

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Заюлиной Ксении Сергеевны на тему «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – «микробиология»

Диссертационная работа Заюлиной Ксении Сергеевны посвящена поиску, выделению и характеристике гликозидаз из гипертермофильных архей. Такие археи являются ценным источником термостабильных и термоактивных ферментов, которые могут быть использованы в промышленности – например, при переработке растительного сырья, которая, как правило, проводится в достаточно экстремальных условиях. Поэтому актуальность данной работы не вызывает сомнений.

Ксенией Сергеевной, в частности, была выделена и охарактеризована мультидоменная гликозидаза из *Thermosoccus* sp. 2319x1, которая способна гидролизовать широкий спектр полисахаридов, благодаря разной субстратной специфичности ее доменов. Кроме высокой активности, эти ферменты обладают устойчивостью к детергентам, что делает их перспективными кандидатами для гидролиза различных полисахаридов, например, целлюлозы.

Помимо чисто практической значимости, работа Заюлиной К. С. интересна и с фундаментальной точки зрения. В ходе ее выполнения были выделены и охарактеризованы различные штаммы гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах - *Thermosphaera* sp. штаммы 3507, 3507L и 3507L2, а также представитель нового рода *Infirmifilum lucidum* штамм 3507LT, способный утилизировать лихенан, ксилоглюкан и крахмал. Оказалось, что этот вид архей принадлежит к глубокой линии кренархеот, исследование филогенетического положения которой привело к предложению нового порядка *Thermofilales*. Всего было выделено 10 штаммов из родов *Pyrobaculum*, *Thermosphaera*, *Thermofilum* и *Infirmifilum*. Важно сказать, что выделение и описание штаммов гипертермофильных архей само по себе является непростой задачей, зачастую требующей творческого подхода и огромного терпения, и Ксения Сергеевна справилась с ней в полной мере. Помимо выделения штаммов, Ксенией были экспрессированы, очищены и охарактеризованы уникальные гликозидазы штаммов *Thermosoccus* sp. 2319x1 и *Thermofilum adornatum* 1910b. Для *Thermosoccus* sp. 2319x1, *Thermofilum adornatum* 1910b и *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 на основе геномных и протеомных данных были впервые реконструированы метаболические пути. Таким образом, объем работы, выполненной Ксенией Сергеевной, огромный, а новизна и значимость полученных данных не вызывает никаких сомнений. Отдельно стоит отметить логичность построения работы и ее описания диссертантом.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа Заюлиной К.С. изложена на 166 страницах машинописного текста и состоит из 7 глав: Обзор литературы – 3 главы, Материалы и методы исследования, Результаты и обсуждение - 3 главы. Работа содержит 57 рисунков и 26 таблиц. В конце приведен список литературы, содержащий 266 ссылок.

Обзор литературы изложен на 35 страницах и включает в себя три основных раздела. Первый раздел посвящен описанию гипертермофильных архей, второй – особенностям их центрального метаболизма, а третий – ферментам, расщепляющим углеводы. Литературный обзор, как и работа в целом, построен очень логично и содержит всю необходимую информацию – он начинается с истории изучения гипертермофильных микроорганизмов, затем следует общее описание гипертермофильных бактерий и архей и подробное описание архей. Также подробно описаны особенности культивирования гипертермофильных архей и полисахаридов, которые они могут разлагать. Отлично и с хорошими иллюстрациями описаны пути центрального метаболизма – гликолиз, путь Энтнера-Дудорова и пентозофосфатный путь. В заключительном разделе приведена информация о гликозидазах и механизмах их действия, а также других ферментах, принимающих участие в разложении полисахаридов. Отдельный подраздел посвящен семейству GH у бактерий и архей. Обзор литературы, без сомнения, отражает общую картину имеющихся к настоящему времени знаний. В качестве единственного небольшого замечания можно отметить, что дерево на рисунке 3 было бы здорово дополнить данными за 2017-2021 годы.

В главе, посвященной **Материалам и методам исследования**, описаны использованные в работе объекты и методы. Глава написана очень аккуратно и подробно, благодаря чему все процедуры могут быть легко воспроизведены. В работе был использован большой арсенал методов современной микробиологии и молекулярной биологии: получение накопительных культур и культивирование штаммов, выделение ДНК для последующей наработки искомых фрагментов с помощью ПЦР, электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле, клонирование, экспрессия и очистка белков, секвенирование и последующий анализ геномных данных, протеомные исследования, биохимическая характеристика ферментов.

