

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА МГУ.015.2

по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

Решение диссертационного совета от «10» декабря 2024 г. № 66

О присуждении **Тиморшиной Светлане Наильевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Протеазы микромицетов с кератинолитической активностью: новые продуценты и свойства» по специальностям 1.5.11. Микробиология (биологические науки) и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки) принята к защите диссертационным советом 29.10.2024 г., протокол № 64.

Соискатель **Тиморшина Светлана Наильевна**, 1996 года рождения, в период с 01.10.2020 г. по 30.09.2024 г. проходила обучение в очной аспирантуре ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» на кафедре микробиологии биологического факультета по направлению 06.06.01. – Биологические науки.

Соискатель работала на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ в лаборатории физиологии и биохимии микробов в должности младшего научного сотрудника с 12.06.2022 г. по 13.09.2024 г. Соискатель работает в ООО «Сенеж-препараты» в должности начальника микробиологической лаборатории с 16.09.2024 г. по настоящее время.

Диссертация выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель – кандидат биологических наук Осмоловский Александр Андреевич, доцент кафедры микробиологии, биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Садыкова Вера Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе» («НИИНА»), заместитель директора по научной работе, отдел микробиологии, лаборатория таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов, заведующая лабораторией;

Машенцева Наталья Геннадьевна, доктор технических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Институт прикладной

биотехнологии и пищевой инженерии имени академика РАН И.А.Рогова, кафедра биотехнологии и биоорганического синтеза, профессор;

Кокаева Людмила Юрьевна, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра микологии и альгологии, старший научный сотрудник

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 18 опубликованных научных работ, в том числе 4 публикации по теме диссертации, из них 3 статьи (объемом 2,6 п.л.), опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология и один патент РФ. По решению диссертационного совета патент на изобретение приравнивается к публикациям, в которых излагаются основные научные результаты диссертации на соискание учёной степени:

Статьи

1. **Тиморшина С.Н.**, Попова Е.А., Галиакберова А.А., Очнева А.Г., Осмоловский А.А. Протеолитические ферменты микромицетов рода *Aspergillus*, гидролизующие фибриллярные белки, для биомедицины и биотехнологических процессов // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2022. — Т. 77, № 3. — С. 195–200. (ИФ РИНЦ = 0,631). [**Timorshina S.N.**, Popova E.A., Galiakberova A.A., Ochneva A.G., Osmolovskiy A.A. *Aspergillus* proteolytic enzymes hydrolyzing fibrillar proteins for biomedicine and biotechnological processes // Moscow University Biological Sciences Bulletin. — 2022. — Vol. 77, № 3. — P. 178–183. DOI: 10.3103/S0096392522030099 (SJR – 0,183, Q 3)] Вклад автора в печатных листах: (0,66/0,46) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **Timorshina S.**, Popova E., Kreyer V., Baranova N., Osmolovskiy A. Keratinolytic properties of *Aspergillus clavatus* promising for biodegradation // International Journal of Environmental Research and Public Health. — 2022. — Vol. 19, № 21. — P. 13939. DOI: 10.3390/ijerph192113939 (SJR – 0,808, Q 2) (1,19/1,00).
3. **Тиморшина С.Н.**, Попова Е.А., Кулешова К.И., Акьол А.К., Осмоловский А.А. Кератинолитический потенциал микромицета *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593 и сравнение его ферментов с коммерческим препаратом кератиназы // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2023. — Т. 78, № 4. — С. 250–257. (ИФ РИНЦ – 0,631) [**Timorshina S.N.**, Popova E.A., Kuleshova K.I., Akyol A.K., Osmolovskiy A.A. Keratinolytic potential of the micromycete *Aspergillus clavatus*

VKPM F-1593 and comparison of its enzymes with the commercial keratinase preparation // Moscow University Biological Sciences Bulletin. — 2023. — Vol. 78, № 4. — P. 225–231. DOI: 10.3103/S0096392524600418 (SJR – 0,183, Q 3)] (0,76/0,46).

Патент РФ

Тиморшина С.Н., Осмоловский А.А., Александрова А.В. Штамм *Aspergillus clavatus* – продуцент протеолитических ферментов с кератинолитической активностью // Патент на изобретение RU 2774366 С 1, дата регистрации 17.07.2022. Заявка № 2021133704 от 19.11.2021.

На диссертацию и автореферат поступило 5 дополнительных отзывов, все положительные.

