ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Грабович Маргариты Юрьевны на диссертацию Заюлиной Ксении Сергеевны «Гипертермофильные археи как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. - «Микробиология»

Актуальность темы исследования

В связи с растущими запросами промышленности в получении новых эффективных катализаторов на основе ферментов, в частности, термостабильных и термоактивных гликозидаз, в мире постоянно ведется поиск новых ферментов и их продуцентов, а также работы по улучшению свойств и способов применения существующих биокатализаторов. Прогресс в разработке новых биокатализаторов невозможен без изучения их физико-химических свойств, особенностей катализа ими реакций, реакций взаимодействия с ингибиторами и активаторами ферментов, особенностей структуры молекул ферментов.

Актуальность темы исследования обусловлена востребованностью в промышленности гидролитических ферментов с высокой стабильностью, в частности, представителей класса гликозидаз. Однако не многие гликозидазы являются устойчивыми к высоким температурам, к давлению, экстремальным значениям pH и солености. Гликозидазы гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах, зачастую соответствуют этим требованиям. В связи с уникальными свойствами гликозидаз архей они востребованы во многих отраслях промышленности. Большинство известных на сегодня стабильных гликозидаз архей используют субстраты с α-гликозидными связями, в то время как ферментов, активных по отношению к полисахаридам с β-(1-4)-гликозидными связями, а также их продуцентов известны лишь единицы.

Поиск и выделение чистых культур новых архей с заданными свойствами, выделение гликозидаз и изучение свойств этих ферментов, участвующих в гидролизе полисахаридов с β-(1-4)-гликозидными связями с применением омиксных подходов, получение рекомбинантных белков гипертермофильных архей – на сегодня это активно развивающееся мультидисциплинарное направление.

Поэтому актуальность темы и цели диссертационного исследования

Заюлиной Ксении Сергеевны – изучение гипертермофильных архей как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз, не вызывает сомнения.

Достоверность, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Автором выполнены исследования на достаточном по объему материале. Экспериментальная часть работы включала проведение экспериментов на накопительных и чистых культурах гипертермофильных архей, выделенных из горячих источников в ходе этой работы. Также в работе были задействованы гипертермофильные археи из коллекции лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот: *Thermococcus* sp. 2319x1, *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 и *Thermofilum adornatum* 1910b. Для достижения цели автором был поставлен ряд задач, для решения которых были использованы современные методы, адекватные поставленным задачам. Представленные автором выводы основаны на полученных данных и логически вытекают из них.

Все представленные в диссертации данные опубликованы. Всего автором сделано 17 публикаций, из которых 6 – статьи, представленные в высокорейтинговых журналах системы WOS, большинство из которых относится к Q1, что уже свидетельствует о высоком уровне мировых достижений. Результаты доложены на международных и всероссийских конференциях (11).

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Автором внесен существенный вклад в систематику архей: был выделен новый представитель семейства *Thermofilaceae*, штамм 3507LT, способный расти на лихенане, ксилоглюкане и крахмале. На основании фенотипических и геномных различий этого микроорганизма 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.*

В ходе сравнительно-геномного и протеомного исследований были выявлены новые ферменты, участвующие в разложении полисахаридов и реконструированы пути центрального метаболизма сахаров у *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 и *Thermofilum adornatum* 1910b.

Биохимическая характеристика нескольких рекомбинантных гликозидаз из *Thermofilum adornatum* 1910b, *Thermococcus* sp. 2319x1 выявила их высокую

удельную активность, широкую субстратную специфичность, выдающуюся термостабильность и устойчивость к различным детергентам.

Автором получены новые данные для штамма *Thermofilum adornatum* 1910b. Были выявлены 4 белка (Cel30, Cel45, Cel25 и Cel40), участвующие в разложении целлюлозы и ее остатков. Белки Cel30 и Cel45 не имеют охарактеризованных гомологов среди гликозидаз, а две гликозидазы, Cel25 и Cel40, содержат каталитические домены из семейств GH3 и GH1, соответственно, среди которых до этого не было известно эндоглюканаз. Все 4 фермента гидролизуют β-глюкан, лихенан и глюкоманнан, Cel30 и Cel45, кроме того, еще и ксилоглюкан.

Автором установлено, что рекомбинантная мультидоменная гликозидаза (МДГ) *Thermococcus* sp. 2319x1, ее фрагменты и отдельные каталитические домены – GH5, GH12-1 и GH12-2 – способны гидролизовать широкий спектр β-(1-4)-полисахаридов. Три домена МДГ отличаются по субстратной специфичности, таким образом, дополняя друг друга и делая МДГ широко специфичным ферментом.

