



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

**ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ
ИМ. С.Н. ВИНОГРАДСКОГО**

119071 РФ, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
117312, РФ, Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7,
корп. 2
Тел. +7 (499) 135-21-39, факс +7 (499) 135-65-30
www.fbras.ru, inmi@inmi.ru

Г
УТВЕРЖДАЮ:

Директор
ФИЦ Биотехнологии РАН,
д.б.н.

А.Н. Федоров

2022 г.



Заключение

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на диссертационную работу Заюлиной К.С. «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз».

Диссертационная работа «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз» была выполнена в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот (Отдел биологии экстремофильных микроорганизмов) Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Заюлина Ксения Сергеевна, 1993 года рождения, в 2015 году окончила Биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова по специальности «Микробиология». С 2015 г. по 2019 г. Заюлина Ксения Сергеевна обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». С 2015 г. Заюлина К.С. работала в Институте микробиологии им. С.Н.Виноградского в должности младшего научного сотрудника.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана 25 февраля 2019 г. в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Тема диссертационной работы утверждена на заседании Ученого совета Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Протокол № 2 от 21.02.2022)

Научный руководитель:

Кубланов Илья Валерьевич, кандидат биологических наук (специальность 03.00.07 Микробиология), заведующий лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот (Институт Микробиологии им. С.Н. Виноградского) Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Подготовленная диссертационная работа Заюлиной К.С. была представлена 11 апреля 2022 года на заседании совместного семинара лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот, лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов и лаборатории молекулярной экологии и филогеномики бактерий Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность темы работы

Гипертермофильными считаются микроорганизмы, оптимум роста которых лежит выше 80°C (Stetter, 1996). Гетеротрофные гипертермофильные археи представлены в трех филумах (*Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* и *Thaumarchaeota* (Kato et al., 2021)), и среди них насчитывается всего 12 родов, культивируемые представители которых способны к росту на полисахаридах, что значительно меньше, чем у бактерий (Medina-Chavez&Travisano, 2022).

Помимо невысокого числа и разнообразия известных полисахаридолитических гипертермофильных архей, достаточно узок и спектр полисахаридов, которые они могут разлагать. В основном это полисахариды с α -гликозидной связью (крахмал, амилоза, декстрины, пуллулан), в то время как на полисахаридах, связанных β -(1-4) гликозидной связью (целлюлоза, ксилан, различные маннаны и бета-глюканы) способны расти лишь единицы. Это связано с тем, что выделение и культивирование новых штаммов гипертермофильных архей сопряжено с рядом трудностей, к которым относятся создание и поддержание необходимых анаэробных условий, подбор физических параметров среды (pH, высокой температуры), поиск и добавление специальных факторов роста (витаминов, микроэлементов, экстрактов).

Актуальность изучения гипертермофильных архей обусловлена присущим им модификациям и новым вариантам метаболических путей, а также высокой стабильности их биомолекул. Белки из гипертермофильных архей являются устойчивыми к высоким температурам, и зачастую также к давлению, экстремальным значениям pH и солености, к присутствию растворителей, детергентов и тяжелых металлов, что подразумевает огромный потенциал этих ферментов в качестве перспективного промышленного инструмента в процессах биотрансформации, протекающих в экстремальных условиях (Bouzas et al., 2006). Все это верно и для гликозидаз, одного из самых востребованных во многих отраслях промышленности классов гидролитических ферментов. Один из наиболее прямых и эффективных путей получения новых высокостабильных гликозидаз – выделение накопительных и чистых культур гипертермофильных микроорганизмов, растущих на полисахаридах, с последующим поиском их гликозидаз с применением омиксных подходов. Такой подход повышает вероятность обнаружения активных и стабильных ферментов с заданными свойствами. При этом выделение новых гипертермофильных архей, способных разлагать полисахариды – крайне нетривиальная задача, что, с одной

стороны, обуславливает невысокое число известных архей с такой способностью, а с другой, делает эту задачу крайне актуальной.

Конкретное участие автора в получении научных результатов

Соискатель принимал участие во всех этапах исследования – от постановки задач и проведения экспериментов до обсуждения полученных данных, подготовки их к публикации и представления на конференциях.

Степень обоснованности научных положений, рекомендаций и выводов, полученных соискателем

Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с использованием современных методов исследования в области микробиологии, биоинформатики и биохимии. Представленные в работе данные являются достоверными, а выводы и положения обоснованными.

