

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
на диссертационную работу Насибова Элвина Мубариз оглы  
**«Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических**  
**протеаз с использованием микромицетов», представленную**  
**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**  
**по специальности 1.5.6. Биотехнология**

**Актуальность исследования.** Диссертационная работа Э.М. Насибова посвящена разработке биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз, образуемых мицелиальными грибами.

Коллагенолитические ферменты, или коллагеназы, присутствуют в тканях животных, клетках микроорганизмов и корней некоторых растений. По сравнению с растениями и животными микроорганизмы в качестве продуцентов коллагеназ имеют множество преимуществ, среди которых можно выделить их способность расти на простых по составу и дешевых средах, высокую продуктивность, возможность экзогенной регуляции процессов биосинтеза коллагеназ, отсутствие прионов, относительная простота процессов выделения и очистки коллагеназ, возможность генно-инженерных манипуляций.

Хорошо известно, что первый коммерческий препарат коллагеназ микробного происхождения был получен из культуры *Clostridium histolyticum*. Коллагеназы этой бактерии производятся до сих пор и их можно найти на рынке. Однако эта бактерия обладает рядом недостатков, среди которых в первую очередь можно назвать патогенность, токсигенность и анаэробность, накладывающие определенные физиологические и технологические ограничения на получение продуцируемой ей коллагеназы. Поэтому особый интерес в качестве продуцентов коллагенолитических протеаз вызывают микромицеты, так как их использование позволяет варировать различные типы культивирования, получая различные количества ферментов или даже ферменты с разными свойствами. Несмотря на существование многочисленных исследований, посвященных изучению протеолитической активности различных микроорганизмов, в настоящее время поиск новых эффективных продуцентов коллагеназ остается актуальной биотехнологической задачей, особенно в виду перспектив их использования в медицине. В последнее время разрабатываются терапевтические методы, основанных на малоинвазивных подходах, в том числе с использованием ферментов, к числу которых относятся коллагеназы. Миграция клеток и ремоделирование коллагена во время восстановления и регенерации тканей является важным этапом в процессе заживления ран, где коллагеназа играет ключевую роль. Для улучшения процесса заживления используются мази с коллагеназой, которые осуществляют ферментативную очистку и потенциально облегчают процесс эпителизации во время санации. Другие применения фермента включают лечение грыжи межпозвоночного диска, фиброза и цирроз печени, контрактуры Дюпюитрена и болезни Пейрони,

миомы матки. Получение с помощью коллагеназ отдельных клеток из тканей печени и поджелудочной железы позволяет использовать их для лечения хронического панкреатита и диабета. Указанные способы применения коллагенолитических ферментов лишь подчеркивают, что современная биоиндустрия нуждается в новых препаратах коллагеназ.

**Целью работы** была разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЛАР.

**Научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов диссертации.** Все представленные в настоящей работе результаты получены впервые. Автором предложен комплекс критериев, позволяющих проводить отбор перспективных продуцентов коллагенолитических ферментов. Был выявлен и охарактеризован коллекционный штамм *Aspergillus fumigatus* F 22 в качестве продуцента коллагенолитических ферментов. Оптимизирован состав питательной среды для культивирования и условия ферментации микромицета. Автором работы была разработана оригинальная двухстадийная схема выделения протеазы, позволяющая провести очистку коллагенолитических ферментов в 25 раз и получить электрофоретически гомогенный препарат. Охарактеризованы некоторые физико-химические и биологические свойства коллагенолитической протеазы *A. fumigatus*. Впервые проведен сравнительный анализ коллагенолитической активности 47 коллекционных штаммов микромицетов до и после их хранения на агаризованных средах. Разработаны условия криоконсервации и лиофилизации, позволяющие сохранять жизнеспособность, высокую продуктивность и коллагенолитическую активность продуцента.

Изученные Э.М. Насибовым биотехнологические процессы позволили определить критерии для создания универсальной технологии и эффективного получения коллагенолитических ферментов с использованием микромицетов. Разработанный им комплекс показателей дал возможность провести скрининг коллекционных культур из биоколлекции ВИЛАР и отобрать перспективный продуцент коллагеназ. Так, было показано, что пассивирование на культуральной среде с индуктором может являться перспективным подходом для увеличения коллагенолитической активности микромицетов. На основе изучения влияния качественного и количественного состава питательных сред и посевного материала оптимизированы условия культивирования продуцента.

Разработанные автором методы выделения и очистки ферmenta до гомогенного состояния обеспечивают возможность проведения доклинических исследований с целью определения эффективности и биобезопасности препарата для использования в медицине.

Таким образом, можно заключить, что полученные результаты имеют существенную научную новизну, высокую теоретическую значимость и вносят новый вклад в получение препаратов коллагеназ микромицетов.

**Степень достоверности и обоснованности научных результатов, положений и выводов.** Верификация полученных результатов работы подтверждается большим разнообразием использованных методов, включающих статистическую обработку значительного объема полученных экспериментальных данных, анализом и обобщением широкого спектра литературных данных в исследуемой области, а также воспроизводимостью результатов исследования. Положения и выводы, выдвинутые в диссертационной работе, являются обоснованными и соответствуют полученным результатам.

**Объем, содержание и оформление диссертации.** Диссертация Э.М. Насибова построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 172 страницах, содержит 26 таблиц и 46 рисунков. Библиографический указатель содержит 332 источника литературы.

