

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

Диссертационная работа Тиморшиной С.Н. посвящена исследованию кератинолитических ферментов микромицетов, способных разрушать сложные биополимеры, такие как кератин, представляющий собой трудноразлагаемый белок с многочисленными дисульфидными связями. Эти связи затрудняют гидролиз кератина, и поэтому требуется поиск эффективных продуцентов кератиназ, которые могли бы ускорить процесс биodeградации кератинсодержащих отходов. Ферменты, разрушающие кератин, широко синтезируются бактериями, археями и грибами, но именно микромицеты представляют особый интерес благодаря простоте культивирования и широкому спектру их протеолитической активности.

Актуальность исследования обусловлена потребностью в ферментах для переработки отходов сельского хозяйства и промышленности, а также в кератиназах для биотехнологий, медицины и косметологии. До сих пор недостаточно изучены грибные продуценты кератиназ, не относящиеся к дерматофитам, поэтому изучение микромицетов из отдела Ascomycota становится перспективным направлением. Исследования бактериальных кератиназ уже привели к созданию ряда коммерческих препаратов, но они не покрывают потребности всех отраслей экономики, что подчеркивает значимость поиска новых источников этих ферментов.

Диссертационная работа С.Н. Тиморшиной изложена на 129 страницах и содержит 43 рисунка и 12 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, перечня публикаций и списка цитируемой литературы, включающего 267 источников, в том числе 263 – на иностранных

языках и четырёх приложений.

Обзор литературы состоит из 5 разделов. В нем приведены сведения о структуре и свойствах кератина, описаны особенности α -кератина в шерсти и β -кератина в перьях, а также кератинолитические ферменты, их природа и биотехнологический потенциал. Обсуждаются различные сферы применения кератина, включая заживление ран, тканевую инженерию и системы доставки лекарств. Отдельное внимание уделено гидролизатам кератина и их использованию, а также микроскопическим грибам как продуцентам кератиназ, с описанием методов повышения синтеза этих ферментов. Обзор литературы изложен подробно и хорошо структурирован, и позволяет получить достаточно полное представление о современном состоянии исследуемой проблемы.

К достоинствам обзора литературы следует отнести его емкость и содержательность: использована современная литература, практически каждое утверждение подтверждено ссылкой на отдельный источник.

Вторая глава описывает **Материалы и Методы**, которые автор использовала в работе. Содержание главы свидетельствует о применении современных подходов, которые адекватны поставленным задачам, а также о большом объеме выполненной экспериментальной работы. Описан довольно широкий спектр экспериментальных методов, что говорит о хорошей методической подготовке диссертанта и позволяет быть уверенным в достоверности полученных им результатов. Методы изложены очень подробно: хорошо описаны как классические микробиологические методы, так и методы биохимические и молекулярно-генетические. Проведен статистический анализ данных, использованы соответствующие задаче критерии.

Глава «Результаты исследований и их обсуждения» содержит полученные в процессе исследований новые данные анализа микромицетов родов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Keratinophyton*,

Pseudallescheria, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* и *Trichoderma*, отобранных из коллекции и из природных накопительных культур. Первичный скрининг этих грибов был проведен с использованием агаризованных сред с казеином, кератином и желатином, что позволило выявить активных продуцентов внеклеточных протеаз. В результате 10 из 54 штаммов показали способность к гидролизу кератина, из которых наиболее перспективными для дальнейших исследований оказались *A. clavatus* ВКПМ F-1593, *K. terreum* C106 и *T. inflatum* ST1. Вторичный скрининг выявил специфические особенности активности ферментов при росте на различных средах и в различных условиях культивирования, что позволяет гибко подходить к оптимизации их секреции для биотехнологических целей.

Заслугой автора можно считать выявленные физико-химические свойства кератиназ. Установлено, что ферменты *A. clavatus* ВКПМ F-1593 отличаются высокой специфичностью к кератину и стабильностью в широком диапазоне температур и pH. Наилучшие показатели активности были получены при культивировании штамма на среде с кератином и нитратом натрия, что подтверждает важность подбора оптимальных условий для наработки ферментов. Эти кератиназы устойчивы к изменению условий внешней среды, что делает их подходящими для промышленного применения в различных условиях.

Одним из значимых результатов исследования является демонстрация возможности использования различных отходов животноводства, таких как куриные перья и свиная щетина, для культивирования штаммов, обеспечивая наработку активных кератиназ. Такой подход позволяет создать экологически безопасные технологии переработки отходов животноводства. Было установлено, что ферменты, полученные при культивировании на этих субстратах, обладают различной субстратной специфичностью, что открывает перспективы их применения в различных промышленных процессах.

Работа также подчеркивает важность изучения регулирования синтеза кератиназ у микромицетов, которое может зависеть от состава питательной среды. Например, кератиназы *A. clavatus* ВКПМ F-1593 показали высокую активность при росте на смеси органического и неорганического азота, а *T. inflatum* ST1 эффективен при использовании только органического азота. Эти данные позволяют гибко подбирать условия культивирования для достижения максимальной целевой активности ферментов, что может быть полезным при разработке коммерческих препаратов.

Заключительные выводы подчеркивают значимость исследования в расширении представлений о разнообразии и свойствах кератинолитических ферментов у микромицетов, а также перспективность их использования в переработке кератинсодержащих отходов. Штамм *A. clavatus* ВКПМ F-1593 был признан перспективным кандидатом для разработки биотехнологий переработки отходов, поскольку его ферменты проявляют высокую стабильность и активность в широком диапазоне температур и pH. Эти ферменты могут найти применение в биодegradации отходов животноводства, а также в медицине, косметологии и других отраслях, что делает данное исследование актуальным и практически значимым.

На основании полученных многочисленных результатов автором в разделе Заключение приведены убедительные выводы и доказана целесообразность работ по экологизации процессов переработки белковых отходов агропромышленного комплекса и применению малоопасных штаммов мицелиальных грибов, способных расти на кератинсодержащих отходах и синтезировать кератинолитические ферменты.

Вместе с тем имеются некоторые вопросы и пожелания:

Не указано точное количество спорового материала, внесённого в пробу для каждого вида при анализе кератинолитической активности. Уточнение этой информации позволило бы лучше понять условия эксперимента и

обеспечить его воспроизводимость. Кроме того, *Tolyposcladium inflatum* и *Cladosporium cladosporioides* демонстрируют более медленные скорости роста по сравнению с представителями рода *Aspergillus*. Может ли этот факт быть связан с их более низкой кератинолитической активностью? Уточнение этих взаимосвязей помогло бы оценить факторы, влияющие на активность штаммов.

В то же время очевидно, что приведенные выше замечания не носят принципиальный характер и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Подводя итоги, следует отметить, что рецензируемая диссертационная работа представляет собой полноценное завершенное исследование, в котором получены новые интересные данные о применении видов рода *Aspergillus* в качестве продуцентов кератиназ. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с привлечением современных методов исследования.

В целом работа С.Н. Тиморшиной представляет собой актуальное научно-квалификационное исследование, выполненное на хорошем техническом уровне с использованием современных методов и имеющее несомненную потенциальную востребованность и фундаментальную значимость.

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 (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 и 1.5.6. Биотехнология.

Старший научный сотрудник кафедры микологии и альгологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кандидат биологических наук (научная специальность 03.02.12 - Микология)

Кокаева Людмила Юрьевна
18.11.2024 г.

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет
119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
Тел.: +7 (495) 939-54-80
Эл. почта: kocaeу
Адрес: <https://www.bio.msu.ru>

Подпись к.б.н., с.н.с. Кокаевой Л.Ю. заверяю: