

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»

На правах рукописи

ЗАЮЛИНА КСЕНИЯ СЕРГЕЕВНА

ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫЕ АРХЕИ КАК ИСТОЧНИК НОВЫХ
ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ И ТЕРМОАКТИВНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1.5.11 – Микробиология

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Кубланов И.В.

Москва – 2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность работы	5
Цель и задачи исследования	6
Научная новизна и значимость работы	6
Практическая значимость работы	7
Апробация работы	7
Объем и структура	8
Место проведения работы и благодарности	8
Список работ, опубликованных по теме диссертации	9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
Глава 1. Гипертермофильные археи	12
1.1. История изучения гипертермофильных микроорганизмов	13
1.2. Общие сведения о представителях домена <i>Archaea</i>	16
1.3. Общие сведения о культивируемых гипертермофильных археях	21
1.4. Органотрофные гипертермофильные археи	22
Глава 2. Центральный метаболизм углеводов у архей	30
2.1. Гликолиз и его отличительные особенности у архей	30
2.2. Путь Энтнера-Дудорова	34
2.3. Пентозофосфатный путь	36
Глава 3. Ферменты, расщепляющие углеводы	38
3.1. Общие сведения о гликозидазах	38
3.2. Механизм действия гликозидаз	39
3.3. Классификация гликозидаз	41
3.4. Другие ферменты, участвующие в разложении полисахаридов	43
3.5. Субстраты для CAZymes	44
3.6. Сравнение распространения и разнообразия семейств GH у архей и бактерий	45
3.7. Рекombинантные гликозидазы из гипертермофильных архей	47
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
Глава 4. Материалы и методы исследования	52
4.1. Микробиологические методы	52
4.1.1. Отбор проб из горячих источников	52
4.1.2. Получение накопительных культур	52
4.1.3. Состав сред для накопительных и чистых культур гипертермофильных архей	53

4.1.4. Культивирование штаммов гипертермофильных архей.....	54
4.1.5. Оптимизация среды Пфеннига для культуры 2319х2.....	55
4.1.6. Подсчет клеток с помощью световой микроскопии	56
4.1.7. Определение концентрации сероводорода.....	56
4.1.8. Измерение газов.....	56
4.2. Молекулярно-генетические методы	57
4.2.1. Выделение ДНК	57
4.2.2. ПЦР	57
4.2.3. Электрофорез в агарозном геле.....	58
4.2.4. Секвенирование.....	58
4.2.5. Клонирование генов	58
4.3. Функциональная аннотация геномов	60
4.4. Анализ протеомных данных.....	61
4.4.1. Подготовка биомассы для протеомного анализа.....	61
4.4.2. Обработка полученных данных	62
4.5. Биохимические методы.....	62
4.5.1. Подготовка проб для биохимических исследований	62
4.5.2. Качественная оценка активности гликозидаз	63
4.5.3. Метод определения редуцирующих сахаров	64
4.5.4. Определение концентрации белка	65
4.5.5. Зимография и денатурирующий гель-электрофорез.....	66
4.5.6. Очистка белков	66
4.5.7. Измерение активности рекомбинантных белков.....	68
4.5.8. Тонкослойная хроматография	68
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	70
Глава 5. Выделение новых штаммов гипертермофильных архей, разлагающих полисахариды из горячих источников	70
Глава 6. Характеристика новых гипертермофильных архей	78
6.1. Характеристика <i>Thermosphaera</i> sp. 3507.....	81
6.2. Характеристика нового представителя семейства <i>Thermofilaceae</i> и реклассификация данного семейства в порядок	82
6.3. Характеристика <i>Pyrobaculum arsenaticum</i> штамм 2319х2.....	91
6.3.1. Анализ генома <i>Pyrobaculum arsenaticum</i> 2319х2.....	93
6.3.2. Анализ протеомов <i>Pyrobaculum arsenaticum</i> 2319х2	96

6.3.3. Выявление активностей внеклеточных гликозидаз у штамма <i>Pyrobaculum arsenaticum</i> 2319x2	98
6.4. Характеристика <i>Thermofilum adornatum</i> 1910b	99
6.4.1. Характеристика генома <i>Thermofilum adornatum</i> 1910b.....	102
6.4.2. Определение белков, участвующих в деградации полисахаридов и утилизации продуктов гидролиза <i>Thermofilum adornatum</i> 1910b с применением протеомики.....	104
6.4.3. Определение активности гликозидаз <i>Thermofilum adornatum</i> 1910b.....	109
6.5. Описание штамма <i>Thermococcus</i> sp. 2319x1	110
6.5.1. Анализ генома <i>Thermococcus</i> sp. 2319x1	111
6.5.2. Характеристика центрального метаболизма <i>Thermococcus</i> sp.2319x1	114
6.5.3. Выявление активностей внеклеточных гликозидаз <i>Thermococcus</i> sp. 2319x1 ...	115
6.6. Идентификация новых гликозидаз с применением СБПА.....	116
Глава 7. Характеристика рекомбинантных белков гипертемофильных архей	117
7.1. Характеристика рекомбинантных белков штамма <i>Thermofilum adornatum</i> 1910b	117
7.2. Характеристика рекомбинантных гликозидаз <i>Thermococcus</i> sp. 2319x1	122
7.2.1. Получение мультидоменной гликозидазы (МДГ).....	125
7.2.2. Характеристика GH12 доменов.....	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	137
ВЫВОДЫ	140
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	141
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Гипертермофильными считаются микроорганизмы, оптимум роста которых лежит выше 80°C (Stetter, 1996). Актуальность изучения гипертермофильных архей обусловлена присущими им модификациями и новыми вариантами метаболических путей, а также высокой стабильностью их биомолекул. Белки из гипертермофильных архей являются устойчивыми к высоким температурам, и зачастую к давлению, экстремальным значениям pH и солености, присутствию растворителей, детергентов и тяжелых металлов, что подразумевает высокий потенциал этих ферментов в качестве инструмента в прикладных 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 поиска и получения новых высокостабильных гликозидаз с заданными свойствами – выделение накопительных и чистых культур гипертермофильных микроорганизмов, растущих на полисахаридах, с последующим применением омиксных подходов.

Однако выделение новых гипертермофильных архей, способных разлагать полисахариды – крайне нетривиальная задача. Это связано с трудностями культивирования всех гипертермофильных архей: созданием и поддержанием необходимых анаэробных условий, подбором физико-химических параметров среды (pH, высокой температуры), потребностью в особых факторах роста (витаминах, микроэлементах, экстрактах других микроорганизмов), подбором твердых сред и культивированием на них. Для гипертермофильных архей, использующих полисахариды, ко всему этому добавляются сложности, связанные с ригидностью и нерастворимостью субстратов. Это объясняет тот факт, что большинство культивируемых гетеротрофных гипертермофильных архей (представленных в трех филумах: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* и *Thaumarchaeota* (Kato et al., 2021)) растут на аминокислотах, пептидах и простых сахарах и только представители 12 родов способны к росту на полисахаридах, что также на порядки меньше, чем у бактерий (Medina-Chavez & Travisano, 2022). Более того, эти немногочисленные археи в основном используют субстраты с α -гликозидными связями (крахмал, амилоза, декстрины, пуллулан), в то время как на полисахаридах с β -(1-4) гликозидными связями (целлюлоза, ксилан, различные маннаны и бета-глюканы) способны расти лишь единицы. Все сказанное выше делает актуальным поиск и выделение новых гипертермофильных архей с такими свойствами.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является выделение и изучение гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах, и характеристика их новых гликозидаз.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Выделить из горячих источников чистые культуры гипертермофильных архей, способных расти на различных полисахаридах.
2. Охарактеризовать фенотипы выделенных штаммов, в первую очередь спектр используемых ими углеводов, включая полисахариды.
3. Определить последовательности геномов выделенных гипертермофильных архей, выявить гены, кодирующие ферменты деструкции полисахаридов, а также вовлеченные в центральный метаболизм сахаров.
4. Выделить и охарактеризовать рекомбинантные ферменты, участвующие в гидролизе полисахаридов у данных гипертермофильных архей.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Выделен и охарактеризован ряд гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах: *Thermosphaera* sp. штаммы 3507, 3507L и 3507L2, растущие на ксилане, лихенане, ксилоглюкане и крахмале; представитель нового рода *Infirmifilum lucidum* штамм 3507LT, способный утилизировать лихенан, ксилоглюкан и крахмал. Помимо гидролитических свойств *I. lucidum* оказался представителем глубокой линии кренархеот, исследование филогенетического положения которой привело к предложению нового порядка *Thermofilales*. Охарактеризован штамм *Thermococcus* sp. 2319x1 являющийся первой археей, растущей на ксилоглюкане и первой эвриархеотой, растущей на ксилане. Впервые для представителей рода *Pyrobaculum* показано потребление сахаров в процессе анаэробного дыхания *P. arsenaticum* штамма 2319x2. 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 вообще не имеют родственников с предсказанной функцией. Две другие относятся к семействам GH1 и GH3 среди которых нет известных эндогликаниз. Рекомбинантные гликозидазы, кодируемые этими четырьмя генами, охарактеризованы. Каждая из них обладала своими особенностями, а их совместное действие обуславливает способность *T. adornatum* эффективно разлагать целлюлозу и другие полисахариды и расти на продуктах их гидролиза. Выделена и охарактеризована мультидоменная гликозидаза (МДГ) эвриархеоты *Thermococcus* sp. 2319x1, обладающая уникальной доменной организацией и широкой субстратной специфичностью. Помимо целой

МДГ выделены и охарактеризованы ее отдельные каталитические домены, которые также как и отдельные гликозидазы *T. adornatum* обладают своими особенностями и дополняют друг друга в процессе гидролиза полисахаридов.

Практическая значимость работы

Технологические процессы переработки растительного сырья нередко проводятся в жестких условиях среды, а именно при высоких температурах, концентрациях солей или растворителей, экстремальных значениях pH и др. Это делает затруднительным и экономически невыгодным использование ферментов из мезофильных и нейтрофильных микроорганизмов ввиду их невысокой стабильности (Krüger et al., 2018, Pramanik et al., 2021). Альтернативой им могут быть ферменты из экстремофильных прокариот (в частности, гипертермофилов), активные и стабильные в различных экстремальных условиях. В данной работе показано, что исследуемые каталитические домены МДГ *Thermococcus* sp. 2319x1, относящиеся к гликозидазам из семейства GH12, представляют собой термостабильные ферменты с продолжительным временем жизни при высоких температурах. Особенно стоит отметить белок GH12-1, время полужизни которого достигает 11 суток при 90°C. Показано, что эти ферменты высокоактивны и устойчивы к наличию в реакционной смеси детергентов, что делает их привлекательными объектами для промышленного применения, например, для гидролиза целлюлозы.

Личный вклад соискателя

Соискатель лично принимал участие в проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей и тезисов конференций.

Апробация работы

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

Публикации.

По материалам работы опубликовано 17 печатных работ, из них: 6 экспериментальных статей и 11 тезисов конференций.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста и включает 57 рисунков и 26 таблиц. Работа состоит из введения, 7-ти глав (обзор литературы, материалы и методы, экспериментальная часть – результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 266 наименований.

Место проведения работы и благодарности

Работа выполнялась в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот, отдела биологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с 2015 по 2022 годы.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю заведующему лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот к.б.н. Кубланову И.В. за предоставленную тему, внимание и помощь в планировании экспериментов, при написании статей, тезисов конференций и диссертации. Автор благодарен Бонч-Осмоловской Е. А. за помощь в работе, решении различных трудностей и теплое отношение. Автор также крайне признателен всем сотрудникам лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот за поддержку и прекрасные дружеские отношения в коллективе, а также за помощь при выполнении различных этапов работы.

Работа выполнена в рамках и при поддержке проектов РНФ №18-44-04024 «Метаболизм углеводов у гипертермофильных архей: новые подходы, ферменты и метаболические пути», РФФИ №21-54-10006_КоА «Новые термостабильные гидролазы архей Курило-Камчатского региона», "Хотзаймс - систематический скрининг новых гидролаз в гидротермальных местообитаниях" ("HotZyme - Systematic screening for novel hydrolases from hot environments"). Автор выражает благодарность всем участникам этих проектов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Экспериментальные статьи

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., Overkleef 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.

Тезисы конференций

7. **Заюлина К.С.**, Гаврилов С.Н., Елизаров И.М., Кожевникова Д.А., Подосокорская О.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Деструкция полисахаридов гипертермофильными археями // Сборник тезисов X Молодежной школы-конференции с международным участием:

«Актуальные аспекты современной микробиологии»: 27-30 октября 2015 г. – Москва – С. 68-70.

8. Kublanov I., **Zayulina K.**, Stracke C., Kallnik V., Jensen K., Menzel P., Slesarev A., Bräsen C., Peng X., Bonch-Osmolovskaya E., Siebers B. Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319X1 and its multidomain cellulose/xylanase // *Thermophiles*, book of abstracts, 30 августа-4 сентября 2015 г. – Santiago de Chile – P. 97.

9. **Заюлина К.С.**, Гаврилов С.Н., Елизаров И.М., Кожевникова Д.А., Подосокорская О.А., Тошаков С.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Метаболизм сахаров двух новых гипертермофильных архей родов *Thermococcus* и *Pyrobaculum* // *Acta Naturae* научные труды: V съезд биохимиков России. Спецвыпуск Т2: 4-8 октября 2016 г. – Сочи-Дагомыс – С. 206.

10. **Заюлина К.С.**, Кубланов И.В., Гаврилов С.Н., Соколова Т.Г., Слесарев А.И., Бонч-Осмоловская Е.А. Гипертермофильные археи и их способности к разложению полисахаридов // Молодежная научно-практическая школа «Современные методы молекулярной биологии и биотехнологии: изучение и использование потенциала микроорганизмов, функционирующих в экстремальных условиях окружающей среды, NorthBiotechYoung 2017» 27 февраля – 1 марта 2017. – Архангельск – С. 8.

11. **Заюлина К.С.**, Гаврилов С.Н., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В. Гипертермофильные археи-гидролитики из горячих источников Кунашира и Чили // Материалы 1-го Российского Микробиологического Конгресса: 17-18 октября 2017 г. – Пущино – С. 105.

12. Елизаров И.М., Лопатин С.А., **Заюлина К.С.**, Кубланов И.В., Гаврилов С.Н. Субстрат и хелатор: участие ксилана в процессе восстановления нерастворимых соединений трёхвалентного железа // Материалы 1-го Российского Микробиологического Конгресса: 17-18 октября 2017 г. – Пущино – С. 98.

13. **Zayulina K.**, Piunova U., Kochetkova T., Kublanov I. Comparative genomic analysis of *Thermofilum* genus: insights into polysaccharide degradation and carbohydrate metabolism. *Bioinformatics from algorithms to applications. Conference proceedings & conference schedule*, 16-19 July, 2018. Saint Petersburg, Russia. – P. 37-38.

14. Piunova U., **Zayulina K.**, Kochetkova T., Kublanov I. Supplier dependent metabolism of *Thermofilaceae* family representatives. *Bioinformatics from algorithms to applications. Conference proceedings & conference schedule*, 16-19 July, 2018. Saint Petersburg, Russia – P. 42-43.

15. **Zayulina K.**, Piunova U., Kochetkova T., Kublanov I. Comparative genomic analysis of the representatives of genus *Thermofilum*: insights into the central metabolism and specific features of

biosynthetic pathways. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS2019); 7-11 July 2019 (Glasgow, Scotland). Abstract Book, P. 1288.

16. **Заюлина К.С.**, Пиунова У.Е., Кочеткова Т.В., Тошаков С.В., Кубланов И.В. Сравнительная геномика представителей рода *Thermofilum*: изучение особенностей метаболизма сахаров и биосинтетических путей. 2-ой Российский Микробиологический Конгресс. 23-27 сентября 2019 (Саранск, Россия). Сборник тезисов – С. 110.

17. **Заюлина К.С.**, Малышева А.Д., Кубланов И.В. Выделение и характеристика новых термостабильных гликозидаз гипертермофильной археи *Thermofilum adornatum* 1910b // 3-й Российский Микробиологический конгресс, Псков (Россия), 26 сентября - 1 октября 2021 г.: материалы конгресса – С. 69.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫЕ АРХЕИ

Среди огромного разнообразия экстремофильных прокариот, выделяют группу гипертермофильных микроорганизмов, оптимальная температура роста которых находится выше 80°C. В данную группу входят как представители домена *Archaea*, так и представители *Bacteria*. Интерес к гипертермофильным прокариотам возник благодаря их необычным гидролитическим ферментам, стабильным при высоких температурах, а также из-за их зачастую новых или модифицированных метаболических путей, наличие которых обусловлено особенностями их местообитаний и тем, что многие гипертермофилы являются представителями глубоких обособленных филогенетических ветвей (Рис.1).

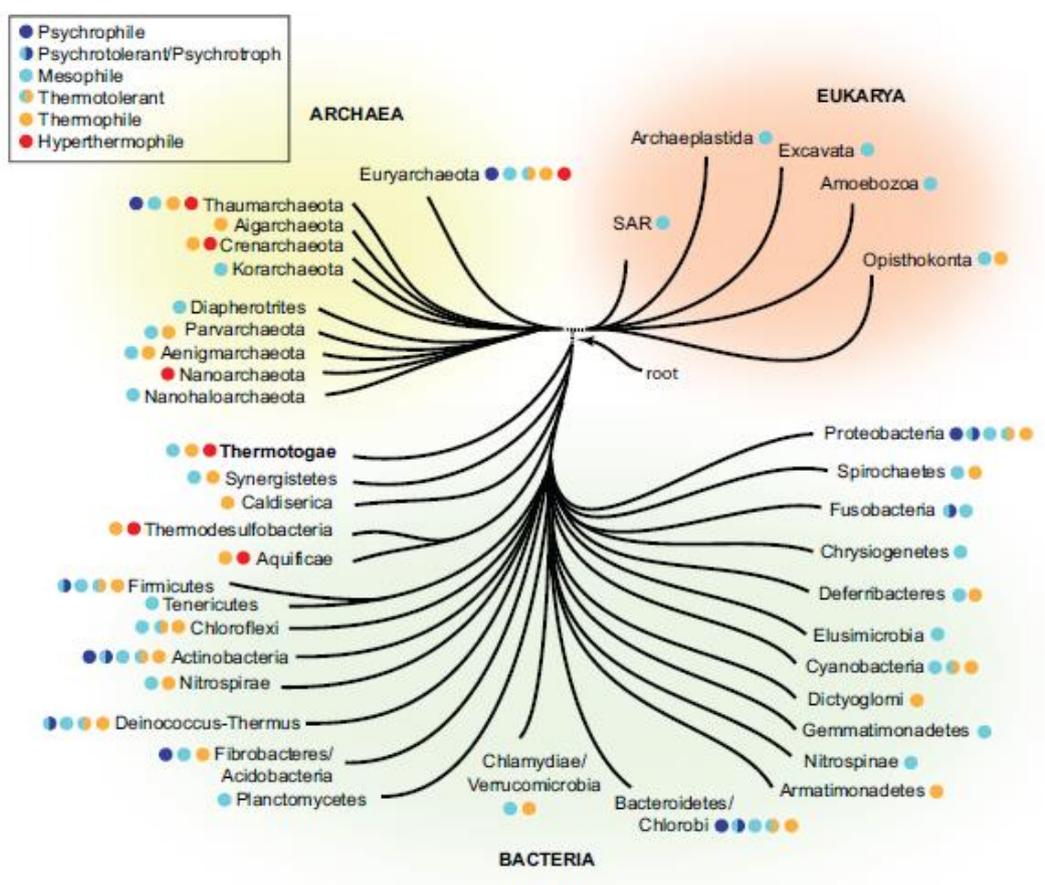


Рисунок 1. Распределение гипертермофильных прокариот среди представителей *Archaea* и *Bacteria* (Pollo et al., 2015). (Красными точками отмечены филумы, где присутствуют данные микроорганизмы).

Гетеротрофные гипертермофильные археи представляют собой филогенетически довольно разнообразную группу, однако, число видов архей-органотрофов значительно уступает таковому у бактерий. Большинство гетеротрофных гипертермофильных архей растет на различных белках, пептидах и смесях аминокислот. Также многие из них способны усваивать моно- и дисахариды, но лишь для единиц был показан рост на полисахаридах, в

основном на крахмале (de Vos et al., 1998), так как он чаще, чем другие полисахариды, используется для выделения и культивирования микроорганизмов. Однако в естественных местах обитания гипертермофильных архей часто присутствуют и другие полисахариды, как и близкие к ним биополимеры (например, пектин, альгинат, агар). Это могут быть составляющие клеток растений, такие как целлюлоза, бета-глюкан, ксилан, арабинан, галактан, маннан и различные гетерополисахариды (такие как глюкоманнан, ксилоглюкан, арабинокислан и другие), а также хитин, входящий в состав покрова беспозвоночных. Гликозидазы, играющие главную роль в разложении полисахаридов, являются одними из самых востребованных на сегодняшний момент ферментами (Ferrer et al., 2016). Гликозидазы гипертермофильных архей особенно перспективны, поскольку помимо термостабильности, термозимы зачастую устойчивы и ко многим другим экстремальным условиям среды (Т, рН, соленость и т.д.), а также к присутствию растворителей, детергентов и тяжелых металлов. Таким образом, гипертермофильные археи-полисахаридолитики и их гликозидазы являются одновременно и мало исследованными и высокоперспективными для биотехнологии.

1.1. История изучения гипертермофильных микроорганизмов

Гипертермофильными считаются микроорганизмы, оптимум роста которых лежит выше 80°C. Соответственно, их экотопы связаны с различными термальными проявлениями, такими как сольфатарные поля и другие наземные горячие источники, мелководные и глубоководные морские гидротермы, например, черные курильщики (Stetter, 1996). Однако, в течение первых трех четвертей XX века микробиологи, изучающие термофилов, интересовались в основном теми микробными экосистемами, которые были так или иначе связаны с деятельностью человека: компосты, угольные месторождения, термофильные метантенки, которые не являлись местами обитания гипертермофильных микроорганизмов ввиду их более низких температур (до 70°C). Также мало уделяли внимания разнообразию и экологии термофилов: считали, что термофильные микроорганизмы являются лишь отдельными видами в мезофильных родах - таких, как *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* (Bergey, 1974). Большинство известных на тот момент термофилов были спорообразующими организмами, и именно с этой особенностью и связывалась их способность переживать высокие температуры; предполагали, что термофильные микроорганизмы имеют оптимум роста в области 50-60°C, и максимум – 70-75°C. В то время ученых прежде всего интересовало наличие у термофилов термостабильных ферментов, которые имели бы массу преимуществ перед термолабильными организмами в ряде производственных процессов (Логинава, 1966).

К концу XX века начинается активное изучение термофильных микроорганизмов микробиологами, генетиками и биохимиками. Полученные в то время результаты изменили

представление о многообразии термофильных прокариот, что повлекло за собой различные открытия в смежных областях. Интерес исследователей обусловлен открытием новых мест обитаний термофилов: природные горячие источники, ассоциированные с современной активностью вулканов или с регионами сдвигов тектонических плит.

В источниках Йеллоустонского Национального Заповедника группа ученых под руководством Т.Д. Брока обнаружила микроорганизмы, отличающихся от всех выделяемых ранее из антропогенных термальных областей (Brock, 1978). Они не образовывали споры, и температурные характеристики их роста были намного выше известных – оптимум роста достигал 70°C, а максимум 80°C, группу этих микроорганизмов стали называть экстремальными термофилами. Открытие данных прокариот, например, такой бактерии, как *Thermus aquaticus*, являющегося продуцентом высокотемпературной Taq-полимеразы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) определило новые направления в науке. Как и микроорганизма - *Sulfolobus solfataricus*, еще одного экстремального термофила из горячих источников Йеллоустона, который стал первым исследованным литотрофом, способным к окислению кислородом воздуха серных соединений до сульфата.

Следующим важным шагом в понимании распространения термофильных микроорганизмов стало исследование вулканических местообитаний, в которых преобладают восстановленные условия из-за низкой растворимости кислорода при высоких температурах, а также из-за присутствия такого восстановителя вулканического происхождения как сероводород. В это время уже были разработаны методы культивирования анаэробных микроорганизмов, причем как органотрофов, так и литотрофов (Hungate, 1950). Огромным вкладом в изучение фенотипического многообразия термофилов стало открытие немецких микробиологов В. Циллига и К. Штеттера, исследовавших наземные источники Исландии (Zillig et al., 1981). Они обнаружили гипертермофилов – микроорганизмов, для которых температурный оптимум роста составил выше 80°C, а максимальная температура роста приближалась к 100°C. Кроме того, они открыли новую физиологическую группу – гипертермофильных сероредукторов, которые были способны восстанавливать элементарную серу до сероводорода путем окисления органических веществ и/или водорода (Stetter, 1996). На рубеже 1970-80-х годов Г. Зейкус обнаружил термофильных метаногенов и сульфатредукторов в горячих источниках Йеллоустонского Национального Заповедника (Zeikus, 1980; Zeikus et al., 1983), которые являлись умеренными или экстремальными термофилами.

Открытие новых высокотемпературных мест обитания термофилов – глубоководных гидротерм, где поддерживается температура до 400°C – вызвало очередной всплеск интереса к исследованиям в данной области (Baross, 1983). Так, поиски новых термофилов позволили

установить новые верхние границы роста гипертермофилов: от 110 до 121°C (Stetter, 1991, 1992; Huber et al., 1993; Kashefi & Lovley, 2003).

Одним из последних выдающихся достижений в области исследования термофилов является открытие высокотемпературного подземного местообитания (Stetter et al., 1993). На глубине 1500-3000 м от поверхности Земли были обнаружены микробные сообщества, которые нередко представлены термофилами, поскольку пластовые воды таких глубин нагреваются от магмы до 40 до 90°C. Изучение биоразнообразия глубинной биосферы является еще одной обширной темой исследований (Whitman et al., 1998). Микробные сообщества в глубинных подземных экосистемах Земли весьма разнообразны по составу, который зависит от геохимических условий (Gehring et al., 2006). С помощью молекулярных методов в таких сообществах были обнаружены различные некультивируемые линии бактерий и архей, некоторые из них были выделены и детально изучены (Moser et al., 2005; Podosokorskaya et al., 2013; Frank et al., 2016; Inagaki et al., 2016; Kadnikov et al., 2018; Karnachuk et al., 2019).

Предполагалось, что первичные биоценозы древней Земли были в основном представлены термофильными и гипертермофильными организмами вследствие ряда факторов, таких как преобладание высоких температур, филогенетически обособленное положение многих гипертермофильных таксонов, литоавтотрофный метаболизм, характерный для многих из них. В то же время, современные наземные или подводные термофильные микробные сообщества нельзя считать близкими моделями древнейших экосистем – этому препятствует существенное влияние на гидротермы современной окружающей их биосферы. Это связано с аэрибиозом окружающей среды, циркуляцией грунтовых вод в наземных горячих источниках, которые обеспечивают приток растворенного органического вещества из соседних холодных участков, где произрастают высшие растения (Заварзин, 1993). В то же время глубинная биосфера является замкнутой системой, и лучше всего подходит на роль аналога первичных биоценозов Земли.

Помимо освоения новых термальных местообитаний необходимо отметить еще один важный стимул к исследованию разнообразия термофилов. В 70-80-х годах была введена таксономическая система, которая основывалась на филогенетическом анализе последовательностей консервативных генов и, в первую очередь, гена 16S рибосомальной РНК (Woese and Fox, 1977; Woese, 1987), и позволила выявить большое количество некультивируемых глубоких линий прокариот в термальных местах обитания (Barns et al., 1996; Hugenholtz et al., 1998). Важно также отметить, что филумы, для которых известны гипертермофильные культивируемые представители, например, бактерии *Aquificae*, *Thermotogae*, *Dictyoglomi* и археи *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota*, вообще не содержат или

содержат сравнительно немного негипертермофильных микроорганизмов и во многих случаях этот отход от термофилии вторичен (Nesbø et al., 2006). Несмотря на то, что гипертермофилы обнаружены среди бактерий и архей, их разнообразие среди последних выше, кроме того, археи являются рекордсменами и по максимальной и по оптимальной температурам роста среди всех живых организмов на планете (Takai et al., 2008).

1.2. Общие сведения о представителях домена *Archaea*

Домен Археи (*Archaea*) является одним из трех доменов (вместе с *Bacteria* и *Eukarya*) жизни на Земле. Домены Архей и Бактерий представлены прокариотными микроорганизмами, при этом, несмотря на внешнее сходство, разница между ними существенная. Представители домена *Bacteria* – прокариоты, имеющие в клеточных мембранах сложные эфиры глицерола и жирных кислот, их клеточная стенка содержит пептидогликан и они содержат рибосомы бактериального типа. У архей, в свою очередь, мембраны состоят из простых эфиров изопреноидов (C₂₀-C₄₀) и глицерин-1-фосфата (Jain et al., 2014), клеточные стенки могут состоять из псевдомуреина и/или белкового S-слоя (Baumeister and Lembscke, 1992) или ее не может быть вовсе (Klingl et al., 2014), РНК-полимераза содержит 9-12 субъединиц в отличие от 4-х субъединичной бактериальной РНК-полимеразы, кроме того, рибосомы архей близки по строению к эукариотическим (Cobucci-Ponzano et al., 2012; Woese et al., 1990).

Большинство культивируемых архей являются экстремофилами – организмами, населяющими экосистемы, такие как: морские и наземные гидротермы, сольфатары, кислые шахтные воды или соленые озера. Однако анализ распространения некультивируемых архей показывает, что они встречаются (и часто в больших количествах) и в менее экстремальных местах обитания: почвах, морской воде и осадках, пресной воде и микробиоме кишечника эукариотических организмов (Swan and Valentine, 2009). Таким образом, археи являются космополитами, то есть занимают различные экологические ниши по всей Земле.

До недавнего времени, согласно сравнительному анализу генов 16S рРНК домен *Archaea* насчитывал 5 филумов: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Korarchaeota* и *Taumarchaeota* (Brochier et al., 2008; Elkins et al., 2008). На 2020-й год, предложено более 20 филумов архей, большинство из которых не имеют культивируемых представителей, а их метаболизм не изучен до конца. Благодаря развитию методов высокопроизводительного секвенирования (NGS – next generation sequencing), было получено огромное количество информации: 1) о составах микробных сообществ различных экосистем (секвенирование переменных участков и целого гена 16S рРНК), и 2) о метаболических возможностях архей, представляющих некультивируемые линии, за счет исследования геномов, собранных из метагеномов (MAG) и геномов единичных клеток (single cell genomes). На Рис. 2 представлено

накопление данных о геномах и количество валидных видов архей за последние 20 лет. Как видно, огромное количество геномов было получено за последнее время.

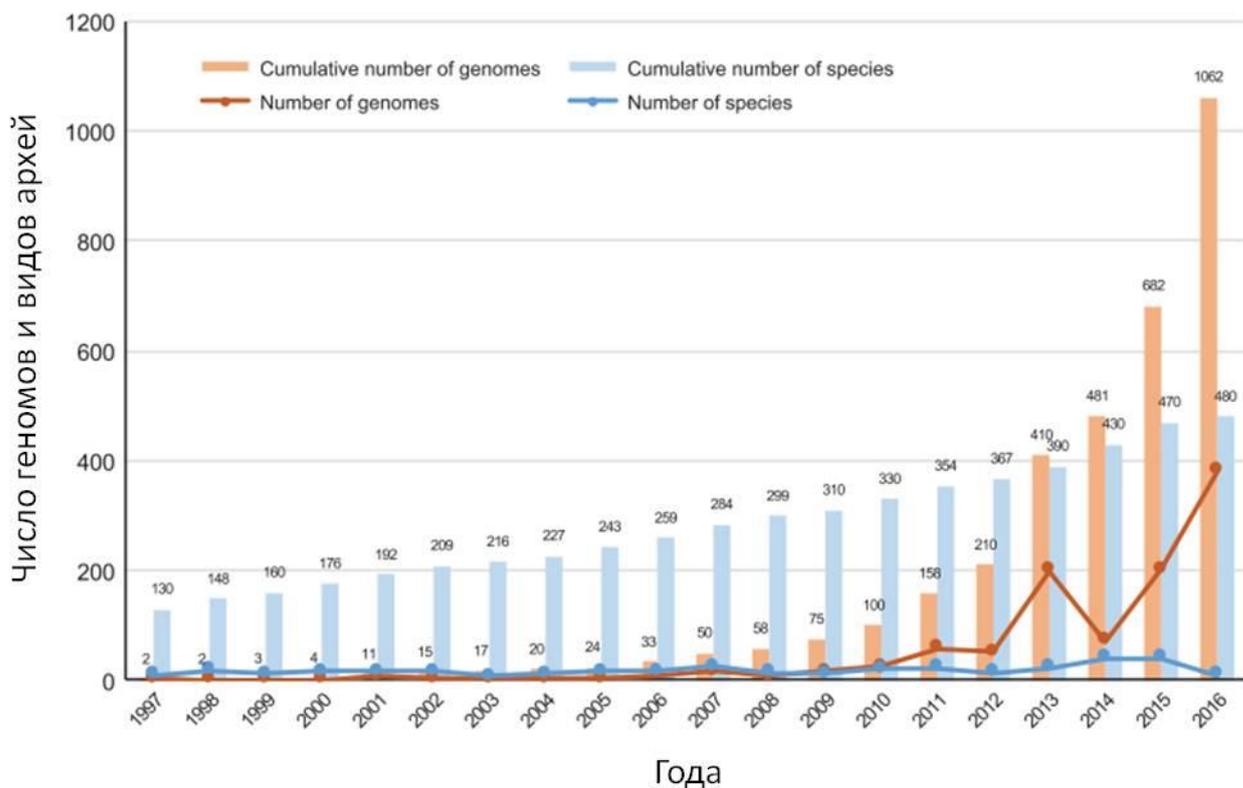


Рисунок 2. Число архейных геномов и валидно описанных видов архей за последние 20 лет (Adam et al., 2017). Оранжевая линия показывает суммарное количество геномов (полные геномы, замкнутые в хромосому, содержащие контиги или скаффолды). Голубая линия – число валидных видов архей по данным базы данных [http:// www.bacterio.net/](http://www.bacterio.net/).

В базе LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) на март 2022 года упоминается 18 филумов в домене *Archaea* (<https://lpsn.dsmz.de/domain>), причем только три из них: *Euryarchaeota* (Garrity and Holt, 2015), *Crenarchaeota* (Garrity and Holt, 2015) и *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet et al. 2008) имеют культивируемых и фенотипически охарактеризованных представителей, а остальные филумы остаются в статусе «*Candidatus*».

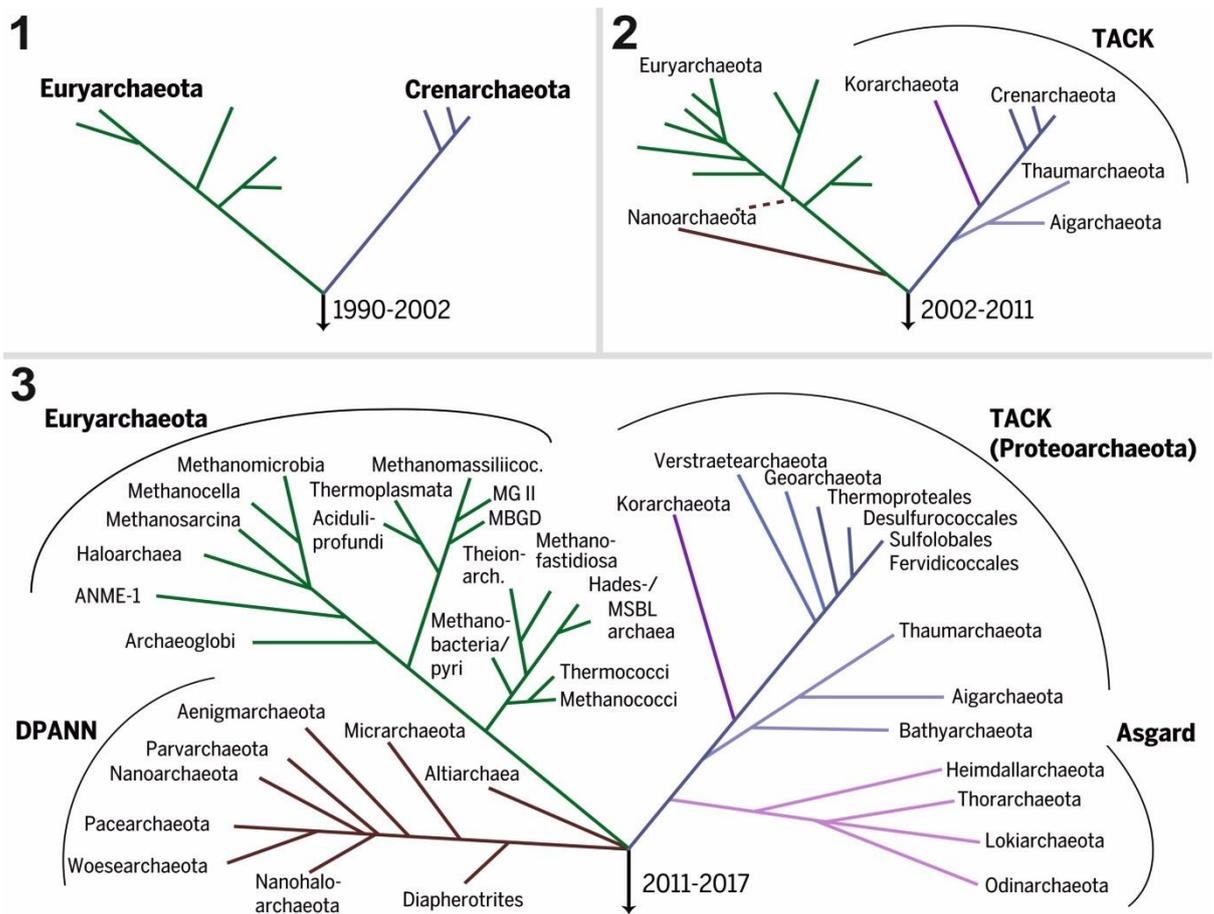


Рисунок 3. Развитие понимания о филогенетическом разнообразии архей в течение последних 30 лет (Spang et al., 2017). 1) С 1990 по 2002 года было известно о двух филумах архей 2) В период 2002 по 2011 год добавлены данные по нескольким филумам 3) современное представление о разнообразии архей.

Наиболее хорошо изученный филум, *Euryarchaeota*, включает в себя метаногенов, гипертермофилов, термоацидофилов и галофилов, достаточно много представителей которых выделены в чистые культуры и охарактеризованы (Garrity and Holt, 2015).

Группа TACK (*Thaumarchaeota*, *Aigararchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*) объединяет эти 4 филума, а также глубокую ветвь *Geoarchaeota*, которая отнесена на данный момент к филуму *Crenarchaeota* (Guy and Ettema, 2011). Представители филума *Crenarchaeota* являются гипертермофильными хемолитоорганотрофными или хемолитоавтотрофными микроорганизмами (Woese et al., 1990), многие из которых выделены в чистые культуры. Данный филум, наряду с *Euryarchaeota*, является одним из самых изученных среди всех архей. Ещё один филум *Korarchaeota* не имеет пока культивируемых представителей, однако показано, что они широко распространены в разнообразных горячих источниках (Auchtung et al., 2006). Анализ генома “*Candidatus Korarchaeum cryptophilum*” показал, что данные микроорганизмы могут быть анаэробными бродильщиками, зависимыми от других обитателей экосистем, поскольку у них отсутствуют некоторые пути биосинтеза витаминов и

кофакторов (Elkins et al., 2008). Филум *Thaumarchaeota* включает в себя мезофильных морских (группа 1 – порядок *Nitrosopumilales*) и наземных (группа 2 – порядок *Nitrososphaerales*) аэробных аммоний-окисляющих архей, некоторые из них выделены в чистые культуры (Pester et al., 2011). Кроме того были обнаружены представители *Thaumarchaeota* и в горячих наземных источниках, и в бескислородных слоях торфяных залежей (Beam et al., 2014). Недавно был описан новый порядок *Conexivisphaerales* с единственным представителем *Conexivisphaera calida*, который является термофильным ацидофильным гетеротрофным микроорганизмом (Kato et al., 2021). Группа *Aigararchaeota* распространена в умеренных и экстремофильных наземных экосистемах. Геном первого представителя “*Caldiarchaenum subterraneum*” был собран из метагеномных данных, полученных из образцов подземного горячего источника (Nunoura et al., 2011). У еще одного кандидатного микроорганизма из этого филума, “*Caldithenius aerorheumensis*”, выделенного из аэробного сообщества горячего ручья, был сделан метатранскриптомный анализ, позволивший раскрыть особенности метаболизма *Aigararchaeota in situ* (Beam et al., 2016). Таким образом, по недавним представлениям, микроорганизмы данного филума являются нитчатными, хемоорганогетеротрофными археями, являющимися ауксотрофами по витаминам и кофакторам, которые получают от других членов микробного сообщества.

Представители филума *Bathyarchaeota* распространены в наземных и морских анаэробных осадках, где и являются основной частью архейного сообщества (Lloyd et al., 2013). Внутри филума насчитывают 17 подгрупп уровня семейства, что предполагает широкое разнообразие метаболизма и механизмов адаптации к окружающей среде (Kubo et al., 2012). Среди *Bathyarchaeota* могут быть и органотрофы, использующие для роста углеводы, жирные кислоты и ароматические соединения (Lloyd et al., 2013), и ацетогены, способные к авто-, гидрогенотрофному росту, благодаря наличию полного пути Вуда-Льюнгаля.

Следующий суперфилум DSAG (Deep Sea Archaeal Group) или Asgard включает в себя такие филумы как *Lokiarchaeota*, *Thorarchaeota*, *Heimdallarchaeota* и *Odinarchaeota*, содержащих некультивируемых представителей, геномы которых были собраны из данных, полученных при секвенировании метагеномов образцов из таких мест, как глубоководные морские осадки и окрестности глубоководных горячих источников (Jorgensen et al., 2012), сульфатно-метановые зоны дельты реки (Seitz et al., 2016) и морские осадки (Zaremba-Niedxweidzka et al., 2017). В их геномах были обнаружены гены эукариотически-подобных белков, тубулинов, а также гомологи ДНК-полимеразы. Вследствие чего, анализ их геномов может помочь в понимании того, как возникла эукариотическая клетка.

Еще одна группа филумов DPANN – суперфилум, включающий в себя глубокие группы *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanohaloarchaeota* и *Nanoarchaeota*.

Представители этого суперфилюма широко распространены в гиперсоленых озерах, морских и пресноводных водах, кислых шахтных дренажах и горячих источниках (Castelle et al., 2015). Анализ геномов некультивируемых представителей групп Diapherotrites, Parvarchaeota и Aenigmarchaeota показал, что у данных микроорганизмов отсутствуют основные анаболические и катаболические пути. Скорее всего, большинство этих архей ведут симбиотический и/или паразитический образ жизни и зависимы от клетки-хозяина, в то время как другие представители данных филумов могут сбрасывать органические соединения, в частности, сахара (Castelle et al., 2015). Члены филума Nanohaloarchaeota, обнаруженные в гиперсоленых озерах, скорее всего, являются свободноживущими, аэробными гетеротрофными или даже фотогетеротрофными микроорганизмами, хотя есть данные, указывающие на способность этих микроорганизмов к брожению (Ghai et al., 2011; Narasingarao et al., 2012). К филуму Nanoarchaeota на данный момент отнесены 3 микроорганизма '*Nanoarchaeum equitans*' (Huber et al., 2002; Swan and Valentine, 2009), '*Nanopusillus acidilobi*' (Wurch et al., 2016) и '*Nanobsidianus stetteri*' (Podar et al., 2013), которые являются экзосимбионтами других архей и ведут паразитический образ жизни, поскольку в их геномах обнаружены значительные потери генов биосинтеза многих веществ (Wurch et al., 2016).

