

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**

Актуальность темы исследования

Микробные ферменты занимают значительное место в биотехнологической промышленности, и протеазы составляют около шестидесяти процентов всего рынка ферментных препаратов. Микробные кератиназы – это универсальные протеазы, использование которых постоянно набирает обороты в биотехнологии благодаря их способности и эффективной биоконверсии отходов, богатых кератином, и экологичности производства. Биодegradация кератиновых материалов с помощью кератиназ расширяет перспективы использования экономически эффективных агропромышленных отходов в качестве легкодоступных субстратов для производства продуктов высокой ценности. Благодаря своему широкому спектру активности, кератиназы считаются эффективной альтернативой химическим и термическим способам обработки вторичных отходов различных промышленных производств, богатых белком. Среди такого вторичного белкового сырья особое внимание уделено кератинсодержащим материалам (перьям, волосам, рогам и т.д.), утилизация которых в жестких условиях кислотного/щелочного гидролиза или сжигания не считается экологически безопасной. Микробные кератинолитические ферменты позволяют расщеплять кератин в мягких условиях, в результате чего образуются гидролизаты кератина, содержащие аминокислоты и биоактивные пептиды. В связи с этим работа Тиморшиной С.Н., посвященная поиску новых продуцентов кератиназ и определению условий, влияющих на их синтез, является безусловно актуальной и востребованной.

Степень обоснованности положений и научных выводов, выносимых на защиту

Основные положения и выводы диссертационной работы сделаны по результатам экспериментов с применением методов микробиологии, генетики и молекулярной биологии. Работа выполнена с использованием современных методов исследования и соответствующего оборудования, реактивов и материалов. Научные результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями, не противоречат теоретическим знаниям в области микробной энзимологии и не вызывают сомнений. В связи с этим достоверность положений и научных выводов является обоснованной.

Научная новизна и значимость исследования

Диссертантом проведен скрининг микромицетов 11 родов отдела Ascomycota, способных секретировать протеолитические ферменты с кератинолитической активностью: *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Tolyposcladium*, *Trichoderma* и *Ulocladium*. Были выделены 22 новых почвенных штамма с кератинолитической активностью, способных гидролизовать куриное перо, в курятниках степной и парковых зонах Воронежской области, Республики Крым и города Москва. Отобрано 10 штаммов с наибольшим кератинолитическим потенциалом: *Aspergillus amstelodami* A6, *A. clavatus* ВКПМ F-1593, *A. ochraceus* ST2, *A. ochraceus* 247, *A. versicolor* C51, *Cladosporium pseudocladosporioides* C66, *C. sphaerospermum* 1779, *Keratinophyton terreum* C106, *Penicillium sizovae* C11 и *Tolyposcladium inflatum* ST1. При глубинном культивировании штаммы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1 проявили наибольшую кератинолитическую активность. Впервые показана способность секретировать кератинолитические протеазы *Aspergillus clavatus* и *Tolyposcladium inflatum*. Впервые показана способность к синтезу таких ферментов представителем рода *Tolyposcladium*. Впервые показано повышение удельной кератинолитической и казеинолитической активности у штамма *A. clavatus* ВКПМ F-1593 на куриных перьях и свиной щетине при

переходе с глубинного на твердофазное культивирование. Установлено, что фермент с кератинолитической активностью микромицета *T. inflatum* ST1 обладал низкой специфичностью к кератину. Показано, что при культивировании *A. clavatus* ВКПМ F-1593 в трех различающихся условиях образуются 3 протеазы с кератинолитической активностью, рI 9.3 и молекулярной массой 27 кДа, но с разными свойствами.

Теоретическая и практическая значимость работы

Конверсия перьев и других побочных продуктов в белковые гидролизаты может иметь промышленное и коммерческое значение. Гидролизаты перьев могут быть использованы в качестве почвенных органических удобрений, кормовых добавок, косметических составов и при производстве биотоплива. Традиционные методы гидролиза требуют значительных затрат энергии, а также снижают содержание аминокислот и показатели потребления чистого белка. Посредством микробного гидролиза перьев тоже можно генерировать биоактивные пептиды. Использование богатых белком отходов мясной промышленности для производства гидролизатов с биологической активностью представляет наибольший интерес для разработки функциональных ингредиентов с повышенной ценностью. Биоконверсия пера с использованием кератинолитических микроорганизмов также целесообразна из-за снижения техногенной нагрузки на окружающую среду.

