатина в *A.terreus*- 20 до 640 мг/л, а симвастатина до 120 мг/л.

5. Установлено преимущество твердофазной ферментации на зерновых субстратах (рис, пшеница, овес, пшеница+арахис, комбикорм) перед глубинным культивированием. Подбором оптимальных параметров твердофазной ферментации (метод инокуляции, температура, pH среды, увлажненность субстрата) и экстрагентов выход ловастатина в *A. terreus*- 4 на пшенице увеличен с 1,9 до 9,7 мг/г с.с., а в *A. terreus*- 20 на овсе с 3,1 до 9,56 мг/г с.с. При ТФФ время максимального накопления продуктов сокращается до 11 суток, а специфическая продуктивность увеличивается в 10-15 раз.

6. Разработан лабораторно-технологический регламент, в котором предложена и применена простая технологическая схема очистки ловастатина и симвастатина из ферментационного субстрата *A. terreus* 20 на овсе. В результате получен очищенный ловастатин с выходом более 60 весовых % и симвастатин с выходом 50 весовых % (вес/вес; W/W), с хроматографической чистотой более 96% и 98%.

7. Установлено, что очищенный ловастатин обладает антибактериальной и антифунгальной активностью против *B. subtilis*, *C. albicans*, *V. dahliae* и *A. alternate*, равной активности референтного препарата ловастатина. Показано, что чувствительность коллекционного штамма *V. dahliae* RKMUz-224 прямо коррелирует с концентрацией ловастатина, и может рассматриваться как новая тест-культура при первичном скрининге культур-продуцентов статинов.

8. Показано гипополидемическое действие БАД «Атерис» *in vivo* на двух моделях животных с экспериментальной дислипидемией. Установлено 2-х кратное снижение уровня ЛПНП - «плохого холестерина» и триглицеридов, снижение в 1,5 раза общего холестерина и сохранение уровня ЛПВП, что свидетельствует о высокой активности новой биологически активной добавки, сравнимой с коммерческим препаратом ловастатина.

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

---

**INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**

**NASMETOVA SAODAT**

**BIOTECHNOLOGY OF STATINS PRODUCTION  
BY DOMESTIC STRAINS OF *ASPERGILLUS TERREUS***

**03.00.23 – Biotechnology**

**DISSERTATION ABSTRACT DOCTOR  
OF BIOLOGICAL SCIENCES (DSc)**

**Tashkent - 2019**

**This dissertation of DSc has been registered with the number at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.**

The dissertation has been prepared 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 (microbio@academy.uz) and on the website of «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

**Scientific consultant:** **GulyamovaTashhan**  
doctor of biological sciences, professor

**Official opponents:** **DavranovKahramon**  
doctor of biological sciences, professor

**Mukhamedov Rustam**  
doctor of biological sciences, professor

**Dalimova Surayo**  
doctor of biological sciences, professor

**Leading organization:** **Institute of Botany**

Defence will take place on «\_\_\_\_\_» april 2019 year 10:00 at the once-only meeting of the Scientific council DSc.27.06.2017.B.38.01 of the Institute of Microbiology and National University of Uzbekistan at the following address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71.

Dissertation is registered at the Information Resource Centre at the Institute of Microbiology (100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: microbio@academy.uz).

Abstract of dissertation is distributed on «\_\_\_\_\_» march 2019 year.

(Protocol at the register \_\_\_\_\_ on «\_\_\_\_\_» march 2019 year)

**AripovTakhir**  
Chairman of the scientific council  
awarding scientific degrees,  
D.B.Sc., academician

**JuraevaRohila**  
Scientific secretary of the scientific council  
awarding scientific degrees, PhD, senior researcher

**Axmedova Zaxro**  
Chairman of the academic seminar under the  
scientific council awarding scientific degrees,  
D.B.Sc., professor

## INTRODUCTION (abstract of DSc thesis)

**The aim of the research work** is determination of the potential of indigenous strains of *Aspergillus terreus* as prospective producers of statins for development of the new hypocholesterolemic preparations.

