

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Заюлиной Ксении Сергеевны «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.**

Решение диссертационного совета от 30 июня 2022 г. №6 о присуждении Заюлиной Ксении Сергеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Заюлиной Ксении Сергеевны «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз» по специальности – 1.5.11. – Микробиология принята к защите 28 апреля 2022 г. протокол № 4 диссертационным советом 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г. (с учетом переименования Совета от 03.06.2021 г. №561/нк).

Соискатель Заюлина Ксения Сергеевна, 1993 года рождения, гражданка РФ, в 2015 г. окончила ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности микробиология. В период 2015-2019 гг. проходила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН). С 2015 г. работает младшим научным сотрудником в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии РАН. Диссертационная работа Заюлиной Ксении Сергеевны «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз» выполнена в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.

Научный руководитель – Кубланов Илья Валерьевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, Грабович Маргарита Юрьевна, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» и кандидат биологических наук, Тутукина Мария Николаевна, старший научный сотрудник Центра молекулярной и клеточной биологии, Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» дали положительные отзывы.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, ФГБУН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» - в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа Заюлиной К.С., посвященная исследованию новых термостабильных и термоактивных гликозидаз из органотрофных гипертермофильных архей, выделенных из различных термальных источников, является завершенной научно-квалификационной работой. Диссертационная работа соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а сама автор, Заюлина К.С., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии. Так, доктор биологических наук Грабович Маргарита Юрьевна известна своими исследованиями в области физиологии, таксономии и биохимии бактерий цикла серы. Кандидат биологических наук Тутукина Мария Николаевна известна своими работами в области исследований молекулярно-биологических особенностей бактерий и их описания. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области таксономии и филогении микроорганизмов, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. Gavrillov S.N., Stracke C., Jensen K., Menzel P., Kallnik V., Slesarev A., Sokolova T., **Zayulina K.**, Brasen K., Bonch-Osmolovskaya E.A., Peng X., Kublanov I., Siebers B. Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319X1 and its unusual multidomain glycosidase // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7 – 552 – doi: 10.3389/fmicb.2016.00552.2.

2. Bonch-Osmolovskaya E.A., Elcheninov A.G., **Zayulina K.S.** and Kublanov I.V. New thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities // *Microbiol. Austral.* – 2018. – V. 39 – № 3 – P. 122-125 – doi: 10.1071/MA18038.
3. **Zayulina K.S.**, Kochetkova T.V., Piunova U.E., Ziganshin R.H., Podosokorskaya O.A., Kublanov I.V. Novel hyperthermophilic crenarchaeon *Thermofilum adornatum* sp. nov. uses GH1, GH3, and two novel glycosidases for cellulose hydrolysis // *Front. Microbiol.* – 2020 – V. 10 – №2972 – doi: 10.3389/fmicb.2019.02972
4. **Zayulina K.S.**, Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Kublanov I.V. Complete genome sequence of a hyperthermophilic archaeon, *Thermosphaera* sp. strain 3507, isolated from a Chilean hot spring // *Microbiol. Resour. Announc.* – 2020 – V. 9 – № 50 – e01262-20 – doi: 10.1128/MRA.01262-20
5. **Zayulina K.S.**, Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Kochetkova T.V., Novikov A.A., Blamey J.M., Kublanov I.V. Novel hyperthermophilic crenarchaeon *Infirmifilum lucidum* gen. nov. sp. nov., reclassification of *Thermofilum uzonense* as *Infirmifilum uzonense* comb. nov. and assignment of the family *Thermofilaceae* to the order *Thermofilales* ord. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2021 – V. 44 – № 4 – 1126230 – doi: 10.1016/j.syapm.2021.126230
6. Klaus T., Ninck S., Albersmeier A., Busche T., Wibberg D., Jiang J., Elcheninov A., **Zayulina K.**, Kaschani F., Bräsen C., Overkleeft H. S., Kalinowski J., Kublanov I., Kaiser M. and Siebers B. Activity-based protein profiling for the identification of novel carbohydrate-active enzyme involved in xylan degradation in the hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319x1E // *Front. Microbiol.* – 2021 – V. 12 – 734039 – doi: 10.3389/fmicb.2021.734039