На данный момент мы имеем достаточно глубокое представление о филогенетическом разнообразии архей (Рис. 4), однако знаем совсем немного об их метаболизме, физиологии и роли в окружающей среде, поскольку большинство из них остаются некультивируемыми, а подходы, не связанные с культивированием хоть и существенно улучшились в последнее время, но все равно позволяют получить лишь частичное представление о микроорганизме.

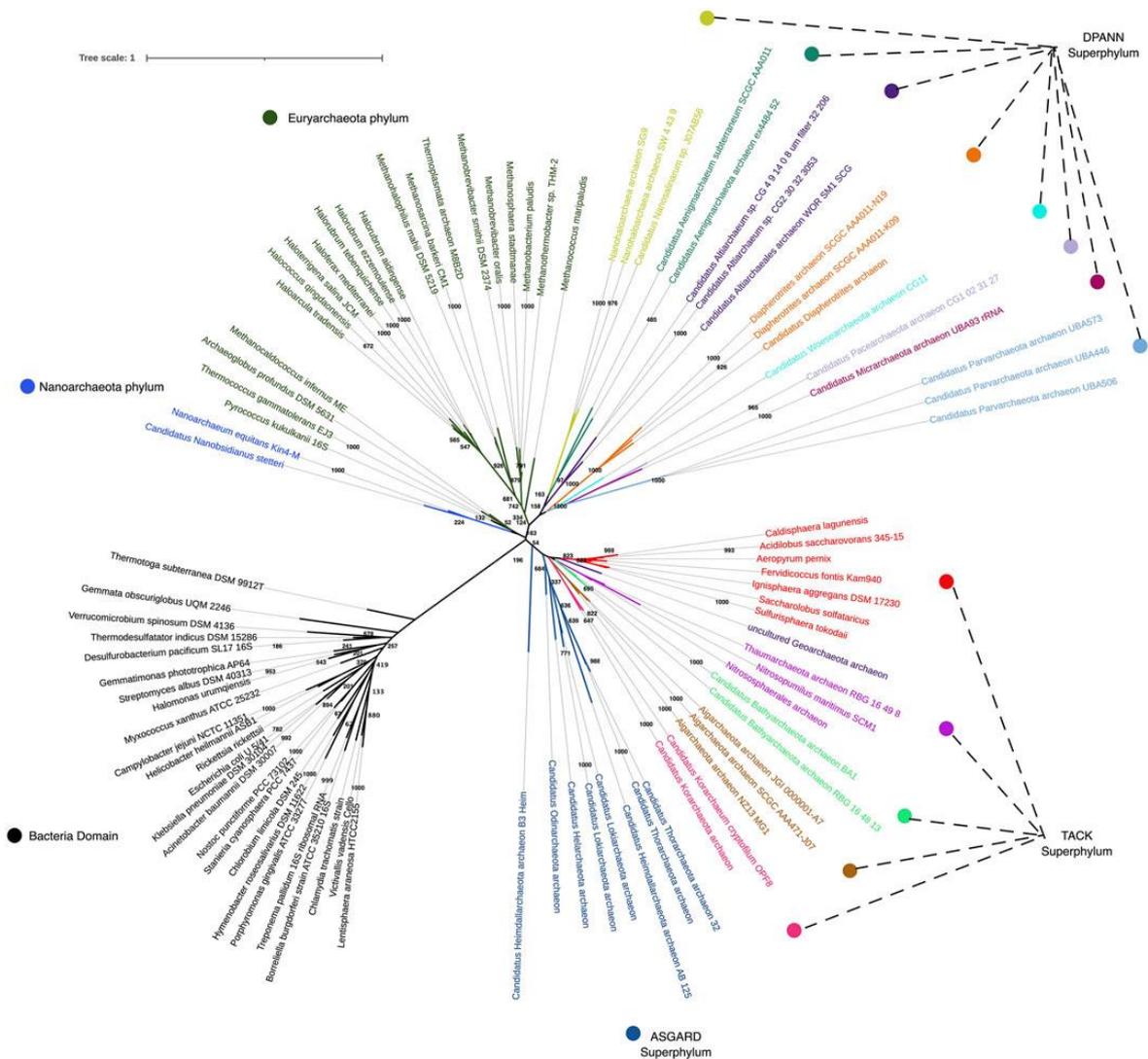


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях генов 16S рРНК из архей и бактерий (Medina-Chavez&Travisano, 2022). Метод максимального правдоподобия.

1.3. Общие сведения о культивируемых гипертермофильных археях

Как упоминалось ранее, гипертермофильными считаются организмы, оптимум роста которых лежит выше 80°C. Большинство гипертермофильных архей являются либо хемолитоавтотрофами, либо хемоорганогетеротрофами, и в некоторых случаях хемолитоавтотрофные микроорганизмы могут быть оппортунистическими гетеротрофами. Гетеротрофные гипертермофилы получают энергию в процессах аэробного или анаэробного дыхания (например, нитратного, сульфатного, серного или CO₂-зависимого), используя органическое вещество в качестве донора электронов, а также брожения (Stetter, 2006).

Гипертермофильные археи известны среди представителей филумов *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota* и *Nanoarchaeota*. Представители наиболее изученных групп с культивируемыми представителями - *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota* являются или нейтрофильными микроорганизмами с серо-зависимым метаболизмом и/или

осуществляющими брожение, или ацидофильными микроорганизмами с различными типами метаболизма (Swan and Valentine, 2009).

Гетеротрофные гипертермофильные археи филогенетически неоднородны, и число видов гипертермофильных архей-органотрофов значительно уступает таковому среди бактерий (Medina-Chavez&Travisano, 2022). Культивирование архей является сложной задачей - создание и поддержание необходимых анаэробных условий, подбор физических параметров среды (рН, высокой температуры), поиск, подбор и добавление специальных факторов роста (витаминов, микроэлементов, экстрактов) - все это затрудняет выделение и культивирование гипертермофильных архей. Большинство из них растут на пептидах и простых сахарах и только немногие (так называемые, гидролитики) способны расти на нерастворимых и слаборастворимых биополимерах включая полисахариды (Kengen et al., 1996, de Vos et al., 1998, Suleiman et al., 2020). Актуальность изучения архей-гидролитиков обусловлена тем, что такие организмы могут обладать ферментами с новыми активностями и/или механизмами, которые, безусловно, будут представлять интерес для фундаментальной науки; а также подобные белки могут быть использованы в биотехнологии.

1.4. Органотрофные гипертермофильные археи

Культивируемых архей-гипертермофилов, разлагающих полисахариды, известно довольно мало (Таблица 1), и, в большинстве случаев, они могут расти лишь на крахмале и/или мальтодекстрине. Соответственно и подавляющее число их гликозидаз представлено ферментами разложения крахмала - амилазами, амилопулланазами, 4-альфа-глюкантрансферазами и т.д. (Amin et al., 2021). Наибольшее количество полисахаридолитических эвриархей (археи из филума *Euryarchaeota*) относятся к семейству *Thermococcaceae*, которое включает в себя гипертермофилов, способных расти на различных органических соединениях и восстанавливать элементную серу до H_2S в процессе анаэробного дыхания. Большинство из этих микроорганизмов выделены из морских термальных экосистем (подводные горячие источники, как глубоководные, так и шельфовые, и прибрежные, гидротермальные выходы возле тектонических разломов). Обычно, представители *Thermococcaceae* обитают при нейтральном рН, температуре выше 80-85°C, полном анаэробии и иногда при избыточном давлении (Cario et al., 2015). Это семейство включает в себя 3 рода (Табл. 1) – *Palaeococcus*, *Pyrococcus* и, самый многочисленный, *Thermococcus*, который включает в себя 43 вида гетеротрофных архей, 17 из которых способны расти на полисахаридах.

Среди кренархеот (архей из филума *Crenarchaeota*) растущие на полисахаридах штаммы относятся к гипер- и экстремально- термофильным ацидофильным археям *Acidilobus*,

Saccharolobus и *Sulfolobus* spp. (Prokofeva et al., 2009; Sakai et al., 2018), представителям порядка *Desulfurococcales*. Только для двух видов кренархей из порядка *Thermoproteales* показан рост на полисахаридах - для *Thermofilum uzonense* и *T. pendens* (Toshchakov et al., 2015; Zillig et al., 1983) из семейства *Thermofilaceae*, которое включает в себя одних из самых глубоких в эволюционном аспекте микроорганизмов. В данной работе будут представлены результаты, демонстрирующие обособленность этой группы кренархеот и реорганизацию этого семейства до уровня порядка.

Среди гипертермофильных архей насчитывается всего 12 родов, культивируемые представители которых способны к росту на полисахаридах, что на несколько порядков меньше, чем у бактерий. Помимо невысокого числа и разнообразия полисахаридолитических гипертермофильных архей, достаточно узок и спектр полисахаридов, которые они могут усваивать. В основном это полисахариды с α -связью (крахмал, амилоза, декстрины, пуллуланы), в то время как на β -связанных полисахаридах (целлюлоза, ксилан, различные маннаны и бета-глюканы) могут расти лишь единицы (Рис. 5).

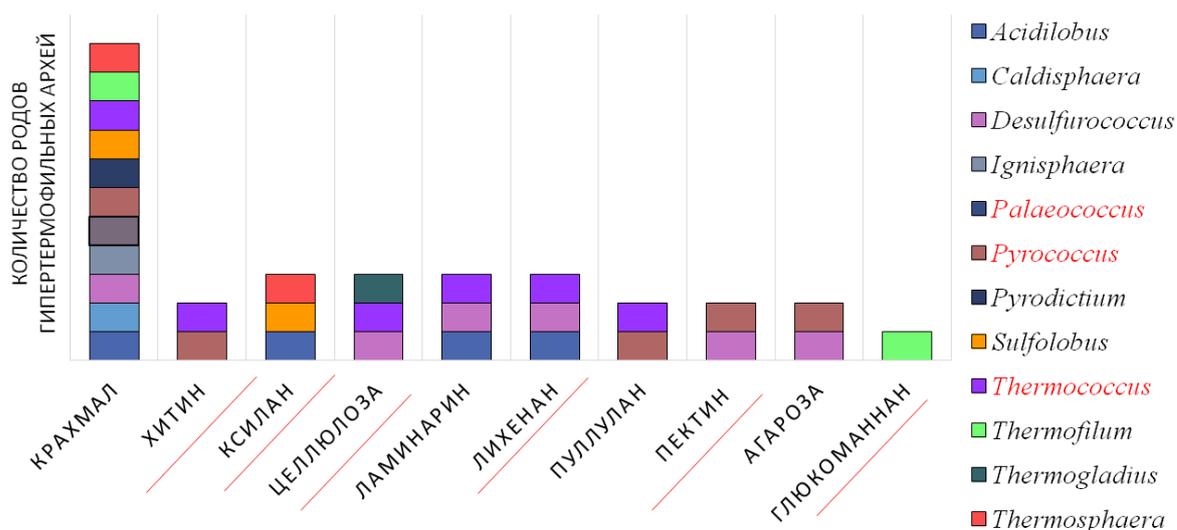


Рисунок 5. Количество родов гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах. Красным шрифтом отмечены представители филума *Euryarchaeota*, черным – *Crenarchaeota*. Красной линией подчеркнуты полисахариды с β -(1-4) и или β -(1-4, β -(1-3)) -гликозидными связями.

С развитием методов секвенирования, а также появлением и развитием новых методов, таких как функциональная метагеномика, скрининг белков по их активности (Zweierink et al., 2017) и др. стало возможным изучать гидролитический потенциал целых сообществ, не выделяя микроорганизмы в чистые культуры. Также, ведется поиск генов гидролитических ферментов в геномах, собранных из метагеномных данных, а также у известных и описанных организмов с секвенированными геномами. Тем не менее, выделение новых гидролитических архей в чистые культуры, с одной стороны делает более надежной и всесторонней их

характеристику, а с другой облегчает работу по поиску и описанию их ферментов (например, проведение сравнительных протеомных или транскриптомных экспериментов для выявления новых классов и семейств ферментов).

На текущий момент (2022 год) по данным базы <https://img.jgi.doe.gov/> секвенировано 2158 геномов архей (здесь учитываются и неполные геномы), что почти в 44 раза меньше, чем бактериальных (96 436). Из них 976 геномов принадлежит представителям филума *Euryarchaeota* и 306 – к филуму кренархеот; 213 геномов отнесено к филуму *Thaumarchaeota* и 21 к наноархеям (представители суперфилума DPANN). Кроме того, секвенированы геномы таких некультивируемых филумов, как *Aigararchaeota* (18 геномов), *Aenigmarchaeota* (15), *Bathyarchaeota* (38), *Parvarchaeota* (24), *Woesearchaeota* (40) и др. все они являются собранными из метагеномов геномами (MAG) или геномами, отсекурованными из единичной клетки (SAG).

Таблица 1. Органотрофные гипертермофильные археи, способные к росту на углеводах.

Микроорганизм/Вид/ Таксономическое положение	Оптимальные условия роста		Полимеры/сложные субстраты/ полисахариды	Простые субстраты/ моно-, олиго-, дисахариды/ЛЖК	Ссылки
	Т, °С мин/ опт/макс	рН мин/ опт/макс			
Филум <i>Euryarchaeota</i>					
Класс <i>Archaeoglobi</i> , Порядок <i>Archaeoglobales</i> , Семейство <i>Archaeoglobaceae</i> , Роды <i>Archaeoglobus</i> , <i>Ferroglobus</i> , <i>Geoglobus</i> – анаэробные гипертермофильные археи, хемолитоавто-, реже хемолитогетеротрофы. Растут на простых органических соединениях, реже на сложных (пептон, дрожжевой экстракт). Не способны усваивать сахара/полисахариды (Slobodkina et al., 2009; Kashefi et al., 2002)					
Класс <i>Thermococci</i> , Порядок <i>Thermococcales</i> , Семейство <i>Thermococcaceae</i> , Роды <i>Palaeococcus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Thermococcus</i> . Анаэробные органотрофные археи, многие способны расти на полисахаридах и усваивать простые сахара. Наиболее многочисленный род <i>Thermococcus</i> (43 вида)* *в таблице приведены только те виды, которые растут на полисахаридах и сахарах					
<i>Palaeococcus pacificus</i>			Пептиды, казеин, крахмал , Казаминовые кислоты	Цитрат, лактат, ацетатфумарат, пропионат, пируват	Zeng et al., 2013
<i>Pyrococcus kukulkani</i>	70/105/112	3,5/7/8,5	Дрожжевой экстракт, пептон, триптон, крахмал , гликоген		Callac et al., 2016
<i>Pyrococcus yayanosii</i>	80/98/108	6/7,5- 8,0/9,5	Пептиды, казеин, крахмал , хитин	Сахароза , целлобиоза , ацетат, пируват	Birrien et al., 2011
<i>Pyrococcus glycovorans</i>	74/95/104	2,5/7,5/9,5	Пептиды, крахмал , хитин	Целлобиоза , мальтоза	Barbier et al., 1999
<i>Pyrococcus woesei</i>	70/95/100	5/6/9	Крахмал , пептиды	Целлобиоза , мальтоза	Zillig et al., 1987
<i>Pyrococcus furiosus</i>	70/100/103	5/7/9	Пуллулан , крахмал , хитин , ламинарин , лихенан , целлюлоза , пептон, дрожжевой экстракт	Мальтоза , целлобиоза	Fiala and Stetter, 1986 Kengen et al., 1993 Gueguen et al., 1997
<i>Thermococcus stetteri</i>	55/75/94	5,7/6,5/7,2	Крахмал , пектин		Miroshnichenko et al., 1989
<i>Thermococcus profundus</i>	50/80/90	4,5/7,5/8,5	Крахмал	Мальтоза	Kobayashi et al., 1993
<i>Thermococcus pacificus</i>	70/80-88/95	6/6,5/8	Крахмал		Miroshnichenko et al., 1993

Микроорганизм/Вид/ Таксономическое положение	Оптимальные условия роста		Полимеры/сложные субстраты/полисахариды	Простые субстраты/моно-, олиго-, дисахариды/ЛЖК	Ссылки
	Т, °С мин/ опт/макс	рН мин/ опт/макс			
<i>Thermococcus aciditolerans</i>	50/85/90	4/5,5/9	Пептиды, крахмал	Мальтоза	Li et al., 2021
<i>Thermococcus indicus</i>	70/80/82	5/6/8	Крахмал, мальтодекстрин	Мальтоза, пируват	Lim et al., 2020
<i>Thermococcus nautili</i>	55/87.5/95	4/7/9	Дрожжевой экстракт, пептон, триптон, крахмал	Пируват	Gorlas et al., 2014
<i>Thermococcus guaymasensis</i>	56/88/90	5,6/7,2/8,1	Крахмал	Мальтоза	Canganella et al., 1998
<i>Thermococcus aggregans</i>	60/88/94	5,6/7/7,9	Крахмал	Мальтоза	Canganella et al., 1998
<i>Thermococcus waiotapuensis</i>	60/88/90	5/7/8,5	Крахмал	Мальтоза	Gonzalez et al., 1999
<i>Thermococcus aegaicus</i>	50/88-90/95	4,5/6/7,5	Крахмал		Arab et al., 2000
<i>Thermococcus eurythermalis</i>	50/85/100	4/7/9	Крахмал		Zhao et al., 2015
<i>Thermococcus chitonophagus</i>	60/85/93	3,5/6,7/9	Хитин		Huber et al., 1995
<i>Thermococcus kodakariensis</i>	60/85/100	5/6,5/9	Пуллулан, циклодекстрин, крахмал		Atomi et al., 2004
<i>Thermococcus sibiricus</i>	40/78/88	5,8/7,5/9	Декстран, АМЦ, КМЦ, агароза		Miroshnichenko et al., 2001 Mardanov et al., 2009
<i>Thermococcus parvalvinellae</i>	50/82/91	5/8/8,3	Дрожжевой экстракт, триптон, казеин	Мальтоза, целлобиоза	Hensley et al., 2014
<i>Thermococcus cleftensis</i>	55/88/94	5/8/8,3	Дрожжевой экстракт, триптон, казеин	Мальтоза, целлобиоза	Hensley et al., 2014
Филум <i>Crenarchaeota</i>					
Класс <i>Thermoprotei</i> , Порядок <i>Acidilobales</i> , Семейство <i>Acidilobaceae</i> , Род <i>Acidilobus</i> - анаэробные кокки, обитающие в ацидофильных гидротермах					
<i>Acidilobus aceticus</i>	60/85/92	2/3,8/6	Крахмал, дрожжевой экстракт, соевый экстракт		Prokofeva et al., 2000
<i>Acidilobus saccharovorans</i>	60/80-85/90	2,5/3,5- 4/5,8	Крахмал, лихенан, ламинарин, ксилан	Лактоза, сахароза	Prokofeva et al., 2009

Микроорганизм/Вид/ Таксономическое положение	Оптимальные условия роста		Полимеры/сложные субстраты/ полисахариды	Простые субстраты/ моно-, олиго-, дисахариды/ЛЖК	Ссылки
	Т, °С мин/ опт/макс	рН мин/ опт/макс			
<i>Acidilobus sulfurireducens</i>	62/70/89	2/3,3/5,5	Дрожжевой экстракт, триптон, желатин, гликоген		Boyd et al., 2007
Класс <i>Thermoprotei</i> , Порядок <i>Acidilobales</i> , Семейство <i>Caldisphaeraceae</i> , Род <i>Caldisphaera</i> (<i>Caldisphaera draconis</i> не растет на углеводах, Boyd et al., 2007)					
<i>Caldisphaera lagunensis</i>	45/70-75/80	2,3/3,5- 4/5,4	Крахмал		Itoh et al., 2003
Класс <i>Thermoprotei</i> , Порядок <i>Desulfurococcales</i> , Семейство <i>Desulfurococcaceae</i> , Роды <i>Aeropyrum</i> , <i>Desulfurococcus</i> , <i>Ignisphaera</i> , <i>Staphylothermus</i> , <i>Stetteria</i> , <i>Sulphobococcus</i> , <i>Thermogladius</i> , <i>Thermosphaera</i> , <i>Zestosphaera</i> – анаэробные археи, имеющие коккообразную или шарообразную форму. Способны сбраживать различные органические вещества.					
<i>Desulfurococcus amylolyticus</i>	68/90-92/97	5,7/6,4/7,5	Аминокислоты, пептиды, гликоген, пектин, крахмал		Bonch-Osmolovskaya et al., 1988
<i>Desulfurococcus fermentans</i>	63/80-82/89	4,8/6/6,8	Агароза, амигдалин, целлюлоза (МКЦ, КМЦ, фильтрованная бумага), ламинарин, лихенан, крахмал, декстран, пектин, пептиды, кератин, казеин	Мальтоза, арбутин	Perevalova et al., 2005
<i>Ignisphaera aggregans</i>	85/90/95	5,4/6,4/7	β Глюкоманнан, крахмал, декстрин	Мальтоза	Niederberger et al., 2006
<i>Thermogladius calderae</i>	84	7,1	Дрожжевой экстракт, пептон, казеин, целлюлоза (КМЦ, МКЦ)		Kochetkova et al., 2016
<i>Thermosphaera aggregans</i>	65/85/90	5/6,5/7	Термически обработанный ксилан, аминокислоты, желатин, пептиды	Глюкоза	Huber et al., 1998
Класс <i>Thermoprotei</i> , Порядок <i>Desulfurococcales</i> , Семейство <i>Pyrodictiaceae</i> , Роды <i>Hyperthermus</i> , <i>Pyrodictium</i> , представители родов <i>Geogemma</i> , <i>Pyrolobus</i> – хемолитоавтотрофы (Bloch et al., 1997)					
<i>Pyrodictium abyssi</i>	80/97/110	4,7/5,5/7,1	Крахмал, гликоген	Лактоза, раффиноза	Pley et al., 1991

Микроорганизм/Вид/ Таксономическое положение	Оптимальные условия роста		Полимеры/сложные субстраты/ полисахариды	Простые субстраты/ моно-, олиго-, дисахариды/ЛЖК	Ссылки
	Т, °С мин/ опт/макс	рН мин/ опт/макс			
Класс <i>Thermoprotei</i> , Порядок <i>Fervidicoccales</i> , Семейство <i>Fervidicoccaceae</i> , Род <i>Fervidicoccus</i>					
<i>Fervidicoccus fontis</i>	55/65-70/85	4,5/5,5- 6/7,5	Дрожжевой экстракт, пептон, триптон, желатин	Сахароза , пируват, трибутирин*, глюкоза*	Perevalova et al., 2010 * Карасева и др., 2021
Класс <i>Thermoprotei</i> , Порядок <i>Sulfolobales</i> , Семейство <i>Sulfolobaceae</i> , Роды <i>Saccharolobus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Sulfurisphaera</i> – аэробные и анаэробные археи, ацидофилы. В основном, органотрофы, но некоторые способны к хемоавтотрофному росту. Род <i>Acidilobus</i> – включает аэробных и анаэробных хемолитоавтотрофных архей, способных к дипропорционированию серы и ее соединений (He ZG et al., 2004). Род <i>Metallosphaera</i> представлен анаэробными, факультативно хемолитотатрофными археями, способных к росту на белковых субстратах (Peng et al., 2015)					
<i>Saccharolobus (Sulfolobus</i> бывш.) <i>sofataricus</i> MT4	70/80/90	2/3,7/4,5	Дрожжевой экстракт, триптон, пептон, Казаминовые ксилоты, декстран, крахмал, ксилан*	Мальтоза, целлобиоза, лактоза, сахароза, манноза	Grogan, 1989 *-Cannio et al., 2003
<i>Saccharolobus solfataricus</i> P2	70/78/86	2/3-3,3/4	Декстран, крахмал	Мальтоза, целлобиоза, лактоза, сахароза, трегалоза	Grogan, 1989
<i>Saccharolobus shibatae</i>	55/81/86	1,5/3/6	Дрожжевой экстракт, триптон, пептон, Казаминовые кислоты, крахмал	Сахароза, мальтоза, раффиноза, глюкоза, галактоза, манноза, арабиноза	Grogan, 1990
<i>Saccharolobus caldissimus</i>	65/85/93	1,5/3/6	Дрожжевой экстракт, триптон, пептон, Казаминовые кислоты, крахмал	Сахароза, мальтоза, раффиноза, глюкоза, галактоза, манноза, арабиноза	Sakai et al., 2018
<i>Sulfodiicoccus acidiphilus</i>	50/60-65/70	1,4/3/5,5	Дрожжевой экстракт, триптон, пептон, Казаминовые кислоты	Арабиноза, ксилоза, галактоза, глюкоза, мальтоза, сахароза, раффиноза и лактоза	Sakai&Kurosawa, 2017

Микроорганизм/Вид/ Таксономическое положение	Оптимальные условия роста		Полимеры/сложные субстраты/ полисахариды	Простые субстраты/ моно-, олиго-, дисахариды/ЛЖК	Ссылки
	Т, °С мин/ опт/макс	рН мин/ опт/макс			
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	55/70-75/80	1,5/2-3/5,9	Дрожжевой экстракт, триптон, пептон, Казаминовые кислоты, крахмал	Глюкоза	Brock et al., 1972; Sakai et al., 2018
<i>Sulfolobus yangmingensis</i>	65/80/90	2/4/6	Дрожжевой экстракт	Сахароза, мальтоза, раффиноза, глюкоза, галактоза, манноза, арабиноза	Jan et al., 1999
Класс <i>Thermoprotei</i> , Порядок <i>Thermoproteales</i> , Семейство <i>Thermofilaceae</i> , Род <i>Thermofilum</i> – анаэробные, гетеротрофные археи, с метаболизмом, зависимым от ко-факторов других архей					
<i>Thermofilum pendens</i>	85-90	5.0-6.0	Дрожжевой экстракт, пептон, триптон, желатин	Сахароза	Zillig et al., 1983
<i>Thermofilum uzonense</i>	70/85/90	5,5/6,0- 6,5/7,0	Дрожжевой экстракт, пептон, глюкоманнан, крахмал	Глюкоза	Toshchakov et al., 2015
Класс <i>Thermoprotei</i> , Порядок <i>Thermoproteales</i> , Семейство <i>Thermoproteaceae</i> , Род <i>Caldivirga</i> , <i>Pyrobaculum</i> , <i>Thermocladium</i> , <i>Thermoproteus</i> , <i>Vulcanisaeta</i> – анаэробные или факультативно анаэробные археи, используют широкий спектр акцепторов для дыхания, морфотип – палочки.					
<i>Caldivirga maquilingensis</i>	85	3.7-4.2	Гликоген , желатин, пептиды		Itoh et al., 1999
<i>Thermocladium modestius</i>	45/75/82	2,6/4.0/5,9	Крахмал , желатин, пептиды		Itoh et al., 1998
<i>Thermoproteus tenax</i>	55/90/100	2,5/5/6	Крахмал, амилоза, амилопектин, гликоген, Казаминовые кислоты	Глюкоза , этанол, метанол, формиат, малат, фумарат	Zillig et al., 1981
<i>Thermoproteus thermophilus</i>	75/85/90	4/5/6	Дрожжевой экстракт, пептон, Казаминовые кислоты, мясной экстракт	Арабиноза , формиат, пируват	June Yim et al., 2015
<i>Vulcanisaeta distributa</i>	90	4,5	Пептиды, казаминовые кислоты, желатин, крахмал	Мальтоза	Itoh et al., 2002
<i>Vulcanisaeta souniana</i>	85	4	Пептиды, казаминовые кислоты, желатин, крахмал	Мальтоза	Itoh et al., 2002

ГЛАВА 2. ЦЕНТРАЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ У АРХЕЙ

Археи сочетают в себе свойства, характерные, как и для бактерий, так и для эукариот. Как и бактерии, археи являются одноклеточными, у них отсутствуют органеллы, с другой стороны, их механизмы информационного процессинга, такие как репликация, транскрипция, репарация, трансляция похожи на урезанные версии эукариотических. Метаболизм у архей весьма сложен и разнообразен, и зачастую в «классических» путях, известных для бактерий и эукариот, в архейных вариантах есть отличительные черты, или у них присутствуют полноценные уникальные пути, например, метаногенез. В частности, это относится и к центральному углеводному метаболизму.

Существуют три основных, «классических» пути, по которым происходит разложение моносахаридов - Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (гликолиз), Энтнера – Дудорова и пентозо-фосфатный путь. Примечательно, что большинство метаболических превращений и интермедиатов, обнаруженных в гликолитических путях, а также и в глюконеогенезе, консервативны во всех трех доменах жизни, что говорит об их управлении термодинамическими и химическими ограничениями, которые единообразны для всех реакций, например, скорости потока веществ (Melendez-Hevia et al., 1997). У *Archaea* обнаружены только модифицированные варианты первых двух путей, а что касается пентозо-фосфатного цикла – он частично представлен в их метаболизме и значительно отличается от бактериального (Bräsen et al., 2014). Однако у архей ферменты, вовлеченные в данные пути, часто не гомологичны таковым у бактерий или эукариот и представляют собой членов новых семейств ферментов.

2.1. Гликолиз и его отличительные особенности у архей

Одним из самых распространённых путей утилизации сахаров является гликолиз, или путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЭМП), который представляет собой многостадийный процесс окисления глюкозы, приводящий к образованию двух молекул пировиноградной кислоты, также двух молекул АТФ. Этот универсальный катаболический путь известен для большинства бактерий и эукариот, а также в модифицированном варианте – для архей.

В основном, архейный гликолиз протекает через те же стадии, что и у бактерий и эукариот, но часто катализируется специфическими ферментами. Стоит заметить, что филогенетически ферменты архей обособлены от таковых у бактерий и эукариот. Различия часто обусловлены приспособленностью организмов к экстремальным условиям среды, в данном случае, к высокой температуре.

Стоит заметить, что у большинства архей транспорт олиго- и моносахаридов происходит с помощью ABC-транспортеров (Albers et al., 2004; Lee et al., 2007), для *Haloarchaea* показан транспорт сахаров через Na⁺-зависимый симпортер (Tawara & Kamo, 1991), в то же время гомологи фосфоенолпируват-зависимых фосфотрансферазных систем (ФТС) не были идентифицированы, кроме нескольких гомологов у представителей *Haloarchaea* (Bräsen et al., 2014).

Первая реакция – фосфорилирование глюкозы – у бактерий, как правило, катализируется АТР-зависимыми специфичными глюкокиназами, в то время как у эукариот гексокиназы, участвующие в этой реакции, имеют широкую субстратную специфичность. Для архей описаны два различных механизма: фосфорилирование АDP-зависимой глюкокиназой свойственно представителям филума *Euryarchaeota* и РОК гексокиназой – филума *Crenarchaeota*. РОК (repressor protein, open reading frame, sugar kinase) гексокиназы – семейство АТР-зависимых киназ, использующих в качестве субстрата различные сахара (гексозы) помимо глюкозы.

Изомеризация глюкозо-6-фосфата до фруктозо-6-фосфата у *Crenarchaeota* происходит при участии фосфоглюкозо/фосфоманнозо-изомеразы – бифункционального фермента, принадлежащего семейству PGI/PMI. Для архей из других филумов, бактерий и эукариот известны различные другие ферменты, например, фосфоглюкозо-изомераза семейства PGI и суперсемейства Cupin (с PGI семейства).

Фосфофруктокиназы, участвующие в гликолизе у архей, бактерий и эукариот, также принадлежат к различным семействам, в зависимости от того, какое соединение выступает в качестве донора фосфатной группы: PP_i (пирофосфат), АDP или АТР пирофосфат-зависимые ферменты встречаются у *Crenarchaeota*, некоторых бактерий и эукариот; АDP-зависимые – в основном у анаэробных представителей *Euryarchaeota*; АТР-зависимые фосфофруктокиназы семейства PFK-A – у бактерий и эукариот; семейства PFK-B у некоторых *Crenarchaeota*.

Известны два класса фруктозобисфосфат-альдозаз, различающиеся по механизму расщепления фруктозо-1,6-бисфосфата на две триозы и по распространению в организмах. Класс I объединяет эукариотические, бактериальные и архейные ферменты, которые, как считается, имеют общего предка, но сильно различные последовательности. Альдозазы II типа найдены у бактерий и грибов.

Изомеризация дигидроксиацетонфосфата (DHAP) в глицeralдегидфосфат (GAP) происходит при участии универсального для разных организмов фермента – триофосфатизомеразы.

В классическом гликолизе у бактерий, и эукариот обратимое окисление глицeralдегид-3-фосфата происходит под действием ферментов NAD⁺-зависимой

глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPN) и фосфоглицерат киназы (PGK) и сопровождается образованием интермедиата – 1,3-бисфосфоглицерата. Однако, у большинства термофильных архей эта реакция происходит в одну стадию и является необратимой. В таком случае катализаторами выступают ферредоксин-зависимая глицеральдегид-3-фосфат ферредоксин оксидоредуктаза (GAPOR; ferredoxin-dependent glyceraldehyde-3-phosphate: ferredoxin oxidoreductase) или NAD(P)⁺-зависимая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (GAPN; NAD(P)⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), использующие в качестве переносчика электронов ферредоксин и NAD(P)⁺, соответственно. Такая реакция не сопровождается образованием АТФ.

Так, в реакциях субстратного фосфорилирования при конверсии 2 молекул GAP до пирувата образуется 4 молекулы АТФ, 2 молекулы АТФ расходуются на фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6 фосфата до фруктозо-1,6-бисфосфата в начальных стадиях гликолиза, таким образом, общий выход составляет 2 молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы. В этом пути стадии изомеризации G6P до F6P и фосфорилирование F6P до F1,6BP, как и образование пирувата из фософенолпирувата являются необратимыми процессами, а их ферменты аллостерически регулируются (Melendez-Nevia et al., 1997).

Данные модификации, вероятно, обусловлены адаптациями к экстремальным условиям среды. Стоит заметить, что триозофосфаты, интермедиаты гликолиза, особенно нестабильны при высоких температурах, и таким образом, избегая образования 1,3-бисфосфоглицерата, термофильные археи увеличивают эффективность гликолиза. Различают кофактор-зависимые и независимые фосфоглицерат мутазы, причем у архей найдены оба типа ферментов. Остальные ферменты – енолаза (ENO) и пируват киназа (PK) - достаточно консервативны как внутри доменов, так и между ними. Дальнейшие стадии – дегидратация 2-фосфоглицерата и образование пирувата из фосфоенолпирувата – также консервативны и не отличаются от классических (Bräsen et al., 2014). На Рисунке 6 представлена схема протекания гликолиза и указаны ферменты, принимающие участие на разных стадиях для трех доменов жизни.

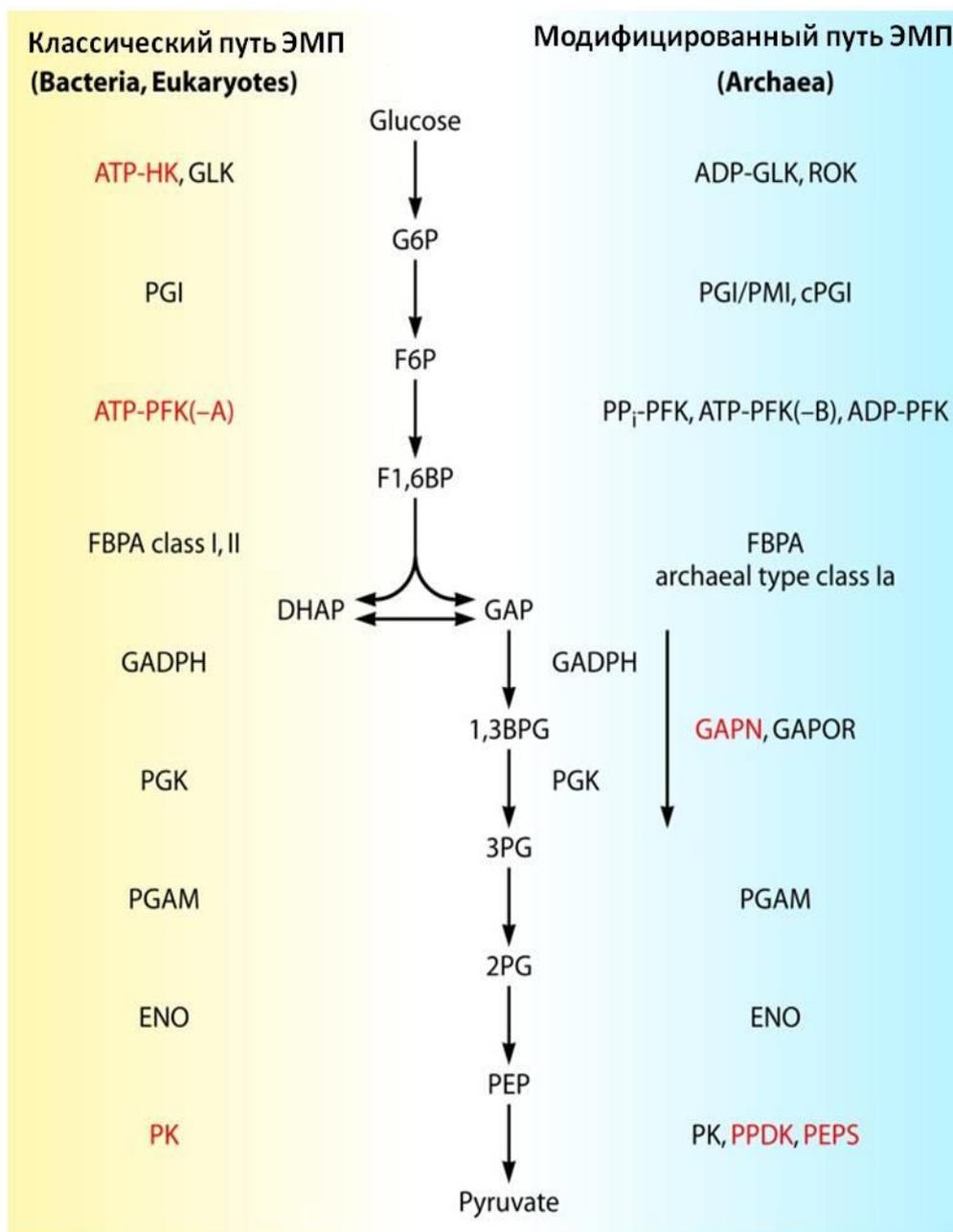


Рисунок 6. Путь гликолиза характерный для бактерий и эукариот (классический) и архей (Bräsen et al., 2014). Аллостерически регулируемые ферменты показаны красным. Сокращения ферментов: ENO, енолаза; FBPA, фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза; GAPDH, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; GAPN; GAPDH; GAPOR; GLK, глюкозо киназа; НК, гексокиназа; PEPS, PEP синтаза; PFK, фосфофруктокиназа; PGI, фосфоглюкозо изомераза; PGI/PMI, фосфоглюкозо изомераза/фосфоманнозо изомераза; cPGI, фосфоглюкозо-изомераза типа *surin*; PGAM, фосфоглицерат мутаза (dPGAM, 2,3-бисфосфоглицерат [2,3BPG] кофактор-зависимая; iPGAM, 2,3BPG кофактор-независимая); PK, пируват киназа; PPK, пируват:фосфат дикиназа; ROK, гексокиназа.

2.2. Путь Энтнера-Дудорова

Классический путь Энтнера-Дудорова отличается от гликолиза только начальными стадиями. Глюкозо-6-фосфат формируется под действием АТФ-зависимых гексокиназ/глюкокиназ или ФТС и последовательно окисляется до 6-фосфоглюконата (6PG) с помощью глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и 6-фосфоглюконолактоназы, которая осуществляет реакцию образования ключевого интермедиата этого пути – 2-кето-3-дезоксиглюконата (KDPG), который разрушается альдолазой на пируват и GAP, который, в свою очередь, превращается в пируват под действием таких же ферментов, как и в гликолизе (Рис. 6). В результате при окислении глюкозы образуется 1 молекула GAP и 2 молекулы АТФ, одна из которых идет на фосфорилирование глюкозы. Таким образом, на 1 молекулу глюкозы образуется 1 молекула АТФ.

Путь ЭД (Рис. 7) у архей представлен двумя модифицированными версиями классических реакций и, как считается, характерен только аэробам (исключение составляет анаэроб *Thermoproteus tenax*). Нефосфорилированный вариант пути ЭД описан для гипертермофильных архей *Sulfolobus solfataricus*, *Thermoplasma acidophilum* и *Thermoproteus tenax*. Полуфосфорилированный – для галофилов *Halobacterium saccharovorum* и *Halobacterium halobium*.

В полуфосфорилированном варианте ЭД пути, описанном для галоархей, глюкоза напрямую окисляется до глюконата с помощью глюкозодегидрогеназы (GDH). Глюконат дегидратаза (GAD) преобразует глюконат в 2-кето-3-дезоксиглюконат (KDG), который фосфорилируется KDG киназой до KDPG. 2-кето-3-дезоксифосфоглюконат расщепляется на пируват и фосоглицеральдегид (GAP) под действием KDPG альдолазы. Далее, GAP преобразуется по общему, как для ЭД, так и для гликолиза пути (у галоархей классический путь ЭМП, как и у бактерий) (Johnsen et al., 2001).

Для нефосфорилированного варианта ЭД пути первые два шага такие же, как и для полуфосфорилированного – это окисление глюкозы до глюконата и дегидратация его до KDG. Однако, далее 2-кето-3-дезоксиглюконат не фосфорилируется, а напрямую расщепляется на глицеральдегид (GA) и пируват с помощью KDG альдолазы, которая специфична только к 2-кето-3-дезоксиглюконату (Reher et al., 2010; Budgen et al., 1986). У *Thermoplasma* и *Picrophilus*, глицеральдегид далее окисляется до глицерата под действием GA дегидрогеназы, который дальше фосфорилируется глицерат киназой до 2-фосфо-глицерата (2PG) и далее, как и в гликолизе, конвертируется в пируват. В данном пути нет фосфорилирования KDG и глицеральдегид окисляется напрямую, без дополнительного фосфорилирования и затрат АТФ, однако, также нет и его образования, поэтому выход АТФ равен нулю (Ahmed et al., 2005).

Однако недавние исследования помогли обнаружить у гипертермофильных кренархей *Sulfolobus solfataricus* P2 и *Thermoproteus tenax* существование обеих ветвей этого пути, работающих параллельно.

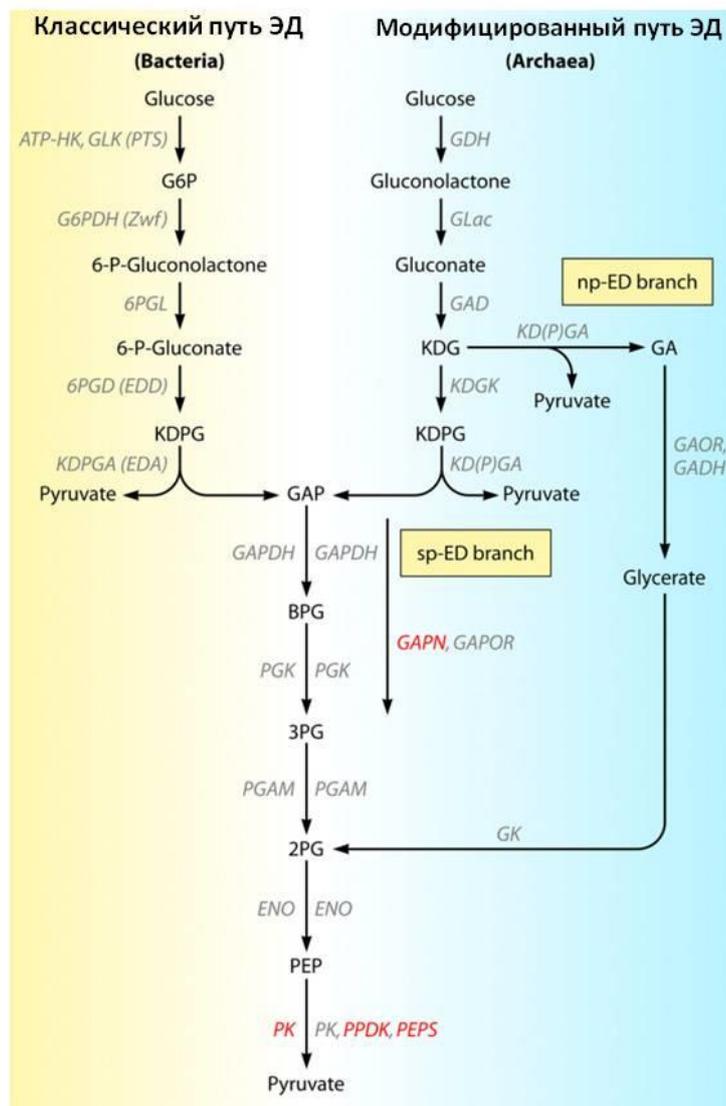


Рисунок 7. Путь Энтнера-Дудорова, классический путь (для бактерий) и версии для архей – нефосфорилированный путь (npED) и полуфосфорилированный (spED) с фосфорилированием глицерата и 2-кето-3-дезоксиглюконата (KDG) (Bräsen et al., 2014). Сокращения: 6PGD (EDD), 6-фосфоглюконатдегидратаза; ENO, енолаза; G6PDH глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; GAD, глюконатдегидратаза; GADH, глицеральдегид дегидрогеназа; GAOR, глицеральдегид: ферредоксин оксидоредуктаза; GAPDH, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; GAPN, нефосфорилирующая GAPDH; GAPOR, GAP: ферредоксин оксидоредуктаза; GDH, глюкозодегидрогеназа; GK, глицераткиназа; GLac, глюконолактоназа; GLK, глюкокиназа; HK, гексокиназа; KDGK, 2-кето-3-дезоксиглюконат киназа; KDPGA (EDA), 2-кето-3-дезоксиглюконат альдолаза; KD(P)GA, 2-кето-3-дезоксиглюконат альдолаза; PGK, фосфоглицерат киназа; PGL, 6-фосфоглюконо-1,4-лактоназа; PGAM, фосфоглицеромутаза (dPGAM, 2,3BPG кофактор зависимая; iPGAM, 2,3BPG кофактор независимая); PK, пируват киназа; PEPS, PEP синтаза PPK, пируват:фосфат дикиназа; PTS, PEP-зависимая фосфотрансферазная система.

