

## **ОТЗЫВ официального оппонента**

**на диссертацию Тиморшиной Светланы Наильевны на тему:  
«Протеазы микромицетов с кератинолитической активностью: новые  
продуценты и свойства», представленную к защите на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук по специальностям**

### **1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология**

Кератиновые побочные продукты состоят исключительно из кератиновых белков, которые являются одним из типов фиброзных структурных белков, синтезируемых эпителиальными клетками высших позвоночных. Отходы сельскохозяйственных производств, содержащие кератин, создают экологический дисбаланс и являются источником загрязнения воздуха, почвы и воды. В природе кератиновые отходы используются рядом микроорганизмов, известных своей способностью производить протеолитический фермент, то есть кератиназу. В связи с этим, на сегодняшний день большое значение и актуальность приобретают исследования, направленные на использование ферментативных процессов переработки кератинсодержащего сырья, в том числе с применением штаммов-продуцентов кератинолитических ферментов (Sinha and Rao 2014; El-Ghonemy and Ali 2017; de Oliveira et al. 2019).

Грибные кератиназы – это протеазы, гидролизующие труднорастворимый кератин, обладающие большим потенциалом, потребность в которых постепенно возрастает из-за их широкой специфичности по отношению к множеству нерастворимых кератиновых субстратов. Среди продуцентов кератиназ грибы стали более частым выбором для производства ферментов из-за их высокой ферментативной активности и способности действовать в широком диапазоне pH. Грибные кератиназы являются отличным ресурсом для промышленного сектора и устойчивого управления окружающей средой, а также источником продуктов с добавленной стоимостью. Спектр применения чрезвычайно широк: в

агроиндустрии для конверсии кератинсодержащих отходов, в производстве кормовых гидролизатов, добавок и азотных удобрений; в биомедицинской, фармацевтической и косметической индустрии для гидролиза прионов. Особый интерес представляет получение протеолитических ферментов с высокой кератиназной активностью по отношению к кератинам, но не обладающих коллагеназной активностью, поскольку их применение за счет отсутствия разрушения коллагена позволяет получать высококачественные кожи, а также фармацевтические и косметических препараты. В связи с вышесказанным, работа Тиморшиной С.Н. является актуальным современным исследованием.

**Степень обоснованности положений и научных выводов, выносимых на защиту**

**Целью работы** являлось создание коллекции культур микромицетов, перспективных в качестве источника внеклеточных протеаз с кератинолитической активностью, изучение кератинолитической активности лидерных штаммов грибов на разных средах и физико-химических свойств их кератинолитических протеаз.

В задачи работы входило отобрать наиболее эффективные коллекционные и свежесыведенные штаммы, оценить способность к синтезу кератинолитических протеаз в разных биотехнологических условиях. Исследовать влияние различных добавок, содержащих кератин на рост, ферментативную активность, а также способность к образованию кератинолитических протеаз. Выделить внеклеточные протеазы с кератинолитической активностью отобранных культур и определить некоторые их биохимические и физико-химические свойства (температурный и рН оптимум и ряд других).

Основные положения и выводы диссертационной работы сделаны по результатам экспериментов с применением методов микробиологии, биохимии и физ-химии, а также молекулярной биологии. Полученные результаты математически обработаны и не вызывают сомнений.

## Научная новизна и значимость исследования

Существенная новизна проведенных диссертантом исследований не вызывает сомнений, и имеет не только прикладную, но и фундаментальную значимость. Две культуры, *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1, проявили высокую кератинолитическую активность и при глубинном культивировании. Для этих двух видов грибов впервые была показана способность секретировать кератинолитические протеазы. В том числе впервые была показана способность к синтезу таких ферментов представителем рода *Tolyposcladium*. Впервые показано, что при культивировании *A. clavatus* ВКПМ F-1593 в различающихся условиях (глубинное культивирование на измельченном курином пере, твердофазное культивирование на цельном курином пере и твердофазное культивирование на свиной щетине) образуются 3 протеазы с кератинолитической активностью с разными свойствами.

