

Анна

**УТВЕРЖДАЮ**

Первый проректор -  
проректор по научной работе  
РУДН, д.м.н., профессор,  
член-корреспондент РАН  
А.А. Костин



2024 г.

### **ОТЗЫВ**

ведущей организации – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» о значимости диссертационной работы Насибова Элвина Мубариз оглы на тему «Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 биотехнология.

#### **Актуальность диссертационной темы**

Микроорганизмы являются источниками биологически активных веществ, таких как антибиотики, иммуномодуляторы, гормоны, витамины, липополисахариды, а также уникальных ферментов, принимающих участие в круговороте веществ в природе, инвазии микроорганизмов и могут быть использованы в биотехнологическом производстве ряда целевых продуктов. В настоящее время показана перспективность использования коллагенолитических протеаз (коллагеназ) в медицине, пищевой промышленности и других областях. Указанные ферменты, гидролизующие фибриллярный нерастворимый белок коллаген, составляющий основу соединительной ткани, получают путем микробного синтеза. При этом основным продуцентом является патогенный штамм *Clostridium histolyticum*,

использование которого имеет ряд существенных трудностей, связанных с его патогенностью и токсигенностью. В связи с этим поиск новых продуцентов и изучение регуляции синтеза коллагенолитических протеаз является актуальной биотехнологической задачей. Настоящее исследование посвящено разработке комплекса показателей для скрининга микромицетов, способных к синтезу и секреции коллагенолитических протеаз и определению экзогенных факторов, увеличивающих выход целевого продукта при культивировании продуцентов.

**Объем и структура диссертации** соответствуют целям и задачам, поставленным в работе. Диссертация изложена на 172 страницах печатного текста, содержит 26 таблиц, 46 рисунков и фотографий. Список использованной литературы включает 332 работы, в том числе 67 отечественных и 265 зарубежных авторов.

Рассматриваемая работа имеет все необходимые формальные признаки диссертации, т.е. состоит из введения, обзора литературы, главы «объекты и методы исследования», глав, описывающих собственно проведение экспериментов, а также полученные результаты, их обсуждение и выводы.

*Во введении* сформулированы цели и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, новизна и практическая значимость полученных результатов.

*В первой главе* на основе современных литературных данных автор рассматривает актуальные вопросы биотехнологического производства коллагенолитических протеаз и возможностей расширения сырьевой базы для этих целей. Описано строение и свойства коллагена как субстрата для действия этих ферментов и его роль в развитии различных патологий. Проанализировано место коллагеназ в семействе протеолитических ферментов. Подробно рассмотрены источники получения коллагеназ, методы оптимизации процессов ферментации биообъектов – продуцентов коллагенолитических протеаз. Проведен сравнительный анализ способов выделения, очистки и характеристики ферментов. Приведены обширные

данные о практическом использовании коллагеназ в медицине, пищевой промышленности и других областях жизнедеятельности человека. Проанализированы также современные методы хранения микроорганизмов. Следует отметить, что литературный обзор выполнен на высоком уровне, проработано большое количество современных литературных источников, большинство, из которых иностранные.

Во второй главе подробно рассматриваются объекты и методы исследования, которые автор использует в своей работе. Описаны способы поддержания и хранения коллекционных штаммов микромицетов при различных условиях с последующим мониторингом их жизнеспособности, протеолитической и коллагенолитической активности. Приведены данные об особенностях проведения процессов твердофазного и глубинного культивирования грибов с использованием различных способов их инокуляции. Подробно описаны методы выделения и очистки коллагенолитических протеаз из культуральной жидкости после ферментации продуцентов, а также способы анализа полученных ферментных препаратов, такие как диск-электрофорез, определение влияния температуры и рН на ферментативную активность, ингибиторный анализ.

Третья глава посвящена селекции 47 штаммов микромицетов из биокolleкции ВИЛАР. На основании результатов поверхностного культивирования грибов на средах, содержащих коллаген, отобрано 20 культур с высокими индексами лизиса и /или скоростями роста, для которых показана секреция коллагенолитических протеаз при глубинном культивировании. Выявлено пять микромицетов с высокими значениями коллагенолитической активности в культуральной жидкости. Проведенный анализ параметров роста, протеолитической и коллагенолитической активности этих культур показал, что микромицет *A. fumigatus* может рассматриваться в качестве потенциального продуцента коллагенолитических протеаз.