В модифицированном пути ЭД низкий выход АТФ нивелируется эффективным управлением необратимых реакций этого процесса. Так, в нефосфорилированной ветви образуются термостабильные интермедиаты (GAP, 1,3BPG), а в фосфорилированной ветви происходит наработка дополнительного количества GAP для анаболического синтеза и может служить механизмом термоадаптации (Kouril et al., 2013).

2.3 Пентозофосфатный путь

Пентозы широко распространены в природе и являются составляющими полимеров, таких как нуклеиновые кислоты (рибоза), гемицеллюлозы клеточных стенок растений (арабиноза, ксилоза). Наиболее тщательно изучен катаболизм пентоз для ксилозы и арабинозы, и описаны три основных пути их деградации.

Первый вариант пути характерен для бактерий – в нем арабиноза и ксилоза конвертируются до ксилулозо-5-фосфата под действием изомераз, киназ и эпимераз с образованием таких интермедиатов как рибулоза и рибулозо-5-фосфат. Далее ксилулозо-5-фосфат метаболизируется через окислительный пентозофосфатный цикл.

Во втором варианте ксилулолозо-5-фосфат также формируется из C5 субстратов (арабинитол, ксилитол и ксилулоза) под воздействием редуктаз, дегидрогеназ и киназ. Этот путь характерен для грибов.

В третьем варианте пути, обнаруженного у некоторых бактерий, пентозы разлагаются до 2-кето-3-деоксиарабиноатов под действием дегидрогеназ, лактоназ и дегидратаз, которые далее конвертируются либо до пирувата и гликоальдегида, либо до оксоглутарата, которые дальше вовлекаются в цикл трикарбоновых кислот.

У архей утилизация пентоз показана для некоторых аэробных галофилов и представителей рода *Sulfolobus* (Рис. 8, Nunn et al., 2010; Johnsen and Schönheit, 2004). Для других архей утилизация пентоз, а, следовательно, и их пути метаболизма не выявлены.

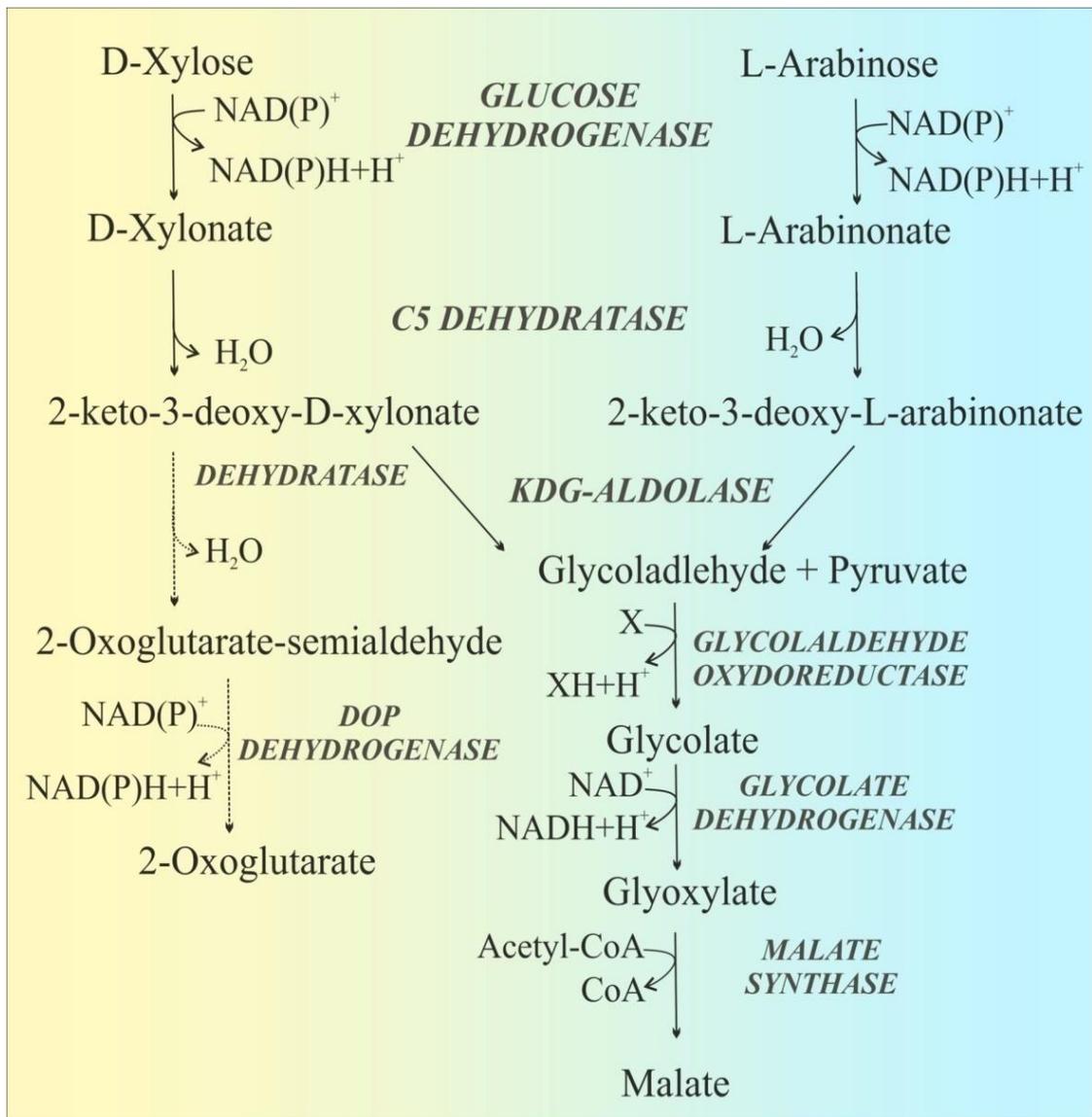


Рисунок 8. Нефосфорилирующий путь Энтнера-Дудорова для катаболизма D-ксилозы и L-арабинозы в *S. solfataricus*. Глюкоза дегидрогеназа (Glucose dehydrogenase) каталитически активна в отношении D-глюкозы, D-галактозы, D-ксилозы и L-арабинозы. Предполагается, что KDG-альдолаза катализирует расщепление 2-кето-3-деокси-глюконата и 2-кето-3-деокси-галактоната, а также KD-ксилоната и KD-арабиноната. Прямое превращение KD-ксилоната в 2-оксоглутарат, предложенное Brouns и др., (Brouns et al., 2006) показано пунктирными стрелками с помощью дегидратазы и DOP (2,5-диоксопентаноат) - дегидрогеназы.

ГЛАВА 3. ФЕРМЕНТЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ УГЛЕВОДЫ

Углеводы - как и моно-, ди-, так и полисахариды - играют важную роль в жизни всех организмов на планете – они являются компонентами многих сложных молекул, таких как нуклеиновые кислоты, гликолипиды и др, а также выполняют структурную, запасующую, протекторную и другие функции. Нерастворимые полисахариды осуществляют структурную и опорную функции в клетках растений, прокариот и в соединительной ткани животных, а некоторые углеводы участвуют в передаче сигналов между клетками. Выполнение большого количества различных функций в организмах обуславливается разнообразием в строении углеводов, а также их производных (гликолипиды, протеогликаны и т.д. (Ленинджер, 1985)). Все эти разнообразные углеводы также являются и источником углерода и энергии для микроорганизмов, способных использовать их в пищу. Однако для этого нужно иметь определенный ферментативный аппарат. За избирательное расщепление гликозидных связей в олиго- и полисахаридах в первую очередь отвечают гликозилгидролазы (гликозидазы) и в меньшей степени, полисахаридлиазы, карбогидратэстеразы и оксидоредуктазы.

3.1. Общие сведения о гликозидазах

Разрушение гликозидной связи между сахарами или между сахаром и другим соединением может происходить различными путями:

1. Гидролиз, в процессе которого образуются отдельные сахараиды, осуществляется гликозидазами (или O-гликозил-гидролазами).
2. Трансгликозилирование осуществляется трансгликозилазами, в итоге образуется альтернативный гликозид.
3. Фосфоролиз – процесс расщепления гликозидов с образованием фосфорилированных производных, осуществляется фосфорилазами.
4. Расщепление сахаридов лиазами с образованием ненасыщенных сахаров.
5. Отщепление углеводэстеразами различных соединений от сахаров с образованием сахара и кислотного остатка.

Все ферменты, участвующие в разложении гликозидных связей называют CAZymes (Carbohydrate Active Enzymes), одним из наиболее многочисленных классов ферментов, входящих в эту группу, являются гликозидазы.

В общем смысле под гликозил-гидролазами (К.Ф. 3.2) подразумевают O-, N-и S-гликозил-гидролазы (Sinnot, 1990). N-гликозил-гидролазы (К.Ф. 3.2.2) являются, главным образом, ферментами метаболизма нуклеиновых кислот, S - гликозил-гидролазы (К.Ф. 3.2.3) или тиоглюкозидазы (Goodman et al., 1959) были реклассифицированы в 2001 году

(<https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.2.1.147>) как O-гликозил-гидролазы с энзиматическим номером (К.Ф. 3.2.1.147).

Гликозидазами называют ферменты, осуществляющие гидролиз O-гликозидных связей в многочисленных субстратах: в олигосахаридах, полисахаридах, гликолипидах, гликопротеинах и т.д. Данные ферменты найдены в подавляющем количестве живых организмах на Земле. Гены, кодирующие гликозидазы, были обнаружены у большинства видов архей, бактерий и эукариотов и даже у некоторых вирусов (Наумов, 2011). Набор гликозидаз у прокариот обычно зависит от их экологической ниши – часто гены гликозил-гидролаз представлены в их геномах в виде дупликаций (несколько паралогов в геноме) или, наоборот, делетированы (наборы гликозидаз различаются у разных штаммов одного вида) или горизонтально перенесены из генома другого микроорганизма (что легко прослеживается по филогенетическому дереву гликозидаз – горизонтально перенесенные ферменты кластеризуются с ферментами хозяина, которые, зачастую, филогенетически далеки от реципиентного организма).

3.2. Механизм действия гликозидаз

Гликозидазы, или гликозил-гидролазы (GH; К.Ф. 3.2.1.xx) являются группой ферментов, катализирующих гликолитическое расщепление O-гликозидной связи. Их субстратная специфичность определяется следующими признаками: 1) аномерная специфичность (α или β); 2) стереохимический механизм катализа (сохраняющий «retaining» или обращающий «inverting»); 3) расположение гидролизуемой связи в сахаре (*экзо*- если гликозидазы отщепляют сахар с конца цепи и *эндо*- если гидролиз происходит внутри полисахаридной цепи); 4) тип разрушаемого сахара (Hancock and Withers, 2007).

Расщепление гликозидных связей этими ферментами основано на кислотном катализе, для осуществления которого нужны два аминокислотных остатка фермента: донор протона (кислота) и нуклеофил (основание). Такой гидролиз может осуществляться с помощью двух главных механизмов – сохраняющий (retaining) механизм и обращающий (inverting) механизм (Koshland, 1953; Sinnott, 1990).

При обращающем «inverting» механизме протонирование гликозидного кислорода кислотным каталитическим остатком и уход агликона сопровождаются атакой молекулы воды, активированной основным каталитическим остатком; в результате такого нуклеофильного замещения образуется продукт с аномерной конфигурацией противоположной субстрату (Davies and Henrissat, 1995). Эти реакции для α - и β -гликозидаз изображены на Рис. 9А и 9Б, соответственно.

При сохраняющем «retaining» механизме кислород у C1 атома в гликозиде протонирован с помощью кислотного остатка в каталитическом центре фермента, а нуклеофильный каталитический остаток стимулирует уход агликона, атакуя аномерный центр с образованием промежуточного комплекса гликозил-фермент; далее кислотный остаток, который играл роль донора протона, депротонирует молекулу воды, которая гидролизует комплекс гликозил-фермент с образованием продукта с такой же аномерной конфигурацией, как и у субстрата (Davies and Henrissat, 1995). Такие механизмы для α - и β -гликозидаз детально изображены на рис. 9В и 9Г, соответственно.

Пространственное положение донора протона по отношению к субстрату в гликозидазах с разными механизмами одинаково, а нуклеофильный остаток расположен ближе к субстрату у ферментов, работающих по сохраняющему механизму, и более отдален у ферментов с обращающим механизмом, у которых между молекулами нуклеофила и субстрата должна присутствовать молекула воды. Таким образом, среднее расстояние между двумя каталитическими остатками составляют 0.55 нм для сохраняющих гликозидаз и 1 нм - для обращающих гликозидаз (McCarter and Withers, 1994). В большинстве случаев каталитическими аминокислотными остатками являются аспартат и/или глутамат (Davies and Henrissat, 1995). Однако в некоторых случаях могут быть использованы другие аминокислоты; например, тирозин - в вирусной нейраминидазе (Burmeister et al., 1993) и бактериальной сиалидазе (Crennel et al., 1993).

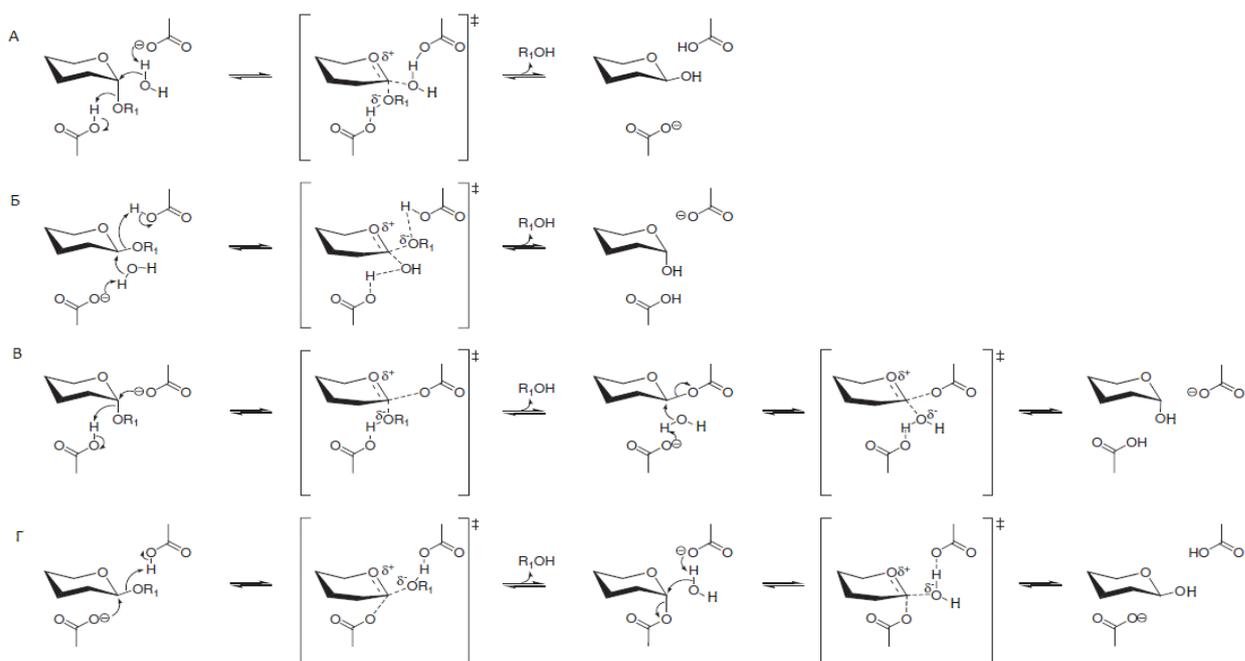


Рисунок 9. Механизм действия гликозилгидролаз: А - обращающая α -гликозидаза, Б - обращающая β -гликозидаза, В - сохраняющая α -гликозидаза, Г - сохраняющая β -гликозидаза (Hancock and Withers, 2007).

Помимо различий в механизмах расщепления, у гликозидаз существуют различные положения (топологии) активного сайта (Davies and Henrissat, 1995):

1. Карман (кратер) оптимален для узнавания нередуцирующего конца сахара и встречается в экзогликозидазах, таких как β -галактозидаза, β -глюкозидаза, сиалидаза, глюкоамилаза и β -амилаза.
2. Бороздка (желобок) позволяет узнавать нескольких единиц в полимерных субстратах и обычно обнаруживается в эндогликозидазах, таких как лизоцим, эндоцеллюлазы, хитиназы и α -амилазы.
3. Туннель обнаружен пока только в целлобиогидролазах.

Все три типа топологии активных сайтов представлены на Рис. 10А, Б и В, соответственно.

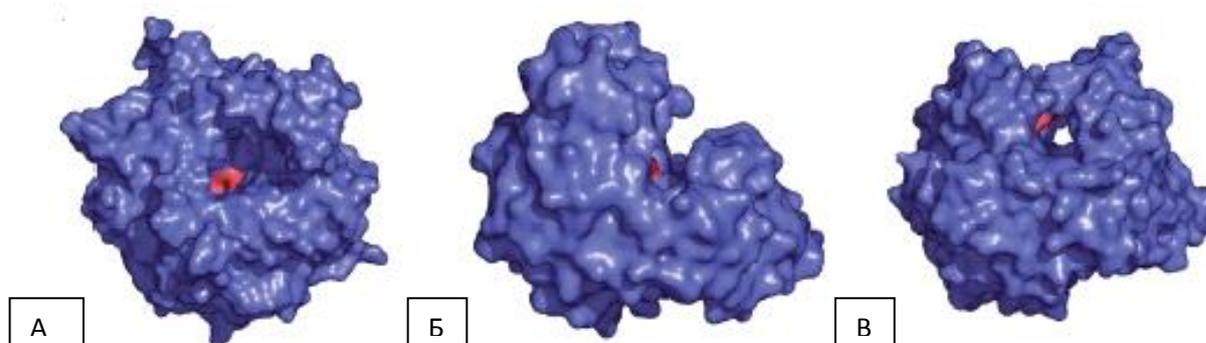


Рисунок 10. Топология активного сайта: А - кратер, Б - бороздка, В - туннель. Предполагаемые каталитические аминокислотные остатки окрашены красным (Hancock and Withers, 2007).

3.3. Классификация гликозидаз

До 1989 года для классификации ферментов использовалась IUBMB номенклатура ферментов, основанная на типе катализируемой реакции и субстратной специфичности фермента. Эта номенклатура была и остается очень полезной, так как позволяет избежать накопления разных тривиальных названий для одних и тех же ферментов и обеспечивает единую классификацию. Однако такая классификация не отражает структурные особенности ферментов и их эволюцию, благодаря чему в одну группу могут попасть и гомологичные (родственные) и аналогичные (в ходе конвергенции неродственные белки приобрели одинаковую активность) белки; помимо этого, такая классификация мало применима к ферментам с широкой субстратной специфичностью.

В 1989 году появилась первая классификация гликозидаз (Henrissat et al., 1989), основанная на сходстве их аминокислотных последовательностей, что позволяет предсказать их родство и объединить на этом основании в различные семейства, а также предсказывать

активности по сходству аминокислотных последовательностей. К 1991 году была исследована 322 последовательность гликозидаз, которые были определены в 36 семейств, причем, из них только 18 содержали одну К.Ф.-активность, а остальные содержали как минимум две К.Ф.-активности (Henrissat, 1991); уже к 1993 году 482 последовательности были определены в 45 семейств (Henrissat and Vairoch, 1993). Согласно базе данных CAZy (Carbohydrate-Active enZymes), на 2022 год 1088916 последовательностей отнесены к 173 семействам (GH1-GH173), однако некоторое количество последовательностей (27915) до сих пор не удается отнести к какому-либо семейству (<http://www.cazy.org>). Многие из этих семейств объединены в кланы, которые формируются в зависимости от строения каталитического домена и третичной структуры белков; распределение семейств гликозидаз по кланам представлено в Таблице 2, поскольку существует прямая взаимосвязь между сходством аминокислотных последовательностей и сходством в третичной структуре белков, также определяющей их активность (Chothia and Lesk, 1986).

Таблица 2. Кланы родственных семейств гликозилгидролаз (<http://www.cazy.org>)

Клан	Тип каталитического домена	Механизм	Семейства гликозилгидролаз (GH)
GH-A	(β/α) ₈ -бочонок	β -сохраняющий	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86, 113, 128, 147, 148, 157, 158, 164, 167
GH-B	β -сэндвич	β -сохраняющий	7, 16
GH-C	β -сэндвич	β -сохраняющий	11, 12
GH-D	(β/α) ₈ -бочонок	α -сохраняющий	27, 31, 36
GH-E	6-лопастной β -пропеллер	α -сохраняющий	33, 34, 83, 93
GH-F	5-лопастной β -пропеллер	β -обращающий	43, 62, 117
GH-G	(α/α) ₆ -бочонок	α -обращающий	37, 63, 100, 125
GH-H	(β/α) ₈ -бочонок	α -сохраняющий	13, 70, 77
GH-I	($\alpha+\beta$)-лизоцимное ядро	β -обращающий	24, 80
GH-J	5-лопастной β -пропеллер	α -сохраняющий	32, 68
GH-K	(β/α) ₈ -бочонок	β -сохраняющий	18, 20, 85
GH-L	(α/α) ₆ -бочонок	α -обращающий	15, 65
GH-M	(α/α) ₆ -бочонок	β -обращающий	8, 48
GH-N	β -спираль	α -обращающий	28, 49
GH-O	(α/α) ₆ -бочонок	α -обращающий	52, 116
GH-P	(α/α) ₆ -бочонок	α -обращающий	127, 146
GH-Q	(α/α) ₆ -бочонок	α -обращающий	94, 149, 161
GH-R	(β/α) ₈ -бочонок	β -сохраняющий	29, 107

3.4. Другие ферменты, участвующие в разложении полисахаридов

Помимо гликозидаз в разложении полисахаридов участвуют полисахаридлиазы, карбогидратэстеразы, а также гликозилтрансферазы.

Полисахаридлиазы (К.Ф. 4.2.2.-) катализируют β -элиминирование гликозидных связей полисахаридов, содержащих урановые кислоты, в процессе которого формируется редуцирующий конец одного фрагмента полисахарида и нередуцирующий фрагмент, содержащий ненасыщенное гексозное кольцо на конце (Gacesa, 1987). Эти ферменты присутствуют почти у всех организмов – от вирусов до эукариот (Sutherland, 1995).

На данный момент времени существует 42 семейства полисахаридлиаз. В целом, классификация полисахаридлиаз аналогична классификации гликозилгидролаз, то есть в ее основе лежит сходство аминокислотных последовательностей ферментов. В настоящий момент 36142 последовательности отнесены к 42 семействам (PL1-PL42) и 1964 последовательности не удалось отнести к какому-либо семейству согласно базе данных CAZy (<http://www.cazy.org>).

Карбогидратэстеразы являются ферментами подкласса эстераз, входящих в класс гидролаз (К.Ф. 3.1(5).1.x). Они катализируют гидролиз сложных эфиров, состоящих из сахаров (находящихся в роли кислоты или спирта) и других групп (ацетильных или метильных).

Согласно базе данных CAZy эти ферменты разделяют на 20 семейств (CE1-CE20) на основании сходства аминокислотных последовательностей белков, также как и в случае гликозилгидролаз и полисахаридлиаз (<http://www.cazy.org>). На 2022 год 110328 последовательностей белков отнесены к этим семействам, а 2829 пока что не определены ни к одному из них. В основном среди карбогидратэстераз распространены ацетилксиланэстеразы (CE1-CE7, CE12), хитиндеацетилазы (CE4), пептидогликандеацетилазы (CE4), пектинметилэстеразы (CE8), рамногалактуронанацетилэстеразы (CE12) и ферменты, катализирующие N-деацетилирование N-ацетилглюкозамин-6-фосфата (CE9) и хитобиозы (CE14) (Biely, 2012).

Гликозилтрансферазы (Glycosyl transferases (GT), К.Ф. 2.4.x.xxx) – ферменты, осуществляющие группу реакций переноса остатков сахаров (одного или нескольких), содержащих молекулу фосфата (которая в процессе реакции удаляется), от активированных «донорных» молекул к «акцепторным» молекулам, формируя при этом гликозидные связи. Субстратами – донорами сахаров часто являются активированные формы нуклеозид дифосфат - сахаров (UDP Gal, UDP Man), нуклеозид монофосфосахара (CMP Man), гликофосфолипиды (долихолфосфодисахарариды), а акцепторами могут быть низкомолекулярные соединения, другие сахара, липиды, белки, нуклеиновые кислоты, антибиотики. Как в случае с

гликозидазами, у гликозилтрансфераз обнаружены 2 механизма действия «inverting» и «retaining». Причем особенности «retaining» механизма до конца не ясны и не изучены. Очень часто такие ферменты часто вовлечены в биосинтез ди-, олиго- и полисахаридов (Lairson et al., 2008).

Согласно базе CAZy на сегодняшний день насчитывают 114 семейств GT (GT1-GT114), в содержащих в общей сумме 934594 идентифицированных белков, тем не менее, 25725 аминокислотных последовательностей не отнесены ни к одному из известных семейств GT.

3.5. Субстраты для CAZYmes

Наиболее распространенными полисахаридами в природе являются следующие полимеры – компоненты растительных клеток: целлюлоза, представленная нерастворимыми фибриллами, гемицеллюлозы (различные растворимые полисахариды), пектины, крахмал, инулин (запасающие вещества), компоненты клеток грибов и животных – хитин, хитозан, различные протеогликаны и гликолипиды, компоненты прокариотических клеток – пептидогликаны, муреиновые кислоты и т.д. (McNeil et al., 1984; Öner et al., 2016). В Таблице 3 перечислены распространенные полисахариды, которые являются субстратами для CAZYmes.

Таблица 3. Распространенные полисахариды – субстраты для CAZYmes

Название	Структура Poly (X-X)_n	Источник	Функция
Целлюлоза	poly-β(1,4)-D-Glucose	Растения, бактерии	Структурная
Ксилан	poly-β(1,4)-D-Xylose	Высшие растения	
	poly-β(1,3)-D-Xylose	Красные водоросли	
	poly-β(1,3;1,4)-D-Xylose		
Арабиноксилан	poly-β(1,4)-D-Xylose- (1,2)-α-L-Arabinose	Голосеменные и покрытосеменные растения, водоросли	
Глюкуроноксилан	poly-β(1,4)-D-Xylose- (1,3)-α-D-Glucuronic acid/O-Methyl-GluA	Высшие растения, водоросли	
Гетероксилан (смешанный тип)	poly-β(-1,4)-D-Xylose- (1,2)-α-L-Arabinose- Galactose-β(1,5)- Arabinose- GluA-β(1,4)- Xylose	Высшие растения	
Маннан	poly β(-1,4)-D-Mannose	Высшие растения	
Галактоманнан	poly β(-1,4)-D-Mannose- α(1,6)-Galactose	Высшие растения	

Название	Структура Poly (X-X) _n ,	Источник	Функция
Глюкоманнан	poly-β(1,4)-D-Glucose- β(1,4)-D-Mannose	Высшие растения	Структурная
Ксилоглюкан	poly-β(1,4)-D-Glucose- β(1,6)-D-Xylose	Высшие растения	
Арабиногалактан I	poly-β(1,4)-D-Galactose- α(1,5)-L-Arabinose	Высшие растения	
Арабиногалактан II	poly-β(1,3)-D-Galactose- (1,6)-L-Arabinose	Высшие растения	
Глюкан (Каллоза)	poly-β(1,3)-D-Glucose	Высшие и низшие растения	Репаративная структурная
	poly-β(1,3;1,4)-D-Glucose		
Галактан	poly-β(1,4)-D-Galactose	Высшие растения	Структурная
Арабинан	poly-α(1,4)-L-Arabinose	Высшие растения	
Галактоуронан	poly-β(1,4)-D- Galacturonic acid	Голосеменные растения	
Крахмал	poly-α(1,4;1,6)-α-D- Glucose	Высшие растения	Запасаящая
Пуллулан	poly-α(1,4;1,6)-α-D- Glucose	Высшие растения	
Инулин	poly-β(2,1)-Fructose- β(2,1)-D-Glucose	Высшие растения	
Леван	poly-β(2,1)-Fructose	Прокариоты, грибы, высшие растения	
Ксантановая камедь	poly-β(1,4)-D-Glucose- α(1,3)-D-Mannose-2,1- β- D-Galacturonic acid-4,1- β-D-Mannose	Бактерии (<i>Xanthomonas campestris</i>)	Структурная
Хитин	poly-β(1,4) -N-acetyl-D- glucosamine	Компоненты панцирей беспозвоночных, клеточных стенок грибов	
Хитозан	poly-β(1,4) -N-acetyl-D- glucosamine- β(1,4) -D- glucosamine	Клеточные стенки беспозвоночных	
Курдлан	poly-β(1,3)-D-Glucose	Микробный матрикс прокариот	Структурная

3.6. Сравнение распространения и разнообразия семейств GH у архей и бактерий.

Выше было упомянуто, что количество архей – гидролитиков значительно уступает таковому среди бактерий. Это же верно и для гликозидаз и других CAZymes. По данным базы CAZymes (<http://www.cazy.org>) количество гликозидаз архей в разных семействах уступает в десятки (Рис. 11), а в некоторых случаях и в сотни раз таковому у бактерий.

	GH 1		GH 2		GH 3		GH 4		GH 5		GH 6		GH 7		GH 8		GH 9		GH 10		GH 11		GH 12		GH 13		GH 14		GH 15		GH 16		GH 17		GH 18		GH 19		GH 20		GH 21		GH 22		GH 23		GH 24		GH 25		GH 26		GH 27		GH 28		GH 29		GH 30		GH 31		GH 32		GH 33	
	Archaea	Bacteria																																																																
1	175	43028	35	25	4265	73	5	28065	106	3	1196	140	1	792																																																				
2	91	25378	36	56	8323	74	0	807	107	0	18	141	1	564																																																				
3	169	37635	37	5	7971	75	0	309	108	0	4730	142	0	213																																																				
4	64	20220	38	91	6907	76	1	1960	109	0	1452	143	0	119																																																				
5	126	16711	39	14	3710	77	75	12433	110	0	624	144	6	1980																																																				
6	0	2334	42	24	6089	78	21	4780	111	0	18	145	0	340																																																				
7	0	10	43	32	21909	79	0	328	112	0	496	146	0	1388																																																				
8	0	7338	44	0	214	80	0	16	113	6	1403	147	0	119																																																				
9	15	2464	45	0	39	81	9	408	114	0	927	148	3	318																																																				
10	44	4387	46	6	968	82	0	90	115	5	1093	149	0	152																																																				
11	11	1372	47	0	54	84	3	1806	116	126	494	150	0	42																																																				
12	129	1198	48	0	1234	85	0	1056	117	0	476	151	0	151																																																				
13	653	112119	49	0	37	86	0	205	118	0	9	152	0	17																																																				
14	0	167	50	7	1149	87	0	826	119	0	38	153	0	3866																																																				
15	591	7886	51	38	5038	88	21	3454	120	0	309	154	15	2410																																																				
16	28	8040	52	0	148	89	0	1043	121	0	387	156	0	53																																																				
17	4	2145	53	3	3406	90	0	133	122	74	0	157	0	4																																																				
18	109	21878	54	0	269	91	0	360	123	0	564	158	0	549																																																				
19	0	8383	55	0	888	92	0	7439	124	0	6	159	2	159																																																				
20	9	10936	57	534	3246	93	12	263	125	0	2490	160	0	13																																																				
22	0	8	58	0	157	94	11	3762	126	0	1235	161	12	121																																																				
23	16	99635	59	0	231	95	6	3383	127	19	3222	162	0	1																																																				
24	1	15234	62	0	498	96	0	12	128	1	321	163	0	232																																																				
25	3	12584	63	8	3742	97	41	2805	129	0	129	164	0	21																																																				
26	16	2897	64	0	782	98	0	400	130	140	2742	165	1	308																																																				
27	6	2196	65	12	7794	99	7	202	133	113	782	166	14	996																																																				
28	17	5697	66	0	337	100	0	255	134	0	6	167	0	86																																																				
29	44	6688	67	10	1093	101	0	710	135	6	388	168	0	33																																																				
30	0	3745	68	32	1555	102	0	9246	136	0	736	169	0	8																																																				
31	135	15411	70	0	796	103	2	17020	137	0	151	170	43	5192																																																				
32	38	14685	71	0	109	104	0	2781	138	0	128	171	7	3163																																																				
33	1	7169	72	0	3	105	17	6098	139	0	136																																																							

Рисунок 11. Сравнение количества последовательностей, принадлежащих археям и бактериям в семействах гликозилгидролаз. Цветами обозначены семейства GH, где присутствуют ферменты, разлагающие целлюлозу, бета-глюкан, лихенан и ксилан. (Данные представлены на конец 2021 года).

Тем не менее, стоит выделить 25 семейств GH, в которых насчитывается наибольшее количество архейных белков (Рис. 12).

Как для архейных, так и для бактериальных гликозидаз достаточно хорошо изучены являются семейства GH1-GH5, а также семейства GH13 и GH15 включающие ферменты разложения крахмала. Интересно, что только для архей характерно семейство GH57, содержащее белки с амилазными и 4-альфа-глюкантрансферазными активностями, что коррелирует с литературными данными – известно достаточно много архейных термостабильных амилаз/пуллулаз из этого семейства (Park et al., 2018; Li et al., 2013; Jiao et al., 2010). Также в число самых многочисленных по архейным белкам семейств GH, вошли семейства GH122, GH130 и GH133, содержащие белки с амилазной, различными маннозилфосфорилазными и α -1,6-глюканазными активностями, соответственно. Для бактерий характерны такие семейства как GH20 - GH25, содержащих ферменты с лизоцим-подобными активностями, также, как и семейства, содержащие гликозидазы, вовлеченные в синтез/разложение пептидогликана (GH102, GH103).

25 семейств GH, где больше всего ферментов

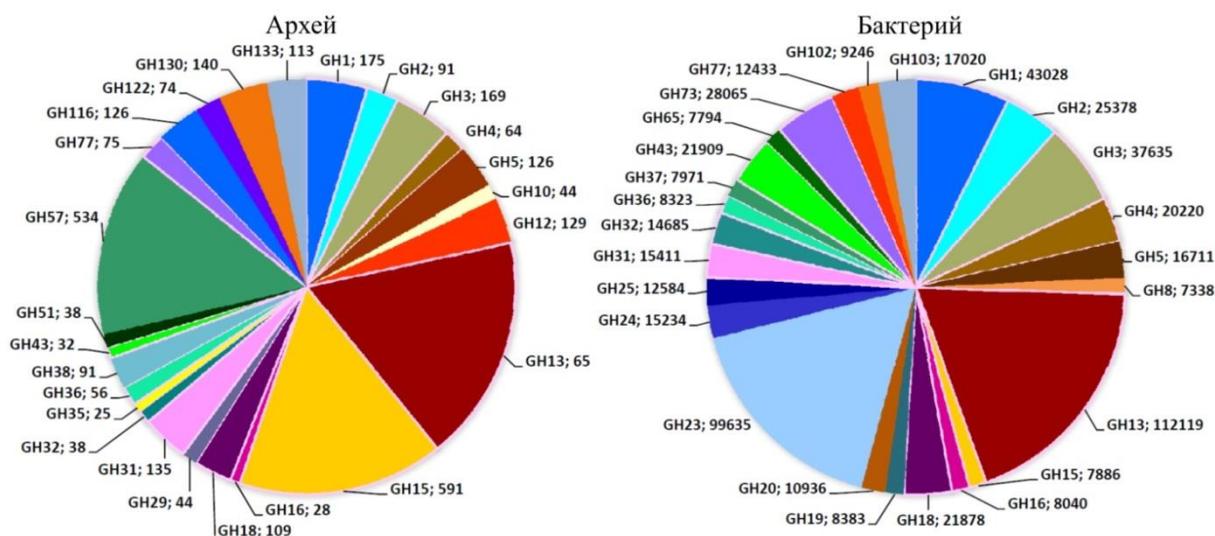


Рисунок 12. Диаграммы из 25 семейств гликозидаз, содержащих наибольшее количество архейных и бактериальных гликозидаз. Минимальные значения для белков из архей составило 25 (в GH38), из бактерий – 7338 (в GH8). Общие семейства GH для архей и бактерий обведены розовой линией: 1-5, 13, 15, 16, 18, 29, 44, 77, 135; (количество последовательностей обозначено для каждого семейства через ; данные представлены на конец 2021 года).

Таким образом, выявление новых белков архей, обладающих способностью к гидролизу полисахаридов, необходимо для расширения знаний о ферментах архей, которые могут представлять неизученные до сих пор семейства, их гидролитическом потенциале и структурных особенностях.

3.7. Рекомбинантные гликозидазы из гипертермофильных архей

Термостабильность и оптимальная активность при высоких температурах – свойства, которые особенно ценятся в ферментах гипертермофилов. Так как большинство ферментов из мезофильных микроорганизмов инактивируются в условиях высоких температур, механизм термостабильности гипертермофильных белков вызывает большой интерес учёных (Bouzas et al., 2006). Для изучения структуры и механизмов работы гипертермофильных ферментов чаще всего используют клонирование их генов в мезофильных микроорганизмах, например, в *E. coli*. За прошедшее время было клонировано более чем 100 генов архейных гипертермофильных ферментов в мезофильных бактериях (Dong et al., 1997). Так как архейные транскрипционные системы ближе к эукариотическим, чем к бактериальным, то экспрессия генов в бактериях требует наличия сильного бактериального промотора (pLac, pTac или промотор РНК-полимеразы фага T7), гены из архей также клонируют в клетках дрожжей (D'Auria et al., 1996). Не так давно стали доступны системы экспрессии в археях, например: *Haloferax volcanii*, *Haloarcula morismortui* (Lv et al., 2013), *Sulfolobus acidocaldarius*

(Hwang et al., 2015). Сравнение свойств нативных и рекомбинантных белков показало, что большинство рекомбинантных белков сохраняют все свойства нативных, включая правильный фолдинг, термостабильность и оптимальную активность при высоких температурах. В некоторых случаях для правильной работы архейных белков требуются определенные условия, такие как повышенная соленость, наличие полиаминов, или посттрансляционные модификации - гликозилирование для большей термостабильности (Littlechild, 2015).

Помимо необходимых взаимодействий для создания правильных конформаций белков (водородные связи, ионные пары, гидрофобные и Ван дер Ваальсовы взаимодействия и др. (Lebbink, 1999)) у белков гипертермофилов выявлены дополнительные взаимодействия благодаря повышенному количеству заряженных аминокислот, высокому содержанию ароматических кислот и высокому числу дисульфидных мостиков (что обусловлено наличием S-содержащих аминокислот), посттрансляционных модификаций с помощью шаперонинов (Elcock, 1998), а также за счет факторов внешней среды, таких как соленость, высокое давление и т.д. (Vieille and Zeikus, 2001).

С помощью сравнительной геномики у некоторых культивируемых гипертермофильных архей были обнаружены гены гликозидаз, вовлеченных в гидролиз полисахаридов, таких как ксилан, целлюлоза, хитин, ламинарин, лихенан, крахмал и др. Некоторые из этих ферментов были получены рекомбинантно или выделены в нативном виде.

На текущее время получены и охарактеризованы рекомбинантные ферменты (Табл. 4) из гипертермофильных архей, таких как *Pyrodictium abyssi*, *Pyrococcus horikoshi*, *Thermococcus zilligi*, *Thermococcus kodakariensis*, *Sulfolobus solfataricus* и *Sulfolobus tokodaii* и др. Причем, некоторые из этих микроорганизмов не были проверены на способность разлагать полисахариды или вообще какие-либо углеводы.

Таблица 4. Некоторые гликозидазы, выделенные из культивируемых гипертермофильных архей и их сообществ.

Организм	Выделенный фермент	GH	Опт Т°С	Субстратная специфичность фермента	Ссылка
<i>Thermococcus zilligi</i> AN1 (DSM 2770)	Ксиланаза	GT35	85	Ксилан (лиственничный, березовый, овсяный)	Uhl and Daniel, 1999
<i>Pyrodictium abyssi</i> (DSM 508)	Ксиланаза	ND	100	Ксилан (березовый, буковый, овсяный)	Andrade et al., 2001
<i>Sulfolobus solfataricus</i> MT 4 (DSM 5833)	Эндоглюканаза/ ксиланаза ^{1,2}	GH12 ²	90	Ксилан (березовый, овсяный, буковый), КМЦ, арабинан	¹ Cannio et al., 2004 ² Maurelli et al., 2008
<i>Pyrococcus furiosus</i> (DSM 3638)	Альфа-амилаза	GH57	100	Крахмал	Laderman et al., 1993
	Эндоглюканаза	GH12	100	Целлотрио-, целлопенто-, гексоза, бета-глюкан, лихенан, КМЦ	Bauer et al., 1996
	Эндо-1,3-бета-глюканаза	GH16	100	Бета-глюкан, ламинарин, лихенан	Gueguen et al., 1997
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	Эндоглюканаза	GH5	85	КМЦ, МКЦ, лихенан	Ando et al., 2002
<i>Pyrococcus sp.</i> ST04	α-амилаза	GH57	90-95	Крахмал, мальтотриоза, мальтопентаоза	Jung et al., 2013
<i>Thermococcus siculi</i> HJ21	Амилопуллуланаза	GH13	95	крахмал, пуллулан	Jiao et al., 2010
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	Эндохитиназа	GH18	80	аморфный хитин	Imanaka et al., 2001
	Экзохитозаназа	GH35	80	Хитобиоза, целлобиоза	Tanaka et al., 2003
Накопительная культура (<i>Ignisphaera</i>)	Эндоглюканаза	Новая GH A-Clan	109	Лихенан, Avicel, КМЦ, бета-глюкан	Graham et al., 2011
Из природного образца (<i>Thermococcus</i>)	Эндоглюканаза	GH12-SBM2-SBM2	92	КМЦ, бета-глюкан, лихенан, АМЦ	Leis et al., 2015
<i>Thermotoga</i> + <i>Sulfolobus</i>	Химерная эндоглюканаза	GH12	80	КМЦ, целлогексаоза	Kufner, Lipps, 2013
<i>Thermococcus sp.</i>	Бета-глюкозидаза	ND	78	Целлобиоза	Sinha, Datta, 2016
Накопительная культура (<i>Thermococcus sp.</i>)	Эндоглюканаза	GH5	115	Бета-глюкан, лихенан, КМЦ, камедь рожкового дерева	Suleiman et al., 2019
Из природного горячего источника	Бета-гликозидаза	Близка к GH1	90	Целлобиоза, целлотриоза, лактоза	Schroder et al., 2014
<i>Caldivirga maquilingensis</i>	Бета-галактозидаза	GH1	85	Лактоза, галактотриоза, трансгликозилирование до лактулозы	Letsididi et al., 2017
<i>Halococcus sp.</i> *. 197A*-не термофил, но фермент работает при высокой T	Бета-агаразы	ND	70	Агароза, неоагар-гексаоза, -тетраоза, -биоза	Minegishi et al., 2013

Одним из интересных биотехнологических приложений стало получение рекомбинантных ферментов, сочетающих в себе свойства как бактериальных, так и архейных

белков. Одним из таких ферментов является эндоглюканаза, сочетающая в себе аминокислотные последовательности белков двух микроорганизмов - *Thermotoga* (бактерия) и *Sulfolobus* (архея). Ее особенностью является высокая оптимальная температура работы (80°C) и низкий pH, равный 3 (Kufner, Lipps, 2013).