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: 1) X Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2015), 2) международной конференции «Thermophiles» (Сантьяго, Чили, 2015), 3) V съезде биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016), 4) молодежной научно-практической школе «NorthBiotechYoung 2017» (Архангельск, Россия, 2017), 5) 1-м Российском Микробиологическом Конгрессе (Пушино, Россия, 2017), 6) международной конференции «Bioinformatics: from algorithms to applications» (Санкт-Петербург, Россия, 2018), 7) 8th Congress of European Microbiologists FEMS2019 (Глазго, Великобритания, 2019), 8) 2-ом Российском Микробиологическом Конгрессе (Саранск, Россия, 2019) и 9) 3-ем Российском Микробиологическом Конгрессе (Псков, Россия, 2021)

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

#### **На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Грабович М.Ю., (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

1. Автором внесен существенный вклад в систематику архей: на основании фенотипических и геномных различий *Thermofilaceae*, штамм 3507LT и его родственников, был предложен новый род и вид *Infirmifilum lucidum*, предложено выделение семейства *Thermofilaceae* в новый порядок - *Thermofilales* в пределах класса *Thermoprotei* филума *Crenarchaeota*. Однако в выводах об этом не говорится, хотя это одно из достоинств работы диссертанта.

2. На схемах метаболизма углеводов (рис. 30, 35) показаны различия в экспрессии генов, выявленных при протеомном анализе: были выявлены белки-ферменты, экспрессия генов которых увеличивалась, снижалась или не изменялась. Как известно, скорость превращения субстрата в метаболическом пути будет лимитироваться реакцией с самой низкой скоростью. Каков физиологический смысл увеличения экспрессии отдельных генов при сохранении скорости экспрессии большинства генов, кодирующих ферменты, участвующих в метаболическом процессе данного субстрата?
3. Автором были получены гомогенные препараты двух гликозидаз и установлено, что эти ферменты различаются по биохимическим свойствам, были ли попытки получить структуры этих ферментов и проанализировать эти данные?

**Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Тутукиной М.Н.,** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания, в основном технические:

- 1) из описания не конца понятно, какой варибельный участок 16S рибосомной РНК был взят для секвенирования? По-видимому, все-таки V3-V4, поскольку именно про него написано в разделе «Материалы и методы». Однако, например, на стр. 72 Результаты и на рис. 17-18 указан участок V4 (при этом в подписи V3-V4). Рис. 21 вообще написано «ген 16S рРНК», что подразумевает амплификацию и секвенирование всего гена целиком. Это важно, поскольку целый ген и участок, например, V4 имеют принципиально разную длину, а значит, и разрешающую способность.
- 2) Непонятно, где и как проводили масс-спектрометрию и как анализировали данные.
- 3) Присутствует некоторая небрежность в оформлении рисунков – так, например, рисунки 6, 7 и 8 было бы логичнее сделать в одном стиле (на рисунках 6 и 7 все названия в виде аббревиатур, а на рисунке 8 – полностью), и возможно, по-русски. Некоторые рисунки абсолютно нечитаемые – как, например, Рис. 4 и Рис. 17. В работе достаточно много барплетов, и было бы логично все сделать в одном стиле. Тут же их огромное разнообразие: рисунок 37 объемный, рисунки 40 и 49 – «плоские», а на рисунке 42 заливка в виде градиента. На рисунке 51 подписи можно было бы сделать рядом с пробами, а не прямо на них.
- 4) Также в работе есть опечатки, в том числе, забавные – например, “Quibit” “glycoladlehyde” (рис. 8)
- 5) Иногда встречаются терминологические неточности – например, «в геноме были найдены белки».