Раздел «Введение» содержит подробную информацию об актуальности предмета исследований, степени разработанности выбранной темы, о научной новизне, теоретической и научно-практической значимости работы. Четко сформулированы цель и задачи работы. Показан личный вклад автора в процесс получения результатов, в их представление на российских и международных конференциях и выставках, а также в подготовке публикаций по теме диссертационной работы.

В разделе «Обзор литературы» имеется содержательная информация о коллагенолитических ферментах и их применении, необходимая для понимания объекта исследований.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит развернутую информацию об использованных в ходе работ современных методах и подходах и включает большой пул микробиологических и биохимических методов.

В разделе «Результаты и их обсуждение» представлен весь спектр полученных результатов и их обсуждение, основанное на систематизации и сравнительном анализе полученных и литературных данных. Результаты собраны в отдельные разделы, согласно поставленным задачам, что удобно для чтения и понимания. Представленный экспериментальный материал логично изложен и дает полную картину о полученных Э.М. Насибовым результатах.

**Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы.** Необходимо отметить, что исследование хорошо продумано, логично выстроено, аккуратно и грамотно выполнено. Цель работы четко сформулирована. Задачи соответствуют цели исследования. Следует подчеркнуть грамотный анализ состояния проблемы, интересное изложение полученного материала, использование автором ряда современных методов. Рисунки и таблицы выполнены качественно и наглядно иллюстрируют полученные автором результаты. Автором получен огромный

объем экспериментальных данных, который был обработан с применением статистического анализа. Выводы по работе представляются достаточно полными и убедительными.

По ходу прочтении текста диссертации были отмечены опечатки, грамматические и пунктуационные ошибки, не влияющие на значимость работы и понимание смысла прочитанного.

При знакомстве с методами и результатами исследований возникли следующие замечания и вопросы:

- 1) почему вместо общепринятого термина «глубинное культивирование» автор использует термин «погруженное»?
- 2) ссылки на источники цитированной литературы приведены в тексте не по порядку, это затрудняет обращение к списку литературы.
- 3) 5-ое положение, выносимое на защиту, довольно очевидно исходя из определения твердофазного культивирования как такового.
- 4) при приведении перечня микроорганизмов из разных родов в тексте лучше делать это по алфавиту.
- 5) микромицет *Aspergillus ruber* является ксерофилом – насколько подходят используемые в диссертации условия для него?
- 6) на рисунках 8-11 и 13 в одинаковой гамме приведены разные активности грибов, лучше бы сделать это одинаково; кроме того, подписи в легенде к этим же рисункам неудачны, так как приведенные аббревиатуры штаммов не расшифрованы и их расшифровку нужно искать в тексте дополнительно.
- 7) выбранный продуцент коллагеназ *Aspergillus fumigatus* является патогеном. Насколько целесообразно его применение в биотехиндустрии?
- 8) некоторые иллюстративные позиции (например, рисунки 21 и 22, таблица 16 и рисунок 25) дублируют данные друг друга.
- 9) в обсуждении результатов и заключении есть повторы текстовых фрагментов из предыдущих разделов.

Хочу отметить, что высказанные замечания и вопросы не снижают высокой оценки работы и не снижают высокого научного уровня представленных результатов.

**Публикации.** В ходе работы над кандидатской диссертацией автором опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в библиографических базах Web of Science, Scopus и РИНЦ (все – в рецензируемых журналах ВАК), 13 тезисов.

**Заключение.** Диссертационная работа Насибова Элвина Мубариз оглы «Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов», обладает высокой научной новизной, существенной теоретической и практической значимостью, отличается достоверностью полученных результатов, а также продуманностью и аргументированностью положений и выводов, направлена на решение актуальных проблем в исследуемой области, что делает работу

законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствующей требованиям Постановления правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 26.10.2023 г.) «О порядке присуждения ученых степеней», и паспорту специальности 1.5.6. «Биотехнология», а ее автор, Насибов Элвин Мубариз оглы, без сомнения заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент:

Оスマловский Александр Андреевич

Кандидат биологических наук

(специальности 03.02.03 – Микробиология, 03.06.01 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

Доцент кафедры микробиологии

Федерального государственного бюджетного

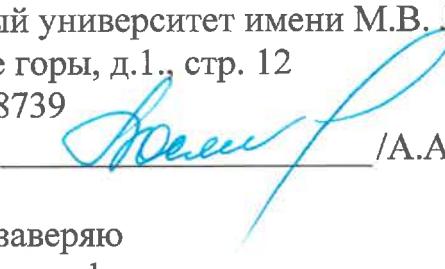
образовательного учреждения высшего образования

«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

199991, г. Москва, Ленинские горы, д.1., стр. 12

Телефон оппонента: 89168168739

E-mail: aostmol@mail.ru



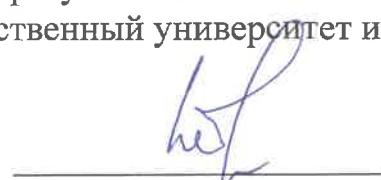
/А.А. Оスマловский/

Подпись А.А. Оスマловского заверяю

ученый секретарь биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.

Ломоносова»



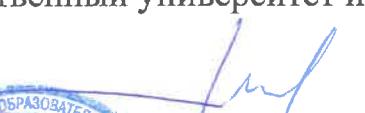
/Петрова Е.В./

Заместитель декана биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.

Ломоносова»

Д.б.н., профессор



/Рубцов А.М./