Большинство из полученных и охарактеризованных ферментов представляют собой эндоглюканазы и амилазы/амилопуллаланазы с одним, реже двумя каталитическим доменами. Ксиланазы, же описаны достаточно скудно, причем не для всех ферментов выявлены каталитические домены. Все представленные ферменты являются термостабильными, с оптимумами работы выше 70-80°C, некоторые из них используются в промышленности (Schulein, 2000; Butt et al., 2008; Wang et al., 2004).

Таким образом, изучение белков архей, в частности гидролитических ферментов, вносит вклад в понимание структуры и механизмов адаптации таких белков к жёстким условиям окружающей среды (экстремальные значения pH, температуры, избыточные количества минералов и солей и т.д.). Кроме того, такие ферменты представляют высокий интерес для биотехнологии и оптимизации промышленных процессов, поскольку ферменты из гипертермофилов обычно свернуты в стабильные конформации, которые устойчивы к высоким температурам. Как правило, стабильность при высоких температурах часто ассоциируется со стабильностью к химическим детергентам, нередко применяемым в промышленности. Благодаря такому сочетанию – устойчивости и активности при высоких температурах, ферменты гипертермофилов очень актуальны в широком спектре промышленных направлений, например, в получении этанола из крахмала или целлюлозы. Такие области применения требуют сохранения активности ферментов при высоких температурах, поскольку при таких условиях нет риска контаминации, улучшается перемешивание, солубилизация субстрата в смеси, что делает его более доступным.

На сегодняшний день множество гликозил-гидролаз из гипертермофильных микроорганизмов нашли свое применение в разных сферах жизнедеятельности человека. Это такие области как (Vieille and Zeikus, 2001; Cabrera and Blamey, 2018):

1) применение в процессах разложения крахмала (термостабильные альфа-амилазы, альфа-глюкозидазы, пуллуланазы) – в пищевой индустрии: получение мальтозных, глюкозных сиропов, желирующих термозависимых субстанций (аналоги желатина), стабилизаторов, пребиотиков (декстрины); в медицине – получение хелатирующих соединений – переносчиков лекарств (циклодекстрины); получение субстрата (глюкозы, мальтозы) для производства биотоплива (этанол).

2) разложение целлюлозы и ксилана (целлюлазы, ксиланазы, глюкозидазы, целлобиогидролазы и тд): в бумажной промышленности – уменьшение вязкости материалов,

разрушение «комков» фибрилл целлюлозы, улучшение экстракции лигнина из целлюлозного сырья, отбеливание бумаги, улучшение её характеристик; в пищевой и кормовой промышленности – осветление соков, обработка целлюлозосодержащего сырья для повышения питательной ценности, экстракция натуральных красителей и антиоксидантов из овощей и фруктов, в процессах виноделия и пивоварения – улучшения качества ферментации; использование для увеличения выхода сахаров при обработке отходов для получения биоэтанола, получения растворителей, органических кислот; в текстильной промышленности – отбеливание тканей (джинсовой), смягчение хлопковых материалов; в агропромышленности – контроль растительных заболеваний (целлюлазы разрушают клеточные стенки фитопатогенов – патогенных растений (Kuhad et al., 2011).

3) разложение хитина (хитиназы, хитобиазы) - в медицине – получение хитоолигосахаридов, обладающих противоопухолевой активностью, N-ацетилглюкозамина, как противовоспалительного препарата, необходимого при лечении остеоартрозов, колитов, кишечных заболеваний. Производство препаратов для лечения ран, кремов, лосьонов. В пищевой промышленности – получение диетических добавок.

Таким образом, гипертермофильные археи являются объектом многогранных исследований, направленных на расширение знаний о возможностях этих микроорганизмов, их метаболизме и ферментах. Отдельного внимания заслуживают гипертермофильные археи, способные гидролизовать полисахариды – как немногочисленная и малоизученная группа, а также их ферменты, гликозидазы.

Используя сочетание микробиологических (выделение накопительных и чистых культур гипертермофильных микроорганизмов, растущих на полисахаридах), омиксных (поиск гликозидаз из этих архей, с помощью анализов геномов и протеомов), а также биохимических (выявление активностей как нативных так и рекомбинантных белков из архей) подходов повышает вероятность обнаружения новых активных и стабильных ферментов.

ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Микробиологические методы

4.1.1. Отбор проб из горячих источников

Отбор проб проводился в различных горячих источниках, расположенных на полуострове Камчатка, полуострове Чукотка (Россия) и на материках – Евразия (республика Тыва, Россия) и Южная Америка (Чили). Пробы из термальных источников отбирали в стеклянные 50 мл флаконы с газонепроницаемой пробкой из бутиловой резины и алюминиевыми крышками, которые заполнялись до самого верха, герметично закрывались и транспортировались в лабораторию без температурного контроля. Некоторые пробы были отобраны в пластиковые флаконы объемом 50 мл с завинчивающейся пластиковой пробкой, которые так же заполнялись до самого верха, герметично закрывались и транспортировались в лабораторию. Во время отбора проб были измерены температура, Eh, pH воды и осадков источника.

4.1.2. Получение накопительных культур

Для получения первичной накопительной культуры микроорганизмов, способных разлагать полимерные субстраты из отобранных проб, было проведено *in situ* инкубирование непосредственно в горячем источнике. Для этого в стеклянные флаконы объемом 50 мл с 30 – 40 мг ксилана/или трагаканта/или хитина были добавлены осадки и вода из источника, которые были плотно закрыты бутиловой пробкой и завинчивающейся крышкой, и затем полностью погружены в горячий источник в течение 5 суток.

В лаборатории, пробы и *in situ* накопительные культуры были засеяны на анаэробные синтетические среды (10%-ый засев см. состав ниже), в которые дополнительно были внесены различные полисахариды (ксилан, АМЦ, ксилоглюкан, лихенан, МКЦ, альгинат и тд.) в качестве единственного источника углерода и энергии. В некоторых случаях, в среду были добавлены акцепторы электронов для анаэробного дыхания – элементная сера, тиосульфат, селенат, ферригидрит.

Использованные коллекционные штаммы

Из коллекции лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии РАН были взяты и охарактеризованы следующие штаммы: *Thermococcus* 2319x1 (99% сходства последовательностей гена 16S рНК с морскими *T. litoralis* и *T. aegaeus*), *Pyrobaculum* 2319x2 (99% сходства с *P. arsenaticum*) и *Thermofilum* sp. 1910b (сходство последовательностей гена 16S рНК равное 97% и 96% с видами *T. pendens* и *T. uzonense*).

4.1.3. Состав сред для накопительных и чистых культур гипертермофильных архей

Для получения накопительных культур, а также для культивирования уже выделенных штаммов гипертермофильных архей были использованы: среда Пфеннига и ее модифицированные варианты.

Состав среды Пфеннига (СП)	на 1 л	Состав среды модифицированной Пфеннига (СПП)	на 1 л
Раствор №1	10 мл	Раствор №1	5 мл
Раствор №2	10 мл	Раствор №2	5 мл
NaCl	9 г		
MgCl ₂	2 г		
NaHCO ₃	2 г	NaHCO ₃	0.5 г
Na ₂ S	0.16 г	Na ₂ S	0.3 г
Витамины (Wolin et al., 1963)	1 мл	Витамины (Wolin et al., 1963)	1 мл
Микроэлементы (Kevbrin and Zavarzin, 1999)	1 мл	Микроэлементы (Kevbrin and Zavarzin, 1999)	1 мл

Растворы №1 и №2 состояли из солей:

Раствор №1	Концентрация, г/л	Раствор №2	Концентрация, г/л
MgCl ₂ *6H ₂ O	33	KH ₂ PO ₄	33
CaCl ₂ *2H ₂ O	33		
KCl	33		
NH ₄ Cl	33		

Состав витаминов и микроэлементов были приготовлены согласно следующему составу:

Раствор витаминов (Wolin et al., 1963)	мг/л	Раствор микроэлементов (Kevbrin and Zavarzin, 1999)	мг/л
биотин	20	(NH ₄) ₂ SO ₄ FeSO ₄ *6H ₂ O (соль Мора)	784
фолиевая кислота	20	CoCl ₂ *6H ₂ O	238
пиридоксин гидрохлорид	100	(NH ₄) ₂ SO ₄ NiSO ₄ *6H ₂ O	395
рибофлавин	50	Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	24
тиамин	50	Na ₂ WO ₄ *2H ₂ O	33
никотиновая кислота	50	ZnSO ₄ *7H ₂ O	144
пантотеновая кислота	50	CuCl ₂ *2H ₂ O	2
B12	1	Na ₂ SeO ₄	94
п-аминобензойная кислота	50	H ₃ BO ₃	6
тиоктовая кислота	50	MnCl ₂ *4H ₂ O	99

Среды кипятили в течение 10-15 минут и охлаждали на водяной бане под непрерывным током газа (азота или CO₂), с пробулькиванием. Нужные значения pH получали добавлением в среду 6 М HCl или NaOH. Среду разливали в предварительно наполненные азотом пробирки Хангейта под током CO₂ или N₂ для предотвращения попадания внутрь кислорода и стерилизовали при 1 АТИ. В качестве индикатора анаэробности среды использовали резазурин C₁₂H₆NO₄*Na. Объем среды в каждой пробирке - 10 мл. В качестве субстратов в пробирки были внесены АМЦ, ксилан, альгинат, ксилоглюкан и лихенан и другие полисахариды. Растворы ди- и моносахаридов, а так же дрожжевой экстракт, некоторые белковые субстраты и растворимые акцепторы стерильно вносились после стерилизации.

В каждую пробирку с помощью стерильного шприца вносили 0.1 мл пробы или аликвоты чистой культуры. Пробирки инкубировали в течение 6 суток в случае накопительных культур и от 1 до 10 дней в случае описания физиологии новых штаммов.

Из накопительных культур, в которых был обнаружен рост, делали три последовательных пересева в свежую среду. Из последнего пересева (с концентрацией клеток около 10⁸ кл/мл) делали разведения в стерильной среде (10⁻²; -4; -6; -7; -8), инкубировали в тех же условиях. Для проверки культур на чистоту из последнего разведения делали пересев на фоновую среду с пептоном и глюкозой в качестве субстрата и культивировали при температуре 37, 60 и 85°C.

4.1.4. Культивирование штаммов гипертермофильных архей

Все микроорганизмы были выращены на среде Пфеннига (СП) или на ее модификации (СМП) (Табл. 5), с добавлением различных субстратов до итоговой концентрации 0.2%, и дрожжевым субстратом с концентрацией 50 мг/л. После окончания культивирования, рост проверяли с помощью прямого подсчета клеток, используя световой микроскоп.

Таблица 5. Используемые среды для чистых культур гипертермофильных архей.

Название культуры	Среда культивирования (СП) +добавки	Т°С	pH
2319x1	СП с элементной серой 1 г/л	85-80	7.5
1910b	СП без NaHCO ₃		5.5
3502	СМП без NaHCO ₃		6.5
3507			
3507L			
3507L2			
3507LT			
3524	СМП без NaHCO ₃ с акцепторами (тиосульфат, селенат)	92	
2319x2	СМПx2 (см.раздел 4.1.5)		

Следующие субстраты для проверки гидролитической активности были использованы: крахмал, пуллулан, ксилан, арабиноксилан, арабинан, арабиногалактан, галактан, ксилоглюкан, глюкоманнан, маннан, галактоманнан, бета-глюкан, КМЦ, АМЦ, МКЦ, листья бамбука, ксантановая камедь, аморфный хитин, хитозан, альгинат, пектин, ламинарин, агароза, лихенан, инулин, курдлан, мальтоза, лактоза, трегалоза, раффиноза, сахароза, целлобиоза, ксилоза, глюкоза, фруктоза, арабиноза были добавлены в среды до концентрации 0.1-0.2%. Из флаконов с субстратами, в которых был обнаружен рост, делали 2 последовательных пересева во флаконы с таким же субстратом для окончательной проверки роста на этом субстрате.

Для проверки анаэробного дыхания использовали следующие акцепторы: ферригидрит, магнетит, сульфид сурьмы (V) и серу добавляли перед разливом среды, которую стерилизовали автоклавированием в течение часа при 0.5 АТИ. Стерильные фильтрованные растворы пиррофосфата железа (III), цитрата железа (III), тиосульфата, сульфата добавляли в пробирки после стерилизации среды.

4.1.5. Оптимизация среды Пфеннига для культуры 2319x2

При выделении этой культуры использовалась среда Пфеннига (см. раздел 9.1.3.), однако, через некоторое время штамм 2319x2 перестал расти на этой среде, поэтому было решено перевести эту культуру на новую среду, более подходящую для рода *Pyrobaculum*. Из базы данных <http://www.dsmz.de> были взяты протоколы сред для типовых штаммов рода *Pyrobaculum*, и на основе этих данных была создана новая среда со следующим составом:

Раствор №1*	10 мл/л
Раствор №2*	10 мл/л
Раствор микроэлементов*	1 мл/л
Раствор витаминов*	1 мл/л
18% Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ в 2% H ₂ SO ₄	2 мл/л
MgSO ₄	0.25 г/л
FeCl ₃	0.02 г/л
Na ₂ S	0.16 г/л

*- состав растворов идентичен растворам среды Пфеннига

Среду готовили анаэробно, под током азота. После стерилизации в среду добавляли дрожжевой экстракт до концентрации 50 мг/л, растворимый акцептор электронов (тиосульфат натрия или селенат натрия до концентрации 0.1 М) и субстраты до концентрации 0.2%. По истечении времени культивирования (от 2 до 5 суток) в среде выпадал красный осадок элементного селена (Se⁰) или черный осадок сульфида (Na₂S или FeS), что свидетельствовало о положительном росте штамма, т.к. данные минералы образовывались вследствие восстановления акцепторов (селената или тиосульфата) в процессе анаэробного дыхания.

4.1.6. Подсчет клеток с помощью световой микроскопии

В нашей работе были использованы микроскопы марок Olympus CX41 и Leica DM500. Пробы, объемом 2 мкл, микроскопировали с иммерсионным маслом под 100-кратным объективом. Количество клеток подсчитывали в 20 полях зрения, вычисляли среднее и умножали на коэффициент пересчета, равный $5,16 \cdot 10^6$. Коэффициент вычислен по формуле $\chi = \frac{S_{\text{стекла}} \cdot 1000 \text{ мкл} \cdot N_{\text{клеток}}}{S_{\text{поля зрения}} \cdot 2 \text{ мкл}}$, где S стекла – площадь поверхности стекла, рассчитываемая по формуле $S = a^2 = 18 \text{ мм} \cdot 18 \text{ мм} = 324 \text{ мм}^2$, S поля зрения = $\pi \cdot R^2 = 3.14 \cdot 0.1^2 = 0,314 \cdot 10^{-2} \text{ мм}^2$, где R - радиус 1 поля зрения.

Для применения флуоресцентной микроскопии на Olympus CX41 использовали краситель акридиновый оранжевый (поглощающий при 320-340 нм, и с длиной волны испускания 400-500 нм), добавляющийся в пропорции 1:1 к препарату клеток. Пересчет количества клеток проводили по выше указанной формуле.

4.1.7. Определение концентрации сероводорода

Сероводород измеряли колориметрическим методом (Trüper & Schlegel, 1964), в модификации. Определение образуемого H_2S проводили только в газовой фазе. При этом в 0.5 мл 10% раствор ацетата цинка медленно пропускали 0.3 мл газовой фазы, фиксируя H_2S в виде ZnS . Добавляли 1.26 мл дистиллированной воды и 0.2 мл диметил-п-фенилендиамина (0.2% раствор в 20% H_2SO_4). Пробирку встряхивали и приливали 10 мкл $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10% раствор в 2% H_2SO_4), смесь снова встряхивали и оставляли на 10 минут для развития окраски. Затем на спектрофотометре Eppendorf при длине волны 670 нм определяли метиленовый синий, образующийся в кислой среде при взаимодействии сульфида цинка с N,N-диметил-п-фенилендиамин в присутствии железоаммонийных квасцов. Расчет концентрации производили по калибровочной кривой.

4.1.8. Измерение газов

H_2 , O_2 , N_2 и CO_2 в газовой фазе измеряли с помощью '3700' модифицированного газового хроматографа (ZIOC RAS., Россия) с поддержкой аналитического софта Phoenix v.3.6.0 (BSoft, Россия). Пробу объемом 1 мл закалывали в хроматограф, далее полученные пики сравнивали с калибровочными. ЛЖК измеряли при помощи Zebtron ZB-WAXplus капиллярной колонки на хроматографе Chromatech-Crystal 5000.2. Перед измерением пробы подкисляли концентрированной муравьиной кислотой.

4.2. Молекулярно-генетические методы

4.2.1. Выделение ДНК

Выделение ДНК из чистых культур проводили стандартным методом (Gavrilov et al., 2016). Для выделения ДНК культуры центрифугировали при 13000 g в течение 10 – 15 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (0.15 М NaCl, 0.1 М ЭДТА (pH 8.0) 0.5 М Tris-HCl) с добавлением 20 мг/мл лизоцима и инкубировали при 37°C в течение 2 часов на качалке при 200 об/мин. Затем добавляли додецилсульфат натрия (ДСН) до концентрации 0.5%. Подвергали лизат 3-х кратной процедуре замораживания/оттаивания (замораживание – в жидком азоте, оттаивание – на водяной бане 65 – 70°C), либо рушили стеклянными шариками при помощи FastPrep бидбиттера MPbio. С помощью раствора протеиназы К (20 мг/мл) при 55 °C в течение 2 ч разрушали белки, тщательно перемешивали. Затем добавляли 0.5 М NaCl. Эффективность разрушения клеток контролировали в световом микроскопе. Далее добавляли 1V фенола и 1V хлороформа. Мягко перемешивали в течение 10 мин и центрифугировали при 13000 g 10 мин и отбирали супернатант. К полученному супернатанту добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и вновь центрифугировали при тех же условиях и снова отбирали супернатант (повторяли 3 раза). Далее пробирку с супернатантом переносили в ледяную баню и добавляли 3 М ацетат Na (pH 5.0) в количестве 1/10 от объема супернатанта, тщательно перемешали. Для осаждения ДНК в полученную смесь добавляли 2 объема ледяного этанола (96%) или 0.7 – 1 объем изопропанола оставляли на 2 часа или на ночь при температуре -10°C. Осаждали ДНК центрифугированием при 13000 g в течении 10-15 минут. Надосадочную жидкость сливали, а к осадку добавляли 200 мкл 70%-го этанола. Смесь центрифугировали при 13000 g в течении 10-15 минут. Супернатант удаляли, а осадок высушивали при 60 °C и растворяли в 50 мкл TE буфера (10 mM Tris-HCl, 1 mM ЭДТА (pH 8.0)).

4.2.2. ПЦР

Аmplификацию проводили в 20 мкл смеси, содержащей однократный реакционный буфер (Evrogen, Россия), 200 мкМ каждого; 1.5 mM MgCl₂; 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеотид-трифосфата; 0.5 мкМ каждого праймера; 1 ед. активности (Evrogen, Россия) и 1 мкл раствора матричной ДНК в концентрации 1-10 нг. При подготовке проб для каждой системы праймеров использовались стандартные протоколы проведения реакции (http://www.roche-applied-science.com/fst/products.htm?/prod_inf/manuals/dig_toc.htm). Во всех экспериментах в качестве отрицательного контроля использовали реакцию без добавления ДНК. Продукты амплификации анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле.

4.2.3. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез проводили в 1.5% агарозном геле 2% агарозный гель с добавлением этидия бромида до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Полученную в результате амплификации ДНК в количестве 5-10 мкл смешивали с 1 мкл стандартного красителя (бромфенола в глицерине) и полученную смесь вносили в лунки агарозного геля, в качестве маркера использовали маркеры Gene Ruler™ DNA Ladder Mix и Lambda DNA/EcoRI + HindIII (“Fermentas”, Литва). Затем гель помещали в электрофорезный буфер TAE (20 mM трис-ацетат, pH 7.4, 10 mM ацетат Na, 0.5 mM ЭДТА) и ДНК разделяли в соответствии с размером в токе электрического поля при 4 В/см. Для визуализации сигналов использовали УФ-трансиллюминатор с длиной волн 270-365 нм.

4.2.4. Секвенирование

При подготовке библиотек ампликонов (гена 16S рРНК, соответствующий V3-V4 гипервариабельным регионам длиной около 430 п.н.) использовали универсальные праймеры, несущие также последовательности адаптеров и молекулярных индексов для системы Illumina. Секвенирование библиотек ампликонов (как для получения профилей 16S рРНК, так и геномов) проводили при помощи системы высокопараллельного секвенирования Illumina Miseq (США). Полученные данные обрабатывали при помощи пакета ПО QIIME – Quantitative Insights Into Microbial Ecology (Caporaso et al., 2010) и других сервисов (IMG-RAST, SilvaNGS). Сборку геномов de novo осуществляли с использованием программ SPADES 3.10.0 и Unicycler v 0.4.8 (Wick et al., 2017).

4.2.5. Клонирование генов

Для клонирования генов гликозидаз в рекомбинантные штаммы *E.coli*, все последовательности были проверены на наличие сигнального пептида, который был обнаружен с помощью сервиса SignalP. В случае его наличия, праймеры к гликозидазам подбирались без учета этой последовательности.

Клонирование рекомбинантных ферментов *Thermococcus* sp. 2319x1. Последовательность мультидоменной целлюлазы/ксиланазы (МДГ) и ее фрагменты были получены с помощью использования In-Fusion R HD Cloning Kit (Takara Bio Company). Для проведения ПЦР амплификации и наработки были разработаны праймеры с помощью программы VectorNTI для всех версий белков. Полная версия МДГ и ее версии были заклонированы в вектор рЕТ24а, проверку наличия вставки в плазмиду проверяли при помощи ПЦР. Плазмидная ДНК была выделена при помощи набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).

Для получения последовательностей GH12-1 и GH12-2 доменов были разработаны системы праймеров с помощью программы Vector NTI и Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). В качестве матрицы была использована нуклеотидная последовательность МДГ. Схема расположения доменов представлена на Рис.13. Далее, полученные последовательности ДНК были клонированы в экспрессионный вектор pLATE51 N-terminated His-tag с помощью набора aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System и трансформированны в экспрессионный штамм *E. coli* BL21 (DE3).

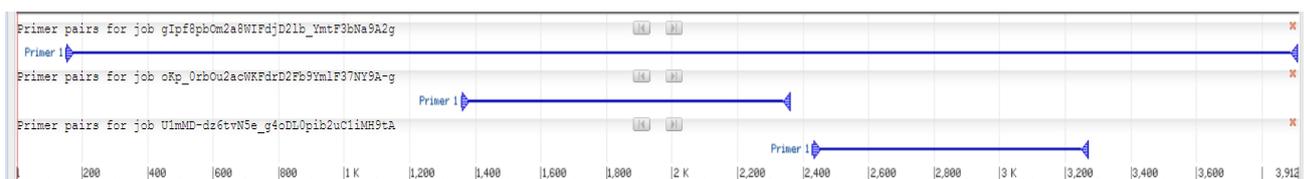


Рисунок 13. Схема расположения доменов GH12-1 и GH12-2 мультидоменной гликозидазы штамма 2319x1.

Клонирование рекомбинантных ферментов *Thermofilum adornatum* 1910b.

Гены белков (Cel25 (2101 п.о.), Cel30 (1120 п.о.), Cel40 (1558 п.о.) и Cel45 (235 п.о.) были амплифицированы с помощью разработанных праймеров (Табл. 6).

Таблица 6. Праймеры, разработанные для генов целлюлаз *T.adornatum* 1910b

Ген	Праймер ID	Последовательность
Cel25	TA_Nested_225F	5'-CCCGGACTAGAAAGGCAGAG-3'
Cel25	TA_TECH_225F	5'-GGTGATGATGATGACAAG ATGAGTCAACAATAATTGAAGAATTATTG-3'
Cel25	TA_TECH_225R	5'-GGAGATGGGAAGTCATTA CTAGTTTCTAAAGGTTTTTCCTCG-3'
Cel30	TA_TECH_230F	5'-GGTGATGATGATGACAAG GACATGGTTGACTCCAAGAAAATAACG-3'
Cel30	TA_TECH_230R	5'-GGAGATGGGAAGTCATTA GGTCTCTGCCTCCACC-3'
Cel40	TA_TECH_340F	5'-GGTGATGATGATGACAAG ATGGTTAGAAAGGAA TTCCCTGAG-3'
Cel40	TA_Nested_340R	5'-GCAACAGGTCGGATTGTTTCG-3'
Cel40	TA_TECH_340R	5'-GGAGATGGGAAGTCATTA TCATATATTTTCACTGCTATGTTTGTG-3'
Cel45	TA_TECH_345F	5'-GGTGATGATGATGACAAG ATGACCAAAACCATAGCGGTAG-3'
Cel45	TA_TECH_345R	5'-GGAGATGGGAAGTCATTA TCACTGTTTGTCAATGTTTGG-3'

В качестве матрицы была взята тотальная ДНК, выделенная из штамма 1910b. Для генов Cel40 и Cel25 был использован метод вложенной (nested) ПЦР (Green & Sambrook, 2019) поскольку параметры для ген-специфичных праймеров были далеки для оптимальных для проведения ПЦР (низкий ГЦ% состав, низкая температура плавления и т.д.). Все праймеры, за исключением тех, которые требовались для nested ПЦР, имели комплиментарную к вектору

pLATE51 техническую последовательность (подчеркнута в Табл. 6). Для экспрессии в *E.coli* был использован вектор pLATE 51 содержащий N-концевой бти- гистидиновый таг и сайт рестрикции энтерокиназой (DDDDK[^]).

ПЦР продукты были вырезаны из геля и очищены с помощью Cleanup Standart Kit (#BC022, Evrogen). Реакция безлигазного клонирования с помощью набора aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System kit (#K1251, Thermo Scientific) была выполнена в течении 5 мин при 25°C. С помощью электропорации компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) были трансформированы плазмидами с целевыми генами в качестве контроля была использована плазида с контрольным фрагментом 720 п.о. для проверки эффективности процедуры клонирования. Наличие заклонированных генов было подтверждено ПЦР, проведенной с использованием ДНК из колоний *E. coli*, которые выросли после трансформации, и вектор специфичных праймеров (LIC Forward Sequencing primer, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' and LIC Reverse Sequencing primer, 5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG -3').

4.3. Функциональная аннотация геномов

Функциональную аннотацию геномов выделенных штаммов проводили с целью выявить гены, кодирующие гликозилгидролазы и другие ферменты, участвующие в разложении углеводов, а также реконструировать пути катаболизма некоторых моносахаридов.

Были использованы: программа BioEdit, серверы RAST (Rapid Annotation Subsystems Technology) (<http://rast.nmpdr.org/>) и IMG/MER (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) для различных операций с геномами, таких как проведение BLAST, с целью поиска генов, кодирующих гликозидазы, предсказание количества доменов у ферментов, возможности их секретирования из клетки (внеклеточность), а также предсказание возможной активности фермента с помощью построения филогенетических деревьев.

Один из биоинформатических подходов при анализе генома с целью нахождения конкретных функциональных генов (в данном случае генов, кодирующих ферменты, участвующие в разложении олиго- и полисахаридов) заключается в проведении BLAST аминокислотных последовательностей биохимически охарактеризованных белков (интересующих нас ферментов) против генома целевого организма. Другой подход заключается в проведении BLAST аминокислотных последовательностей из геномов против базы данных биохимически охарактеризованных белков или против созданной нами локальной базы данных охарактеризованных белков. Также использовали наиболее популярные BLAST-серверы: NCBI/NIC

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_L OC=blasthome), Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/>), а также dbCAN (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/index.php>) - сервер, имеющий базу аминокислотных последовательностей на основе CAZyme.

С помощью серверов Pfam (базы данных белковых доменов (<http://pfam.xfam.org/search>)) и dbCAN предсказывали наличие и организацию доменов у аминокислотных последовательностей белков.

Для предсказания расположения белка (является ли он внутри- или внеклеточным или заякорен в мембране) использовали несколько серверов: SignalP - определяет наличие сигнального пептида (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>); TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) для предсказания наличия трансмембранных доменов; Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) для предсказания и сигнальной последовательности и количества трансмембранных доменов.

Для предсказания функции белков использовали филогенетический анализ. Для построения филогенетических деревьев использовали программу MegaB, для которой предварительно производили выравнивание аминокислотных последовательностей с помощью алгоритма MUSCLE.

Для предсказания путей катаболизма полисахаридов пользовались метаболическими картами серверов MetaCyc (<http://metacyc.org/META/new-image?object=Degradation>) и Kegg (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Для предсказания активностей ферментов, участвующих в катаболизме моносахаридов, проводили BLAST биохимически охарактеризованных белков с известными активностями против геномов.

4.4. Анализ протеомных данных

4.4.1. Подготовка биомассы для протеомного анализа

Для анализа протеомов *T. adornatum* 1910b был выращен при стандартных условиях (80°C, pH 5.7) на среде Пфеннига с добавлением 1 г/л целлюлозы Avicel до плотности клеток, составляющей $5-7 \cdot 10^6$ клеток/мл, а также, в качестве контрольного эксперимента, на среде Пфеннига с добавлением 1 г/л пирувата. Всего было сделано 3 биологические реплики опыта и 2 реплики контроля.

Другой микроорганизм *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 был выращен на ксилане 1 г/л с 100 мМ тиосульфатом в качестве опыта (3 повторности) и на желатине (1 г/л) с тиосульфатом (100 мМ) в качестве контроля (2 повторности) в оптимальных условиях (T=92°C, pH 5.6).

Выросшие клетки были собраны центрифугированием при 17 600 g в течение 20 мин и лизированы согласно Kulak et al. (2014). Концентрация белка в клеточном экстракте с помощью реактива Брэдфорда. Клеточные белки (как внутриклеточные, так и белки клеточной стенки) обрабатывали так же, как описано в Kulak et al. (2014). Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили после трипсинолиза протеомов образцов на системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific) (Sidorenko et al., 2018).

4.4.2. Обработка полученных данных

Необработанные MS-данные анализировали с помощью программного пакета MaxQuant (<https://www.maxquant.org/>) против геномных последовательностей (CP006646 для штамма 1910b и 2867967589 для штамма 2319x2). В результате первичной обработки были получены значения интенсивности и iBAQ (интенсивность, пропорциональная количеству молей данного пептида) для каждого детектированного белка. Далее были вычислены нормированные значения riBAQ, как отношение iBAQ к сумме iBAQ по всем белкам:

$$riBAQ = iBAQ / (\sum iBAQ)$$

После этого протеомный анализ проводили с помощью R. Скрипт доступен в репозитории (https://bitbucket.org/Ulyana_Piunova/thermofilum-adornatum-1910b/src/master/).

Количественные значения обнаруженных белков были получены и нормализованы как суммарные значения iBAQ в пределах одного образца, которые представляют собой молярное обилие или относительное iBAQ (riBAQ) идентифицированного белка в образце. Для каждого обнаруженного белка рассчитывали значение $\log_2 riBAQ$ (Cijssouw et al., 2018). Для определения сходства профилей экспрессии образцов была проведена иерархическая кластеризация образцов на основе коэффициентов корреляции значений riBAQ. Для определения генов со статистически значимыми различиями в экспрессии использовали независимый двухвыборочный t-тест с поправкой Бенджамини-Хохберга (Green & Sambrook, 2019).

4.5. Биохимические методы

4.5.1. Подготовка проб для биохимических исследований

Для биохимических исследований использовали штаммы гипертермофильных архей, выращенные в оптимальных условиях с добавлением полисахаридов в качестве субстратов. Из флаконов или пробирок отбирали по 2 мл культуральной жидкости, предварительно встряхнув их, и центрифугировали 25 мин при максимальной скорости (13400 об/мин).

Супернатант культуральной жидкости отбирали в отдельные пробирки для дальнейших исследований.

Осадок (клетки) отмывали от остатков среды в 2 мл 0.05 М MOPS pH 7.3 для штамма 2319x1, либо 0.05 М MES, pH 6.0 для культур 2319x2 и 1910b при 25°C и далее центрифугировали 25 минут при максимальной скорости (13400 об/мин). Супернатант отбирали, осадок (клетки) ресуспендировали в 100 мкл 0.05 М MOPS pH 7.3 либо 0.05 М MES, pH 6.0.

Далее работали либо с целыми клетками, для чего к осадку (клеткам) добавляли 100 мкл 0.05 М MOPS pH 7.3/0.05 М MES, pH 6.0, либо со смытыми ферментами. Для отделения ферментов (фракции поверхностных мембрансвязанных белков) к осадку (клеткам) добавляли 50 мкл 1 М NaCl, 3 М мочевины, 0.5% ДСН (додецилсульфат натрия), 0.5% Тритон X-100 или 0.5% Твин-80 и инкубировали 1 час при комнатной температуре (25°C); далее добавляли 450 мкл 0.05 М MOPS pH 7.3/0.05 М MES, pH 6.0, перемешивали и ждали еще 30 минут. Получившуюся смесь центрифугировали 15 минут при 13400 об/мин, отбирали супернатант со смытыми ферментами и измеряли концентрацию белка. Суспензии клеток и раствор со смытыми ферментами наносили в качестве образцов при выявлении ферментативных активностей методом агарозных чашек и методом зимографии.

4.5.2. Качественная оценка активности гликозидаз

Стеклянные чашки Петри заливали 2% агарозным гелем (2% термостойкой агарозы разводили в 0.05 М буфере MOPS pH=7.3/0.05 М MES, pH 6.0, содержащим полисахариды: КМЦ, ксилан, ксилоглюкан, хитин, крахмал, до конечной концентрации 0.2%, автоклавировали и охлаждали до 50°C). После застывания геля в нем были сделаны лунки диаметром ~3 мм. В лунки наносили от 15 до 60 мкл (в случае низкой концентрации белков) образцов супернатанта культуральной жидкости, суспензии клеток и растворов со смытыми ферментами, либо препаратов белков. Далее чашки Петри в пластиковых контейнерах с небольшим количеством соответствующего буфера (для предотвращения засыхания геля) помещали в термостат с температурами 54, 60, 65, 77 и 85°C, и инкубировали от 4 до 16-18 часов.

По окончании инкубации чашки Петри заливали 0.1% раствором Конго красного и оставляли окрашиваться на 30 минут (Imam et al., 1993). Далее раствор Конго красного сливали и отмывали 1 час в 1 М NaCl (с двукратной сменой раствора), для контрастирования окраски на 20 секунд заливали 5% ледяной уксусной кислотой. Зоны активности ферментов определяли по бесцветным участкам вокруг лунок, которые образуются в местах гидролиза полимерного субстрата.

4.5.3. Метод определения редуцирующих сахаров

Принцип метода заключается в восстановлении карбонильными группами редуцирующих сахаров 3,5-динитросалициловой кислоты, раствор которой имеет желтую окраску, до 3-амино-5-нитросалициловой кислоты, раствор которой имеет оранжево-красную окраску (Рис. 14). По интенсивности окраски определяют количество редуцирующих сахаров.

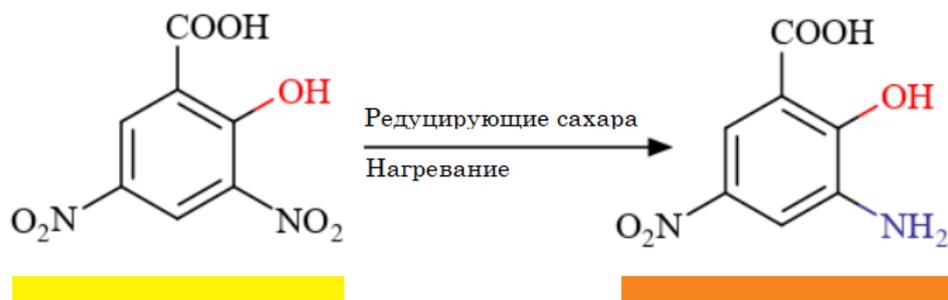


Рисунок 14. Схема реакции восстановления ДНСК карбонильной группой редуцирующего сахара.

Для проведения измерений с помощью данного метода мы готовили два реагента (Miller, 1959): 1% раствор ДНСК-реагента (г/л): ДНСК – 10; фенол – 2; сульфит натрия – 0.5; гидроксид натрия – 10 и 20% раствор тартрата калия-натрия

В качестве образцов использовали смеси ферментов, смытых с поверхности клеток с помощью детергентов, либо отмытые от среды клетки, либо очищенные препараты белков или клеточные экстракты рекомбинантных клеток. В качестве субстратов использовали 0.1%-0.3% растворы различных полисахаридов. В эппендорф объемом 2 мл добавляли 200 мкл образца и 1800 мкл раствора субстрата. Опыты проводили в 3-х повторностях. Также в 2 эппендорфа добавляли 2 мл субстрата в качестве контроля. Инкубировали при различных температурах при перемешивании в течение определенного времени (от 5 мин до 48 часов для различных проб). Отбирали по 500 мкл смеси в различные периоды инкубации; пробы измеряли сразу после отбора для избежания окисления количеств сахаров, особенно, глюкозы и ксилозы (Spoehr, 1924)

Далее к 500 мкл пробы (в контроле – воды) добавляли 500 мкл ДНСК-реагента, перемешивали и инкубировали на кипящей водяной бане 15 минут; потом некоторое время остужали пробирки. Далее добавляли 170 мкл тартрата калия-натрия и еще раз перемешивали. Измеряли оптическую плотность проб при длине волны 575 нм против контроля. Концентрацию редуцирующих сахаров определяли с помощью калибровочных кривых, построенных по результатам измерения OD₅₇₅ растворов глюкозы, ксилозы и целлобиозы с концентрациями от 50 до 500 мкг/мл.

4.5.4. Определение концентрации белка

Определение с помощью БСА метода. Бицинхониновая кислота способна образовывать окрашенный комплекс пурпурного цвета с одновалентными ионами меди (Cu^+) в щелочном растворе. Образование ионов Cu^+ происходит в результате восстановления Cu^{2+} с помощью белка в щелочном растворе (биуретовая реакция, Рис. 15). Интенсивность окраски раствора зависит от количества белка, что и позволяет определить концентрацию белка (Smith et al., 1985).

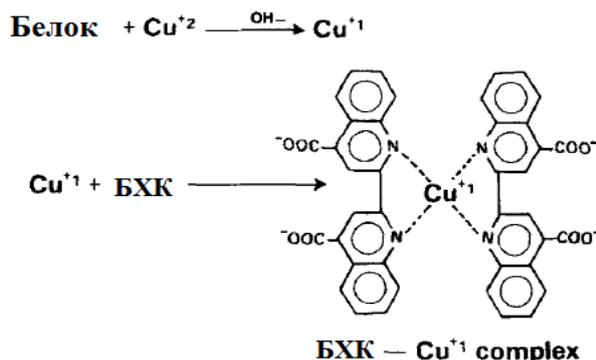


Рисунок 15. Схема реакций образования комплекса бицинхониновой кислоты (БХК) с одновалентным ионом меди, который образуется в ходе биуретовой реакции.

Для проведения измерений были приготовлены 2 реагента:

Реагент А (г/л): бицинхонинат натрия – 10, Na_2CO_3 – 20, тартрат натрия – 1.6, NaOH – 4, NaHCO_3 – 9.5. Реагент Б (г/л): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 4.

Реагенты смешивали в пропорции 100 объемов реагента А к 1 объему реагента Б. Получившийся рабочий раствор был стабилен в течении недели.

К образцам (фракция поверхностных белков, смытых с помощью детергента, супернатант), клетками объемом 20 мкл добавляли 1 мл рабочего раствора и перемешивали. Инкубировали 30 мин при $T=60$ °С, затем измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре при длине волны $\lambda=562$ нм. Цвет образцов был стабилен в течение часа.

Определение с помощью Qubit. Также измерение концентрации белка проводили на спектрофотометре Qubit согласно протоколу (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33211>).

4.5.5. Зимография и денатурирующий гель-электрофорез.

Для оценки молекулярной массы белков использовали электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970), в качестве контроля применяли маркеры белков с ранее определенными массами от 10 до 170 кДа и от 10 до 40 кДа (ThermoFischer Prestained Protein Ruler).

Метод зимографии основан на электрофоретическом разделении белков в полиакриламидном геле с последующим определением их активностей по отношению к субстратам, сополимеризованным с полиакриламидом и равномерно в нем расположенным. При использовании этого метода готовили гели (Schwarz et al., 1987):

- Концентрирующий: акриламид 4%; 0,4М Tris pH 8.8; 3М мочевины; ДСН 0.1%; КМЦ 0.1%.
- Разделяющий: акриламид 7.5%; 0.122 М Tris pH 6.8; 3М мочевины; ДСН 0.075%; КМЦ 0.1%.

В качестве субстратов для тестируемых гликозидаз использовали КМЦ до конечной концентрации 0.2%. В качестве образцов на гель наносили клетки, культуральную жидкость и смывы с клеточных стенок ферменты, рекомбинантные белки. Перед нанесением на гель к 20 мкл образца добавляли 7 мкл 4-кратного лизирующего буфера (200 мМ Tris-HCl, pH 6.8; 4% ДСН; 0.01% бромфенола синего; 40% глицерола).

После электрофореза гели отмывали от ДСН многократным промыванием дистиллированной водой. Инкубацию гелей проводили в течение 13 часов при 60°C в буфере 0.05 М MOPS pH 8.3. Гели окрашивали в растворе 0.1% Конго красного (см. выше).

4.5.6. Очистка белков

Очистка с помощью аффинной хроматографии на Gravity Flow колонке. Штаммы *E.coli*, содержащие плазмиды с целевыми генами, были выращены на среде Luria-Bertani (LB) с добавлением ампициллина (100 мкг/мл); для штамма с контрольным фрагментом в среду было добавлено 30 мкг/л хлорамфеникола. Когда плотность культур составляла примерно 0.5 при OD 600, в среду был добавлен 0.5 мМ ИПТГ для индукции экспрессии целевых генов, после чего штаммы культивировались 16 ч при +14°C и перемешивании. Затем 15 мл культуры центрифугировали при 4000 ×g 15 мин при 4°C, промывали фосфатным буфером (25 мМ, pH 7.5), и ресуспендировали в 0.7 мл того же буфера (pH 7.5) с добавлением 0.5 М NaCl, и 25 мМ имидазола и сонифицировали. После обработки ультразвуком, клеточные экстракты центрифугировали (15 000 ×g, 4 °C, 15 мин), и полученные фракции супернатанта, содержащего растворимые белки и дебриса (нерастворимая фракция) проверяли на эндоглюканазную активность. Далее фракции с растворимыми белками инкубировали 1 час

при +4°C с Ni-NTA HP агарозой (Cytiva) (в соотношении 1 мл агарозы на 5 мл супернатанта), после наносили на Gravity Flow колонку и проводили элюцию ступенчатым градиентом имидазола с концентрациями от 50 мМ до 500 мМ. Наличие целевых белков в клеточном экстракте и во фракциях, элюированных с колонки, проверяли с помощью денатурирующего гель-электрофореза. Фракции, содержащие целевые белки обессоливали с помощью PD-10 колонок (Cytiva), измеряли концентрацию белка и проводили дальнейшие измерения активности ферментов.