Выбор официальных оппонентов обосновывался компетентностью в соответствующей отрасли науки и наличием публикаций в соответствующей сфере исследования: Садыкова Вера Сергеевна является ведущим специалистом в области микологии, микробиологии и биотехнологии; Машенцева Наталья Геннадьевна является ведущим специалистом в области микробиологии и энзимологии, а также в области биотехнологического получения кормовых добавок; Кокаева Людмила Юрьевна является ведущим специалистом в области микологии и таксономии.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований показано, что:

кератинолитическая активность широко распространена среди микромицетов отдела *Ascomycota*: 10 штаммов микроскопических грибов, относящихся к 5 родам, проявили высокий кератинолитический потенциал при поверхностном культивировании, а именно *Aspergillus clavatus* ВКПМ F-1593, *A. amstelodami* А6, *A. ochraceus* 247, *A. ochraceus* ST2, *A. versicolor* С51, *Cladosporium pseudocladosporioides* С66, *C. sphaerospermum* 1779, *Keratinophyton terreum* С106, *Penicillium sizovae* С11 и *Tolypocladium inflatum* ST1.

A. clavatus ВКПМ F-1593, *K. terreum* С106 и *T. inflatum* ST1 обладают высоким уровнем секреции кератинолитических ферментов при глубинном культивировании. Величина кератинолитической и общей протеолитической активности этих культур зависит от источников азота в питательной среде: для повышения накопления целевых ферментов штаммами *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *K. terreum* С106 необходимо использование смешанных источников азота – органического (кератиновый субстрат) и неорганического

(нитрат), для стимуляции синтеза кератиназ микромицетом *T. inflatum* ST1 нужен лишь источник органического азота.

Кератинолитическая протеаза микромицета *T. inflatum* ST1 с pI 5.6 и молекулярной массой около 31 кДа обладает высокой общей протеолитической активностью, однако неспецифична по отношению к кератину и наиболее активно гидролизует субстрат, содержащий остаток положительно заряженной аминокислоты в положении P1 – H-D-Val-Leu-Lys-pNA.

A. clavatus ВКПМ F-1593 активно секретирует кератиназы на белковых отходах агропромышленного комплекса (курином пере и свиной щетине) как при глубинном, так и при твердофазном культивировании. При разных условиях роста штамм синтезирует кератиназы с различными свойствами. Протеазы с кератинолитической активностью, наработанные при глубинном культивировании продуцента, а также твердофазном культивировании на курином пере обладают высокой специфичностью к кератину и хромогенному пептидному субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNA. Кератинолитическая протеаза, синтезируемая микромицетом при росте на свиной щетине, показывает высокую общую протеолитическую активность и с высокой специфичностью расщепляет хромогенный пептидный субстрат H-D-Val-Leu-Lys-pNA.

Все выделенные кератиназы микромицета *A. clavatus* ВКПМ F-1593 стабильны в широком диапазоне температуры и pH, обладают наибольшей активностью гидролиза кератина при 50 °С, а pH-оптимум этого процесса соответствует 8.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что *A. clavatus* ВКПМ F-1593 является перспективным продуцентом кератинолитических ферментов.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Способность к росту на кератинсодержащих субстратах широко распространена среди микромицетов отдела *Ascomycota*, в том числе среди грибов родов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* и *Penicillium*;
2. Синтез протеолитических ферментов с кератинолитической активностью, а также их специфичность по отношению к кератину у микромицетов отдела *Ascomycota* зависят как от природы кератинсодержащего субстрата (куриное перо или свиная щетина) и наличия дополнительного источника азота, так и от способа культивирования продуцента (глубинное, твердофазное или в иммобилизованном состоянии);

3. Новые кератинолитические протеазы, синтезируемые продуцентами *A. clavatus* ВКПМ F-1593 и *T. inflatum* ST1 при оптимальных для них способах и условиях культивирования, различаются своими физико-химическими свойствами, оптимумами активности и стабильности, а также специфичностью к субстрату;
4. Регуляция условий культивирования *A. clavatus* ВКПМ F-1593 позволяет контролировать и изменять свойства секретируемых кератиназ, что может быть использовано при разработке разнонаправленных коммерческих препаратов.

На заседании 10.12.2024 г. диссертационный совет принял решение присудить Тиморшиной С.Н. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология и 7 докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 21, против – нет, не действительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета МГУ.015.2,
доктор биологических наук, профессор

Нетрусов А.И.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.б.н.

Костина Н.В.

10.12.2024 г.