

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертационную работу Насибова Элвина Мубариз оглы
«РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ
КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МИКРОМИЦЕТОВ», представленную в Диссертационный Совет 99.0.027.03
при ФГБОУ ВО Российского химико-технологического университета им.
Д.И. Менделеева на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.6 – биотехнология

Актуальность исследований.

Получение протеолитических ферментов, участвующих в физиологических и патологических процессах в организме человека и животных, обеспечивающих круговорот веществ в природе, а также необходимых для осуществления различных технологических задач, является одним из важных направлений современной биотехнологии. Коллагенолитические протеазы, гидролизующие фибриллярный нерастворимый белок коллаген, составляющий основу соединительной ткани, представляют в этом отношении особый интерес, так как могут быть использованы в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности, а также для решения экологических задач. Несмотря на то, что указанные ферменты присутствуют в различных тканях животных и растений, единственным реальным способом их получения является микробный синтез. При этом в настоящее время 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 коллагенолитических протеаз и изучение регуляции их биосинтетической активности является актуальной биотехнологической задачей. Настоящее исследование посвящено отбору на основе комплекса показателей микромицетов, способных к продукции коллагенолитических протеаз, определению экзогенных факторов, усиливающих выход целевого продукта, и разработке биотехнологических процессов получения ферментов.

Объем и структура диссертации. Диссертация построена по традиционному плану и 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. Работа состоит из введения, обзора литературы, главы «объекты и методы исследования», пяти глав, описывающих проведенные эксперименты, полученные результаты, а также 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 субстрата этих ферментов - коллагена. Проанализировано место коллагеназ в семействе протеолитических ферментов. Подробно рассмотрены источники получения и методы оптимизации процессов ферментации биообъектов – продуцентов коллагенолитических протеаз. Проведено сравнение 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.

Во второй главе 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, примененные в работе, а также способы физико-химического и биохимического анализа полученных ферментных препаратов.

В третьей главе проанализированы данные собственных исследований 47 штаммов микромицетов из биокolleкции ВИЛАР при поверхностном культивировании грибов на средах, содержащих коллаген. Автором отобрано 20 культур с высокими индексами лизиса и/или скоростями роста, для которых показана секреция коллагенолитических протеаз при глубинном культивировании. Выявлено пять микромицетов с высоким уровнем секреции указанных ферментов. Проведенный анализ параметров роста, протеолитической и коллагенолитической активности этих культур показал, что микромицет *Aspergillus fumigatus* F 22 может рассматриваться в качестве потенциального продуцента коллагенолитических протеаз.

В четвертой главе изучены факторы, влияющие на секрецию коллагенолитических протеаз при глубинном культивировании *A. fumigatus*. Проанализировано влияние таких параметров, как количественный и качественный состав питательной среды, способ инокуляции посевного материала, пассирование на среде с индуктором (коллагеном), время культивирования. Оптимизированы условия культивирования гриба и проведено масштабирование процесса с использованием ферментера.

Пятая глава посвящена сравнительному изучению коллагенолитической активности и продуктивности 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*. С помощью, предложенной двухстадийной схемы очистки фермента удалось получить электрофоретически гомогенный препарат с выходом более 50% и 25-кратной степенью очистки. Проведен анализ физико-химических и биохимических свойств протеазы.

Седьмая глава посвящена изучению жизнеспособности и коллагенолитической активности 47 коллекционных штаммов микромицетов после хранения в течение 4-4,5 лет на агаризованных средах под вазелиновым маслом. Отработаны условия криоконсервации и лиофилизации *A. fumigatus* - продуцента коллагенолитических протеаз, обеспечивающие сохранение жизнеспособности и ферментативной активности гриба.

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.