**Отзыв ведущей организации** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» – отзыв положительный. Некоторые замечания и вопросы:

1. Стр. 58 - не приведены последовательности праймеров для амплификации гена мультидоменной целлюлазы/ксиланазы из *Thermococcus* sp. 2319x1 и ее компонентов;
2. Стр. 59 - вместо «Клонирование рекомбинантных ферментов» нужно писать «Клонирование генов рекомбинантных ферментов»;
3. Стр 63 - необходимо использовать либо супернатант, либо культуральная жидкость;

4. Стр. 68 - не представлено описание методов по определению устойчивости гликозидаз к различным детергентам, солям и прочее;
5. Стр. 82. в Методах не описано, каким образом готовили и вносили клеточный фильтрат архей, пояснение в подписи к рисунку малоинформативно;
6. Стр 86, Рис. 21. не указаны значения бутстрепа;
7. Стр 98-99 - активность гликозидаз рассчитана в мкг/мл час. Возможно, если рассчитать на мг белка, она была бы одинакова в клетках, выросших с разными акцепторами;
8. Стр 106 - Какие программы использовались для предсказания локализации белка?
9. Стр 113 - не указано, как строились филогенетические деревья;
10. Стр. 122 и везде - неприемлемо использовать слово «заклонированы» - клонированы.
11. Стр 136, Таблица 26 - не указаны единицы измерения.

Однако замечания, безусловно, носят рекомендательный характер и никоим образом не умаляют достоинств работы.

**На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:**

1. Аксенов А.С. – к.т.н., доцент, профессор кафедры биологии, экологии и биотехнологии ФГАОУ ВПО «Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова». Замечание:  
В работе не прослеживается единая позиция в выборе целлюлозных субстратов. Так, используются целлюлоза без указания происхождения, МКЦ, альфа-целлюлоза, аморфная целлюлоза (в ряде случаев указана как АМЦ), а также эфиры целлюлозы КМЦ и гидроксиэтилцеллюлоза. Чем обусловлен выбор того или иного субстрата в различных экспериментах? Кроме того, представляет интерес применение промышленных образцов (предназначенных не для аналитических целей) древесной целлюлозы/полуцеллюлозы, полученных как сульфатным, так и сульфитным способами.
2. Давранов К.Д. (д.б.н., профессор, директор) и Кондрашева К.В. (к.б.н., ст.н.сотр. лаборатории биохимии и биотехнологии физиологически активных соединений) - Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан. Замечаний нет.
3. Данилова И.В. – к.б.н., доцент кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; Замечаний нет.
4. Земская Т.И. (д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории микробиологии углеводов) и Павлова О.Н. (к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии углеводов) ФГБУН Лимнологический институт СО РАН. Замечаний нет.
5. Карначук О.В. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Томского государственного университета. Замечаний нет.
6. Качмазов Г.С. – к.вет.н., доцент кафедры товароведения и технологии продуктов питания, факультет химии, биологии и биотехнологии. ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова». Замечаний нет.
7. Паршуков А.Н. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории паразитологии животных и растений Института биологии – обособленного подразделения ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр РАН». Замечаний нет.

8. Строева А.Р. - к.х.н., доцент, старший научный сотрудник, кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; Замечаний нет.
9. Зайцева Ю.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экобиомониторинга и контроля качества, доцент кафедры ботаники и микробиологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова». Замечаний нет.
10. Ракитин А.Л. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории систем молекулярного клонирования, Института биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН. Замечаний нет.

Все отзывы положительные.

**Вопросы задавали:** д.б.н. Ивановский Р.Н., д.б.н. Горленко В.М., д.б.н. Мысякина И.С., д.б.н. Варламов В.П., д.б.н. Терешина В.М., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Складнев Д.А., д.б.н. Пименов Н.В.