В четвертой главе рассматриваются факторы, влияющие на секрецию коллагенолитических протеаз при глубинном культивировании отобранного для дальнейшего исследования гриба *A. fumigatus*. Изучены такие параметры, как количественный и качественный состав питательной среды, способ инокуляции посевного материала, пассирование на среде с индуктором (коллагеном), время культивирования. На основании полученных результатов оптимизированы условия культивирования гриба и проведено масштабирование процесса с использованием ферментера.

Пятая глава посвящена сравнительному изучению секреции коллагенолитических протеаз при погруженном и твердофазном культивировании *A. fumigatus*. Изучена коллагенолитическая активность и продуктивность гриба при твердофазном культивировании по сравнению с погруженной ферментацией. Проведен анализ указанных параметров при использовании различных носителей (вермикулит, шрот цветков пижмы).

В шестой главе приводятся результаты по выделению, очистке и характеристике внеклеточного коллагенолитического фермента из культуральной жидкости *A. fumigatus*. Предложена двух стадийная схема очистки фермента, включающая гель-фильтрацию и аффинную хроматографию на сорбенте, полученном иммобилизацией желатина на CNBr-активированной сефарозе. В результате проведенных экспериментов удалось получить электрофоретически гомогенный препарат с выходом более 50% и степенью очистки около 25 раз. Проведен анализ физико-химических свойств полученного фермента.

Седьмая глава посвящена изучению влияния различных методов консервации, как коллекционных штаммов, так и *A. fumigatus*, на жизнеспособность и ферментативную активность микромицетов. Изучена жизнеспособность и коллагенолитическая активность 47 коллекционных штаммов микромицетов после хранения в течение 4-4,5 лет на ааризованных средах под вазелиновым маслом. Отработаны условия криоконсервации и лиофилизации *A. fumigatus* - продуцента коллагенолитических протеаз,

обеспечивающие сохранение жизнеспособности и ферментативной активности гриба.

Далее автор приводит *заключение и выводы* по всей диссертационной работе. В *заключении* подробно обсуждаются полученные результаты, их соответствие имеющимся литературным данным, а также возможные преимущества, и перспективы использования разработанных биотехнологических процессов. *Выводы*, сформулированные в диссертации, соответствуют целям и задаче, поставленным в работе и полученным экспериментальным результатам.

**Новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.**

Научная новизна работы не вызывает сомнений. На основании полученных экспериментальных результатах, автором впервые разработан комплекс критериев для скрининга микромицетов и схема отбора продуцентов коллагенолитических протеаз. Выявлен и охарактеризован новый перспективный продуцент коллагенолитических протеаз среди микромицетов коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЛАР – *Aspergillus fumigatus* штамм F22. Впервые определены экзогенные факторы, повышающие ферментативную активность гриба. Оптимизирован состава среды и условия культивирования *Aspergillus fumigatus*. проведено пилотное масштабирование процесса получения протеазы. Разработан оригинальный метод выделения и очистки фермента. Впервые охарактеризованы некоторые физико-химические и биологические свойства коллагенолитической протеазы *A. fumigatus*. Проведен сравнительный анализ коллагенолитической активности 47 коллекционных штаммов микромицетов до и после хранения на агаризованных средах. Для *A. fumigatus* разработаны условия криоконсервации и лиофилизации, позволяющие сохранять жизнеспособность и ферментативную активность продуцента.

**Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.**

Полученные в диссертационной работе результаты дополняют имеющиеся в современной литературе теоретические представления о факторах, влияющих на биосинтетические процессы микроорганизмов. Значительный интерес представляют сведения об изменении интенсивности секреции ферментов после пассирования биообъекта на средах с индуктором – субстратом ферментативной реакции. Сравнительное изучение влияния количественного и качественного состава питательных сред и посевного материала при твердофазном и погруженной культивировании дополняет имеющиеся теоретические представления о экзогенной регуляции биосинтетических процессов у микромицетов.