Очистка белков на хроматографе низкого давления. Для выделения белков штаммы *E.coli* BL21(DE3), содержащие плазмиды с целевыми белками, были выращены в жидкой культуре (объем варьировался от 2 л до 38 л, в зависимости от целевого фермента). Индукцию экспрессии генов проводили добавлением 0.5 мМ ИПТГ с последующей инкубацией в течение 16 часов при +14°C. Выросшие клетки концентрировали центрифугированием и разрушали ультразвуком. Клеточные экстракты отделяли от фракции нерастворимых белков и остатков клеток центрифугированием (40 мин, 13400 об/мин, +4°C) и затем производили очистку с помощью аффинной хроматографии на Ni-сефарозной колонке HP HisTrap, 1 мл (Cytiva), с линейным градиентом имидазола от 25 мМ до 500 мМ, скорость потока 0.5 мл/мин, максимальное давление 0.5 МПа. Фракции, содержащие целевые белки, собирали в отдельные емкости, после чего избавлялись от имидазола и NaCl с помощью концентрации и промывки с помощью центрифужных модулей Amicon Ultra с MWCO 30 кДа или 3 кДа (в случае с Cel45). Далее, полученную фракцию наносили на ионообменную колонку (анионообменная колонка C10/10, носитель DEAE-Sepharose, Cytiva), и далее собирали фракции (10 штук), в которых было наибольшее количество целевого белка. Для более надежного определения возможности олигомеризации исследуемых белков (в случае с GH12-1 и GH12-2) проводили электрофорез в нативных условиях, а также эксклюзионную хроматографию на FPLC (колонка C16/100, носитель Sephadex G100, Cytiva). Для всех полученных фракций измеряли концентрацию белка при помощи флуориметра Qubit (Qubit Protein Assay Kit), а также проводили ПААГ-электрофорез с последующей окраской геля окраски геля коллоидным раствором Кумасси G-250 (Dybala and Metzger, 2009). По результатам ПААГ-электрофореза массу полученных белков сравнивали с теоретически рассчитанными массами. Для определения выхода целевого белка (в случае с GH12-1 и GH12-2) были измерены эндоглюканазные активности по отношению к AZO-СМС всех фракций, которые были получены на различных этапах очистки, в оптимальных для ферментов условиях.

4.5.7. Измерение активности рекомбинантных белков

После выделения белков проводили определение их ферментативной активности, в том числе определение оптимальных параметров работы, термостабильность, субстратную специфичность, устойчивость к детергентам и требование к наличию кофакторов. Диапазон температуры и pH, в пределах которых работает фермент, определяли с помощью динитросалицилового метода (Miller, 1959) на бета-глюкане в качестве субстрата. Время инкубации составило 10 мин (в случае с белками *Thermococcus* sp. 2319x1), либо 2-4 часа для белков из *Thermofilum adornatum* 1910b. Субстратами являлись ксилан, ксилоглюкан, КМЦ, бета-глюкан, лихенан, целлобиоза, пахиман, маннан, галактоманнан, арабиногалактан, трегалоза, крахмал и раффиноза (концентрация всех субстратов 10 мг/мл). А также хромогенные субстраты: Azo-Avicell, Azo-Galactomannan, Azo-Galactan, Azo-Xylan, Azo-xyloglucan (Megazyme, <https://www.megazyme.com/shop-all-products/enzyme-substrates/soluble-chromogenic-substrates?p=1>). В качестве контролей были использованы вышперечисленные углеводы с концентрацией 1% (10 мг/мл) в 50 мМ Tris-HCl либо в 50 мМ MES (pH и буфер варьировались в зависимости от исследуемого фермента), проинкубированные такое же время без добавления фермента. Количество (мкмоль/мл) редуцирующих сахаров было рассчитано по калибровочной кривой. Далее была рассчитана специфическая активность фермента, которая определена как количество (мкмоль/мл) образующихся редуцирующих сахаров 1 мг белка за минуту.

Для определения pH зависимости для гликозидаз GH12-1 и GH12-2 были приготовлены 50мМ растворы буферов (ацетатный, MES, Tris-HCl, CAPS) с различным диапазоном значения pH (от 3.6 до 11), а также для данных ферментов проведено выявление температурного оптимума и границ (от 50 до 100 °C). В обоих случаях измерения активности осуществляли с помощью 1% AZO-CMC в соответствии с протоколом производителя (https://www.megazyme.com/documents/Booklet/S-ACMC_DATA.pdf). Также проводили определение устойчивости гликозидаз к различным детергентам, денатурирующим агентам и солям, а также влияние на их активность различных кофакторов (ионы металлов).

4.5.8. Тонкослойная хроматография

Для анализа продуктов гидролиза вышперечисленных полисахаридов была использована тонкослойная хроматография (ТСХ). На алюминиевую пластинку (20*20 см) с силикагелем (Merck) наносили проинкубированные образцы фермента с субстратом и субстраты, в качестве контроля. В качестве маркеров использовались растворы олигосахаридов (ксилозы, ксилобиозы, ксилотриозы, ксилотетраозы и ксилопентаозы для одного маркера и глюкозы, целлобиозы, целлотриозы, целлотетраозы, целлопентаозы и целлогексозы для

второго маркера) с концентрацией 0.0625% каждого компонента в смеси. Пластинку высушивали 20 мин при 42°C, 10 мин при 60°C и опускали в смесь растворителей – этанол: бутанол: вода в соотношении 2:2:1 (по объему). После элюции пластину высушивали 30 мин при 42°C, 30 мин при 60°C и проявляли раствором 0.1% орцинола в 5% серной кислоте. Далее высушивали при 75°C около 10–15 мин до проявления окраски. Наличие пятен в соответствующей пробе свидетельствовало о гидролизе того или иного полисахарида ферментом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 5. ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ, РАЗЛАГАЮЩИХ ПОЛИСАХАРИДЫ ИЗ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ

Для выделения гипертермофильных архей, разлагающих полисахариды, были поставлены накопительные культуры с добавлением различных сложных углеводов в качестве субстратов. Для этой цели были использованы пробы, отобранных из горячих источников Чили, Тувы, Чукотки и Камчатки (экспедиции 2015, 2016 и 2019 годов). Важными условиями выбора проб для культивирования было присутствие растительных остатков в месте отбора, высокая температура и анаэробные условия. В качестве посевного материала для исходных накопительных культур были рассмотрены следующие источники (Табл. 7):

Таблица 7. Список источников, отобранных для выделения гипертермофильных архей

№ пробы	Место отбора	Координаты	Т°С/рН/Eh	Описание
3308	Источники Аржан-Тарыс, Тыва, Россия	N51.28.262 E98.03.213	75/9.2/-420	Вода с осадком, листьями и матом
3310		N51.28.254 E98.03.192	82.5/9.1/-420	Вода с примесью матов
3502	Подножие вулкана Тингиририка, Чили	S34 57.535 W70 26.298	80/6.3/нд	Смесь матов, песка, листьев, отложений железа III
3507		S34 57.518 W70 26.331	83/6.2/нд	Листья, черная грязь, отложения FeIII
3515	Гейзеры вулкана Татио, Чили	S22.328214 W68.006309	85.2/6.5/нд	Вода, песчинки
3519		S22.328359 W68.0065	81/6.3/нд	Вода
3523		S22 19.889 W68 00.711	83/7/нд	Вода, песок и камни с краёв источника
3524		S22 19.885 W68 00.717	83/7/нд	Вода, часть обрастаний со дна
3527	Склон вулкана Ластаррия с фумарольными выходами, Чили	S25.152331 W68.523594	100/<3/нд	Порода у выхода с серой из 2 разных фумарол
3703	Мечигменские источники, Чукотка, Россия	N65.806337 W173.39562	86/6.7/-240	Вода с темно-серыми и рыжими осадками
3704		N65.806329 W173.39563	80/6.7/-278	Вода с серыми волокнами, немного рыжего осадка
3709b		N65.806266 W173.39635	80/6.7/-285	Обрастания с остатков органики, кусочки тканей, вода
3710		N65.806271 W173.39639	84/7/-20	Черный осадок, вода

Продолжение Таблицы 7.

№ пробы	Место отбора	Координаты	Т°С/рН/Еh	Описание
3711	Мечигменские источники, Чукотка, Россия	На северо-запад 1м от 3710	87/6.8/-290	Черный и серый осадок со дна, растительные остатки, слизистые обрастания, вода
3712		N65.806335 W173.39644	81/6.4/-305	Белые слизистые нити, вода
3727b		N65.805912 W173.39653	81/6.8/-200	Черные осадки и вода
3730		N65.805844 W173.39485	88/6.9/-360	Темно-серые осадки и вода
3731		N65.805777 W173.39483	93/6.8/-400	Темно-серые осадки и вода
3755c	Сенявинские источники, Чукотка, Россия	N64.424418 W172.50138	87/7.4/-300	Соскоб матов с размягченной белой доски под трубой
3812	Камчатка, долина Узон, Россия	N54.300089 E160.002046	91/3.0/-70	Небольшой грязевой источник с большим количеством опада
3825		N54.300267 E160.002679	82/5.3/-239	Небольшой бурлящий источник с растительным опадом и обрастаниями
3827		N54.300058 E160.000659	78/6.0/-295	Группа мелких источников посреди травы с большим количеством растительного опада
3828		N54.302681 E160.000218	72/3.4/-100	Серая мелкая лужа посреди травы
3829		N54.302665 E160.000222	85/5.7/-290	Серая мелкая лужа посреди травы

Из вышеуказанных проб были получены первичные накопительные культуры на различных полисахаридах; каждая из проб была посеяна на несколько вариантов субстратов (Табл. 8). Условия культивирования были подобраны как можно ближе к естественным условиям экосистем, из которых были отобраны пробы – высокая температура, околонеутральный или щелочной рН и анаэробноз (поскольку для большинства источников были измерены отрицательный Еh среды, также было отмечено присутствие сульфида). Среднее время культивирования первичных накопительных культур составляло от 4 до 7 дней, после чего проводили их микроскопирование. В случае выявления роста микроорганизмов, следовала серия последовательных пересевов и с помощью микроскопии подтверждалось присутствие микроорганизмов; кроме того, проводилась оценка разнообразия сообщества микроорганизмов с помощью молекулярных методов (DGGE, NGS секвенирование участка V4 гена 16S рРНК), и, в зависимости от результатов, работа с этой культурой продолжалась или прекращалась.

Таблица 8. Условия культивирования накопительных культур для выделения гипертермофильных архей

№ пробы	Субстраты	T, °C	pH		
3308	Ксилан	85	7 и 10		
3310				7 и 10	
3502			6.5		
3507					
3515					
3519					
3523					
3524					
3527		92			
3703	Ксилан Альгинат МКЦ	87	6.9		
3704		80			
3709b		80			
3710		85			
3711		87			
3712		80			
3727b		87			
3730		93			
3731		93			
3755c		87			
3812		Лихенан		85	5.5
3825				Трагакант гам	
3827	МКЦ		78		
3828	Ксилан	75	3.2		
3829	Хитин, Карайя гам	85	5.5		

После 3 последовательных пересевов, для ряда культур были проведены серии предельных разведений и установлено, что в них на протяжении всего времени культивирования сохранялись одни и те же морфотипы клеток. После этого из культур была выделена ДНК, с которой был проведен DGGE, либо подготовлены библиотеки на NGS секвенирование фрагмента V4 гена 16S рРНК. В результате этих экспериментов, в некоторых культурах были определены представители архей.

Так, из накопительных культур Чилийских горячих источников были получены смешанные культуры гипертермофильных архей родов *Thermosphaera*, *Pyrobaculum* и *Thermofilum*, из которых впоследствии, были получены чистые культуры, использующие различные полисахариды (Табл. 8). В накопительных культурах из Чукотских и Тувинских горячих источников наблюдалось присутствие разнообразных гипертермофильных бактерий филумов *Thermotogae* и *Dictyoglomi*, имеющих характерную морфологию клеток. Поскольку в этих накопительных культурах гипертермофильные археи отсутствовали, далее эти

культуры не упоминаются. В случае культивирования проб из кальдеры Узон, Камчатка, были получены смешанные культуры гипертермофильных микроорганизмов, в которых было подтверждено наличие архей из родов *Fervidococcus*, *Desulfurococcus*, *Caldisphaera*, *Thermoproteus* и представителей глубоких групп, таких как *Thermoplasmatales* A10 и THSCG. С помощью методов предельных разведений и лазерного сортирования были получены чистые культуры гипертермофильных архей (Табл. 9).

Таблица 9. Штаммы гипертермофильных архей, выделенные в ходе работы

Культура	Морфотип клеток	Субстрат	Присутствие в накопительной культуре архей*	Штамм	Анализ полного гена 16S рРНК (сходство с ближайшим организмом)
3502	Кокки, палочки	Ксилан	98% <i>Thermofilum izonense</i>	3502	99% <i>Thermosphaera aggregans</i>
3507	Кокки	Ксилан	96% <i>Thermosphaera aggregans</i>	3507	99% <i>Thermosphaera aggregans</i>
	Кокки, тонкие палочки	Лихенан	96% <i>Thermosphaera aggregans</i> , 92% <i>Desulfurococcus fermentans</i>	3507L	99% <i>Thermosphaera aggregans</i>
		Лихенан		3507LT	97% <i>Thermofilum usonense</i>
	Кокки, палочки	Ксилоглюкан	96% <i>Thermosphaera aggregans</i>	3507L2	99% <i>Thermosphaera aggregans</i>
3524	Палочки	Ксилан	99% <i>Thermofilum izonense</i>	3524	98% <i>Pyrobaculum aerophilum</i>
3825 (KZ7)	Кокки и палочки	Трагакант	96.4% <i>Fervidococcus fontis</i>	KZ7_Cs	нет данных
3827 (KZ4)	Кокки	МКЦ	96.8% <i>Fervidococcus fontis</i>	KZ4_Cs	нет данных
3828 (KZ1)	Кокки, овальные клетки	Ксилан	92% <i>Thermoplasmatales</i> A10, 99% <i>Caldisphaera</i>	KZ1_Cs	100% <i>Caldisphaera lagunensis</i>
3829 (KZ4)	Кокки и палочки	Хитин	97.2% с <i>Fervidococcus fontis</i> 99.2% <i>Desulfurococcus fermentans</i>	KZ4_Cs	98% <i>Desulfurococcus fermentans</i>

* - присутствие представителей домена Archaea было выявлено с помощью секвенирования фрагментов в районе участка V3-V4 гена 16S рРНК.

Таким образом, в процессе данной работы, было получено 10 чистых культур гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах таких, как ксилан, лихенан, ксилоглюкан, целлюлоза, хитин и трагакант.

Дальнейшая работа была сконцентрирована на характеристике представителя родов *Thermosphaera* и *Thermofilum*, выделенных из чилийских источников (Рис. 16). Штамм 3507LT является представителем нового рода в *Thermofilaceae*, поскольку сходство последовательностей гена 16S рРНК этого штамма и ближайшего валидно описанного вида *Thermofilum usonenze* составило 97%.

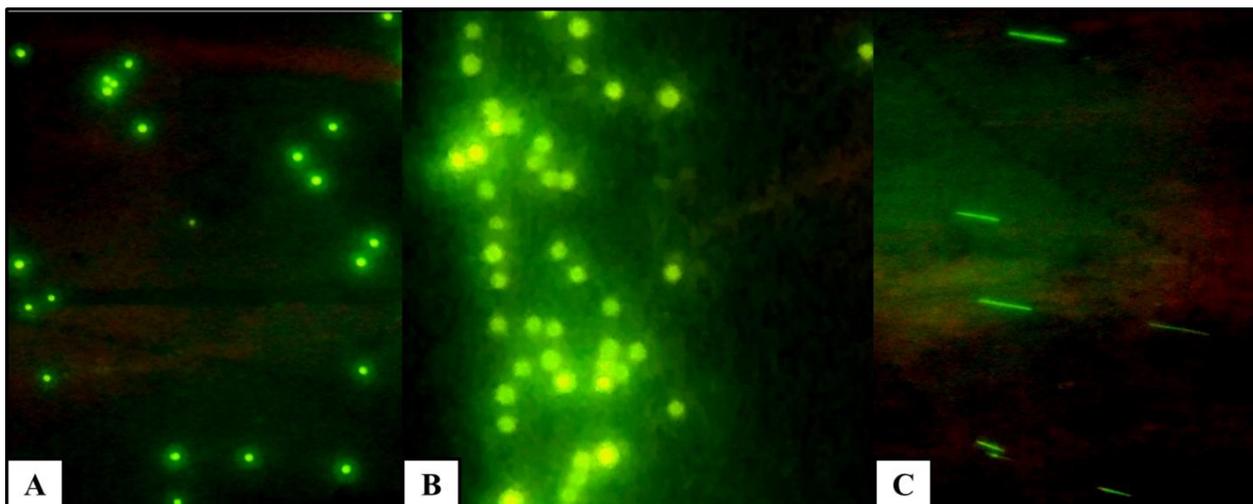


Рисунок 16. Микрофотографии новых штаммов гипертермофильных архей, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, краситель акридин оранжевый: А) штамм 3502; В) штамм 3507; С) штамм 3507LT.

Поскольку штаммы 3507, 3507L и 3507L2, растущие на ксилане, лихенане и ксилоглюкане, были идентичны по гену 16S рРНК между собой (данные не представлены) и были выделены из одного и того же источника, то работа была сконцентрирована только на одном из них – 3507, для которого был секвенирован геном и проведена характеристика его физиологических особенностей (см. Раздел 6.1).

Из проб, отобранных на Камчатке, были выделены в чистые культуры представители родов *Desulfurococcus*, *Caldisphaera* и *Fervidicoccus*. К сожалению, выделить в чистые культуры представителей глубоких групп не удалось.

Так, в накопительной культуре 3828, растущей на ксилане, по данным анализа 16S рРНК профилей (Рис. 17) было отмечено доминирование ранее некультивируемой группы архей *Thermoplasmatales* A10 (Wilkins et al., 2019). При микроскопировании в данной культуре преобладали кокки неправильной формы, диаметром 2-4 мкм, в меньшем количестве присутствовали прямые тонкие палочки, длиной от 3 до 15 мкм.

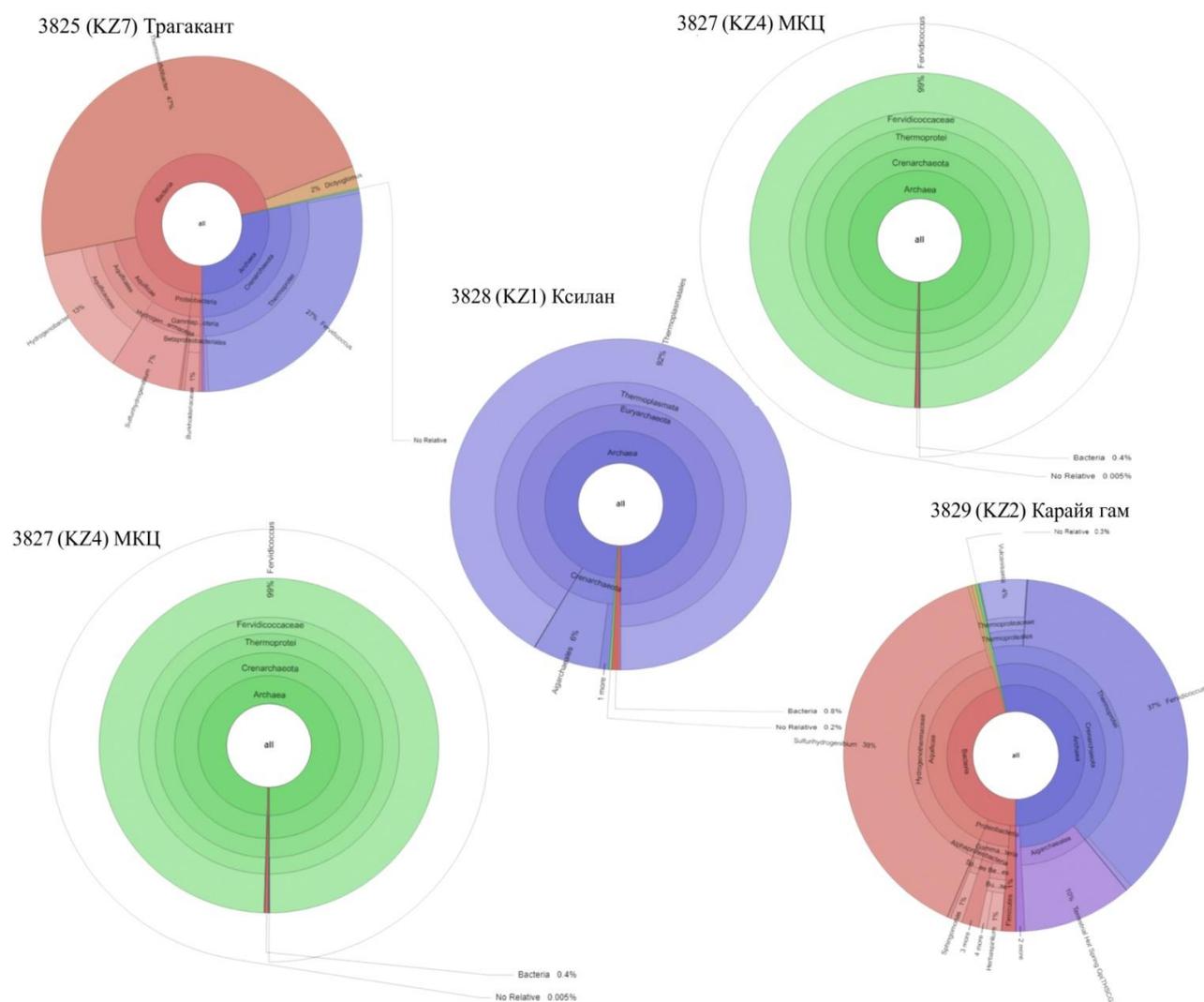


Рисунок 17. Таксономические профили на основе анализа последовательностей участка V4 генов 16S рРНК, полученные для 5 накопительных культур из Камчатских проб.

В последующем пересеве на анаэробную среду Пфеннига с ксиланом (1 г/л) в качестве субстрата мелкие кокки были доминирующими. Данную культуру решили использовать для лазерного сортирования клеток (Kochetkova et al., 2019), с целью отделить единичные клетки, чтобы получить чистую культуру архей. После завершения сортирования, из каждой лунки отбирали 200 мкл пробы и засевали в среду с различными субстратами (Табл. 10), объемом 10 мл, разлитую в пробирки Хангейта. Культуры инкубировали при трех температурах в течении 2 недель. Рост проверяли микроскопированием. Наилучший рост наблюдался на ксилане и ксантановой камеди, незначительный рост был отмечен на глицероле. Поскольку на ксилане культура микроорганизмов выглядела однородной и представляла собой кокки, далее была выделена ДНК и проведено секвенирование участка 16S рРНК гена (Рис. 18).

Таблица 10. Культивирование культуры 3828 (KZ1) после лазерного сортирования

Субстрат	Т, С	Рост после сортирования на 14 сутки инкубирования, подтверждение роста/морфология клеток	Следующий пересев, (подтверждение роста/морфология клеток)		
Ксилан	70	Кокки	Кокки, неправильной формы сферы		
Ксантановая камедь	74	Кокки+тонкие палочки	Кокки		
Крахмал+ S (полисульфид)	74	Нет роста			
Пуллулан	74				
Глюкоза+50мг ДЭ	60				
Глюкоза + клеточный фильтрат +полисульфид	70				
Сахароза	70				
Лактоза	74				
Пируват	70				
Пролин+100ДЭ	70				
Глицин+Валин	74				
Малат+Тартрат+100мг ДЭ					
Пальмитат					
Глицерол+50мг ДЭ				Кокки	Кокки (очень мало)
300 мг ДЭ+ нитрат 50мМ+NH ₄ Cl				Нет роста	
Твин80+ сульфат100мМ					
Стеарат+50мгДЭ					
Смесь витаминов В1+В6					

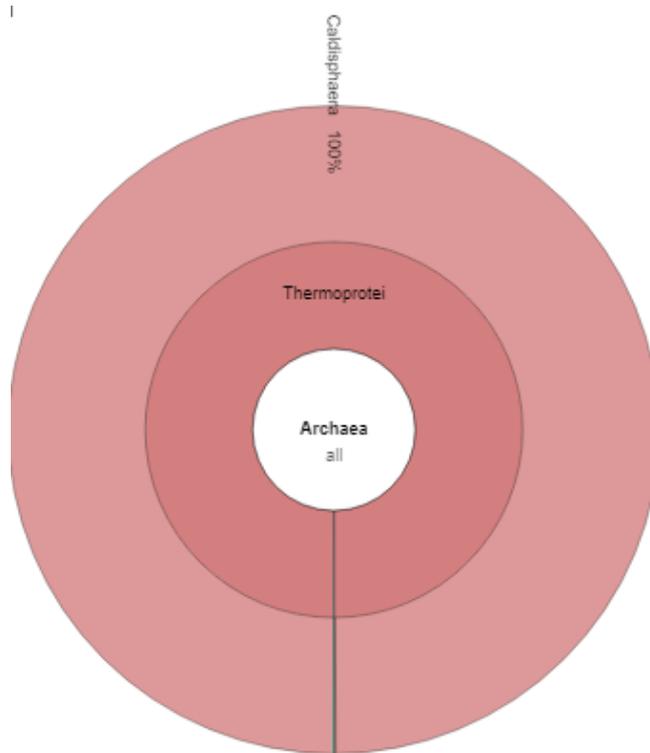


Рисунок 18. Таксономический профиль на основе анализа последовательностей участка V4 генов 16S рРНК, культуры 3828, растущей на ксилане, после лазерного сортирования.

Анализ участка V3-V4 гена 16S рРНК чистой культуры, выделенной на ксилане из накопительной культуры 3828 с помощью лазерного сортирования, показал, что она является штаммом *Caldisphaera lagunensis* (сходство 100%, Рис. 17). Данный микроорганизм является гипертермофильной анаэробной гетеротрофной археей (Itoh et al., 2003), однако, ранее для него не был показан рост на ксилане. Новый штамм *Caldisphaera lagunensis*, обозначенный как KZ1_Cs, является анаэробным, гетеротрофным микроорганизмом, растущем при 70-74°C, pH 3.0 и способным утилизировать ксилан и белковые субстраты, такие как пептон, желатин и дрожжевой экстракт.

Также из Камчатских источников был выделен штамм анаэробной органотрофной гипертермофильной археи KZ4_Cs, который оказался близок к *Desulfurococcus fermentans* (сходство 98% по участку гена 16S рРНК). Данный микроорганизм растет при температуре 85°C в слабоацидофильных условиях, при pH 5.5, и способен использовать в качестве субстратов ксантановую камедь, дрожжевой экстракт и пептон.

ГЛАВА 6. ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ

Шесть штаммов гипертермофильных архей были выбраны для подробного описания и характеристики их гидролитического потенциала: *Thermofilum adornatum* 1910b, *Thermococcus* 2319x1, *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2, *Thermosphaera aggregans* 3502 и 3507, *Thermofilum* sp. 3507LT. Все штаммы были проверены на способность разлагать сложные полимеры (полисахариды и некоторые белки), усваивать их олиго- и мономеры, расти в присутствии/отсутствии акцепторов электронов и при различных физико-химических параметрах среды (диапазон температур, pH, концентрация солей). При проверке субстратной специфичности была использована оптимальная для каждого штамма среда (см. Главу 4, Раздел 4.1.3) и условия культивирования. В Таблице 11 представлена характеристика данных архей, способных утилизировать достаточно большой спектр углеводов, в частности, полисахаридов.

Таблица 11. Характеристика штаммов гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах

Штамм	<i>Thermococcus</i> sp. 2319x1	<i>Pyrobaculum</i> <i>arsenaticum</i> 2319x2	<i>Thermosphaera</i> sp. 3502	<i>Thermosphaera</i> sp. 3507	<i>Thermofilum</i> <i>adornatum</i> 1910b	<i>Thermofilum</i> sp. 3507LT
Место выделения	Кунашир, Россия	Кунашир, Россия	Чили	Чили	Камчатка, Россия	Чили
Наличие жгутика	+	-	-	-	+	-
Т°С (Min./opt./max)	65/85/92	60/92/98	70/85/92	70/85/92	50/80/85	73/80-85/92
pH (Min./opt./max)	6/7-7.5/9	5.2/6.3/7.5	5/6.2-6.5/7	5/6.2-6.5/7	5.5/5.5-6.0/8.5	5/5.6-6.0/7
NaCl (% w/v) (Min./opt./max.)	0/0.6/2	0/0/0.72	0/0/0.5	0/0/0.5	0/0/0.5	0/0/нд
Наличие дополнительного источника кофакторов	-	-	-	-	Клеточный фильтрат <i>Desulfurococcus</i> или <i>Fervidococcus</i>	Клеточный фильтрат <i>Thermosphaera</i> <i>aggregans</i>
Зависимость от акцептора электронов	+ (S ⁰)	+	-	-	-	-
Время удвоения (ч)	2	3.4	нд	нд	4.95	6
Использование субстратов:						
Пептон	+	+	+	+	+	-
Дрожжевой экстракт	+	+	+	+	+	+
Аморфная целлюлоза	+	-	-	-	+	-
Микрокристаллическая целлюлоза/ Avicell	-	-	-	-	+	-
α-целлюлоза	нд	-	+	+	-	-
Карбоксиметил целлюлоза	+		нд	нд	-	-
Фильтровальная бумага	н.д.	н.д.	-	-	-	-
Хитин	+	-	-	-	-	-

Продолжение Таблицы 11.

Штамм	<i>Thermococcus</i> sp. 2319x1	<i>Pyrobaculum</i> <i>arsenaticum</i> 2319x2	<i>Thermosphaera</i> sp. 3502	<i>Thermosphaera</i> <i>aggregans</i> 3507	<i>Thermofilum</i> <i>adornatum</i> 1910b ^T	<i>Thermofilum</i> sp. 3507LT
Лихенан	+	-	+	+	-	+
β-глюкан	-	-	нд	нд	+	-
Крахмал	+	+	+	+	+	+
Пуллулан	+	+	+	+	нд	нд
Ксилан	+	+	+	+	-	-
Ксилоглюкан	+	-	+	+	Н.д.	+
Маннан	-	-	-	-	-	-
Глюкоманнан	-	-	нд	нд	-	-
Целлобиоза	-	+	нд	нд	+	-
Глюкоза	+	+	нд	нд	+	+/-
Сахароза	+	+	-	-	-	+
Мальтоза	+	+	нд	нд	-	нд
Лактоза	+	+	нд	нд	+	+
Манноза	-	+	нд	нд	+	нд
Ксилоза	+	+	+	+	-	нд
Арабиноза	-	-	нд	нд	-	нд
Геном секвенирован	+	+	-	+	+	+

* - знак «+» означает рост в трех последовательных пересевах на данном субстрате, по численности клеток превышающий контроль (среда без субстрата, либо среда с минимальным количеством дрожжевого экстракта, как источника витаминов и кофакторов) в три и более раз. Отсутствие роста отмечено знаком «-». Если рост на данном субстрате не проверен – помечено сокращением «нд» - нет данных.

6.1. Характеристика *Thermosphaera* sp. 3507

Клетки штамма 3507 представляли собой кокки от 1 до 3 мкм в диаметре, подвижные, иногда собирающиеся в гроздьевидные агрегаты. Штамм рос в интервале температур от 70 до 92°C с оптимумом при 85°C и в интервале pH от 5.0 до 7.0 с оптимумом в области 6.2-6.5. Организм способен утилизировать такие полисахариды как ксилан, ксилоглюкан, α-целлюлозу, лихенан, крахал, пуллулан, а также белковые субстраты - пептон, триптон и дрожжевой экстракт в качестве источников углерода и энергии. Анализ гена 16S рPHК нового изолята показал, что его ближайшим родственником является *Thermosphaera aggregans* M11TLT (Huber et al., 1998) с уровнем сходства 99%. Таким образом, новый изолят был идентифицирован как штамм *Thermosphaera* sp. 3507. Не смотря на высокое сходство последовательностей генов 16S рPHК, штамм 3507 отличался по физиологии от его ближайшего родственника, *T. aggregans*, который не был способен расти на полисахаридах, за исключением термически обработанного ксилана и не мог потреблять ксилозу (Huber et al., 1998).

Геном штамма 3507 был секвенирован и собран в кольцевую хромосому общей длиной 1,305,106 п.о. и содержанием G+C 47.6%. 1.458 генов были предсказаны, из них: 1.399 белок-кодирующих, 50 RNA генов (3 rRNA, 45 tRNA, 2 ncRNA) и 9 псевдогенов. BLAST анализ выявил сходство 99.67% по 16S рPHК последовательностям с *Thermosphaera aggregans* M11TLT, однако среднее сходство по нуклеотидам и аминокислотам (AAI и ANI) были ниже порогового по видам (95%) и составляли 86.5% и 83.2%, соответственно. Что позволяет отнести данный штамм к новому виду *Thermosphaera*. Способность к разложению полисахаридов определяется наличием генов CAZymes, представленных десятью гликозидазами из семейств GH1, GH13, GH57 и GH122 и 17 представителями гликозилтрансфераз. Из них, 13 генов CAZymes были предсказаны как секретируемые. Анализ генома также выявил полное или частичное отсутствие генов путей биосинтеза следующих аминокислот: аргинина, гистидина, метионина, пролина, серина, разветвленных и ароматических аминокислот. По полученным данным была опубликована статья Microbiology Resource Announcements (MRA) - **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.

6.2. Характеристика нового представителя семейства *Thermofilaceae* и реклассификация данного семейства в порядок

Штамм 3507LT был выделен из той же накопительной культуры, что и *Thermosphaera* sp. 3507. Клетки штамма 3507LT представляют собой тонкие, неподвижные палочки (Рис. 19) длиной 3-20 мкм и шириной 0.15-0.2 мкм. Изолят является анаэробным гипертермофильным органотрофным представителем филума Crenarchaeota, растущим при 73-93 °С и в диапазоне рН от 5 до 7.5 оптимально при 85 °С и рН 6.0-6.7. Для роста штамма 3507LT необходимо добавление клеточного фильтрата его спутника, *Thermosphaera* sp. 3507, или клеточных фильтратов других архей, а также обязательное присутствие в среде дрожжевого экстракта.

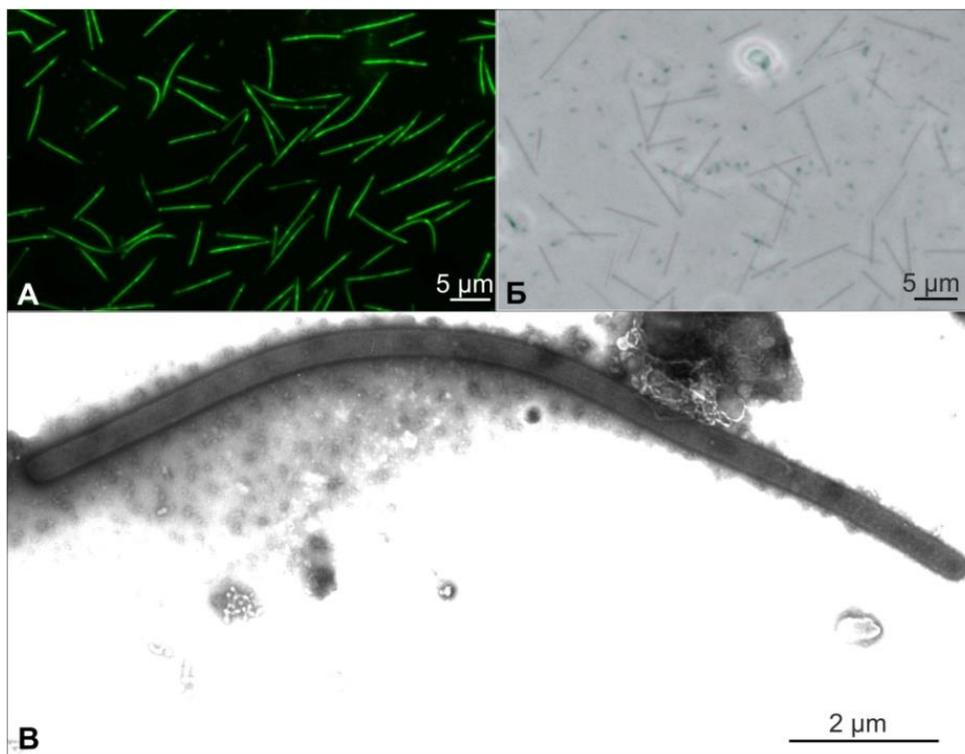


Рисунок 19. Морфология клеток штамма 3507LT: А) микрофотографии клеток, окрашенных акридином оранжевым (шкала 5 мкм); Б) клетки под фазово-контрастным микроскопом (шкала 5 мкм); В) микрофотографии клеток, полученные с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (шкала 2 мкм).

Новый организм является бродильщиком и растет на моносахаридах, дисахаридах и широком спектре полисахаридов (лихенане, крахмале, ксантановой камеди ксилотриозане, альфа-целлюлозе и аморфной целлюлозе). Добавление акцепторов (серы, нитрата, селената и тиосульфата) не стимулировали рост (Табл. 12).

Таблица 12. Рост штамма 3507LT на различных субстратах.

Субстраты	Кол-во клеток x 10 ⁶ мл ⁻¹	соотношение эксперимент/контроль
Контроль (среда без субстрата)	2	1
Сахара		
Глюкоза	26	13
Галактоза	5.3	2.65
Манноза	11.7	5.85
L-рамноза	0.77	0.385
Ксилоза	0	0
Сахароза	70	35
Лактоза	43	21.5
Мальтоза	11.6	5.8
Целлобиоза	23	11.5
Полисахариды		
Крахмал	20	10
Лихенан	15	7.5
АМЦ	8.6	4.3
Альфа-целлюлоза	15	7.5
Avicel (микрористаллическая целлюлоза)	5	2.5
Ксантановая камедь	11	5.5
Гуаровая камедь	6.8	3.4
Ксилан	5.6	2.8
Ксилоглюкан	12.9	6.45
Белковые субстраты		
Пептон	3	1.5
Триптон	2	1
Альбумин	0	0
Дрожжевой экстракт	2.2	1.1
Акцепторы 10мМ (субстрат - сахароза)		
NaNO ₃	2.7	1.35
Na ₂ S ₂ O ₃	2.7	1.35
Na ₂ SeO ₄	5.6	2.8
Элементарная сера	0	0

Количество клеток приведено после 7 дней культивирования. Соотношение эксперимента к контролю более чем в 3 раза расценивалось как рост, в 2-3 раза - слабый рост, менее чем в 2 раза – отсутствие роста.

Помимо клеточного фильтрата спутника *Thermosphaera* 3507, штамм 3507LT способен расти с добавлением клеточных фильтратов других гипертермофильных архей: *Thermococcus* sp. 2319x1 и *Thermosphaera aggregans* 3502 (Рис. 20).

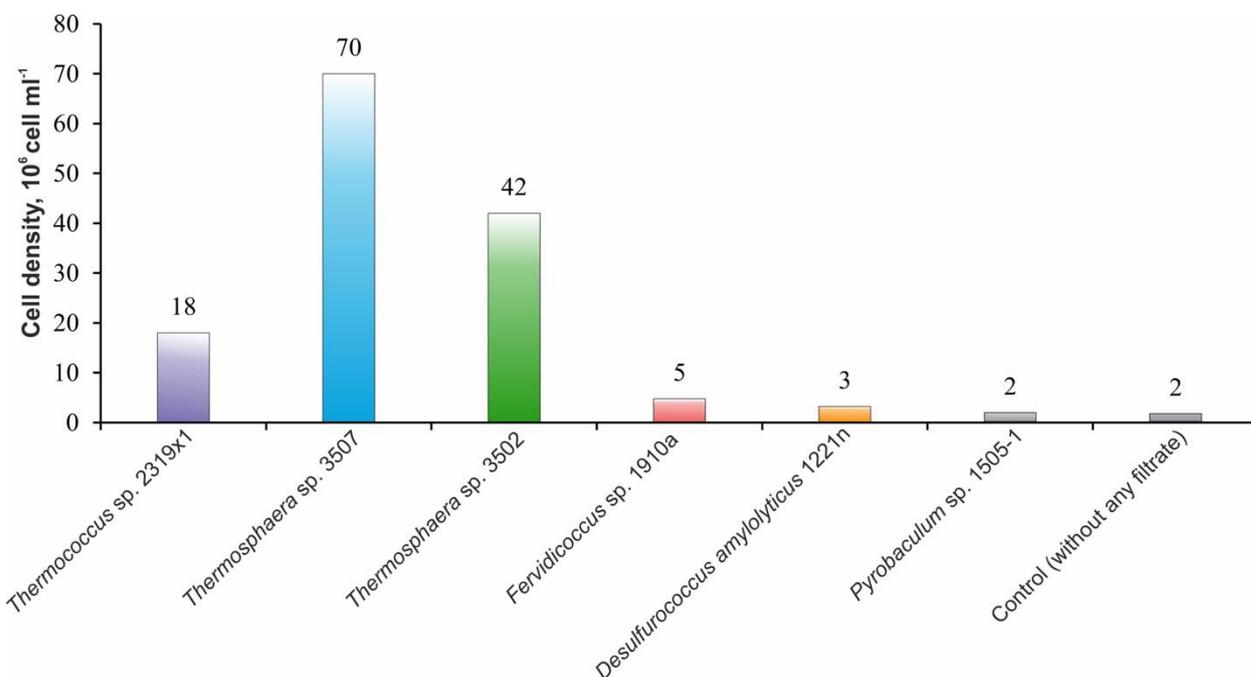


Рисунок 20. Рост штамма 3507LT в оптимальных условиях (T=85 °C, pH=6.5, субстрат сахара) при добавлении клеточных фильтратов различных архей, полученных фильтрованием через 0.22 мкм фильтр (Millipore).

Геном штамма секвенирован и замкнут в одну кольцевую хромосому длиной 1625846 пар нуклеотидов, содержание GC пар оснований составило 53.9 мол. %. С помощью сервера IMG/M (Chen et al., 2019) были предсказаны 1853 гена: 1803 белок-кодирующих последовательностей (CDS) и 50 генов РНК (3 rRNA, 46 tRNA и 1 ncRNA).

Чтобы идентифицировать таксономическое положение нового изолята, был проведен BLASTn анализ полного гена 16S рРНК штамма 3507LT против нуклеотидной nt/nt базы последовательностей генов 16S рРНК, который показал, что микроорганизм относится к семейству *Thermofilaceae*, находящееся в порядке *Thermoproteales*, класса *Thermoprotei*. По сходству последовательностей 16S рРНК ближайшими родственными видами оказались *Thermofilum uzonense* 1807-2 (97.6 % сходства), *Thermofilum pendens* Hrk5 (97.07 % сходства) и *Thermofilum adornatum* штаммы 1910b и 1505 (оба 96.67% сходства). Значения величин полногеномных сравнений (среднее сходство по нуклеотидам ANI и аминокислотам AAI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизация) были ниже порговых (Табл. 12) для вида (95% (Konstantinidis, 2005), 95% (Kim et al., 2014) and 70% (Wayne et al., 1987), соответственно).

Таблица 13. Полногеномные сравнения штамма 3507LT и видов *Thermofilum*.