Практическая значимость работы определяется тем, что на основании установленной автором способности ряда штаммов к образованию кератинолитических ферментов их можно рекомендовать для разработки коммерческих препаратов кератиназ и использования самих продуцентов в сфере биodeградации отходов. Новые ферменты с кератинолитической активностью штамма *A. clavatus* ВКПМ F-1593 могут быть применены в различных отраслях экономики (медицинской, косметологической, кожевенной) благодаря высокой активности и возможности получения протеаз с различными свойствами при регулировании условий роста продуцента. Данные по культивированию коллекционного штамма *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на кератинсодержащих отходах позволяют считать их перспективными для использования в качестве деструкторов таких отходов. Возможность контролировать и изменять свойства секретлируемых кератиназ за счет регуляции условий культивирования *A. clavatus* ВКПМ F-1593 может способствовать разработке нескольких разнонаправленных коммерческих препаратов.

## **Методология и методы исследований**

В работе продемонстрированы возможности современных микробиологических, биохимических, физико-химических и биотехнологических методов. Результаты исследований очень подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики. Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу.

Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических фундаментальных вопросов классической микологии и биохимии микроорганизмов, а также прикладных биотехнологических задач по поиску продуцентов ферментов и эффективных подходов к получению ферментных препаратов и биопрепаратов для утилизации отходов нового поколения. Возможность использования ферментного потенциала микроскопических грибов отдела рассматривается как перспективный источник альтернативы бактериальным ферментным препаратам, а также химическим и физическим методам переработки трудноразлагаемых органических отходов.

Структура диссертационной работы изложена на 129 страницах, содержит 12 таблиц, 43 рисунка, 267 литературных источника (4 - на русском и 263 - на английском языке) и 4 приложения. Диссертация написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов, рекомендаций, списка литературы и приложения. В главе 1 приводится детальный обзор, касающийся характеристики различных типов кератинов и структуры белков. Во второй части обзора затронуты вопросы, касающиеся ферментов кератиназ и теории кератинолиза, описаны их свойства, продуценты и биотехнологический потенциал. В финальной части литературного обзора обобщены литературные сведения о микроскопических грибах как продуцентах кератинолитических

ферментов и Способы увеличения биосинтеза кератиназ микромицетного происхождения.

В главе 2 и приложениях представлена исчерпывающая информация по объектам и материалам исследования, а также всех используемых автором в диссертационной работе методик, включающих современные микробиологические, микроскопические, биотехнологические, молекулярные, а также обширный блок биохимических и химических исследований. Глава 3 разделена диссертантом на ряд подглав (3.1 – 3.12), согласно поставленным ранее задачам, и прекрасно иллюстрирована - во всех подглавах в качестве подтверждения имеется подробный материал, представленный в виде микрофотографий, графиков и таблиц с результатами, полученными соискателем. В подглавах 3.1 – 3.3 автором оценивается способность к синтезу кератинолитических протеаз среди коллекционных культур микромицетов разных родов и видов на твердых и жидких питательных средах, содержащих различные типы кератинов, 10 культур микромицетов из 32 показали возможность к гидролизу кератина. Высокие значения энзиматических индексов на всех трёх средах показали четыре штамма, а именно *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* А6, *A. ochraceus* 247 и *Cladosporium sphaerospermum* 1779. Для этих культур исследована возможность накопления кератиназ на разных жидких средах с разными источниками азота, в результате которой отобран штамм *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и установлено, что кератиназы микромицета обладают наиболее высоким уровнем накопления при использовании кератина и неорганического азота в составе питательной среды. Подглавы 3.4 – 3.7 объединяют результаты многоступенчатого скрининга на способность образовывать кератинолитические ферменты у микромицетов, выделенных автором из накопительных субстратов, содержащих кератин и почвенные образцы различных регионов. Идентифицированы 22 новых штамма микромицетов из накопительных культур кератинолитических микроорганизмов. Данные морфолого-культуральной идентификации