**The object of the research work** is indigenous strains of micromycetes *A. terreus* maintained at the collection of industrially important strains of microorganisms of the Institute of Microbiology.

**Scientific novelty of the research work:** for the first time it was established that indigenous strains of *A. terreus* possess capacity to produce lovastatin comparable to productivity of known strains-producers;

composition of metabolites of statin nature produced by indigenous strains was determined, including several biologically active polyketides: pravastatin, simvastatin, monakolin L and lovastatin in three forms (lactone, hydroxyacid, methyl ether);

for the first time inability of *A. terreus* strains to synthesize simvastatin as final product of fermentation was established, which is an alternative to existing semi-synthetic synthesis of simvastatin from exogenous lovastatin;

optimal conditions of submerged cultivation were determined according to ratio of sources of carbon and nitrogen nutrition, quantity, type and age of used inoculum, duration of cultivation; as result the level of produced lovastatin increased in 2-3 times, and of simvastatin in 12 times;

advantage of solid-state fermentation on cereal substrates compared to submerged cultivation was established and optimal conditions of cultivation (inoculation method, temperature, medium pH level, humidity and degree of substrate aeration) were determined that resulted in decrease of the time of maximum accumulation of products to 11 days and in increase of specific productivity by 10-15 times;

antibacterial and antifungal activity of purified lovastatin preparation was established, which was equal to the reference lovastatin in regards of bacteria *B. subtilis*, and fungi *C. albicans*, *V. dahliae* and *A. alternata*.

hypocholesterolemic action of the purified lovastatin was proven *in vivo* on model animals with experimental dyslipoproteinemia; efficient decrease of the level of lipoproteins of low density and absence of toxic action was established.

### **Implementation of the research results.**

As result of scientific study on biotechnology of statins production on basis of indigenous strains of *Aspergillus terreus*:

- the patent of the Republic of Uzbekistan was received (№ IAP 05086). The invention is linked with medical biotechnology in the pharmacology field, relates to microbiological synthesis of lovastatin—inhibitor of 3-hydroxy3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase and represents it self as strain-producer of lovastatin.

- technical conditions on production of biologically active additive «Ateris», which consists of purified lovastatin from *A. terreus*-20 and natural olive oil, were

approved by the Agency UzStandard (TSh15011021-011:2018). As result the preparation «Ateris» is accepted for production at the Orom Biopreparat Ltd. Production of the preparation will allow to increase level of provision of domestic pharmaceutical market with hypocholesterolemic preparations.

- results of scientific study on identification of statins in indigenous strains of *A.terreus* and statin-synthesizing activity of the most active strains at submerged and solid-state fermentation are cited in publication of foreign leading scientific journals: Journal of Microbial and Biochemical Technology Vol 7(6), 2016, 334-337, IF-4.09, Research Gate; Asian Pacific journal of cancer prevention Vol 17, 2016, 3797-3803, IF 2.39, Research Gate; Current Microbiology 75(1), 2017, 84-91, IF-1.92, Research Gate; American Journal of Phamacy and Health Research 3(7), 2015, 116-126, IF 0.865, Global.

**The structure and volume of the thesis.** Containing 165 pages of text, the dissertation has introduction, five chapters, conclusions and list of references.