	<i>Thermofilum uzonense</i> 1807-2	<i>Thermofilum adornatum</i> 1910b	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk5
AAI	66.1%	56.7%	58.8%
ANI	70.7%	70.3%	71.0%
DDH	18.8%	49.4%	19.2%

Для построения филогенетического дерева (Рис. 21) были взяты нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК всех представителей класса *Thermoprotei*. Как видно из Рис. 21, штамм 3507LT и другие представители рода *Thermofilum* формируют монофилетичную группу. Чтобы подтвердить результаты, полученные с помощью 16S рРНК филогении, было построено дерево, основанное на наборе конкатенированных белков «ag122» (Parks et al., 2017, (Рис. 22)). Филогенетическое дерево, основанное на белках, подтверждает, что штамм 3507LT находится внутри кластера, содержащего ранее описанные виды *Thermofilum*, и попадает в группу вместе с *T. uzonense*, в то время как *T. adornatum* и *T. pendens* попадают в другую группу. Основываясь на белковой филогении, мы предлагаем новый род *Infirmifilum*, состоящий из двух видов: *Infirmifilum lucidum* sp. nov. штамм 3507LT и *Infirmifilum uzonense* comb. nov (ранее известный как *Thermofilum uzonense* штамм 1807-2), а также выделение семейства *Thermofilaceae* в порядок *Thermofilales*. Значения ААI на уровне рода между членами семейства *Thermofilaceae* подтверждают этот факт: медиана между родами *Infirmifilum* и *Thermofilum* составила 58%, что ниже порогового значения 65% (уровень, необходимый для выделения рода (Konstantinidis et al., 2017) и близко к 56% - медиане межродового ААI, которое показано для представителей других порядков класса *Thermoprotei* (Рис. 23). Более того, если сравнивать ААI значения протеомов различных представителей класса *Thermoprotei* (Рис. 24), то эти данные будут коррелировать с результатами белковой филогении, поскольку внутри порядка *Thermoproteales* значения медианы ААI являются очень низкими и сравнимы с межпорядковыми значениями внутри класса *Thermoprotei*.

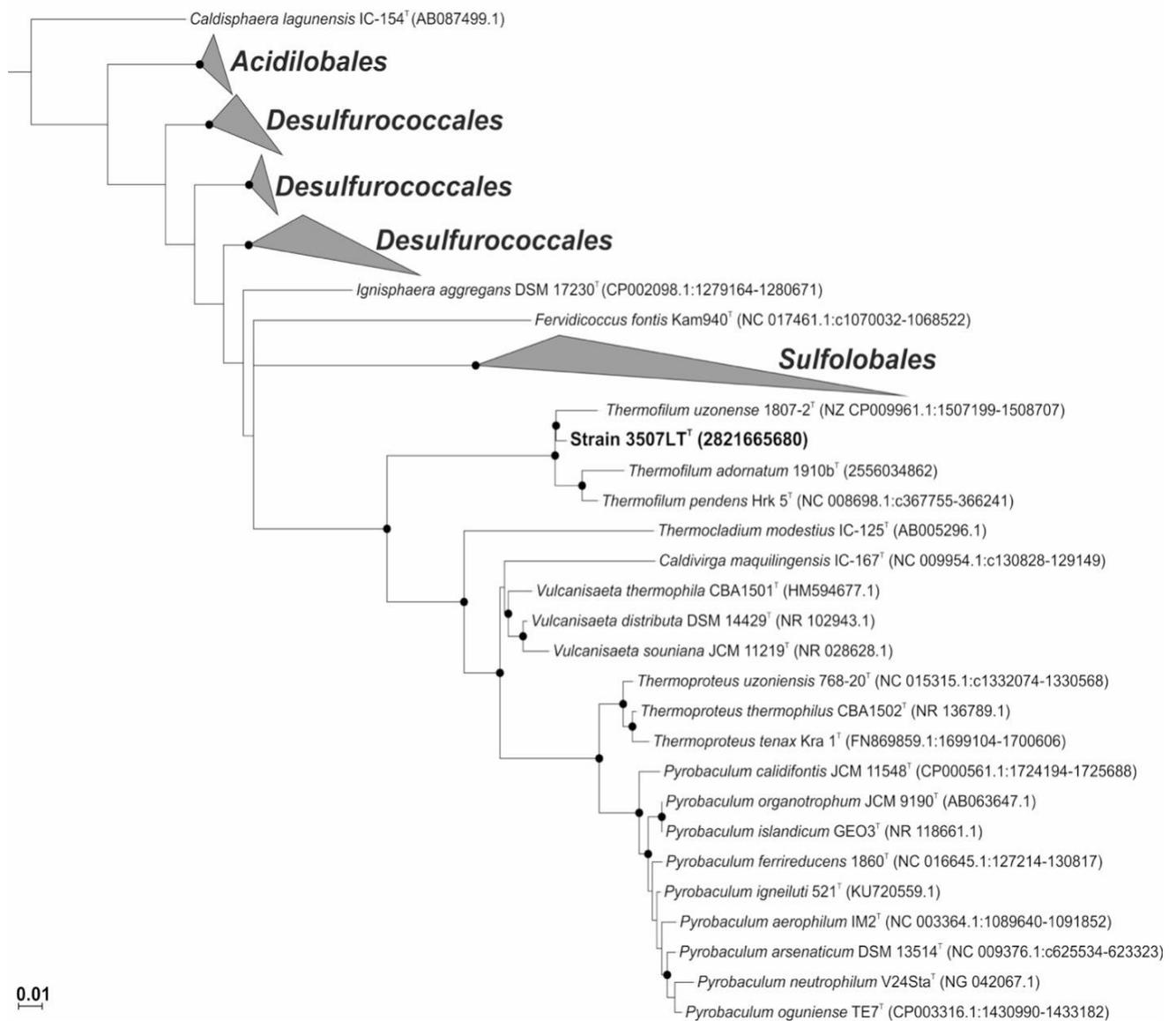


Рисунок 21. Филогенетическое дерево класса *Thermoprotei*, основанное на последовательностях генов 16S рРНК, построенное методом максимального правдоподобия. Штамм 3507LT выделен темным. *Methanothermobacter defluvii* DSM 7466 был использован в качестве корня (не показан на рисунке).

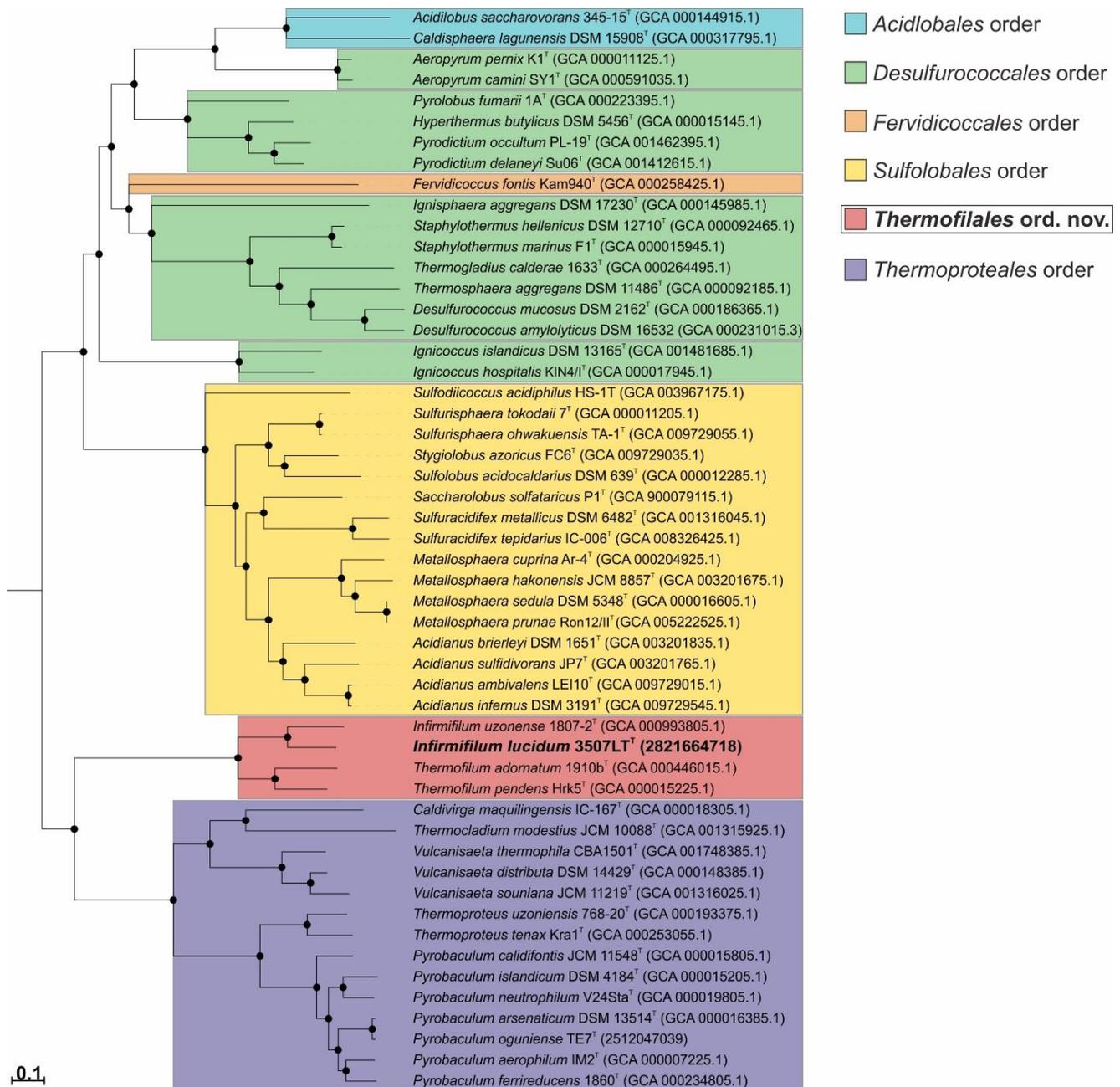


Рисунок 22. Филогенетическое дерево класса *Thermoprotei*, основанное на 122 консервативных архейных белках, построенное методом максимального правдоподобия. Штамм 3507LT выделен жирным шрифтом. Черные точки в узлах означают, что процентные значения бутстрепа (1000 повторений) больше 50%.

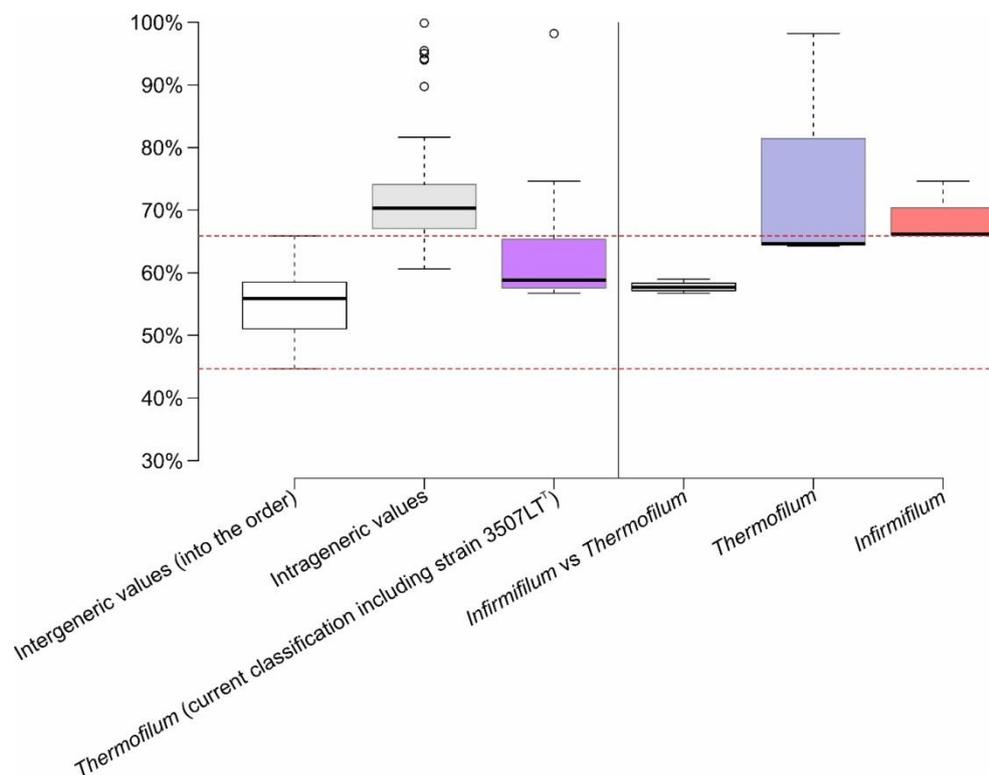


Рисунок 23. Сравнение AAI значений внутри рода и между различными родами. Между- и внутривидовые значения были вычислены среди представителей *Sulfolobales*, *Thermoproteales* и *Thermofilales*. Порядки *Desulfurococcales*, *Acidilobales* и *Fervidicoccales* были исключены из анализа из-за их полифилетичности (первый) и небольшого количества видов (последние два).

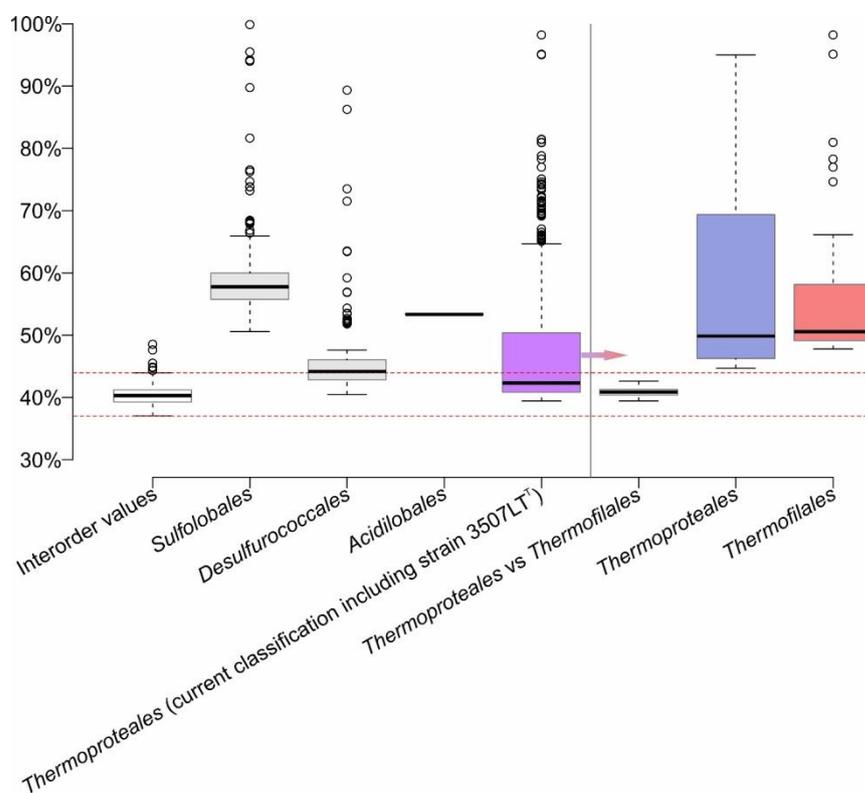


Рисунок 24. Сравнение значений AAI представителей различных порядков класса *Thermoprotei*. Значения внутри порядков показаны над названиями соответствующих порядков. Межпорядковые значения были вычислены для всех представителей порядков из класса *Thermoprotei*.

Центральный метаболизм углеводов штамма 3507LT сходен со всеми известными представителями *Thermofilaceae* и типичен для других сахаролитических гипертермофильных архей (Bräsen et al., 2014). Окисление глюкозы происходит через гликолиз архейного типа. Манноза, транспортируемая в клетки через фосфотрансферазную систему, превращается в глюкозо-6-фосфат при помощи маннозо-6-фосфат-изомеразы, ген которой обнаружен во всех геномах представителей *Thermofilaceae*, включая штамм 3507LT. Конверсия лактозы и галактозы происходит по пути Лелуара (Frey, 1996), гены ключевых ферментов которого были обнаружены во всех геномах *Thermofilaceae*: это гены галактокиназы, UDP-глюкозо-гексозо-1-фосфатуридилтрансферазы и двух фосфоманномутаз / фосфоглюкомутаз.

Чтобы проанализировать функциональное разнообразие семейства *Thermofilaceae* и сравнить его с другими членами класса *Thermoprotei*, было выполнено неметрическое многомерное шкалирование (NMDS) с использованием данных о распределении групп COG (clusters of ortologous group) во всех доступных в настоящее время геномах, отнесённых к классу *Thermoprotei*. Анализ показал, что члены *Thermofilaceae* обладают функциональным профилем, четко отличающимся от членов других порядков класса, включая порядок *Thermoproteales*, к которому принадлежит это семейство (Рис. 25).

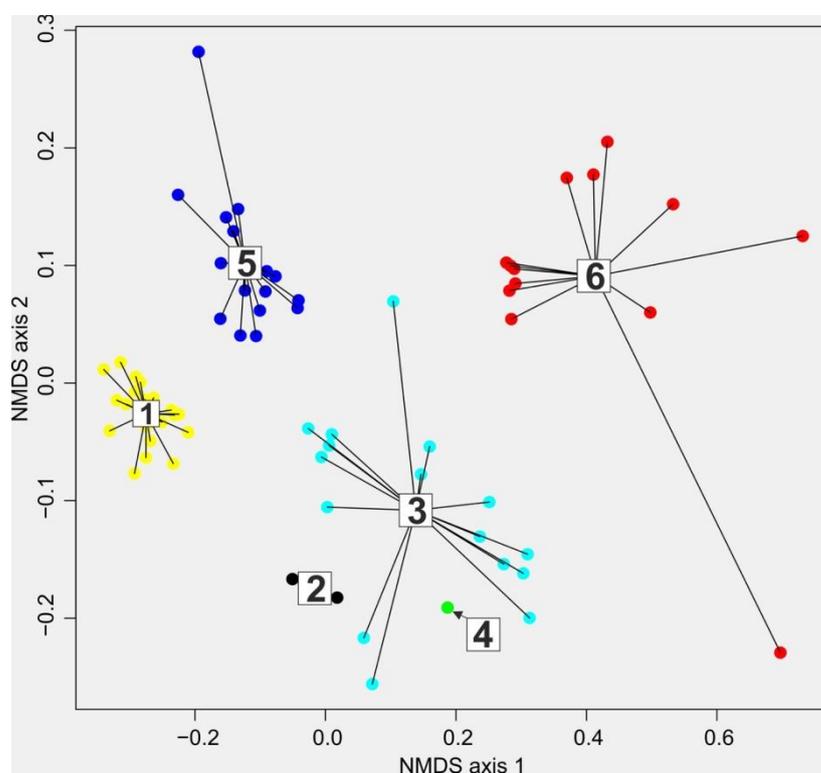


Рисунок 25. NMDS график, демонстрирующий распределение COG среди представителей класса *Thermoprotei*: 1 – *Sulfolobales*, 2 – *Thermoproteales* (за исключением *Thermofilaceae*), 3 – *Acidilobales*, 4 – *Desulfurococcales*, 5 – *Fervidicoccales*, 6 – *Thermofilaceae*.

Поскольку представители *Thermofilales* фенотипически значительно отличаются от *Thermoproteales*, то возникает вопрос: как представители *Thermofilales* эволюционировали от *Thermoproteales*? Наличие геномов культивируемых представителей *Thermofilaceae*, а также собранных из метагеномных данных геномов (MAG), отнесенных к семейству *Thermofilaceae*, позволили выполнить расчет потерь и приобретения генов в ходе эволюции группы и предсказать появление и исчезновение путей и их особенностей (Рис. 26). Прежде всего, для группы *Thermofilales* показано значительная потеря генов ферментов биосинтеза L-аминокислот, таких как аргинин, ароматические аминокислоты (триптофан, фенилаланин и тирозин), ВСАА (лейцин, изолейцин и валин), треонин, глицин, гистидин и глутамат. Играющий решающую роль во многих катаболических и анаболических процессах цикл Кребса оказался неполным. Некоторые гены биосинтеза липидов отсутствовали. Наблюдалось значительное снижение количества генов биосинтеза пиримидинов, которые участвуют в важнейших путях биосинтеза нуклеотидов, пиридоксаля (витамин В1) и тиамина (витамин В6), потеря детерминант биосинтеза пуринов *de novo*, а также кофакторов, таких как кобаламин, рибофлавин, пантотенат, кофермент А и фолиевая кислота. С другой стороны, *Thermofilales* сохранили некоторые гены, утраченные порядком *Thermoproteales*. Это гены, кодирующие белки, которые участвуют в импорте и утилизации соединений, которые не могут быть синтезированы ими (транспортеры аминокислот, витаминов, нуклеотидов). Примечательно, что группа культивируемых *Thermofilales* приобрела гены, кодирующие фосфотрансферазную систему (ФТС), которая отсутствует среди всего филума *Crenarchaeota*. По-видимому, ФТС, наряду с гликозидазами и ферментами центрального метаболизма углеводов является одной из основных причин способности всех известных представителей *Thermofilales* расти на углеводах. Потери путей биосинтеза многих соединений, необходимых для жизнедеятельности клетки и, наоборот, приобретение генов транспортеров этих соединений, указывает на то, что члены *Thermofilales* используют стратегию «мусорщиков», использующих внеклеточные соединения и метаболиты из мертвых клеток других микро- и макроорганизмов, населяющих их экологическую нишу и окружающую среду.

По полученным данным была опубликована статья Zayulina K.S. et al., 2021. 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. and Appl. Microbiol. – 2021 – 44 – 1126230.

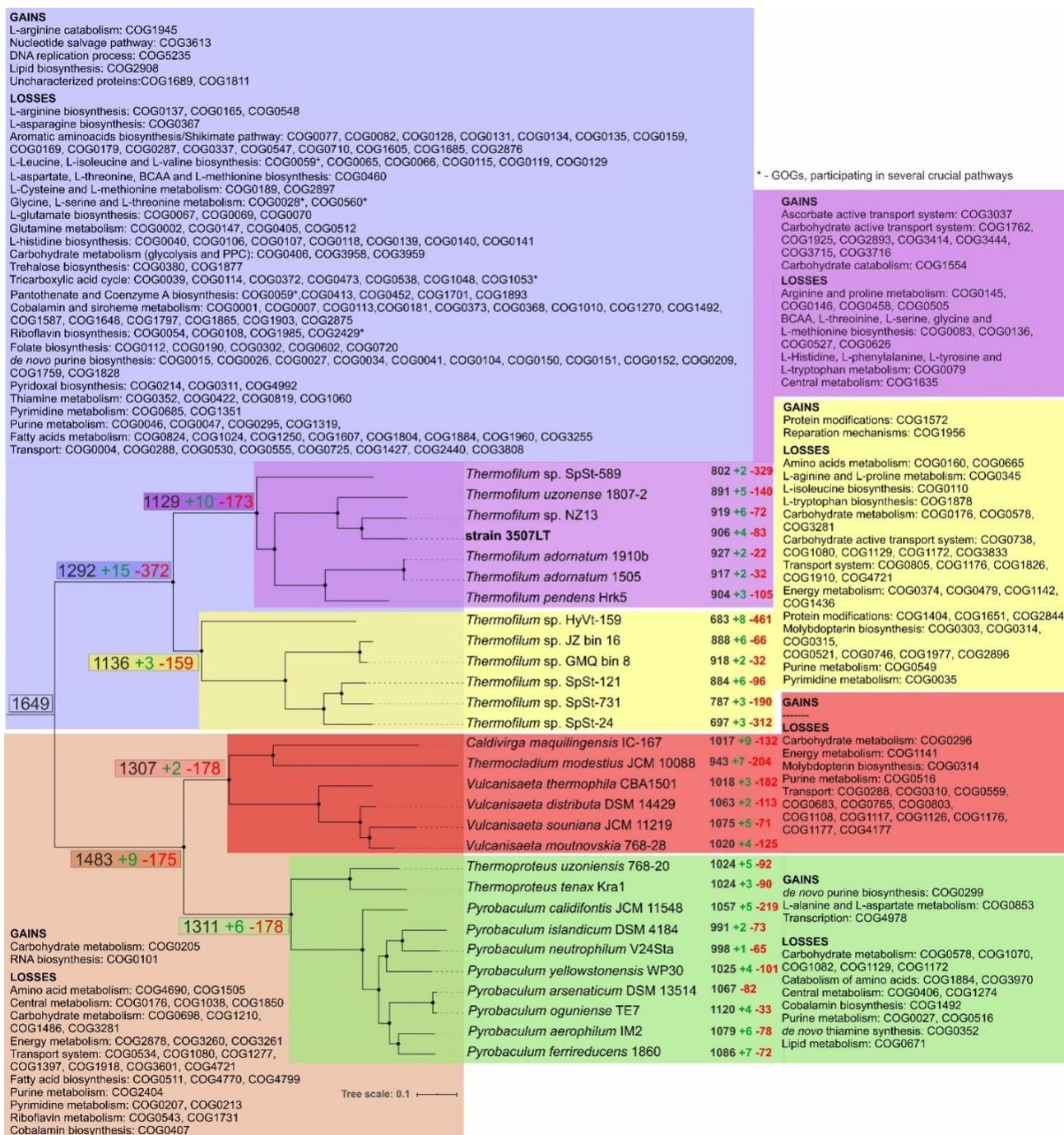


Рисунок 26. Приобретения (Gains) и потери (Losses) генов у штамма 3507LT и его ближайших родственников.

6.3. Характеристика *Pyrobaculum arsenaticum* штамм 2319x2

Штамм *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 способен расти только на трех полисахаридах: на ксилане, пуллулане и крахмале, и на многих моносахаридах. Как и ближайшие родственники, данный микроорганизм получает энергию в процессе анаэробного дыхания (Huber et al., 2000; Jorgensen and Bak, 1991). Рост штамма 2319x2 на углеводах наблюдался только при наличии акцепторов электронов, данное свойство является уникальным для представителей рода *Pyrobaculum*, показано впервые и требует подробного изучения.

В ходе экспериментов было обнаружено, что гипертермофильный штамм *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 способен расти на ксилане исключительно в присутствии акцепторов электронов, таких как: ферригидрит (FeOOH), селенат (SeO_4^{2-}) и тиосульфат ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), которые восстанавливаются до магнетита (Fe_3O_4), селена (Se^0) и сульфида (S^{2-}) соответственно. Примечательным моментом, оказалось то, что при росте культуры на ферригидрите, ксилан, присутствующий в избытке в среде, избирательно связывает восстановленные продукты (Fe^{2+} и его оксиды), что облегчает процесс дыхания, убирая их из реакции (Рис. 27). Таким образом, ксилан выступает не только как субстрат, но и как хелатирующий агент (Melo-Silveria et al., 2012). Представители рода *Pyrobaculum* обладают характерной чертой – они способны использовать различные акцепторы в процессе дыхания (Huber et al., 2000; Jay et al., 2015), то для штамма 2319x2 были проверены следующие акцепторы: элементная сера, кислород (до 5% в газовой фазе), магнетит (Fe_3O_4), арсенат (AsO_4^{2-}), переменновалентный оксид сурьмы Sb(III/V) , фумарат, сульфит, сульфат, нитрат, нитрит, селенит, пирофосфат железа, цитрат железа. Рост штамма 2319x2 наблюдали при наличии таких акцепторов электронов как элементная сера, кислород (до 5% в газовой фазе), магнетит (Fe_3O_4), арсенат (AsO_4^{2-}), переменновалентный оксид сурьмы Sb(III/V) и фумарат.

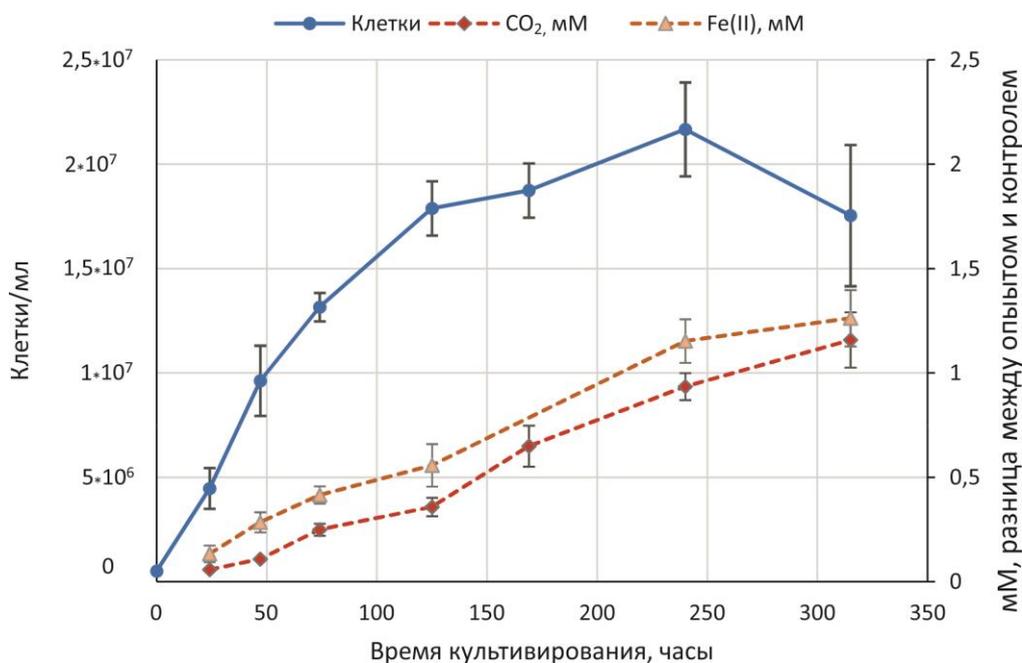


Рисунок 27. Кривая роста штамма 2319x2 с ксиланом и ферригидритом в качестве акцептора электронов при оптимальных условиях ($T=92^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5.6$). Также отображены кривые образования CO_2 как главного метаболита при дыхании и образование двухвалентного железа (Fe(II)).

Поскольку штамм 2319x2 не мог расти на углеводах без присутствия внешнего акцептора электронов, важно было понять, полностью ли данный процесс является дыханием или все же присутствует частичное брожение. В ходе роста на ксилозе в присутствии акцептора, происходило потребление последней и образование углекислоты, что подтверждает анаэробное дыхание этой археи на ксилозе (Рис. 28 А, Б). Продуктами при росте в присутствии 10 мМ тиосульфата натрия были сероводород и CO₂. Образование летучих жирных кислот в процессе роста не было выявлено.

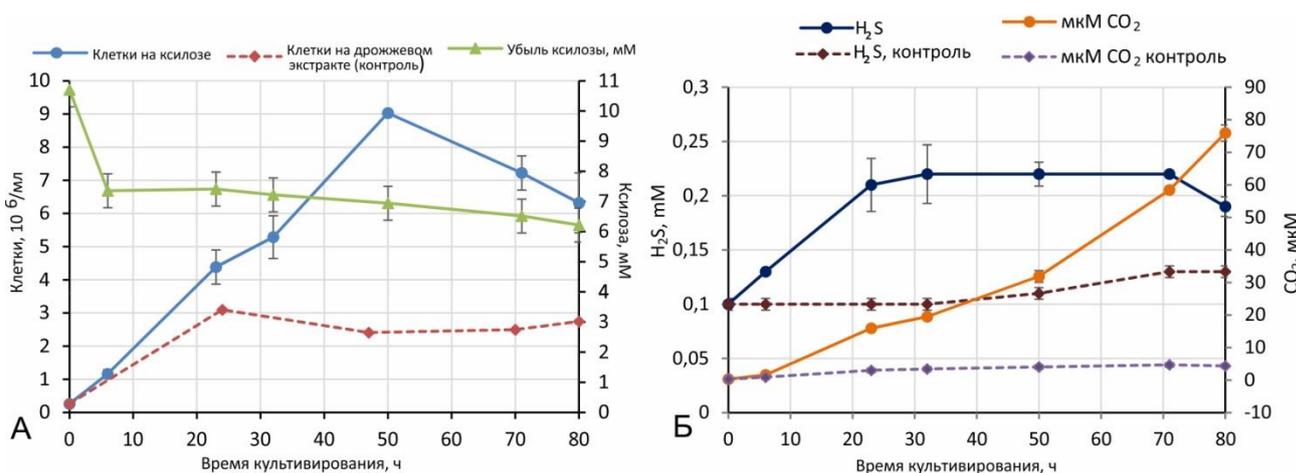


Рисунок 28. А – рост, потребление ксилозы и образование продуктов метаболизма штаммом 2319x2. Б – образование сероводорода (H₂S) и CO₂.

Как видно из Рис. 28 разница между количеством клеток на ксилозе и только на дрожжевом экстракте (контроль) в конце стационарной фазы различается примерно в 3 раза, а снижение концентрации ксилозы в ходе эксперимента говорит о потреблении ксилозы клетками 2319x2. Также в ходе культивирования образуются значительные количества CO₂. Продукты брожения (ЛЖК) не были обнаружены в процессе роста, что означает, что клетки *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 осуществляют процесс анаэробного дыхания. За 80 часов культивирования клетки успели утилизировать более чем 1.33 мМ ксилозы и образовать 70 мкмоль углекислого газа, что подразумевает энергетически выгодный процесс.

6.3.1. Анализ генома *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2

Способность к росту на ксилане, крахмале и пуллулане не характерна для представителей рода *Pyrobaculum*, поэтому нами был проанализирован геном штамма 2319x2 с целью поиска генов гликозидаз и других CAZymes, вовлеченных в деградацию олиго- и полисахаридов. В процессе аннотирования генома, мы обнаружили 8 генов гликозилгидролаз, отнесенных к 6 семействам, участвующих в метаболизме крахмала, пуллулана и дисахаридов: GH1, GH 13, GH 31, GH 57, GH 77, GH 99. Генов, кодирующих известные семейства ксиланаз в геноме данного штамма обнаружить не удалось (Табл. 14).

Таблица 14. Список гликозидаз, обнаруженных у штамма 2319x2

Семейство GH	Номер гена	Предсказанная активность
GH31	fig 2276.17.peg 2141	α -глюкозидаза(К.Ф. 3.2.1.20)
GH13	fig 2276.17.peg 548	α -амилаза (К.Ф. 3.2.1.1)
GH1	fig 2276.17.peg 892	предполагаемая β -глюкозидаза
GH57	fig 2276.17.peg 72	предполагаемая α -амилаза
	fig 2276.17.peg 706	
	fig 2276.17.peg 899	
	fig 2276.17.peg 1928	
HO	fig 2276.17.peg 50	предполагаемая пуллуланаза (К.Ф. 3.2.1.41)
GH 77	fig 2276.17.peg 824	предполагаемая 4- α –глюкан-трансфераза (К.Ф. 2.4.1.25)
GH99	fig 2276.20.peg.758	предполагаемая эндо-1,2 α –манназа

Примечательно, что у остальных представителей рода *Pyrobaculum* также обнаружены в геномах гомологичные гены гликозидаз, однако, ни у кого из ранее описанных видов не был показан рост на сахарах или полисахаридах. На Рис. 29 представлено сравнение семейств гликозилгидролаз, встречающихся у представителей рода *Pyrobaculum*.

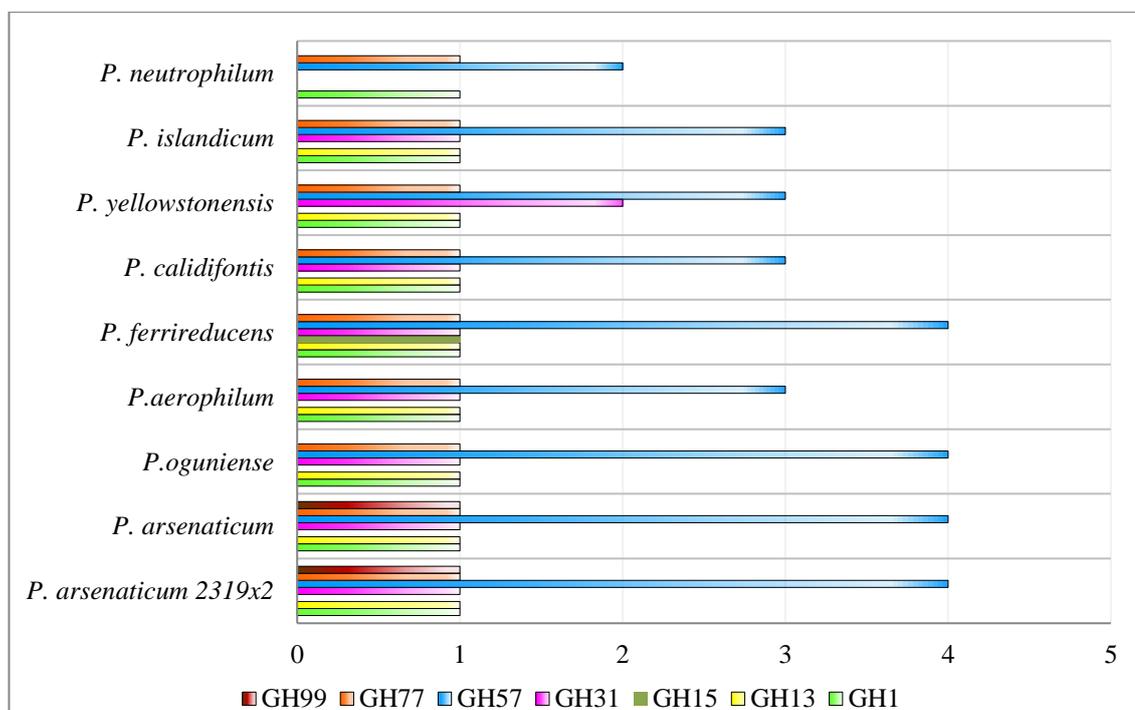


Рисунок 29. Количество семейств гликозидаз, характерных для представителей рода *Pyrobaculum*.

Как видно из Рис. 29, большинство представителей рода *Pyrobaculum* имеют похожий набор ферментов, относящихся к семействам GH, вовлеченных в разложение крахмала и его производных.

Поскольку штамм *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 способен расти на моносахаридах, далее был проведён анализ его генома с целью выявить ферменты, принимающие участие в катаболизме D-глюкозы, D-маннозы и D-ксилозы – моносахаридов, являющихся субстратами для роста данного микроорганизма, а также компонентами ди-, олиго- и полисахаридов, потребляемых *P. arsenaticum* 2319x2. Были обнаружены все гены, кодирующие ферменты модифицированного пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, используемого для метаболизма D-глюкозы и D-маннозы (Рис. 30). На первом этапе гликолиза у штамма 2319x2 гексокиназа из семейства ROK (fig|2276.20.peg513) катализирует фосфорилирование как D-глюкозы, так и D-маннозы, после чего образовавшиеся глюкоза-6-фосфат и манноза-6-фосфат изомеризуются во фруктозу-6-фосфат за счет фосфоглюкоза/фосфоманноза изомеразы (fig|2276.20.peg.224). Важно отметить, что основным претендентом на осуществление фосфофруктокиназной реакции гликолиза является киназа (fig|2276.20.peg653), относящаяся к суперсемейству (pfam00294, COG1105, TIGR03168, cd01937, PRK09434), которое включает в себя ферменты, катализирующие фосфорилирование широкого спектра сахаров и фосфосахаров. Кроме того, в геноме штамма 2319x2 не было обнаружено генов классических альдозаз I или II классов, но был найден ген бифункциональной фруктоза-1,6-бисфосфатальдозазы/бисфосфатазы (fig|2276.20.peg2390), которая, как правило, принимает участие в глюконеогенезе, а не в гликолизе. Однако данный фермент при осуществлении фруктоза-1,6-бисфосфатальдозазной реакции способен работать как в катаболическом, так и в анаболическом направлении, поэтому его участие возможно и в пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Также были выявлены архейные глицеральдегид-3-фосфат: ферредоксин оксидоредуктаза (fig|2276.20.peg62, fig|2276.20.peg277, fig|2276.20.peg1228, fig|2276.20.peg2342) и нефосфорилирующая НАД(Ф)⁺-зависимая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (fig|2276.20.peg1964), которые осуществляют превращение глицеральдегида-3-фосфата в 3-фосфоглицерат в один этап. Кроме того, были обнаружены фосфорилирующая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (fig|2276.20.peg1732) и фосфоглицераткиназа (fig|2276.20.peg1731), которые способны осуществлять данную реакцию в два этапа. Хотя путь метаболизма D-ксилозы остаётся неясным, однако, геном *P. arsenaticum* 2319x2 содержит большое количество генов НАД(Ф)⁺-зависимых оксидоредуктаз, сахаракиназ и изомераз, которые могут быть вовлечены в данный процесс. Скорее всего, в метаболизме D-ксилозы могут участвовать некоторые ферменты неокислительной ветви пентозофосфатного пути – транскетолаза (fig|2276.20.peg245 и fig|2276.20.peg246) и рибоза-5-фосфат изомеразы (fig|2276.20.peg2344). Кроме того, важную

роль в метаболизме D-ксилозы могут играть фосфогексулоизомераза (fig|2276.20.peg1889) и D-арабино-3-гексулоза-6-фосфат формальдегид-лиаза (fig|2276.20.peg556). Анализ генома показал, что, предположительно, у штамма 2319x2 работает цикл Кребса, так как были выявлены все гены, кодирующие ферменты участвующие в нем, что подтверждает способность штамма к полному окислению сахаров до CO₂ (Рис. 29).

6.3.2. Анализ протеомов *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2

Для выявления белков, участвующих в разложении ксилана и дальнейшем метаболизме ксилозы, был проведен сравнительный анализ протеомов штамма 2319x2, выращенного на ксилане и желатине. Только 40% белков всего протеома штамма 2319x2 было выявлено при хромато-масс-спектрометрии. Это могло быть связано как с трудностью культивирования данной археи на ксилане и, как следствие, малого количества биомассы и недостаточного количества белка, а также со сложностью трипсинолиза высокостабильных белков этого гипертермофильного микроорганизма. Из-за такой неполноты протеомных данных дальнейший поиск пути окисления ксилозы стал базироваться практически только на геномных данных.

Было показано значительное увеличение количества транскетолазы (fig|2276.20.peg.245 и fig|2276.20.peg.246) при росте на ксилане, что соотносится с геномным анализом, который предполагал важную роль данного фермента в катаболизме ксилозы (Рис. 30). Тем не менее, гены других ферментов пентозофосфатного пути не экспрессировались лучше на ксилане, и, кроме того, остаётся до конца невыясненной последовательность биохимических реакций на этапе превращения ксилозы в рибулозо-5-фосфат, что является сильным аргументом в пользу нового пути окисления ксилозы штаммом 2319x2. Увеличение экспрессии бифункциональной фруктозо-1,6-бисфосфата альдозазы/фосфатазы (fig|2276.20.peg.2390) и фосфоглюкозо/фосфоманнозо изомеразы (и fig|2276.20.peg.224) при росте на ксилане, по-видимому, связано с активацией глюконеогенеза, необходимого для образования глюкозо-6-фосфата, являющегося важным соединением для дальнейших биосинтетических процессов. Протеомный анализ позволил также выявить, что при росте на ксилане превращение глицеральдегида-3-фосфата в глицерат-3-фосфат происходит в одну стадию за счёт работы глицеральдегид-3-фосфат:ферредоксиноксидоредуктазы, что характерно для пути ЭМП, показанного для архей (Bräsen et al., 2014).