Автором впервые на основе проведенных экспериментов разработан комплекс критериев для скрининга микромицетов и схема отбора продуцентов коллагенолитических протеаз. Найден новый перспективный продуцент коллагенолитических протеаз среди микромицетов из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЛАР – *Aspergillus fumigatus* штамм F22. Впервые проведено изучение экзогенных факторов, повышающих ферментативную активность гриба при глубинном культивировании. Оптимизирован состав среды и условия культивирования *Aspergillus fumigatus*. Предложен оригинальный метод выделения и очистки фермента. Впервые охарактеризованы некоторые физико-химические и биологические свойства коллагенолитической протеазы *Aspergillus fumigatus*. Разработаны условия криоконсервации и лиофилизации, позволяющие сохранять жизнеспособность и ферментативную активность продуцента.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Сформулированные в диссертации выводы, сделанные на основе результатов проведенных экспериментов, расширяют имеющиеся теоретические представления о факторах, влияющих на биосинтетические процессы микроорганизмов. Полученные данные об изменении интенсивности секреции ферментов при культивировании и пассирования биообъектов на средах с субстратом ферментативной реакции играют важную

роль в понимании механизмов индукции синтеза вторичных метаболитов микромицетами

Результаты, рекомендации и выводы, представленные в работе, позволяют решить ряд практических задач, связанных с разработкой биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз. Предложена и апробирована схема поиска микромицетов, способных к синтезу и секреции указанных ферментов. Найден новый штамм *Aspergillus fumigatus*, обладающий коллагенолитической активностью. Оптимизированы условия его культивирования, как при погруженной, так и при твердофазной ферментации. Примененный в работе способ выделения фермента позволил получить электрофоретически гомогенный препарат высокой степени очистки, что дает возможность приступить к созданию новых лекарственных средств. Разработанные биотехнологические процессы получения коллагенолитических протеаз являются основой для использования ферментов в медицине, пищевой промышленности, охране окружающей среды. Предложенные методологические подходы могут быть применены и для работы с другими продуцентами коллагеназ. Экспериментальные результаты, полученные в работе, и биотехнологические подходы будут полезны для студентов и аспирантов, обучающихся по специальности биотехнология (биологические науки).

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.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, к ней имеются некоторые замечания и вопросы:

1. В обзоре литературы используются термины «коллагеназы» и «коллагенолитические протеазы», а при описании результатов в основном «коллагенолитические протеазы».
2. В разделе «Объекты и методы исследования» не совсем понятно сколько было измерений при определении диаметров колоний и зон лизиса при поверхностном культивировании.
3. В главе 4 при изучении влияния различных факторов на секрецию коллагенолитических протеаз *Aspergillus fumigatus* хотелось бы более четких объяснений - почему были использованы такие компоненты сред, концентрации спор, вегетативного мицелия и т.д.
4. В работе показано увеличение ферментативной активности *Aspergillus fumigatus* при пассировании культуры на среде с коллагеном. Каковы механизмы подобной активации?
5. В разделе «Заключение» хотелось бы более четкого сравнения продуктивности нового штамма с продуктивностью других культур, описанных в литературе.
6. В тексте диссертации и списке литературы имеются опечатки и неточности.

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

Заключение

Диссертация Насибова Элвина Мубариз оглы на тему «Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. - биотехнология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой осуществлено новое решение актуальной задачи современной

биотехнологии - предложен оптимальный штамм-продуцент коллагенолитической протеазы, разработаны биотехнологические процессы получения фермента, обеспечивающие возможность его дальнейшего использования в медицине, пищевой промышленности, охране окружающей среды. Работа Э.М. Насибова по актуальности, научной новизне, объему исследования, значению для теоретической и практической биотехнологии полностью соответствует требованиям пункта 9-14. «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842 (в редакции с изменениями и дополнениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, соответствует специальности 1.5.6. - биотехнология, а ее автор – Насибов Элвин Мубариз оглы заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией анализа геномов
Всероссийского научно-исследовательского
института сельскохозяйственной биотехнологии»,
доктор биологических наук по специальности 03.00.23 – биотехнология,
профессор РАН

Илья Александрович Шилов

«02» февраля 2024 года

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. 8-499-976-65-44, E-mail: iab@iab.ac.ru

Подпись Шилова И.А. удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ,

канд. биол. наук



Е.И. Федина