Научно-практическая значимость полученных данных

Диссертация Заюлиной К.С. является фундаментальным исследованием, которое вносит вклад в решение ряда актуальных задач микробиологии, биохимии, технологических процессов по переработке растительного сырья. Полученные результаты позволили выделить и охарактеризовать новые гипертермофильные археи-полисахаридолитиков, а также найти, выделить и охарактеризовать новые семейства гликозидаз с новыми свойствами.

Общая характеристика и оценка содержания работы

Диссертация представлена на 166 страницах. Диссертация написана по традиционному плану: состоит из 7 разделов, введения, обзора литературы, «Материалы и методы», раздела «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка литературы, включающего 266 источников. Иллюстративный материал включает 57 рисунков и 26 таблиц.

Во Введении автором обоснована актуальность выбранной темы исследования, сформулированы цели и задачи исследования.

Обзор литературы состоит из трех частей. В первой части обзора приводится общая характеристика гипертермофильных архей. В следующем разделе обзора рассматривается центральный метаболизм углеводов у архей в

сравнении с бактериями. Достаточно подробно рассматриваются особенности гликолиза и пути Энтнера-Дудорова у архей, как одного из звеньев превращения полисахаридов. В последнем разделе обзора литературы рассматриваются ферменты, расщепляющие углеводы, в частности гликозидазы.

Раздел «Материалы и методы» описан детально, что позволяет при возможности воспроизвести эксперименты, проведенные автором. В работе используются классические микробиологические (культуральные, морфологические) и биохимические методы (зимография и денатурирующий гель-электрофорез, очистка белков, получение рекомбинантных белков, тонкослойная хроматография), а также молекулярно-генетические методы и протеомный анализ.

В разделе «**Результаты и обсуждение**» автор последовательно излагает полученные данные об исследовании.

В главе 5 автор описывает выделение новых штаммов гипертермофильных архей, разлагающих полисахариды из горячих источников. Следующий раздел, глава 6 - это характеристика новых гипертермофильных архей, *Thermosphaera* sp. 3507, *Pyrobaculum arsenaticum* штамм 2319x2, *Thermofilum adornatum* 1910b и *Thermococcus* sp. 2319x1. Автор приводит результаты анализа геномов и протеомов исследуемых архей, активность гликозидаз и утилизации продуктов гидролиза с применением протеомики. Далее автор приводит результаты идентификации новых гликозидаз с применением скрининга белков по их активности.

Последняя глава раздела «Результаты и обсуждение» посвящена характеристике рекомбинантных белков новых гипертемофильных архей

Завершают работу заключение и выводы.

В разделе Заключение, который является важнейшим квалификационным показателем работы, Ксения Сергеевна воедино сложила все полученные ею данные и сопоставила с имеющимися в научной литературе сведениями, и на этой основе сформулировала конкретный вклад ее работы в решение выбранной научной проблемы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В целом следует отметить, что автором получены интересные фундаментальные данные, которые могут лечь в основу дальнейших исследований новых термостабильных и термоактивных гликозидаз из архей-полисахаридолитиков, что позволит повысить эффективность переработки растительного сырья во многих отраслях промышленности. Автором внесен

существенный вклад в изучение гликозидаз и, в частности, в изучение их структуры и механизма действия. Автором убедительно продемонстрировано выделение семейства *Thermofilaceae* в новый порядок – *Thermofilales* в пределах класса *Thermoprotei* филума *Crenarchaeota.*

По данному диссертационному исследованию имеется ряд замечаний:

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?

Разумеется, эти недочеты не принципиальны и не умаляют исключительной научно-практической значимости полученных результатов, правомерности основных защищаемых положений и выводов данной диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Заюлиной Ксении Сергеевны « Гипертермофильные археи

как источник новых термостабильных и термоактивных гликозидаз» является научно-квалификационной работой и представляет собой самостоятельное завершенное научное исследование, посвященное решению актуальной научной задачи, а именно получению и изучению новых гликозидаз с высокой термостабильностью и термоактивностью из архей-полисахаридолитиков.

Результаты, что очень важно, имеют важное научно-практическое и теоретическое значение для микробиологии, биохимии, многих отраслей промышленности.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа Заюлиной Ксении Сергеевны соответствует требованиям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 - микробиология, а сам автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры биохимии и физиологии клетки
медико-биологического факультета Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»,
дбн, проф. по специальности микробиология Грабович М.Ю.

Адрес: Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл. 1,
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,
Тел:+7 (473)220-88-77; e-mail: margarita_grabov@mail.ru

08.06.2022

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)
Подпись Грабович М.Ю.
Заверяю Ведущий специалист
должность
Сенская 08.06.2022
подпись, расшифровка подписи