**В дискуссии приняли участие:** д.б.н. Плакунов В.К., д.б.н. Бонч-Осмоловская Е.А., д.б.н. Пименов Н.В.

**Диссертационный совет отмечает, что** диссертация Заюлиной К.С., посвященная выделению и изучению гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах, и характеристике их новых гликозидаз, является завершенной научной работой.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что сделан существенный вклад в понимание разнообразия архей-полисахаридолитиков, а также действия их гликозидаз. Был охарактеризован ряд штаммов архей-гипертермофилов, которые растут на полисахаридах: *Thermosphaera* sp. штаммы 3507, 3507L и 3507L2, растущие на ксилане, лихенане, ксилоглюкане и крахмале; представитель нового рода и вида *Infirmifilum lucidum* 3507LT, который способен использовать лихенан, ксилоглюкан и крахмал. *I. lucidum* также оказался представителем глубокой линии кренархеот, анализ филогенетического разнообразия которой привел к предложению нового порядка Thermofilales. Был охарактеризован штамм *Thermococcus* sp. 2319x1, который является первой археей, способной расти на ксилоглюкане и первой эвриархеотой, способной расти на ксилане. Для представителей рода *Pyrobaculum* впервые показано потребление сахаров в процессе анаэробного дыхания штаммом 2319x2. У гипертермофильной кренархеоты *Thermofilum adornatum* 1910b с использованием сравнительно-геномного и протеомного подходов были обнаружены четыре гликозидазы, участвующие в гидролизе целлюлозы. Две из них не относятся ни к одному из известных семейств гликозидаз и не имеют родственников с предсказанной функцией. Два других фермента относятся к семействам GH1 и GH3, среди которых нет известных эндоглюканаз. Рекомбинантные гликозидазы, кодируемые этими четырьмя генами, были охарактеризованы: каждый из белков обладал своими особенностями, а их совместное действие дает возможность *T. adornatum* эффективно гидролизовать целлюлозу (и другие полисахариды) и использовать продукты

их гидролиза для роста. Была охарактеризована гликозидаза из *Thermococcus* sp. 2319x1, которая обладает уникальной мультидоменной организацией и широкой субстратной специфичностью. Кроме полной МДГ были выделены и охарактеризованы ее отдельные каталитические домены, обладающие своими особенностями, ввиду чего они дополняют друг друга в процессе деструкции полисахаридов.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики** подтверждается тем, что термостабильные и термоактивные ферменты из гипертермофильных архей могут быть применимы в технологических процессах переработки растительного сырья, которые нередко проводятся при жестких условиях (высокие температуры, присутствие солей или растворителей, экстремальные значения рН). В настоящей работе показано, что каталитические домены МДГ *Thermococcus* sp. 2319x1, которые относятся к гликозидазам из семейства GH12, являются крайне термостабильными ферментами с продолжительным периодом активности при высоких температурах. Особенно стоит отметить фермент GH12-1, время полужизни которого достигает 11 суток при 90°C. Показанная высокая активность и устойчивость к присутствию детергентов делает эти ферменты привлекательными объектами для биотехнологии.

**Оценка достоверности результатов** исследования выявила, что полученные результаты являются воспроизводимыми и достоверными, а выводы – обоснованными. При выполнении диссертационной работы был применен комплекс микробиологических, молекулярно-биологических, биохимических и биоинформатических подходов.

По теме диссертации опубликовано: 17 научных работ, отражающих основные результаты работы, в том числе 6 статей в изданиях, индексируемых в Web of Science и/или Scopus, а также 11 тезисов на научных конференциях. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

**Личный вклад соискателя** состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, включая планирование и постановку экспериментов, обработку и анализ данных, апробацию основных положений работы на различных конференциях, подготовку публикаций по теме работы.

### **Заключение.**

Диссертация **Заюлиной Ксении Сергеевны «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз»** является законченной научно-квалификационной работой, в которой решаются задачи, имеющие значение для развития представлений о функциональном разнообразии и биотехнологическом потенциале гипертермофильных архей.

Работа соответствует профилю Диссовета 24.1.233.02 и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с п. 9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых

степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

На заседании 30 июня 2022 г. Диссертационный совет принял решение присудить **Заюлиной Ксении Сергеевне** ученую степень кандидата биологических наук по специальности – 1.5.11. – Микробиология.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 14 чел., из них 9 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 14, «против» - 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета 24.1.233.02  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Доктор биологических наук

Н.В. Пименов

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.233.02  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Доктор биологических наук



Т.В. Хижняк

30 июня 2022 г.