Структура и основное содержание диссертационной работы

Работа изложена на 129 страницах, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение, список литературы и приложение.

Обзор литературы посвящен структуре и свойствам кератина, сфере применения кератина и гидролизатов кератина, кератинолитическим ферментам и их продуцентам – микромицетам.

Раздел **Материалы и методы** включает объекты исследования, общую схему работы, методы по выделению чистых культур кератинолитических микромицетов, их молекулярно-генетической идентификации, определению

кератинолитической активности в условиях глубинного и твердофазного культивирования, выделению комплексного протеолитического фермента, изучению условий культивирования на активность протеазы, статистическому анализу результатов.

Раздел **Результаты и обсуждения** посвящен первичному и вторичному скринингу коллекционных штаммов микромицетов; выделению чистых культур кератинолитических микромицетов и их молекулярно-генетической идентификации, изучению динамики синтеза протеаз при глубинном и твердофазном культивировании, изучению способности деградации куриного пера и шерсти, получению и разделению комплексных препаратов внеклеточных белков и изучению их субстратной специфичности, влиянию условий культивирования и ингибиторов на активность протеаз, гликозилированию и физико-химическим свойствам.

В разделах **Выводы** и **Заключение** представлены основные выводы, которые логично резюмируют приведенные в диссертации материалы исследований, полностью отвечают на вопросы, поставленные в цели и задачах работы.

Список литературы содержит 267 литературных источника (4 – на русском и 263 – на английском языке).

Раздел **Приложения** содержит 4 приложения: Коллекционные штаммы микромицетов, использованные в исследовании; Штаммы микромицетов, выделенные из накопительных культур кератинолитиков; Питательные среды и условия культивирования микромицетов; Праймеры, использованные при молекулярно-генетической идентификации микромицетов.

Результаты исследований Тиморшиной С.Н. опубликованы в виде 4 печатных работ, 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. Автореферат диссертации и публикации соискателя полностью отражают содержание диссертации.

Пожелания и замечания

Диссертационная работа Тиморшиной Светланы Наильевны заслуживает высокой оценки, однако есть ряд пожеланий и замечаний, которые не снижают этой оценки, но могут быть полезны автору в последующей работе.

1. В работе рассматриваются кератинолитические активности микромицетов. В природе существуют и представители других таксонов, проявляющих кератинолитическую активность, описанную в литературе. Проводилось ли сравнение этих активностей?

2. В диссертации проводилось изучение штаммов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Были ли депонированы вновь выделенные штаммы в Международную коллекцию ВКПМ?

3. Не указаны условия и режимы глубинного культивирования штаммов, оборудование (стр. 69, стр. 47 п 2.6.1).

4. Не представлено описание картины изменений пера, полученной методом сканирующей электронной микроскопии (стр. 79–80).

5. Не указана предварительная подготовка куриного пера для гидролиза (промывка, сушка, степень измельчения), которая также влияет на глубину его гидролитических изменений.

6. Не ясно, какая технология в итоге рекомендуется для внедрения в промышленность – глубинного или твердофазного способа культивирования штаммов-продуцентов или с использованием ферментного протеолитического препарата, который предварительно нужно осадить, очистить и высушить, и какой способ экономически более целесообразен.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология,

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 и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент: доктор технических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологии и биоорганического синтеза Института прикладной биотехнологии и пищевой инженерии имени академика РАН И.А. Рогова ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

Машенцева Наталья Геннадьевна _____

Контактные данные: тел.: +7-916- _____, e-mail: natali

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ

Адрес места работы: 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». MashencevaNG@mgupp.ru, +7(499)750-01-11, доб. 6883

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»,

член-корреспондент РАО

Галина Ивановна Ефремова _____

08.11.2024г.