## LIST OF PUBLISHED WORKS

### I-бўлим (I часть; I-part)

1. Гулямова Т.Г., Абдульмянова Л.А., Насметова С.М., Рузиева Д.М., Расулова Г.А. Скрининг статинообразующих штаммов *Aspergillus*. Доклады Академии Наук РУз № 3, 2011, С.28-32.(03.00.00; №6)
2. ГулямоваТ.Г., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Расулова Г.А., Саттарова Р.С. Влияние различных питательных сред на синтез ловастатина местными штаммами *Aspergillus terreus*. Доклады Академии Наук РУз № 6, 2012. С.48-51. (03.00.00; №6).
3. Лобанова К.В., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Расулова Г.А., Худоярова Н.Э., Гулямова Т.Г. Получение ловастатина методом твердофазного культивирования гриба *Aspergillus terreus*. // Вестник НУУз №4, 2012, С.31-32. (03.00.00; №9).
4. Насметова С.М.. Влияние оптимизации питательных сред на продукцию ловастатина при глубоинной ферментации штамма *Aspergillus terreus-20*. Узбекский биологический журнал – 2012. – Спецвыпуск. С.45-48. (03.00.00; №5).
5. Насметова С.М., Цеомашко Н.Е., Расулова Г.А., Махкамова М.А., Азимова Ш.С., Гулямова Т.Г. Гиполипидемическая активность препарата ловастатина из местного штамма *Aspergillus terreus-20*. Доклады Академии Наук РУз № 1, 2015. С.70-73. (03.00.00; №6).
6. Nasmetova S.M., D.M. Ruzieva, G.A. Rasulova, R.S. Sattarova, T.G. Gulyamova. Effect of the Principal Nutrients on Simvastatin Production by Wild Strain *Aspergillus terreus 20* in submerged fermentation. Int. Journal of Current Microbiology and Aplied Sciences Vol.4, № 9, 2015, pp.894-898 (№5 Global Impact Factor -0,654).
7. Насметова С.М., Саттарова Г.Б., Гулямова Т.Г. Антибактериальные и антифунгальные свойства статинсодержащего экстракта местного штамма *A. terreus-20*. // Gulustan Black Sea scientific Journal Academic Research, 2018. vol 27. issue 06.-P. 16-18 (№5 Global Impact Factor -0,812).
8. Насметова С.М., Рузиева Д.М., Расулова Г.А., Махкамова М.П., Гулямова Т.Г. Оптимизация условий твердофазного культивирования для продукции ловастатина штаммом *A. terreus 20*. Доклады Академии Наук РУз №,3 2016. С.65-68. (03.00.00; №6).
9. Насметова С.М., Мукимов З, Гулямова Т.Г. Фунгицидные свойства ловастатин-содержащего экстракта местного штамма *A. terreus-20*, полученного методом твердофазного культивирования *Agro ilm* № 2 (46)-2017, С. 85-86. (06.00.00; №1).
10. Насметова С.М., РузиеваД.М., ГулямоваТ.Г. Влияние аэрации на продукцию ловастатина при твердофазной ферментации местных штаммов *Aspergillus terreus*. // Вестник НУУз, №3/2, 2017, С. 109-110. (03.00.00; №9).



11. Насметова С.М., Д.М. Рузиева, Г.А. Расулова, Т.Г. Гулямова. Продукция ловастатина местными штаммами *Aspergillus terreus* в условиях твердофазной ферментации. ДАН №6, 2017. С. 6-12. (03.00.00; №6).
12. Патент РУз № IAP 05086. Ловастатин хосил килувчи *Aspergillus terreus* – 497 замбуруғи штамми / Гулямова Т.Г., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Абдульмянова Л.И., Файзиева Ф.Х., Расулова Г.А. // Расмий ахборотнома.- 2013.-№6.