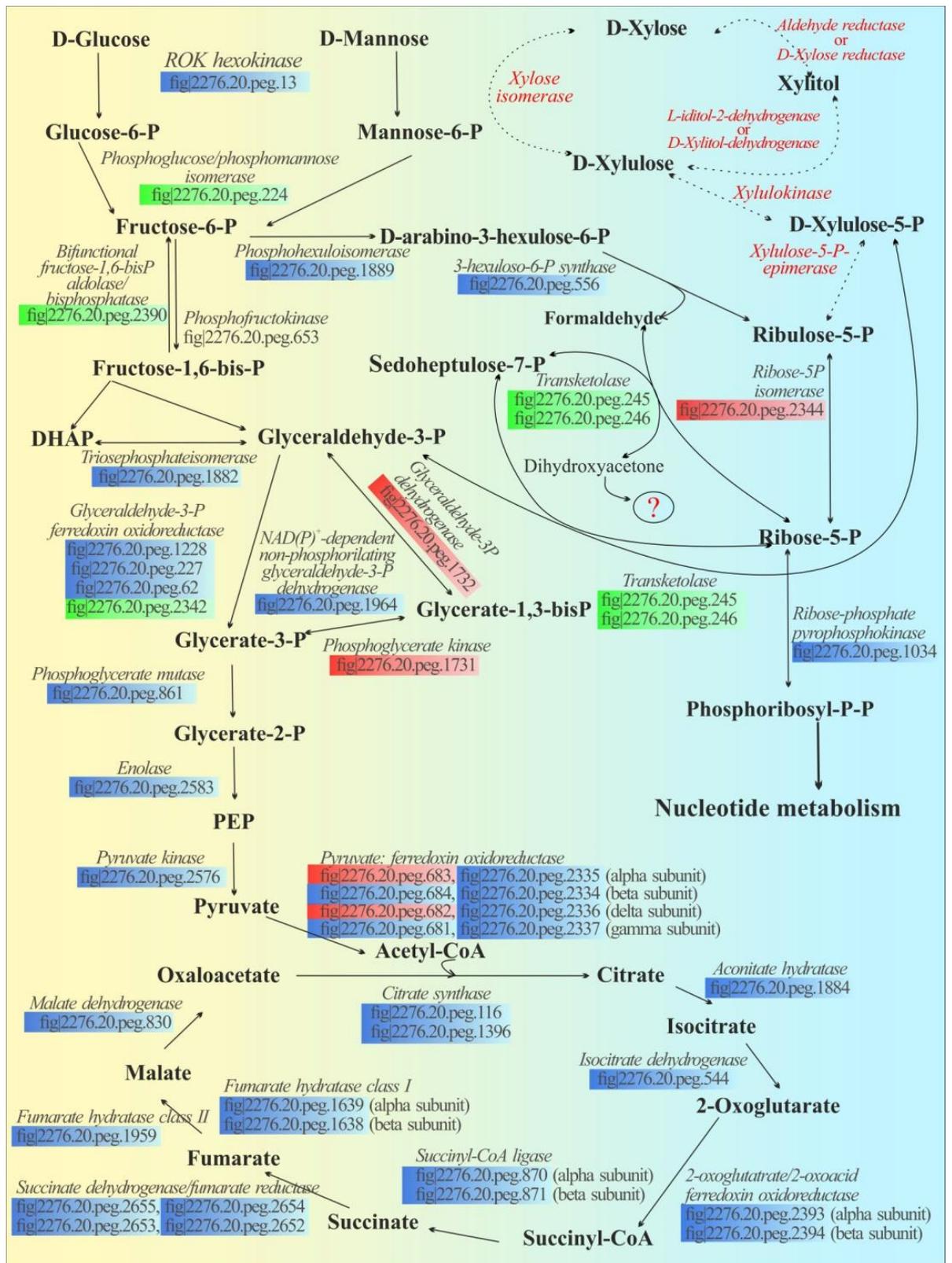


Рисунок 30. Ферменты, вовлечённые в метаболизм углеводов у *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2. Цветами показаны различия в экспрессии генов, выявленных при протеомном анализе. Зелёный – увеличение экспрессии (увеличение количества белка) при росте на ксилане, красный – снижение экспрессии, синий – нет влияния. Отсутствие цветовой раскраски говорит об отсутствии белка в протеоме. Красным шрифтом – предполагаемые ферменты, для которых не было достоверно обнаружено соответствующих генов.

Как было указано выше, помимо высокоэкспрессирующихся генов транскетолаз (компонентов пентозофосфатного пути, который может быть использован в одном из вариантов разложения ксилозы) генов других ферментов этого пути, также как и генов ферментов, катализирующих превращение ксилозы в рибулозо-фосфат, обнаружено не было. Возможно, что альтернативным путем является путь превращения ксилозы в: 2-кето-3-деоксиксилонат с последующим окислением до 2-кетоглутарата, как это происходит у галофильной эвриархеоты *Haloferax volcanii* и термофильной кренархеоты *Sulfolobus solfataricus* (Johnsen et al., 2009, Nunn et al., 2010); или пирувата и гликолата (Рис. 8, Глава 2, стр. 35), как это было описано для того же *S. solfataricus* (предполагается, что у этого микроорганизма работают оба пути, Nunn et al., 2010).

6.3.3. Выявление активностей внеклеточных гликозидаз у штамма *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2

Поскольку подробный анализ геномов и протеомов показал наличие потенциальных гликозидаз у штамма *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2, то следующим этапом работы для доказательства наличия данных ферментов было измерение гидролитической активности нативных клеток по отношению к различным полисахаридам.

Для идентификации гликозидаз данный штамм был выращен на ксилане с различными вариантами акцепторов – ферригидрит (FeOOH), тиосульфат ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), селенат (Na_2SeO_4) при 92°C . Сконцентрированные клетки и супернатант были проинкубированы с 0.2% ксиланом в течение 23 часов при $T=92^\circ\text{C}$, $\text{pH}=6.5$. Активность гликозидаз была измерена с помощью ДНСК метода (Miller, 1959), о наличии активности судили по образованию редуцирующих остатков сахаров и олигосахаридов, образующихся при расщеплении ксилана (Табл. 15).

Таблица 15. Активности гликозидаз *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2

Фракция	Скорость образования редуцирующих сахаров, мкг/мл*ч
	Ксилан
Клетки + FeOOH	3.03±0.15
Супернатант FeOOH	0
Клетки + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	4.19±0.17
Супернатант $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0
Клетки + Na_2SeO_4	2.87±0.09
Супернатант Na_2SeO_4	0

Наибольшая скорость образования редуцирующих остатков сахаров наблюдалась при инкубировании ксилана с клетками, выращенными на тиосульфате в качестве акцептора электронов. В случае с клетками, выращенными на ферригидрите и селенате – были получены сходные данные. Исходя из полученных данных, можно точно утверждать, что ксиланазы у *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 связаны с мембраной и не секретируются во внешнюю среду. Следующим этапом данной работы стало получение фракции белков, связанных с мембраной, и проверка их ксиланазной активности. Были получены фракции мембрансвязанных белков (ФМБ) после обработки клеток растворами 1 М NaCl, 3 М мочевины, 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100 и 0.5% Tween-80. Первичная проверка активностей с помощью ДНС-метода показала, что во ФМБ, полученных с помощью Tween-80 наблюдалась ксиланолитическая активность, в отличие от фракций, полученных при обработке остальными детергентами. На Рис. 31 показана динамика образования редуцирующих сахаров, образующихся при инкубировании ФМБ с 0.2% ксиланом.

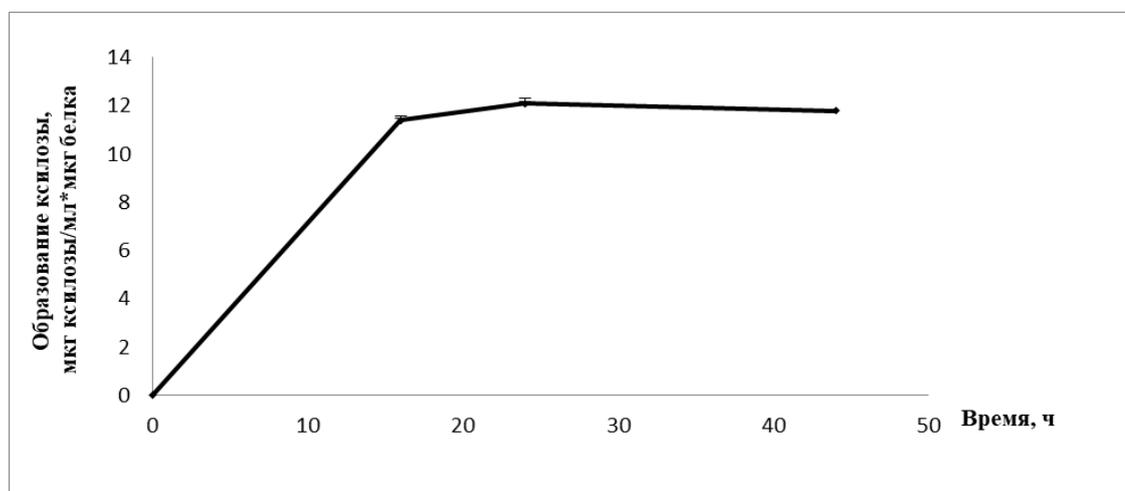


Рисунок 31. Ферментативная активность ФМБ штамма 2319x2 по отношению к ксилану, условия протекания реакции 92°C, pH=6.5.

Как видно из графика на Рис. 31, наибольшая активность наблюдается при 20 часах инкубирования и далее выходит на плато, что скорее всего связано с ингибированием белков продуктами, либо с непродолжительным времени жизни белков. Поскольку после 24 ч не происходит накопления редуцирующих остатков ксилозы, то можно сделать вывод, что фермент активен именно в период до 30 часов. Скорость образования редуцирующих остатков сахаров составила 0.48 мкг ксилозы/мл*мкг белка*час.

6.4. Характеристика *Thermofilum adornatum* 1910b

Для гипертермофильной кренархеи *Thermofilum adornatum* 1910b, выделенной из горячего источника Паужетки, Камчатка, был показан рост на таких полисахаридах как аморфная целлюлоза, микрокристаллическая целлюлоза (avicel), β-глюкан и крахмал. Штамм

не рос на карбоксиметилцеллюлозе, α -целлюлозе, бумаге, лихенане, ксилане. Рост штамма 1910b на аморфной целлюлозе показан на Рис. 32.

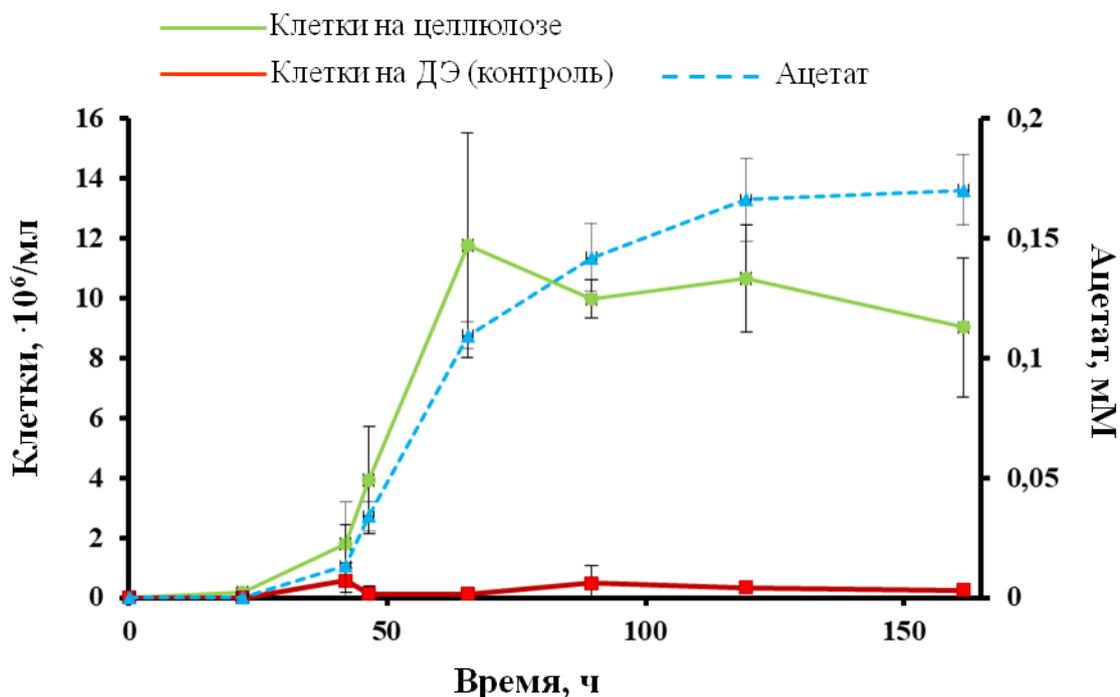


Рисунок 32. Рост *T. adornatum* и образование ацетата штаммом 1910b на среде с целлюлозой. Количество клеток 1910b, выращенных на фоновой среде, содержащей 0.05 г/л дрожжевого экстракта (ДЭ) было принято в качестве контроля. Условия культивирования: 80°C, pH 5.6.

Способность роста на целлюлозе ранее не была показана для представителей рода *Thermofilum*, однако были опубликованы сведения о наличии в геноме *T. pendens* гена гликозидазы семейства GH5, представители которого способны разлагать аморфные участки в целлюлозе (Anderson et al., 2008). Сравнительная характеристика представителей родов *Thermofilum* и *Infirmifilum* дана в Таблице 16. Все представители семейства *Thermofilaceae* являются строгими анаэробами, способными к сбраживанию углеводов, глюкозы, в частности, и пептидов.

Таблица 16. Фенотипическая характеристика представителей семейства *Thermofilaceae*.

	<i>Infirmifilum lucidum</i> 3507LT	<i>Infirmifilum uzonense</i> 1807-2	<i>Thermofilum adornatum</i> 1910b	<i>Thermofilum adornatum</i> 1505	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk5
Откуда выделен	Чили	Камчатка, РФ	Камчатка, РФ	Камчатка, РФ	Исландия
Min./opt./max. температура роста (°C)	73/85/93	70/85/90	50/80/95	85	85-90
Min./opt./max. значение pH	5/6-6.7/7.5	5.5/6.0-6.5/7.0	5.3/5.5-6.0/8.5	6.8	4.0/5.0-6.0/6.5
Источники кофакторов для роста	клеточные экстракты архей из родов <i>Thermosphaera</i> , <i>Thermococcus</i> и дрожжевой экстракт	клеточные экстракты архей <i>Desulfurococcus</i> и дрожжевой экстракт	клеточные экстракты архей <i>Desulfurococcus</i> , <i>Pyrobaculum</i> или <i>Fervidococcus</i> и дрожжевой экстракт	клеточный экстракт <i>Desulfurococcus</i> , дрожжевой экстракт и цистеин	фракция полярных липидов архей <i>Thermoproteus tenax</i> и дрожжевой экстракт
Наличие S ⁰	-	-	-	-	+
Время удвоения (ч)	14.2	нд	5	нд	10
Рост на субстратах					
Дрожжевой экстракт	-	+	+	+	+
Пептон	-	+	+	+	+
Триптон	-	нд	-	-	+
-Аморфная целлюлоза	+	-	+	-	+(g)
-альфа-целлюлоза	+	нд	-	-	
-Avicell	-	-	+	+	
Ксантановая камедь	+	нд	нд	нд	нд
Лихенан	+	нд	нд		нд
Гуаровая камедь	+	нд	нд		нд
Глюкоманнан	-	+	-	-	нд
Крахмал	+	+	+		(+g)
Целлобиоза	+	-	+		нд
Глюкоза	+	+	+		(+g)
Сахароза	+	нд	-		+
Мальтоза	+	-	-		нд
Лактоза	+	нд	+		нд
Манноза	+	-	+		нд
G+C mol%	53.86	47.9	46.5		57.6
Размер генома (Mb)	1.62	1.61	1.75	1.75	1.78
Ссылка	Zayulina et al., 2021	Toshchakov et al., 2015	Zayulina et al., 2020	Kochetkova et al., 2020	Zillig et al., 1983; Anderson et al., 2008

Обозначения: НД – нет данных, + - положительный рост, - нет роста (по сравнению с контролем), (+g) – в геноме были обнаружены гены, кодирующие ферменты, ответственные за разложение данного субстрата, однако рост не был подтвержден экспериментально.

6.4.1. Характеристика генома *Thermofilum adornatum* 1910b

Геном *Thermofilum adornatum* 1910b был секвенирован и собран в кольцевую хромосому. Для выявления генов гликозидаз, был проведен анализ *in silico* транслированного генома.

В соответствии со способностью штамма 1910b к росту на крахмале, в его *in silico* транслированном геноме были найдены белки, содержащие домены GH13 и GH57. Белок N186_RS08045 содержит α -амилазный каталитический домен (GH13), и, скорее всего, является циклодекстрин глюканотрансферазой или цикломальтодекстриназой. Домены GH57 содержатся в белках N186_RS08040, N186_RS01850, N186_RS01555 и N186_RS05435 штамма 1910b. Вероятно, большинство вышеперечисленных ферментов имеют α -амилазную активность, в то время как белок N186_RS08040, является предполагаемой амилопуллулазой.

Согласно экспериментам, маннан не является подходящим субстратом для штамма 1910b, тем не менее, в геноме 1910b был найден фермент, предположительно участвующий в его гидролизе - N186_RS07230. Этот белок содержит домен GH130 и может катализировать обратимую реакцию фосфоролиза β -1,4-манноолигосахарида с образованием α -маннозо-1-фосфата. Возможно также, что белок N186_RS00270 принимает участие в деградации маннанов, поскольку он принадлежит к семейству GH113 и является эндо-1,4- β -маннозидазой, гидролизующей β -1,4-D-маннозидные связи в различных маннанах, а также содержит GTA TIM-barrel-like домен, присутствующий у представителей семейства GH113. Кроме того, ферменты семейства GH3 могут быть также вовлечены в разложение глюкоманнана за счет β -глюкозидазной активности. В геноме штамма 1910b был обнаружен белок, содержащий 2 домена GH3 (N186_RS00225), являющийся β -глюкозидазой – ферментом, катализирующим гидролиз терминального невосстанавливающего остатка глюкозы и участвующим в гидролизе остатков β -глюкозы при деградации глюкоманнана или целлюлозы. Таким образом, остается непонятным причина отсутствия роста на глюкоманнанах и маннанах у штамма 1910b. Можно предположить, что β -1,4-манноолигосахаридфосфорилазы специфически узнают полисахариды, содержащие, наряду с маннозидными, глюкозидные связи, но это не объясняет неспособность штамма 1910b утилизировать глюкоманнан. Не стоит сбрасывать со счетов и несовершенство культивационных методов. Возможно, просто не были подобраны условия, подходящие для роста на маннанах. Предполагалось, что ферменты семейства GH1 (N186_RS06555 и N186_RS00340), присутствующие в геноме данного штамма, также могут проявлять β -глюкозидазную и/или β -маннозидазную активность, но белки, содержащие этот домен, вероятнее всего являются β -галактозидазами. Это подтверждается высоким сходством вышеперечисленных ферментов и охарактеризованных белков, найденных в базе данных

UniProtKB/Swiss-Prot. Кроме того, данный штамм способен расти на лактозе, за разложение которой, скорее всего, и ответственны данные ферменты.

Интересен тот факт, что данный штамм может усваивать D-маннозу. Для представителей филума *Crenarchaeota* характерны бифункциональные изомеразы, преобразующие маннозо-6-фосфат наряду с глюкозо-6-фосфатом во фруктозо-6-фосфат для вовлечения этих сахаров в гликолиз. Данную реакцию катализирует фосфоглюкозо-изомераза, ключевой фермент метаболизма сахаров во всех трех доменах жизни, так как он принимает участие как в классическом гликолизе, так и в его модифицированном варианте, характерном для архей. Он был обнаружен у штамма 1910b - N186_RS04475. Фосфорилирование маннозы, вероятно, происходит при участии ROK гексокиназ, вовлеченных в гликолиз.

Таким образом, пути использования маннозы как самостоятельного субстрата и как метаболита маннана теоретически способны осуществляться через одни и те же реакции, с участием одних и тех же ферментов. Разница в росте на этих субстратах, остается неясной.

В соответствии с тем, что субстраты, поддерживающие рост *Thermofilum adornatum* 1910b, состоят или из D-глюкозы, или из D-маннозы (штамм растет на маннозе), были обнаружены все ферменты модифицированного пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, используемого для метаболизма D-гексоз (Рис. 35.). Все этапы данного пути согласуются с известными представлениями о процессе метаболизма гексоз у архей. В то же время стоит отметить ряд особенностей, которые характерны для представителей рода *Thermofilum*, но не встречаются у архей филума *Euryarchaeota*. Первая особенность связана с участием гексокиназы из семейства ROK (N186_06060) в процессе фосфорилирования как глюкозы, так и маннозы. Вторая особенность связана с тем, что окисление глицеральдегид-3-фосфата, скорее всего, происходит в одну необратимую стадию при помощи ферментов - глицеральдегид-3-фосфат: ферредоксин оксидоредуктаз (N186_01805, N186_08490, N186_01390, N186_00660). Однако обнаружить нефосфорилирующую НАД(Ф)⁺-зависимую глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу, которая также принимает участие в данном этапе гликолиза, не удалось. Тем не менее, два фермента (фосфорилирующая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (N186_05295) и фосфоглицераткиназа (N186_05285) также присутствуют у штамма 1910b и, вероятно, также могут принимать участие в гликолизе.

6.4.2. Определение белков, участвующих в деградации полисахаридов и утилизации продуктов гидролиза *Thermophilum adornatum* 1910b с применением протеомики

Как было обнаружено, *Thermophilum adornatum* штамм 1910b способен разлагать целлюлозу, что было доказано ростовыми экспериментами, но в его *in silico* транслированном геноме не было обнаружено гомологов ранее охарактеризованных архейных или бактериальных целлюлаз. Тем не менее, были найдены ферменты, имеющие β -глюкозидазную активность, и относящиеся к семейству GH1 и GH3, для которых целлюлазной функции (К.Ф. 3.2.1.4) ранее показано не было. Среди них с определенной долей вероятности могут присутствовать белки, вовлеченные в разложение целлюлозы.

Для идентификации гомологов известных целлюлаз, а также для выявления всех белков, участвующих в разложении целлюлозы, был проведен протеомный анализ. Этот анализ позволяет отобрать белки, наиболее вероятно принимающие участие в деградации целлюлозы, транспорте и окислении олигомеров и мономера (глюкозы), исходя из относительного содержания этих белков в протеоме штамма 1910b, выращенного на среде с целлюлозой относительно контроля (выращенного на пирувате). При этом анализировались тотально все цитоплазматические, мембранные и заякоренные на мембране внеклеточные белки. Важно отметить, что внеклеточные белки, секретируемые во внешнюю среду в свободном виде (не заякоренные за клеточные оболочки) нехарактерны для архей, что в случае штамма 1910b подтвердилось отсутствием результата измерения концентрации белка в культуральной жидкости.

После масс-спектрометрического (МС) анализа протеомов штамма 1910b, выращенного на целлюлозе (опыт) и пирувате (контроль) и обработки первичных данных МС-анализа были получены значения интенсивности и iBAQ (интенсивность, пропорциональная количеству моль данного пептида) для каждого детектированного белка. Далее были вычислены нормированные значения riBAQ, как отношение iBAQ к сумме iBAQ по всем белкам.

Разница количества белка между опытом и контролем является биологически значимой, когда отношение содержания белка в опыте к содержанию белка в контроле превышает 2. Такое пороговое значение было выбрано исходя из того, что в норме, в одних и тех же условиях, содержания белка в клетке может изменяться почти в 2 раза.

Учитывая результаты статистического анализа, были отобраны белки, содержание которых в опыте значимо ($\alpha=0.05$) превышает содержание в контроле. Были обнаружены потенциальные целлюлазы среди отобранных по результатам статистического анализа белков (Рис. 33). Принимались во внимание гомология белка с известными биохимически

охарактеризованными белками других организмов, их филогенетические отношения, наличие каталитических доменов, локализация белка в клетке, а также геномное окружение.

Таким образом, был получен список белков, удовлетворяющих следующим требованиям (Табл. 17): предположение о наличии у белка целлюлозолитической активности делалось на основании сочетания следующих факторов: высокого значения отношения riBAQ в опыте к riBAQ в контроле, наличия каталитических гидролазных доменов, расщепляющих β -связи в сахарах, наличия сигнала внеклеточной локализации, присутствия в геномном окружении ферментов, участвующих в метаболизме углеводов. Стоит заметить, что найденные в геноме гликозидазы, которые могут участвовать в разложении целлюлозы, при анализе протеома не являлись преобладающими (Табл. 17).

Таблица 17. Гликозидазы, предсказанные в ходе геномного анализа штамма 1910b и их представленность в протеоме.

Ген	riBAQ_cel/ riBAQ_contr	Функция	Наличие каталитического домена
N186_RS07750	250.9	гликозилтрансфераза	GT2
N186_RS00340	61.7	предполагаемая β -гликозидаза	GH1
N186_RS08540	6.2	α -гликозидаза	GH4-GH4C
N186_RS08045	4.0	α -амилаза	GH13
N186_RS01850	3.2	α -амилаза	GH57
N186_RS04390	3.0	гликозилтрансфераза 66 семейства	STT3
N186_RS05435	1.9	α -амилаза	GH57-DUF1925-DUF1926
N186_RS00420	1.2	гликозилтрансфераза	GT1
N186_RS08795	1.2	ацетилксилан эстераза	AXE1
N186_RS00225	1.0	β -гликозидаза	GH3-GH3-X
N186_RS08040	1.0	α -амилаза	GH57-GlucodextranC
N186_RS01555	0.8	α -амилаза	GH57
N186_RS07400	0.8	α -маннозидаза	GH38-Middledomain-GH38C
N186_RS07230	0.8	β -1,4-маннозилглюкозизомераза	GH130
N186_RS05430	0.7	гликозилтрансфераза	GT5
N186_RS06555	0.1	β -галактозидаза	GH1
N186_RS06465	0.1	N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза	Amidohydro_1
N186_RS00270	0	β -маннаназа	нд

Сравнительный анализ протеомов *Thermofilum adornatum* 1910b, выращенного на целлюлозе (опыт) и пирувате (контроль) показал значительное увеличение экспрессии генов N186_RS00340, N186_RS00345 и N186_RS00230, кодирующих целлюлазы под названиями Cel40, Cel45 и Cel30, в то время как представленность гена N186_RS00225, кодирующего целлюлазу Cel25 в исследуемом протеоме осталась неизменной, что говорит о конститутивном характере ее экспрессии (Табл. 18).

Таблица 18. Наиболее вероятные белки-кандидаты, участвующие в гидролизе целлюлозы.

Ген	Белок	riBAQ_cel/ riBAQ_contr	Предполагаемая активность	Pfam	Локализация	Длина гена, п.о.
N186_RS00340	Cel40	61.7	β -гликозидаза	GH1	внутри клетки	1557
N186_RS00345	Cel45	11.3	?	-	внутри клетки	243
N186_RS00230	Cel30	3.0	?	-	вне клетки	1119
N186_RS00225	Cel25	1.0	β -гликозидаза	GH3	внутри клетки	2100

Гены N186_RS00340 и N186_RS00345, кодирующие белки Cel40 и Cel45, располагаются последовательно и на одной цепи (Рис. 34), что может говорить о функциональной связи этих ферментов. Несмотря на то, что значение отношений riBAQ для белка Cel25 ниже порогового, его стоит рассматривать, как потенциальную гликозидазу вовлеченную в гидролиз терминальных остатков глюкозы от основной цепи целлюлозы и ее олигомеров, поскольку данный белок содержит 2 гликозидазных домена из GH3 семейства, для представителей которого показана бета-гликозидазная активность (К.Ф. 3.2.1.21). Также ген этого белка находится рядом с геном белка Cel30, чей продукт значимо активнее синтезируется штаммом 1910b при росте на целлюлозе. Согласно серверам, предсказывающим локализацию белка, только Cel30 имеет сигнальный пептид, что указывает на его внеклеточное расположение.

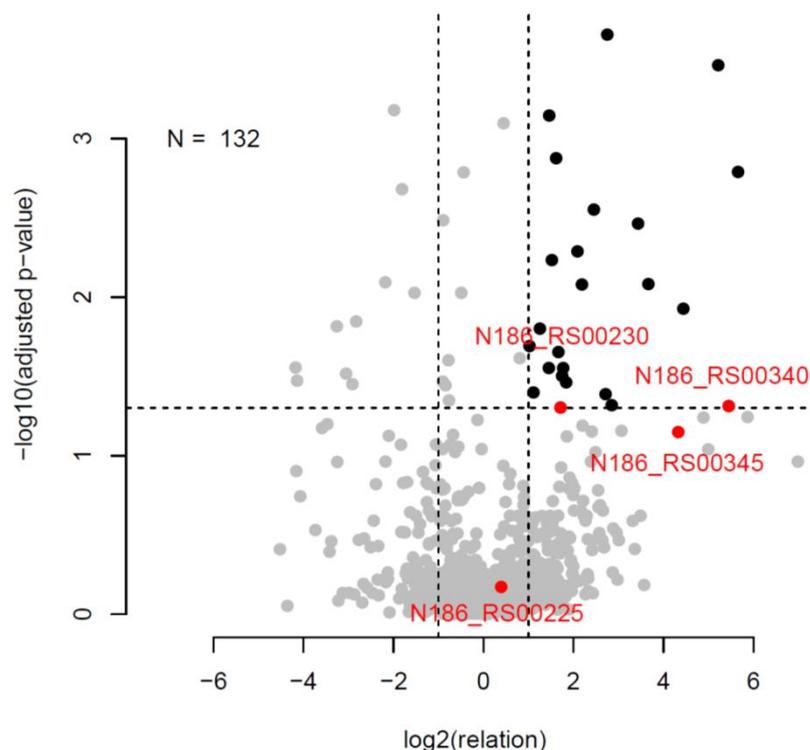


Рисунок 33. График распределения статистической и биологической значимостей разниц экспрессии между опытом и контролем для всех детектированных белков. Белки, чья разница в экспрессии между опытом и контролем удовлетворяем как биологическим, так и статистическим требованиям находятся в правом верхнем углу графика и выделены черным.

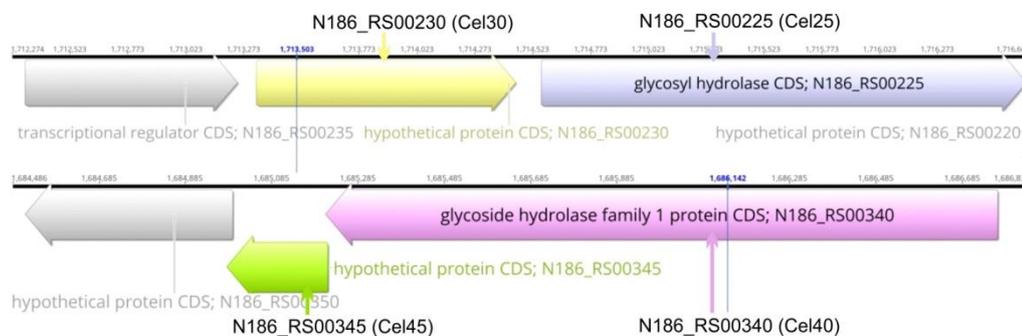


Рисунок 34. Расположение генов предполагаемых целлюлаз в *in silico* транскрированном геноме.

В геноме штамма 1910b было обнаружено большое количество генов, которые кодируют белки, относящиеся к суперсемейству транспортных белков ABC. ABC-транспортеры осуществляют АТФ-зависимый транспорт как органических, так и неорганических соединений, так, удалось выявить те гены, которые с наибольшей вероятностью кодируют ABC-транспортеры непосредственно принимающие участие в импорте сахаров в клетку (Рис. 35). Протеомный анализ подтвердил наши предположения и показал, что при росте штамма 1910b на целлюлозе увеличивается экспрессия генов, которые

кодируют транспортные белки N186_RS06740-N186_RS06750 и N186_RS08050-N186_RS08060. Таким образом было показано, что ABC-транспортеры участвуют в транспорте моно- и олигосахаров, образующихся при гидролизе целлюлозы. Протеомный анализ также позволил выявить изменения в экспрессии ферментов центрального метаболизма углеводов (Рис. 35). Было показано, что при росте на целлюлозе значительно возрастает экспрессия ряда генов ответственных за ферменты модифицированного пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (гликолиза): фосфофруктокиназы (N186_RS07290), фруктоза-1,6-бисфосфатаальдозы (N186_RS05135), триозофосфатизомеразы (N186_RS05665), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (N186_RS05135) и фосфоглицераткиназы (N186_RS05220). Также из 4 генов, кодирующих глицеральдегид-3-фосфатоксидоредуктазу только один (Рис. 35) лучше экспрессировался на целлюлозе (N186_RS00640). Экспрессия остальных генов центрального метаболизма гексоз сравнима в опыте и эксперименте, что говорит о конститутивном характере их работы.

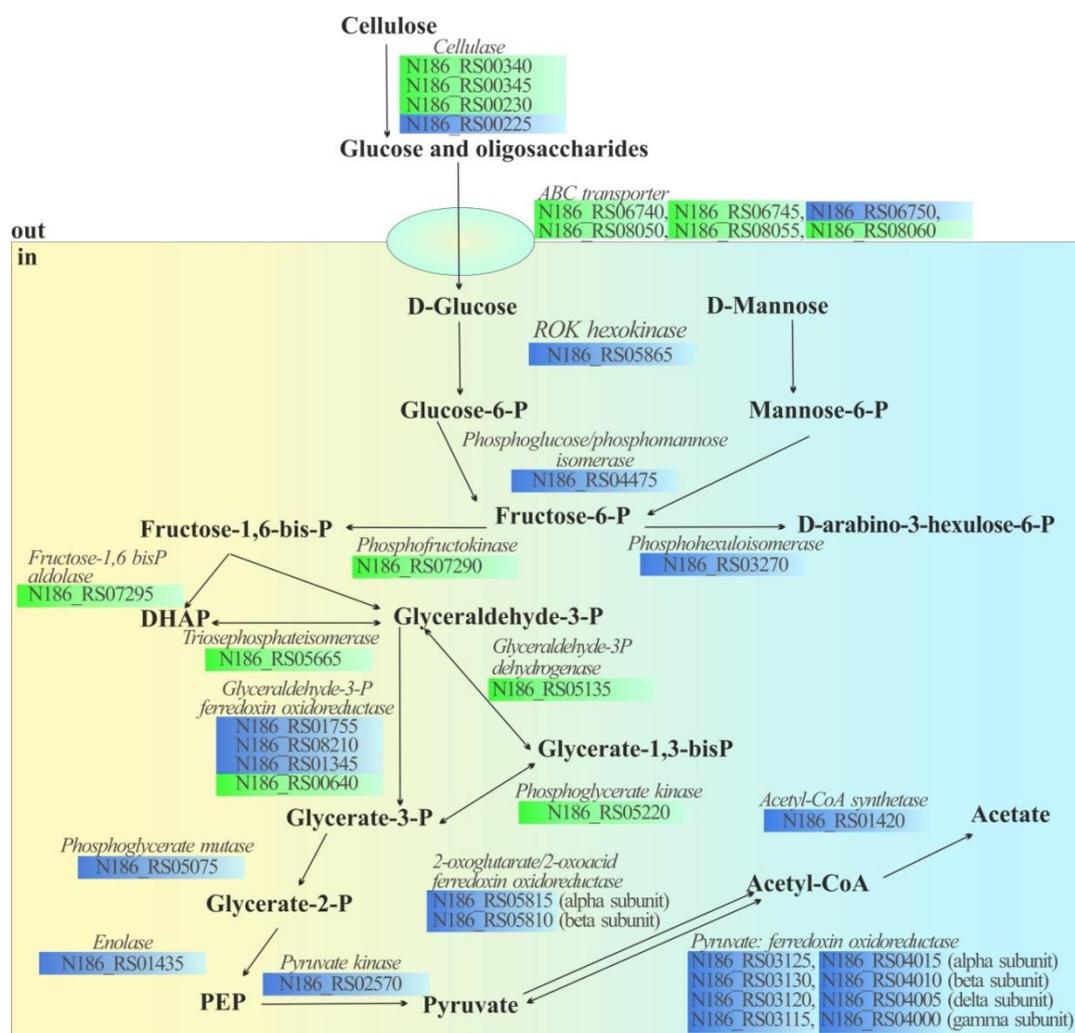


Рисунок 35. Ферменты, вовлечённые в метаболизм углеводов у *Thermofilum adornatum* штамма 1910b. Цветами показаны различия в экспрессии генов, выявленных при протеомном анализе. Зелёный – увеличение экспрессии при росте на целлюлозе, красный – снижение экспрессии (нет в данной части метаболической карты), синий – нет влияния.

6.4.3. Определение активности гликозидаз *Thermofilum adornatum* 1910b

Идентификация целлюлазной активности нативных гликозидаз *Thermofilum adornatum* штамма 1910b, выращенного на МКЦ (условия культивирования T=80°C, pH=5.5) была проведена как для неразрушенных, нативных, клеток, так и для супернатанта, а также для фракций мембран-связанных белков (Табл. 19) в следующих условиях: T=80°C, pH=5.6, время инкубирования 18 ч, на двух субстратах 0.2% АМЦ и 0.2% КМЦ. Данные фракции были получены с использованием таких детергентов как Triton-X100 (0.5% w/w), мочевины (1M) и SDS (0.5% w/w).

Таблица 19. Активности гликозидаз *Thermofilum adornatum* 1910b

Фракция	Скорость образования редуцирующих сахаров, мкг/мл*ч	
	АМЦ	КМЦ
Клетки	3.48±0.174	0
Супернатант	0	0
ФМБ (SDS)	0	0
ФМБ (Triton-X100)	3.38±0.016	3.68±0.09
ФМБ (Мочевина)	3.85±0.19	6.67±0.2

Как видно из представленных данных, наибольшее количество редуцирующих сахаров образуется при инкубации фракции белков, полученной с помощью мочевины, с двумя субстратами (АМЦ и КМЦ). Кроме того, у фракции, полученной с помощью Triton-X100, также наблюдается активность против двух субстратов, в то время как на клетках, активность проявилась только в случае с АМЦ. Это может быть связано с тем, что для фермента, закрепленного на мембране клеток, более доступными являются короткие свободные участки цепей глюкозы в аморфной целлюлозе, в то время как для растворенного фермента, находящегося в растворе, такой проблемы нет, и он активен по отношению к любой полисахаридной цепи. Стоит заметить, что КМЦ представляет собой линейный полисахарид с карбоксиметил-группами, которые обуславливают ее растворимость в воде и доступность (Lopez et al., 2015); аморфная целлюлоза частично растворима в воде, однако большая ее часть находится в кристаллическом состоянии. В супернатанте и фракции белков, полученной с помощью ДСН, целлюлазной активности не наблюдалось.

Для подтверждения индуцибельного характера экспрессии системы гидролитических ферментов была проведена характеристика эндоглюканазной активности по отношению к 0.2% КМЦ нативных клеток, выращенных на МКЦ и на пирувате. Эндоглюканазная

активность клеток, выращенных на пирувате была в разы ниже, чем активность клеток, выращенных на МКЦ (Рис. 36).

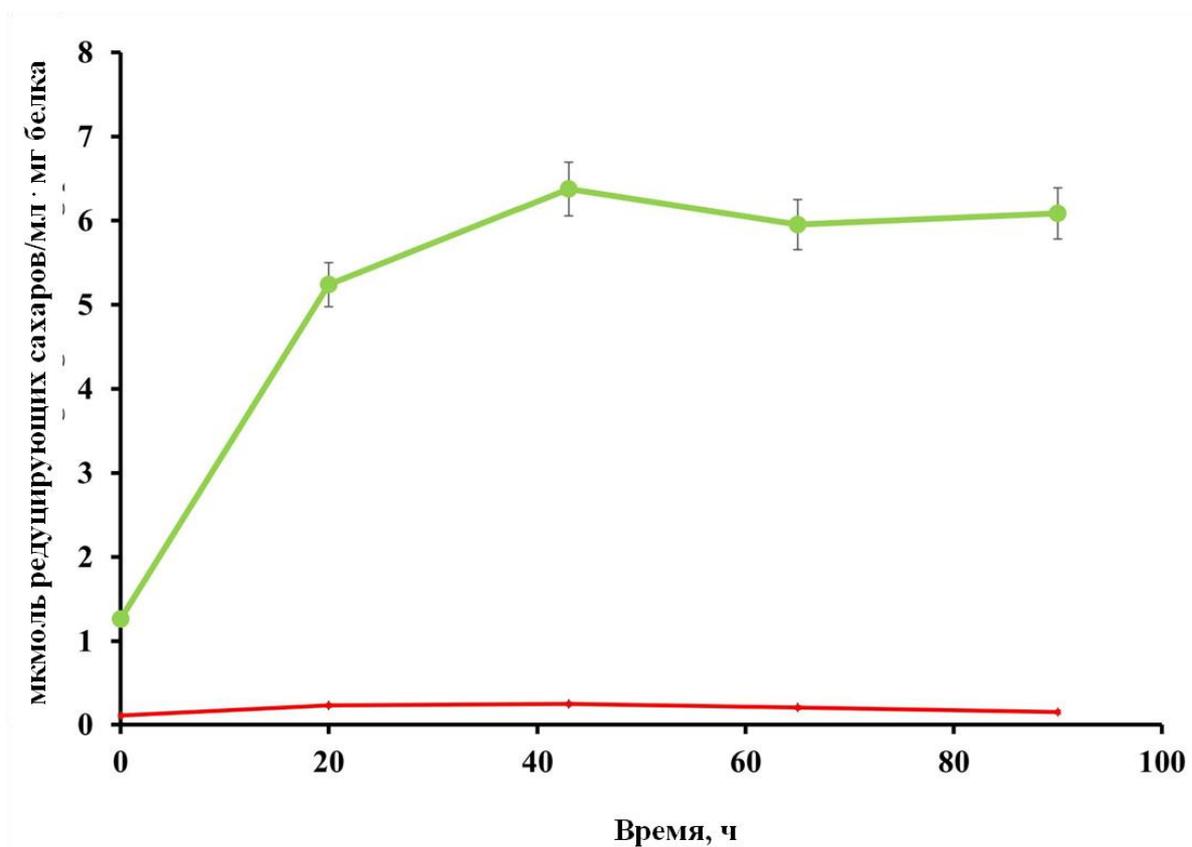


Рисунок 36. Эндоглиуказная активность по отношению к КМЦ клеток штамма 1910b выращенных на целлюлозе (отмечена зеленым) и на пирувате (отмечена красным).

Как представлено на Рис. 36 наибольшая активность прослеживается в первые 40 часов инкубации, далее количество редуцирующих сахаров остается почти на постоянном уровне. Скорость образования редуцирующих остатков сахаров (РОС) составляет 0.47 мкг РОС/мл*мкг белка*ч. Учитывая индуцибельный характер целлюлазной активности и данные протеомного анализа, дальнейшим этапом работы являлась характеристика 4 рекомбинантных белков (Cel25, Cel30, Cel40 и Cel45) и выявление их гидролитической активности (см. Главу 7).

По результатам данной работы была опубликована статья Zayulina et al., 2020. 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

6.5. Описание штамма *Thermococcus* sp. 2319x1

Штамм 2319x1 способен усваивать различные сахара (глюкозу, ксилозу, мальтозу, лактозу) и разлагать различные виды целлюлоз (АМЦ и КМЦ), хитин, альгинат, ксилан,

ксилоглюкан, лихенан, бета-глюкан и крахмал, что, возможно, связано с его местом обитания в природе, т.к. в источнике, откуда штамм был выделен, присутствовало большое количество растительных остатков. До проведения данной работы было описано только два вида архей, способных разлагать целлюлозу - *Desulfurococcus fermentans* (Perevalova et al., 2005) и *Thermococcus sibiricus* (Mardanov et al., 2009). Сравнивая рост на аморфной целлюлозе между штаммом 2319x1 и этими видами, можно сделать вывод, что штамм 2319x1 более эффективно использует целлюлозу, чем ранее описанные виды (Рис. 37).