показали, что выделенные грибы относились к 8 родам отдела Ascomycota, а именно *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolyposcladium* и *Trichoderma*. Отобран лидерный штамм – продуцент кератиназ, а изучение динамики накопления целевых протеаз *T. inflatum* ST1 на ферментационной среде с перемолотым куриным пером и измельченной свиной щетиной показало, что максимум кератинолитической активности (78.8 Е) приходится на 4 сутки культивирования. **Подглавы 3.8 – 3.9** включают результаты сравнительного исследования кератиназной активности и самих ферментов кератиназ двух лидерных продуцентов – коллекционного *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1, отобранных ранее в ходе работы. Диссертантом показано, что одностадийность культивирования, отсутствие необходимости в активном перемешивании и использовании пеногасителей и высокая активность *A. clavatus* ВКПМ F-1593 позволяет считать ТФК потенциально одним из наиболее многообещающих подходов к биодegradации кератинсодержащих отходов как с точки зрения воздействия на окружающую среду, так и по энергоемкости и рентабельности процесса. При создании твердофазных условий для выращивания микромицета *T. inflatum* ST1 максимальный уровень целевой активности достигался на 7 сутки культивирования: казеинолитическая активность – 73.7 Е, кератинолитическая активность – 44.3 Е, что значительно ниже активности, проявленной продуцентом при глубинном культивировании. Способность микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 расти на кератинсодержащих отходах сельского хозяйства, приводя к их гидролизу, а также высокая активность его кератиназ, стабильных в широком диапазоне температуры и рН (25-45°C и рН 4-11) говорит о перспективности разработки коммерческих препаратов как на основе самой культуры, так и на основе очищенных ферментов. В **подглавах 3.10 - 3.11** описаны результаты выделения, очистки и физико-химических характеристик кератиназ двух отобранных штаммов. **Заключительная подглава 3.12** включает результаты исследования свойств трех протеаз с кератинолитической активностью микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593.

Результаты ингибиторного анализа указывают на то, что кератиназы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 являются сериновыми, так как только два ингибитора уменьшали активность ферментов: PMSF ингибировал активность протеаз на 60-100%, кроме того, применение ЭДТА привело к снижению активности на 20-30%. Другие ингибиторы значимо не влияли на активность протеаз. Автором показано, что кератиназа *A. clavatus* ВКПМ F-1593 с рI 9.3 и молекулярной массой около 27 кДа обладает наибольшей активностью гидролиза кератина при 50 °С, а рН-оптимум этого процесса соответствует 8. Автором в диссертационной работе представлено «**Заключение**», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, среди которых 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова и один патент РФ на изобретение.

Диссертационная работа Тиморшиной С.Н. заслуживает высокой оценки, однако есть ряд замечаний, которые не снижают этой оценки, но могут быть полезны автору в последующей работе:

1. Неясно, по какому принципу первоначально были отобраны для изучения способности к синтезу кератиназ 32 коллекционных штамма? В методической части нет четкого обоснования выбора для исследования определенных видов и родов для коллекционных культур, с которыми работала соискатель.
2. Рисунок 7 – схема исследования. Неудачный термин «новые» штаммы. Как правило, для вновь изолируемых культур в научной литературе используется термин «свежевыделенные» изоляты/культуры.

3. Автором в автореферате и диссертации в части «новизна исследования», утверждается, что для двух видов грибов «впервые была показана способность секретировать кератинолитические протеазы», однако в автореферате на стр. 23 автор пишет, что «для вида *A. clavatus* показано наличие в геноме гена кератинолитической металлопротеазы, которая была синтезирована путём рекомбинантной экспрессии в *Pichia pastoris* X-33 (Qiu et al., 2022)» Очевидно, что в случае вида *A. clavatus* в разделе новизна следовало уточнить, что речь идет о сериновой кератиназе, синтезируемой штаммом.

Вышесказанное не уменьшает научной ценности работы, диссертация Тиморшиной С.Н. отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода.

### **Заключение**

Диссертационная работа Тиморшиной Светланы Наильевны выполнена на современном методическом уровне и представляет собой масштабное исследование. Полученные диссертантом данные не вызывают сомнений и вносят ценный вклад в современное представление специалистов о кератинолитической способности микромицетов, свойствах кератиназ грибов. Ферментные препараты могут найти применение в биодegradации отходов животноводства и других отраслях экономики. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11. Микробиология; 1.5.6. – Биотехнология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой

степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Тиморшина Светлана Наильевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология; 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам).

**Официальный оппонент:**

доктор биологических наук, доцент, заместитель  
директора по научной работе, заведующая  
лабораторией таксономического изучения и  
коллекции культур микроорганизмов отдела  
микробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт по изысканию новых антибиотиков имени  
Г.Ф. Гаузе»

Садыкова Вера Сергеевна \_\_\_\_\_

26.11.2024

**Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:** 03.02.12 – Микология; 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**Контактные данные:** тел. +7(499) 255-20 -13 e-mail: [sadykova](mailto:sadykova)

Адрес организации: 119021, Москва,

ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Отзыв Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА», к.х.н.

О.В. Кисиль