Научная новизна работы

Выделен и охарактеризован ряд гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах: штаммы *Thermosphaera* sp. 3507, 3507L и 3507L2, растущие на ксилане, лихенане, ксилоглюкане и крахмале; представитель нового рода *Infirmifilum lucidum* штамм 3507LT, способный утилизировать лихенан, ксилоглюкан и крахмал. На основе филогенетических и фенотипических различий, семейство *Thermofilaceae* (включая *I. lucidum*) реклассифицировано до уровня порядка *Thermofilales*. Охарактеризован штамм *Thermococcus* sp. 2319x1 являющийся первой археей, растущей на ксилоглюкане и первой эвриархеотой, растущей на ксилане. Показано потребление сахаров в процессе анаэробного дыхания для *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2, что показано впервые для представителей рода *Pyrobaculum*. С помощью сравнительно-геномного и протеомного подходов у гипертермофильной кренархеоты *Thermofilum adornatum* 1910b обнаружены четыре гликозидазы, участвующие в разложении целлюлозы, две из которых не относятся ни к одному из известных семейств гликозидаз, и не имеют родственников с предсказанной функцией. Рекомбинантные гликозидазы, кодируемые этими генами, охарактеризованы: две из них представляют новые семейства целлюлаз, а две другие являются первыми целлюлазами в своих семействах. Каждая из них обладала своими особенностями, а их совместное действие обуславливает способность *T. adornatum* расти и эффективно разлагать целлюлозу и другие полисахариды. Выделена и охарактеризована мультидоменная гликозидаза (МДГ) эвриархеоты *Thermococcus* sp. 2319x1, обладающая уникальной доменной организацией и широкой субстратной специфичностью, и ее отдельные каталитические домены.

Практическая значимость работы

Многие технологические процессы переработки растительного сырья нередко проводятся в жестких условиях среды при наличии таких факторов, как высокие температуры, концентрации солей или растворителей, экстремальные значения pH и др., что делает затруднительным и экономически невыгодным использование ферментов из мезофильных и нейтрофильных микроорганизмов ввиду их невысокой стабильности (Kruger et al., 2018, Pramanik et al., 2021). Альтернативой им могут быть ферменты из экстремофильных прокариот, гипертермофильных, в частности, активные и стабильные в различных экстремальных условиях. Обнаруженные в ходе данной работы гликозидазы, благодаря своим уникальным характеристикам, могут найти свое применение в биотехнологии. В данной работе показано, что исследуемые белки из семейства GH12, фрагменты МДГ *Thermococcus* sp. 2319x1, являлись термостабильными ферментами, имеющими продолжительное время жизни, особенно

белок GH12-1, чье время полужизни составило 11 суток. Также эти ферменты оказались высокоактивны и устойчивы к наличию в реакционной смеси детергентов, что делает их привлекательными объектами для промышленного применения, например, для гидролиза целлюлозы

Соответствие содержания диссертации специальностям, по которым она рекомендуется к защите

Представленная Заюлиной Ксенией Сергеевной диссертационная работа посвящена выделению и изучению гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах и характеристике их новых гликозидаз. Работа соответствует специальности 1.5.11 Микробиология, по которой рекомендуется к защите.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем научной степени

По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей в изданиях, удовлетворяющих требованиям п.13 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013 г. №842, и перечню рецензируемых журналов ВАК РФ:

Апробация работы:

Соискателем опубликованы 6 экспериментальных статей:

1. Gavrilov 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- №12 -734039. // doi: 10.3389/fmicb.2021.734039

Результаты работы представлены в виде устных и стендовых докладов на 11 научных конференциях и конгрессах.

Считать диссертационную работу Заюлиной Ксении Сергеевны «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз» законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013 г. №842, и профилю диссертационного совета Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Работа отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть представлена к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Рекомендовать диссертационную работу Заюлиной Ксении Сергеевны «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз» к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Заключение принято на совместном научном семинаре лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот, лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов и лаборатории молекулярной экологии и филогеномики бактерий Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». путем открытого голосования. Результаты голосования: "за" - 27 человек, "против" - нет, "воздержалось" - нет. Протокол № 15 от 11 апреля 2022 г.

Председатель семинара

зав. лабораторией реликтовых микробных сообществ,
д.б.н.

 /Н.В. Пименов/

Рецензент

зав. лабораторией инженерии биополимеров (ИНБ),
д.х.н., проф.

 /В.П. Варламов/

Рецензент

с.н.с. лаборатории биотехнологии ферментов (ИНБИ),
к.х.н.

 /А.М. Рожкова/

Секретарь,

с.н.с. лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот
к.б.н.

 /А.А. Клюкина/