### II-бўлим (II часть; II-part)

13. T.G. Gulyamova, D.M. Ruzieva, S.M.Nasmetova, R.S.Rasulova, Sattarova,R.S., Lobanova, L.A.Abdulmyanova. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid state and submerged fermentations. Int. Journal of Engineering, Science and Technology Vol.5, № 3, 2013, pp.19-24.
14. T.G.Gulyamova, D.M. Ruzieva, S.M. Nasmetova., J.F. Ziyavitdinov, R.S. Sattarova, G.A. Rasulova. Composition of statins produced by indigenous strain of *Aspergillus terreus*. Int. Journal of Engineering, Science and Technology Vol.6, № 1, 2014, pp.71-76.
15. Гулямова Т.Г., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Расулова Г.А. Содержание ловастатина в различных штаммах *Aspergillus terreus*. Вестник МГОУ– 2011. – №2. С.16-20.
16. Рузиева Д.М., Насметова С.М., Расулова Г.А, Лобанова К.В., Каримова Ф.А., Ташпулатов Ж.Ж. Влияние метода инокуляции на накопление ловастатина в *Aspergillus terreus* Сб. Научных трудов по материалам Международной заочной научно-практической конференции, “Современные тенденции в науке: новый взгляд”, Тамбов, 2011, С.42-45.
17. Гулямова Т.Г., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Расулова Г.А., Абдульмянова Л.И. Скрининг статинообразующих штаммов гриба *Aspergillus terreus* Шестой московский Международный Конгресс.-Москва, 2011. - С.58.
18. Насметова С.М., Рузиева Д.М., Расулова Г.А., Лобанова К.В., Гулямова Т.Г. Продукция ловастатина *Aspergillus terreus* в условиях глубоинной ферментации Пятый съезд микробиологов Узбекистана.-Ташкент, 2012. – С.30.
19. Насметова С.М., Рузиева Д.М., Расулова Г.А., Каримова Ф.А., Саттарова Р.С. Гулямова Т.Г. Продукция симвастатина местными штаммами *Aspergillus terreus* в условиях глубоинной ферментации. Микробиология и вирусология.-Алматы 2013- №3(2) С.1-13.
20. Гулямова Т.Г., Насметова С.М., Рузиева Д.М., Каримова Ф.А., Расулова Г.А., Продукция симвастатина местными штаммами *Aspergillus terreus* Материалы юбилейной конференции по медицинской микологии.-Москва 2013,-С. 346.
21. Насметова С.М., Расулова Г.А., Каримова Ф.А., Гулямова Т.Г. Антибиотическая активность статин-содержащего препарата из *Aspergillus*

- terreus*. Материалы 3 Международного микологического форума.-Москва 2015,-С. 327.
22. Тухтаев Д.Д., Насметова С.М., Умарова Г.Б., Юнусова М.Х. *Aspergillus terreus* штамларини сифат ва микдор ташхиси. Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы физико-химической биологии» посвященной 80-летию академика Ташмухамедова Б.А.-Ташкент 2015,- С.302.
  23. Тухтаев Д.Д., Насметова С.М., Тураев Б.Б., Мухамедова М.Ж. Турли эритувчилар ёрдамида *Aspergillus terreus* 20 штамлар биомассаси ва култура суюклигидан статинларни экстракция қилиш Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы физико-химической биологии» посвященной 80-летию академика Ташмухамедова Б.А.-Ташкент 2015,- С.301.
  24. Тухтаев Д.Д., Насметова С.М., Умарова Г.Б.,Тураев Б.Б. Материалы научно-практической конференции Адсорбцион хроматография услуги ёрдамида *Aspergillus terreus* замбуруғи экстрактидан статинларни тозалаш «Актуальные проблемы физико-химической биологии» посвященной 80-летию академика Ташмухамедова Б.А.- Ташкент 2015,- С.303.
  25. Насметова С.М., Рузиева Д.М., Расулова Г.А., Гулямова Т.Г. Подбор условий твердофазного культивирования для продукции ловастатина в штамме *A. terreus-20*. Международный симпозиум «Микроорганизмы и биосфера, Microbios – 2015», посвященный 50-летию Института микробиологии, Ташкент, 2015. С. 200-201.
  26. Насметова С.М., Саттарова Г.Б. Биотехнология получения статинов на основе местного штамма *Aspergillus terreus-20*. Международный симпозиум «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS-2018» и IV Национальный конгресс бактериологов г. Омск 2018, С. 48-49.