Представленная работа имеет несомненное практическое значение. Найден штамм-продуцент, позволяющий получать коллагенолитические протеазы. Изученные свойства полученного препарата свидетельствуют о возможности его применения в медицине, фармакологической и пищевой промышленности. Результаты настоящего диссертационного исследования могут быть использованы для разработки технологической схемы получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов. Новые экспериментальные данные и биотехнологические подходы будут полезны для студентов (бакалавров) и магистрантов, обучающихся по направлению биологические науки (биотехнология, микробиология, фармакология).

#### **Обоснованность положений выводов и заключения диссертации.**

Положения, выводы и заключения диссертационной работы Насибова Э.М. сделаны на основе полученных результатов с применением современных микробиологических, физико-химических и биохимических методов. Все использованные в работе методики были надлежащим образом валидированы. Автором подробно описана методология проведения технологических и аналитических процедур. Все данные проанализированы адекватными методами статистики и биоинформатики. Достоверность полученных результатов и сделанных выводов основывается на повторении экспериментов и подтверждается их воспроизводимостью и корреляцией с применением

независимых взаимодополняющих методов, а также их согласованностью с известными литературными данными.

**Сведения о полноте опубликованных научных трудов, апробации результатов и соответствии содержания автореферата основным положениям диссертационной работы.**

По результатам исследования опубликовано 18 печатных работ, в числе которых 5 работ из списка изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и входящих в базу данных RSCI на платформе WoS, из них 1 работа из базы данных Scopus. Материалы диссертации были представлены на 9 международных и всероссийских конференциях и съездах.

Анализ представленных диссертантом данных свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Выводы аргументированы и соответствуют полученным экспериментальным результатам. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы.

**Соответствие работы паспорту специальности.**

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.6. биотехнология, а именно пункту 1: «Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии», пункту 2: «Оптимизация процессов биосинтеза» и пункту 3: «Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений».

**Замечания по содержанию, стилю изложения материала диссертационной работы и ее оформлению.**

В целом диссертационная работа производит благоприятное впечатление, но имеются некоторые замечания и вопросы.

1. В главе «Обзор литературы» подробно описаны структура и свойства различных типов коллагена. С чем связана необходимость такой детализации?
2. В разделе «Объекты и методы» можно сократить описание таких рутинных методов исследования, как диск-электрофорез, определение концентрации белков, сахаров.
3. При проведении экспериментов для характеристики коллагенолитической активности грибов при поверхностном культивировании используется индекс лизиса. С чем связан выбор этого показателя?
4. Обозначения на рис. 2 и 3 даны в англоязычной транскрипции.
5. В тексте диссертации и списка литературы имеются некоторые опечатки и неточности.

Однако, сделанные замечания носят главным образом рекомендательный характер и не снижают научную и практическую значимость проделанной диссертационной работы.

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Насибова Элвина Мубариз оглы на тему «Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Никитиной Зои Кимовны, представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача по созданию биотехнологических продуцентов для получения коллагенолитических ферментов.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016



№335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Насибов Элвин Мубариз оглы достоин присуждения искомой степени по специальности наук по специальности 1.5.6. биотехнология.

Настоящий отзыв подготовлен заведующим кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», доктором фармацевтических наук, доцентом Суслиной Светланой Николаевной, обсужден и утвержден на заседании кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», протокол № 6 от «19» января 2024 года.

Отзыв составили:

Заведующий кафедрой общей фармацевтической и биомедицинской технологии медицинского института РУДН (14.04.01 Технология получения лекарств), доцент



С.Н. Суслина

Директор медицинского института РУДН, доктор медицинских наук



А.Ю. Абрамов

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Тел. (495) 787-38-03, (495) 434-42-12, (495) 434-66-82

e-mail: [rector@rudn.ru](mailto:rector@rudn.ru); [rudn@rudn.ru](mailto:rudn@rudn.ru)