Первая глава **Результатов и обсуждения** посвящен выделению штаммов гипертермофильных архей из горячих источников, способных разлагать полисахариды. Были использованы пробы, отобранные из горячих источников Чили, Тувы, Чукотки и Камчатки в 2015-2019 годах – всего 24 пробы. Из них были получены накопительные культуры, в условиях, максимально приближенным к естественным – бескислородные условия, высокая температура и близкие к щелочным значения рН. В качестве источника углерода использовались различные полисахаридные субстраты. Присутствие

микроорганизмов контролировалось с помощью микроскопии, DGGE и секвенирования вариабельных участков 16S рРНК. В ходе работы было выделено 10 штаммов гипертермофильных архей из 7 культур, описана их морфология, и для некоторых – таксономия. Шесть штаммов были выбраны для более подробного описания и характеристики их гидролитического потенциала – они описаны в Главе 6. Была оценена их способность разлагать сложные полимеры, усваивать олиго- и мономеры, использовать различные акцепторы электронов и расти при различных рН, температурах и концентрациях солей. Также были секвенированы и собраны их геномы. На основании полученных данных было сделано достаточно много интересных наблюдений, одно из которых – для штамма 3507LT, *Infirmifilum lucidum*, выделенного в Чили, – позволило предложить новый порядок *Thermofilales* (ранее это было семейство *Thermofilaceae*) и переименовать *Thermofilum uzonense* 1807-2 в *Infirmifilum uzonense*. Еще одним интересным результатом было то, что для штамма *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 была впервые показана возможность роста только при наличии акцепторов электронов, таких как элементная сера, кислород, магнетит, арсенат, оксид сурьмы III/IV и фумарат. Для этого же штамма была показана способность разлагать ксилан и проведен поиск белков, участвующих в этом процессе. Данные получились несколько противоречивые, но все же они позволяют предположить участие транскетолаз ПФП или же наличие альтернативных путей превращения ксилоэзы в 2-кетоглутарата, пирувата или гликолата.

Несколько подразделов посвящены подробному описанию штамма *Thermofilum adornatum* 1910b, способного разлагать целлюлозу, и его гидролитических свойств. Это ближайший родственник *Infirmifilum lucidum* 3507LT, принадлежащий к тому же вновь выделенному порядку *Thermofilales*. Был охарактеризован его геном, и были найдены гены, кодирующие белки, участвующие в утилизации крахмала, (глюко)маннана и целлюлозы – хотя рост на маннане показан не был. Интересно, что при этом данный штамм был способен расти на D-маннозе. С помощью сравнительной протеомики были идентифицированы белки, экспрессия генов которых активируется при росте на целлюлозе, на основании чего, как и для *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2, был реконструирован путь метаболизма углеводов. Аналогичные исследования были проведены для штамма *Thermosoccus* sp. 2319x1.

Последняя глава результатов посвящена характеристике рекомбинантных гликозидаз *Thermosoccus* sp. 2319x1 и *Thermofilum adornatum* 1910b. Для всех рекомбинантных белков из *Thermofilum adornatum* 1910b была зарегистрирована способность к гидролизу целлюлозы, причем каждый из них играет специфическую роль – Cel25 и Cel45 являются ключевыми, но Cel45 узкоспецифична, а Cel25 – наоборот, универсальна; Cel30 и Cel40 являются вспомогательными. Для *Thermosoccus* sp. 2319x1, несмотря на все трудности с очисткой, была выделена и описана уникальная мультидоменная гидролаза с разной субстратной специфичностью доменов и высокой

термостабильностью, о которой шла речь выше. Как и методическая часть, результаты изложены очень логично и подробно, а чтение порой напоминает чтение захватывающего детектива.

По результатам диссертационной работы опубликовано 17 научных работ – 11 тезисов международных и российских конференций и 6 статей в журналах, все из которых индексируются в WoS, а 4 относятся к Q1.

Работа хорошо спланирована и выполнена на высоком методическом уровне. Текст написан прекрасным языком и легко читается. Сформулированные выводы полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Однако работа не лишена и некоторых недостатков – в основном, технических.

1. Из описания не до конца понятно, какой вариабельный 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 Результатов и на Рис. 17 и Рис.18 указан участок V4 (при этом в подписи на стр. 72 Результатов и на Рис. 17 и Рис.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 логично 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 барплотов, 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” и «glycoladlehyde» (Рис. 8)
5. Иногда встречаются терминологические неточности – например, «в геноме были найдены белки».

Указанные замечания являются техническими и абсолютно не снижают фундаментальной и практической значимости рецензируемой работы, которая является полноценным законченным исследованием. Достоверность результатов не вызывает сомнений, а сформулированные выводы обоснованы и убедительны. Автореферат

соответствует содержанию диссертации, а в 6 публикациях автора отражены все основные результаты.

По актуальности темы, объему проведенных исследований, практической значимости и новизне полученных результатов диссертационная работа Заюлиной Ксении Сергеевны на тему «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз», несомненно, соответствует критериям пункта 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в редакции с изменениями, утвержденными постановлением Правительства РФ от 11-го сентября 2021 г. №1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11. – «микробиология».

10.06.22

Кандидат биологических наук
Старший научный сотрудник
Центра Молекулярной и клеточной биологии
Сколковский институт науки и технологий
121205, Москва, Территория ИЦ «Сколково»,
Большой бульвар 30, стр.1
Тел: +79152127277
E-mail: m.tutukina@skoltech.ru

Мария Николаевна Тутукина



Годунов Тутукиной М.Н. неизвестно.
руководитель отдела
кадрового администрирования

Gudov S.