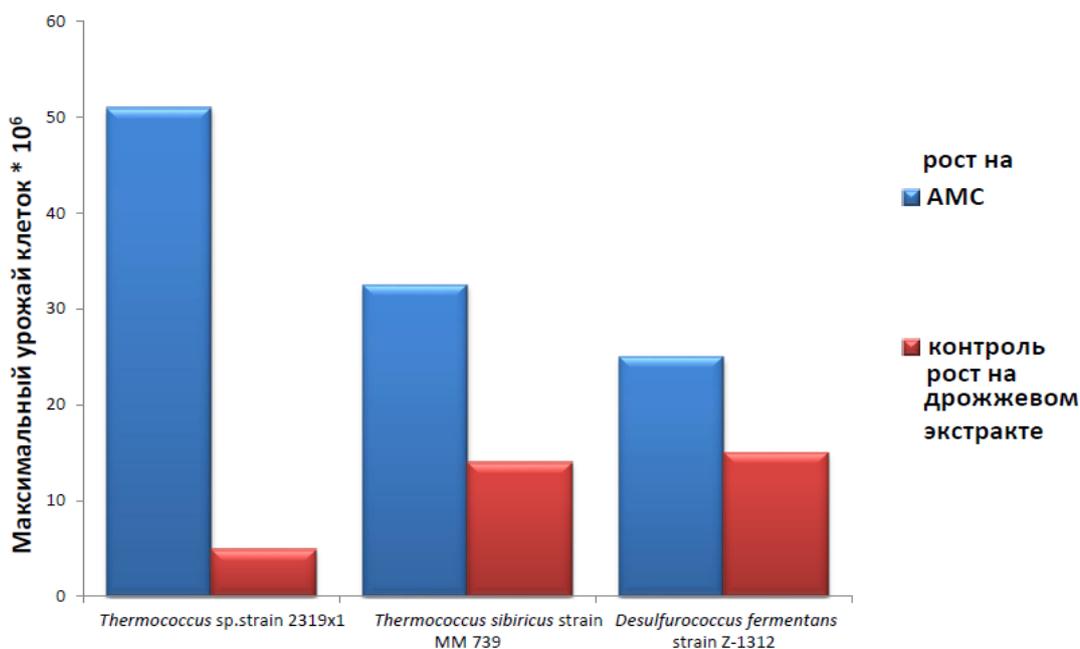


Рисунок 37. Сравнение числа клеток между чистыми культурами гипертермофильных архей, растущих на аморфной целлюлозе - *Thermococcus sibiricus* (Mardanov et al., 2009) и *Desulfurococcus fermentans* (Perevalova et al., 2005).

6.5.1. Анализ генома *Thermococcus sp.* 2319x1

В геноме данного штамма были обнаружены гены различных гликозидаз, относящихся к семействам GH1, 13, 35, 57 и тд. Большая часть из них вовлечена в разложение крахмала и хитина (Табл. 20). Однако, в транслированном геноме данного штамма был также найден белок с уникальным расположением доменов – GH5-GH12-GH12-CBM-CBM. Домены данного белка могут обладать эндоксилазной, эндоглюканазной активностями, и возможно, он является ключевым ферментом, ответственным за разложение большинства полисахаридов.

Таблица 20. Гликозидазы, обнаруженные у *Thermococcus* sp. 2319x1

Ген	Семейство GH, предполагаемая функция	PredHel	Наличие сигнального пептида
ADU37_CDS00170	GH13, α -амилаза	0	N
ADU37_CDS02890	GH 63, гликоген-расщепляющая гликозидаза	0	N
ADU37_CDS02900	GH130, β -1,4 манноолигосахарид фосфорилаза	0	N
ADU37_CDS03850	GH57, α -амилаза /4 α -глюкантрансфераза	0	N
ADU37_CDS05320	GH1, β -глюкозидаза	0	N
ADU37_CDS05340	GH57, α -амилаза	0	N
ADU37_CDS07270	GH35 <i>exo</i> - β -D-глюкозаминидаза	0	N
ADU37_CDS07340	GH1, β -галактозидаза	0	N
ADU37_CDS07440	GH1, β -галактозидаза	0	N
ADU37_CDS07750	GH122, α -глюкозидаза	0	N
ADU37_CDS12970	GH57, 1,4 α -глюкантрансфераза	0	N
ADU37_CDS13420	Углевод эстераза	0	Y
ADU37_CDS18940	GH57, амилопуллулаза	1	Y
ADU37_CDS18980	GH13, неопуллулаза	0	N
ADU37_CDS20530	GH13, α -амилаза	0	N
ADU37_CDS21030	GH13, α -амилаза	1	Y
ADU37_CDS21840	Предполагаемая оксидоредуктаза, близкая к GH109	0	N
ADU37_CDS22600	Мультидоменная гликозидаза (GH5-GH12-GH12-CBM-CBM), предположительно эндоглюканаза/эндоксилаза	1	Y

Мультидоменный белок, продукт ADU37_CDS22600, является объектом дальнейшего исследования, поскольку содержит 3 каталитических домена, предположительно обладающих эндоглюканазными/эндоксилазными активностями (см. Главу 7.). Интересен тот факт, что домены имеют разное происхождение (см. Рис. 38 А, Б) – GH5 гомологичен архейным эндоглюканазам, GH12-1 близок к гликозидазам из гипертермофильных архей, для которых на данный момент нет ни одного охарактеризованного фермента, а GH12-2 к ферментам из гипертермофильных бактерий, для которых показана эндоглюканазная активность. Стоит заметить, что наличие CBM (carbohydrate binding module) вовсе не характерно для архей, хотя в данном белке присутствуют 2 таких мотива. Их функция, скорее всего, заключается в узнавании полисахаридных цепей субстрата. Оба модуля отнесены к семейству CBM2 – наиболее распространенному и обширному семейству, включающему в себя белки, участвующие в распознавании целлюлозных цепей.

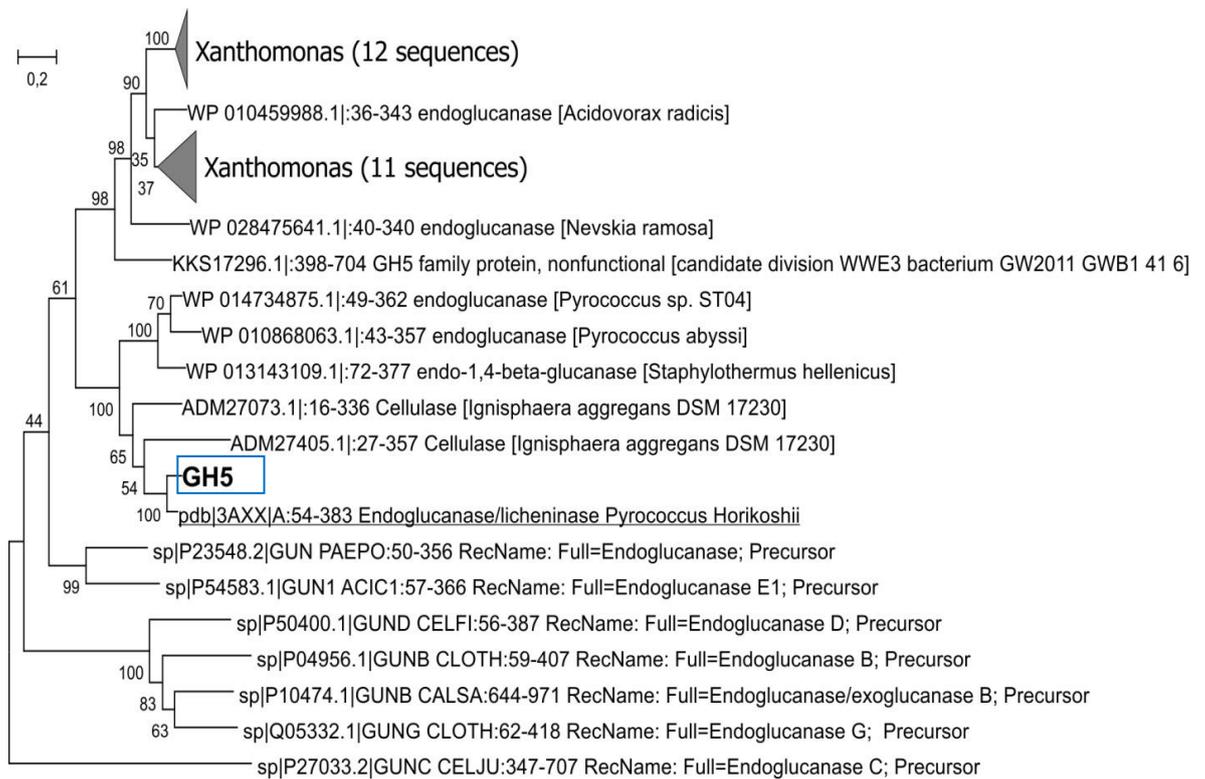


Рисунок 38А. Филогенетическое дерево, отражающее положение домена GH5. Подчеркнут наиболее ближайший гомолог – эндоглюканаза из гипертермофильной археи *P. furiousus*.

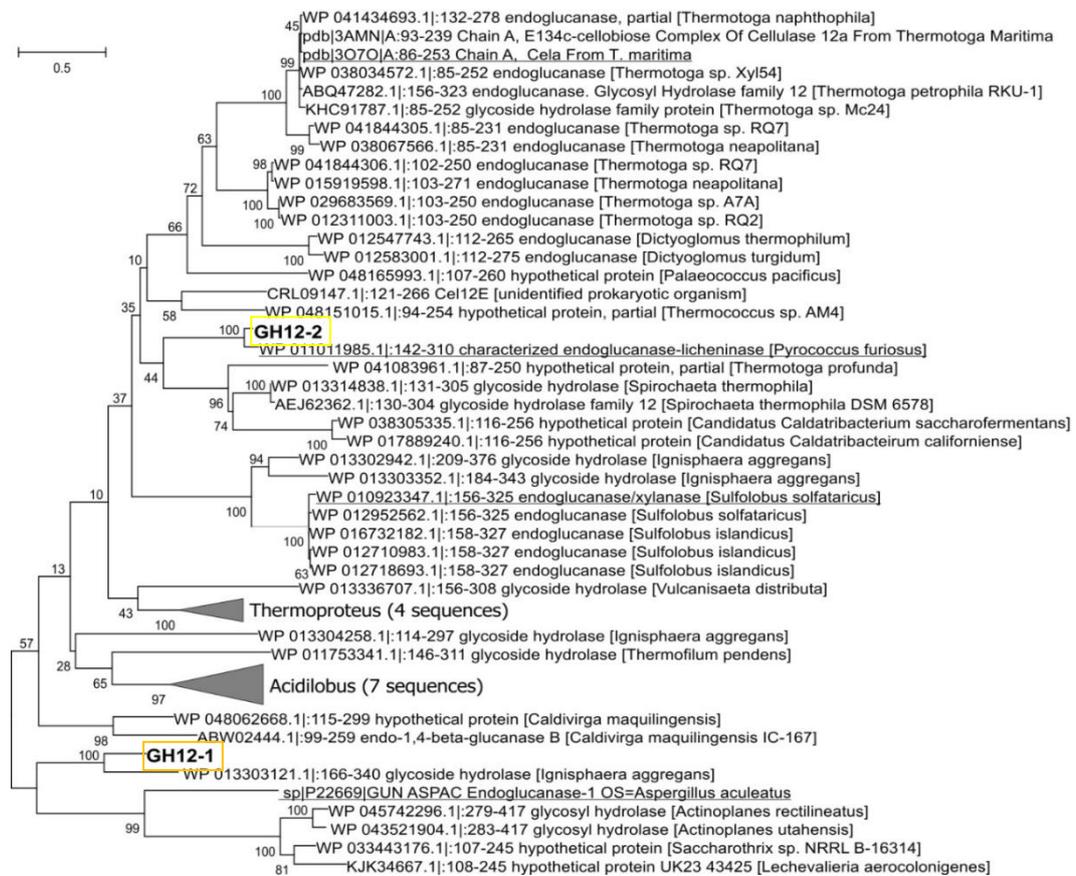


Рисунок 38Б. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей 2х доменов GH12-1 и GH12-2.

6.5.2. Характеристика центрального метаболизма *Thermococcus* sp.2319x1

Мономерами при гидролизе многочисленных полисахаридов, поддерживающих рост штамма *Thermococcus* sp. 2319x1 являются D-глюкоза или D-ксилоза.

В геноме штамма 2319x1 были обнаружены все генетические детерминанты ферментов модифицированного пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса архейного типа, используемого для метаболизма D-глюкозы и включающего в себя ферменты: АДФ-глюкокиназу (ADU37_CDS01920), АДФ-фосфофруктокиназу (ADU37_CDS09450), глицеральдегид-3-фосфат: ферредоксин оксидоредуктазу (ADU37_CDS17140), нефосфорилирующую НАД(Ф)⁺-зависимую глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (ADU37_CDS19860). В то же время путь деградации D-ксилозы остаётся до конца неясным. Катаболизм D-ксилозы у архей описан только для *Haloferax volcanii* (Johnsen et al., 2009) и *Sulfolobus solfataricus* (Nunn et al., 2010), однако гомологи ферментов, участвующих в этом процессе, не были выявлены у *Thermococcus* sp. 2319x1. Также не были выявлены и гомологи ферментов путей деградации D-ксилозы, характерные для бактерий. Тем не менее, в геноме *Thermococcus* sp. 2319x1 содержится большое количество НАД(Ф)⁺-зависимых оксидоредуктаз, сахаракиназ и изомераз, которые могут быть вовлечены в путь деградации D-ксилозы. Можно предположить, что в этом процессе могут участвовать некоторые ферменты неокислительной ветви пентозофосфатного пути, в частности транскетолаза (ADU37_CDS10120 и ADU37_CDS10130) и рибоза-5-фосфат изомеразы (ADU37_CDS07560). Кроме того, в катаболизм D-ксилозы могут быть вовлечены ферменты метаболизма нуклеотидов и нуклеозидов. Результаты поиска представлены на Рис. 39.

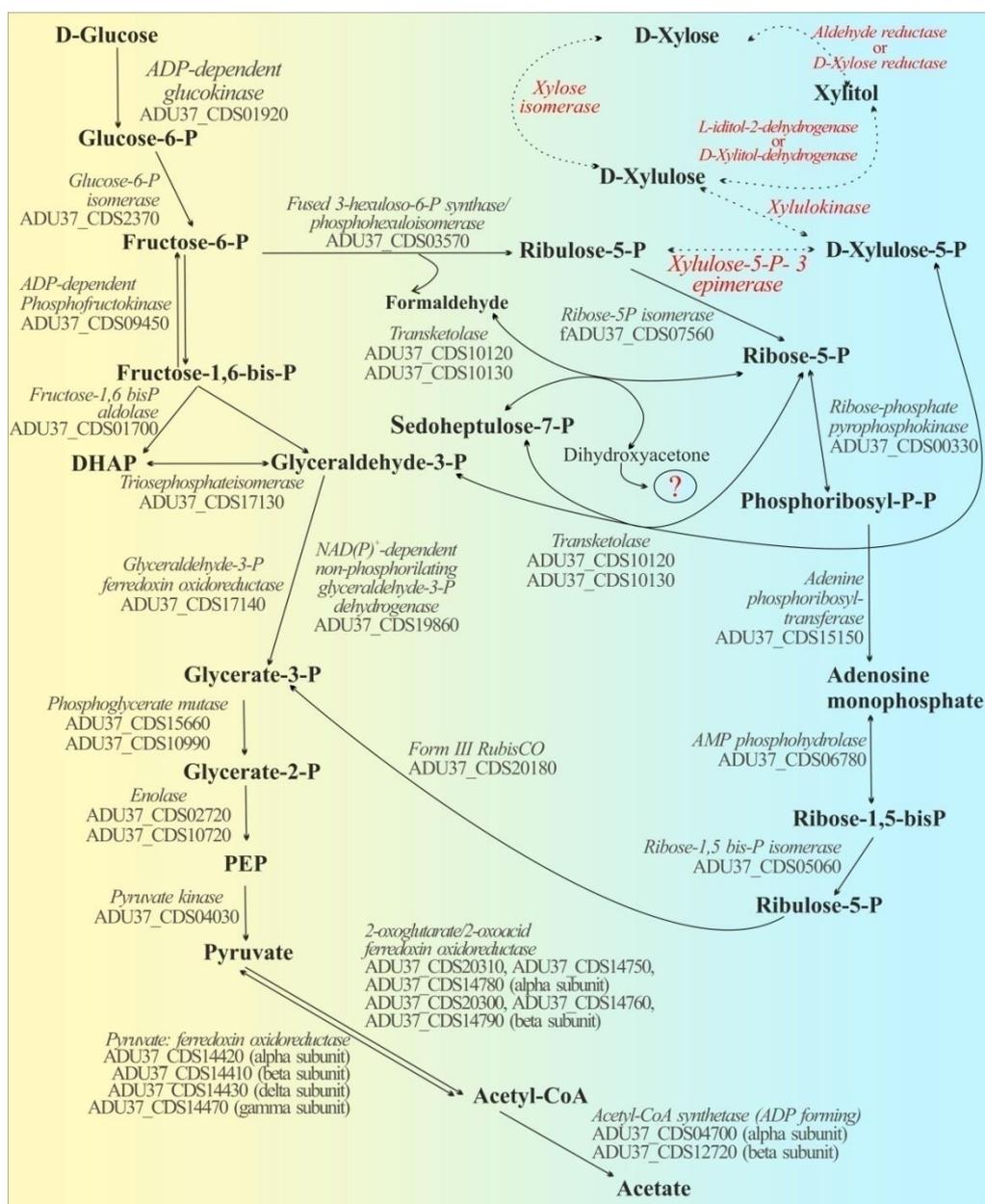


Рисунок 39. Ферменты, вовлечённые в метаболизм углеводов у *Thermococcus* sp. 2319x1. Красным цветом обозначены ферменты, которые на данный момент не выявлены.

6.5.3. Выявление активностей внеклеточных гликозидаз *Thermococcus* sp. 2319x1

Для выявления активности нативных гликозидаз, штамм был выращен на АМЦ, ксилане, ксилоглюкане и желатине (количество клеток на каждом субстрате примерно составляло $1-1.5 \times 10^8$ кл/мл), были получены фракции солюбилизованных мембран-связанных белков (концентрация белков составила 49.6, 84.6, 66.7 и 70 мкг/мл, соответственно) и измерена активность по отношению к ксилану, ксилоглюкану, АМЦ, КМЦ и бета-глюкану (Рис. 40). Эти ферменты (или фермент) являются индуцибельными поскольку гликозидазной активности при выращивании штамма 2319x1 на желатине обнаружено не было.

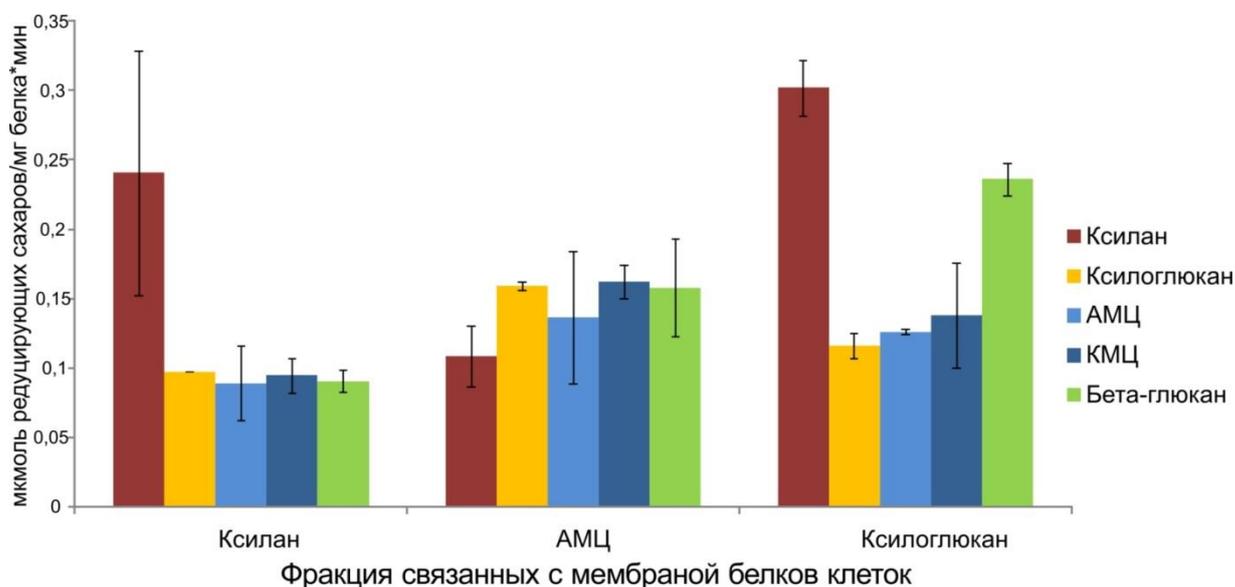


Рисунок 40. Гидролитическая активность фракций белков штамма 2319x1, связанных с мембраной, по отношению к ксилану, ксилоглюкану, АМЦ, КМЦ и бета-глюкану, соответственно.

6.6. Идентификация новых гликозидаз с применением СБА

Скрининг белков по их активности (СБА (АВРР)) применялось очень редко для представителей *Archaea* (Zweerink et al., 2017). Из той же накопительной культуры, что и *Thermococcus* sp. 2319x1 был выделен еще один штамм *Thermococcus*, обозначенный как штамм 2319x1E. Как и 2319x1, изолят способен расти с ксиланом в качестве единственного источника углерода и энергии при 85°C, pH 6-7. Однако, в геноме этого штамма, идентифицировать гены ксиланаз не удалось. С этой целью был применен сравнительный анализ протеомов штамма 2319x1E, выращенного на ксилане и на ксилозе, в сочетании с АВРР, с использованием α - или β - гликозидазных селективных зондов и последующего масс-спектрометрического (МС) анализа. Совокупность этих подходов (протеомика, рекомбинантная экспрессия белка и классическая характеристика фермента) позволила идентифицировать новую бифункциональную мальтозообразующую α -амилазу (EGDIFPOO_00674), принадлежащую к семейству GH57, и широкоспецифичную β -гликозидазу (EGIDFPOO_00532) с β -ксилозидазной активностью.

По результатам проведенной работы была опубликована статья Klaus et al., 2021. 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

ГЛАВА 7. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ГИПЕРТЕМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ.

Были исследованы рекомбинантные гликозидазы *Thermococcus* sp 2319x1 и *Thermofilum adornatum* 1910b и дана их характеристика. Для штамма 2319x1, который имеет мульцидоменную гликозидазу (МДГ), целью стало выявление гидролитических активностей каждого из каталитических доменов, а также активность целого фермента. Для штамма 1910b основной задачей стало доказательство целлюлазной или гликозидазной активности выбранных кандидатных белков (Табл. 18, раздел 11.4.2), так как гомологов охарактеризованных целлюлаз в геноме этого штамма выявлено не было.

7.1. Характеристика рекомбинантных белков штамма *Thermofilum adornatum* 1910b.

Была проведена гетерологичная экспрессия четырех белков *Thermofilum adornatum* 1910b, участвующих в разложении целлюлозы - (N186_RS00225 = Cel25, N186_RS00230 = Cel30, N186_RS00340 = Cel40 и N186_RS00345 = Cel45) и характеристика их эндоглюканазной активности.

Клеточные экстракты, в которых было подтверждено наличие с помощью ПААГ-электрофореза целевых белков Cel25, Cel30, Cel40 и Cel45, были проверены на способность к гидролизу КМЦ (1%) и целлобиозы (1%) (Рис. 42). Для этого белки инкубировали с субстратами (80°C, 50 мМ MES, pH 5.6) в течение 4 часов, после чего измеряли активность с помощью колориметрического метода (Miller, 1959). В качестве контролей были использованы вышеперечисленные углеводы с концентрацией 1% (10 мг/мл), проинкубированные такое же время без добавления фермента. Количество (мкмоль/мл) редуцирующих сахаров рассчитывали по калибровочной кривой. Концентрацию белка измеряли с помощью Qubit protein Assay Kit. Специфическую активность ферментов по отношению к различным субстратам определяли как мкмоль/мл образующихся редуцирующих сахаров 1 мг белка за минуту.

У белка Cel45 (Рис. 41) качественным методом (на агарозных чашках) была выявлена эндоглюканазная активность по отношению к КМЦ, для остальных белков зоны просветления выявить не удалось. Количественным методом эндоглюканазная активность была идентифицирована у клеточных экстрактов с белками Cel40, Cel45 и Cel30 (Рис. 42А), причем наибольшую активность проявляли экстракты с Cel40 и Cel45 (37.36 U/мг и 27.81 U/мг, соответственно). Небольшой по сравнению с Cel40 и Cel45 активностью в размере 3.17 U/мг обладал белок Cel30, а экстракт с Cel25 не проявлял целлюлозолитической активности. По отношению к целлобиозе (Рис. 42Б) были активны три фермента – Cel40, Cel30 и Cel25 (15.26,

6.10 и 4.17 U/мг, соответственно), что предполагает их участие в отщеплении концевых участков глюкозы в целлюлозе. Стоит отметить, что белок Cel40 имеет домен семейства GH1 (для представителей которого показана бета-галактозидазная/бета-глюканазная активность), он также может принимать участие в разложении лактозы, которая служит субстратом для данного штамма.

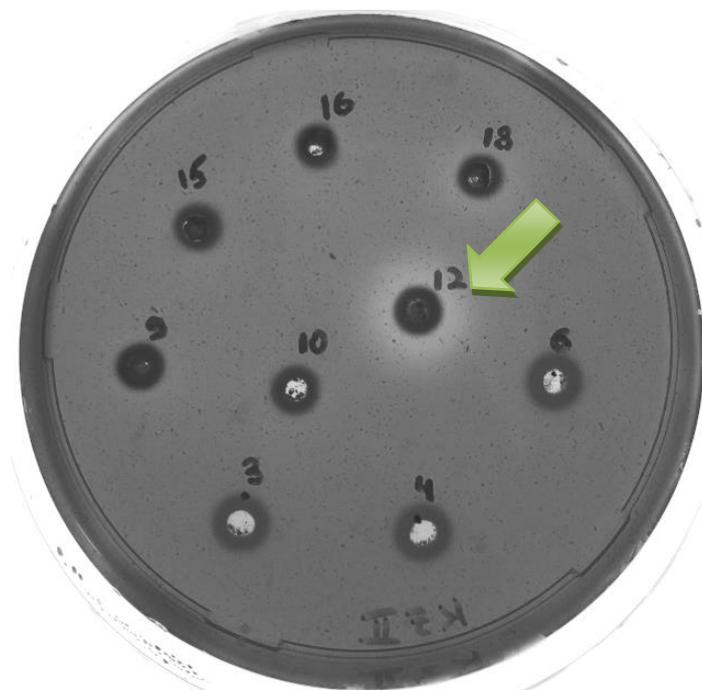


Рисунок 41. Эндоглюканазная активность рекомбинантного белка Cel45 (№12 на чашке). Время инкубации 16ч при температуре 77 °С.

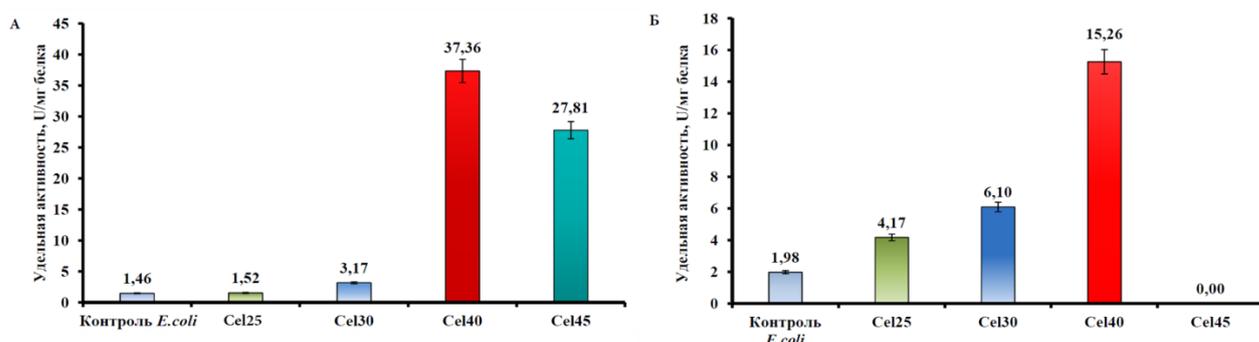


Рисунок 42. Эндоглюканазная (А) и бета-глюканазная активности (Б) рекомбинантных белков штамма *Thermophilum adornatum* 1910b. Условия реакции 80°C, 50 mM MES, pH 5.6, время 4 ч.

Была дана общая характеристика очищенных препаратов всех четырех рекомбинантных белков Cel25, Cel30, Cel40 и Cel45. Из четырех рекомбинантных гликозидаз 3 связывались с Ni-сефарозной колонкой, что позволило работать с очищенными препаратами после их элюции при добавлении имидазола (Рис. 43). Поскольку Cel30 не связывался с колонкой, дальнейшая работа велась с фракцией растворимых белков, которая была нанесена на колонку, т.е. с клеточным экстрактом *E. coli*. Размер обнаруженных с помощью ДСН-

ПААГ-электрофореза полос целевых белков совпадал с их теоретической массой: 77 кДа для Cel25, 42 кДа для Cel30, 60 кДа для Cel40 и 10 кДа для Cel45. Поскольку Cel45 является необычно небольшим для гликозидазы белком и у него нет охарактеризованных гомологов, было необходимо дополнительное подтверждение, что полоса на геле соответствующего размера действительно является этим белком. Для этого, из полиакриламидного геля был элюирован белок из полосы, соответствующей размеру Cel45, после чего был проведен трипсинолиз с последующей матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация – масс-спектрометрией (MALDI-TOF, на приборе UltrafleXtreme, Bruker, Германия). Покрытие теоретического белка идентифицированными с помощью MALDI-TOF пептидами составило 88% а его размер был близок теоретическому (Рис. 44).

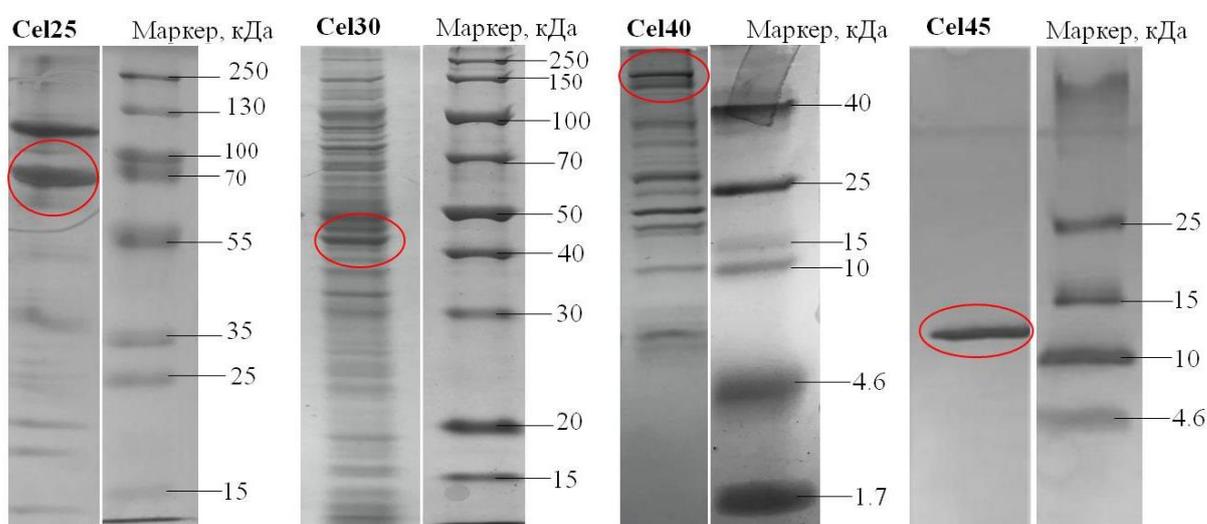


Рисунок 43. Наличие целевых белков во фракциях после аффинной хроматографии. В случае с белком Cel30 показано наличие белка во фракции растворимых белков *E. coli*.

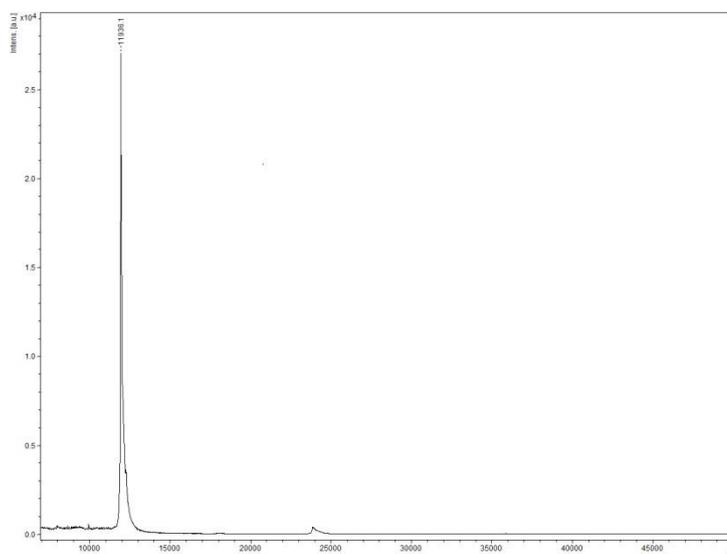


Рисунок 44. Спектр масса/заряд исследуемого белка Cel45. Масса составляет 11.9 кДа.

Активность ферментов по отношению к различным полисахаридам (КМЦ, АМЦ, лихенан, β -глюкан, целлобиоза, ксилоглюкан, глюкоманнан, пахиман, курдлан, ксилан, галактан, крахмал) измеряли при помощи динитросалицилового метода, при концентрации каждого субстрата равной 10 мг/л, $T=82^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH}=5.6$. Концентрация белка в реакционной смеси составила 20 мкг/мл. Время инкубации было 39 часов. В качестве контроля были использованы субстраты без добавления ферментов.

Все исследуемые рекомбинантные гликозидазы *T. adornatum* 1910b были активны по отношению к КМЦ, АМЦ, β -глюкану, лихенану и глюкоманнану (Рис. 45). Ни один из исследованных белков не был способен к гидролизу ксилана, пахимана, крахмала, галактана и курдлана. Целлобиозу гидролизовали 2 белка – Cel25 и Cel40, что характерно для представителей семейств GH3 и GH1, к которым, соответственно, относятся данные белки. На ксилоглюкане были активны Cel30 и Cel45. Гликозидаза Cel25 обладала наибольшей активностью, которая составляла от 16 (галактоманнан) до 373 (бета-глюкан) мU/мг белка; другие ферменты обладали активностью от 0.8 до 22 мU/мг (Рис. 45).

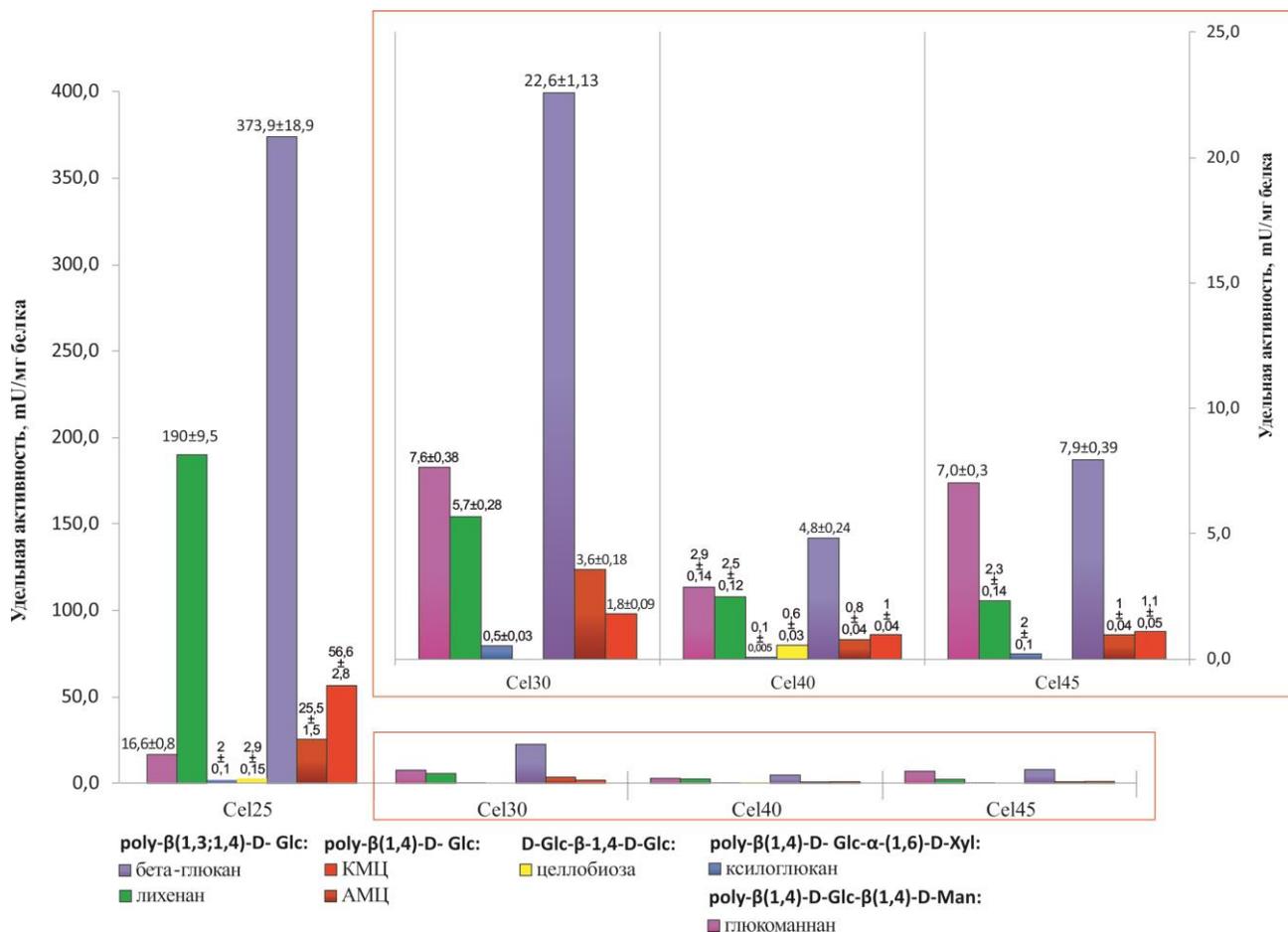


Рисунок 45. Удельная активность рекомбинантных гликозидаз *T. adornatum* 1910b.

Был выявлен спектр образуемых остатков моно- и олигосахаридов для целевых рекомбинантных белков на полисахаридах, мономеры которых были связаны $\beta(1,4)$ - и $\beta(1,3)$ -связями (Рис. 46), и на которых ранее была показана активность (а именно КМЦ, бета-глюкан, лихенан и целлобиоза).

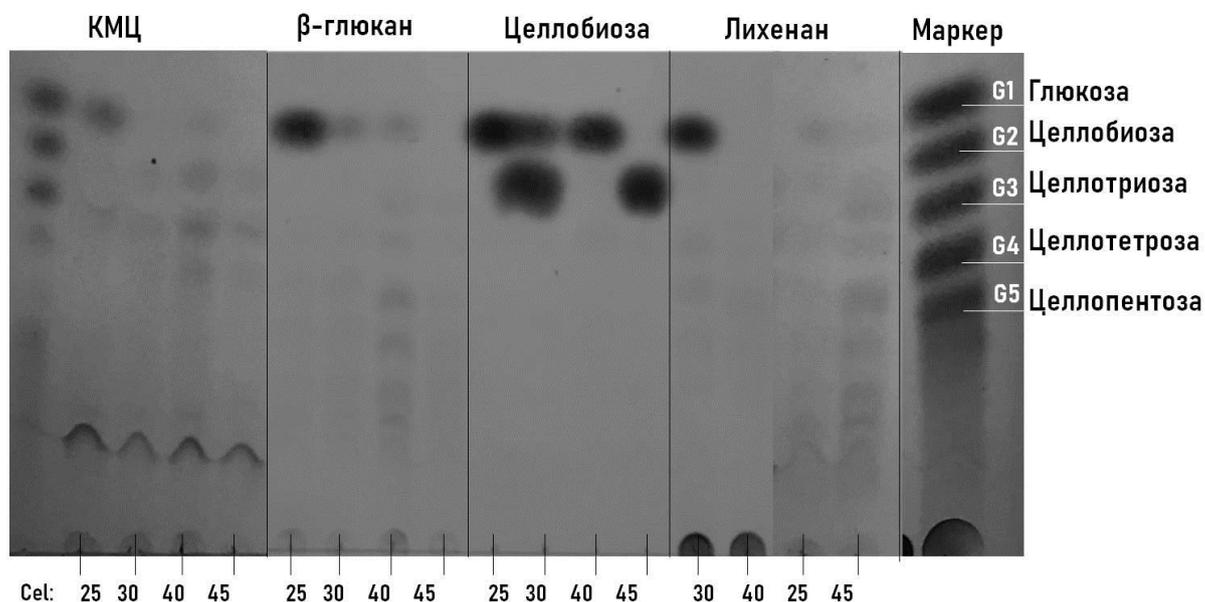


Рисунок 46. Тонкослойная хроматография ферментативных смесей на различных полисахаридах рекомбинантных гликозидаз *T. adornatum* 1910b (Cel25, Cel30, Cel40, Cel45). Справа маркер, содержащий целые олигосахариды.

Установлено, что Cel25 полностью расщепляет КМЦ (линейный полимер poly- $\beta(1,4)$ глюкозы) и целлобиозу до остатков глюкозы, а лихенан и β -глюкан (полисахариды poly- $\beta(1,3;1,4)$ -D-глюкозы) расщепляет на весь спектр от глюкозы до целлопентаозы. Гликозидаза Cel30 гидролизует КМЦ до смеси целлобиозы, целотриозы и целлотетрозы, а β -глюкан и лихенан - от глюкозы до более высокомолекулярных олигосахаридов. Гликозидаза Cel40 разлагает КМЦ, β -глюкан и лихенан на смесь глюкозы и более высокомолекулярных олигосахаридов. Целлобиозу данный фермент полностью гидролизует до глюкозы. Белок Cel45 гидролизует КМЦ на спектр олигосахаридов: от целлотриозы до целлопентозы, а β -глюкан, лихенан на спектр от целлобиозы до более высокомолекулярных олигосахаридов. В то же время Cel45 не способен гидролизовать целлобиозу. Все описываемые нами белки активны на глюкоманнанах и их активность выше, чем у описанных ранее гликозидаз. Сравнивая полученные данные по активности рекомбинантных гликозидаз *T. adornatum* с ранее опубликованными значениями по активности рекомбинантных гликозидаз из гипертермофильных прокариот, можно сделать вывод о том, что гликозидаза Cel25 имеет наибольшую активность на β -глюкане из известных (Табл. 21).

Таблица 21. Сравнение значений удельных активностей (mU/мг белка) белков *T. adornatum* 1910b с литературными данными.

Белок	Условия работы белка (Т°С/рН)	Источник выделения	β-глюкан	КМЦ	Лихенин	Ксилан	Глюкоманнан
EglA ¹	98-100/6	<i>Pyrococcus furiosus</i>	58	7	53	0.045	-
Cel12E ²	90-95 /5.5	Накопительная культура	317.7 ± 3.8	692.3 ± 55.7	272.0 ± 6.9	-	2.8 ± 0.1
Vul_Cel5A ³	115/ 6	Накопительная культура	210.74 ± 2.4	38.53 ± 1.08	209.9 ± 2.18	-	-
cellulase II ⁴	95/ 6	<i>Thermotoga maritima</i>	3.640	0.578	-	0.229	-
Cel25			373.9 ± 11	56.6 ± 2.7	190 ± 8	-	16.6 ± 0.83
Cel30			22.6 ± 1.2	1.8 ± 0.04	5.7 ± 0.2	0.26 ± 0.03	7.6 ± 0.38
Cel40	82/5.6	<i>Thermofilum adornatum</i> 1910b	4.8 ± 0.15	1 ± 0.03	2.5 ± 0.08	0.033 ± 0	2.9 ± 0.08
Cel45			7.9 ± 0.4	1.1 ± 0.01	2.3 ± 0.07	0.09 ± 0.01	7 ± 0.33

¹ Bauer et al., 1996; ² Leis et al., 2015; ³ Suleiman et al., 2019; ⁴ Bronnenmeier et al., 1995.

Таким образом, для всех рекомбинантных белков было показано участие в разложении целлюлозы. Белки Cel45 и Cel25 играют ключевую роль: Cel45 является узкоспецифичной эндоглюканазой, а Cel25, напротив, - более высокоактивный и универсальный фермент по спектру разлагаемых субстратов и образуемых продуктов целлюлазой. Cel30 и Cel40, по-видимому, играют вспомогательную роль.

7.2. Характеристика рекомбинантных гликозидаз *Thermococcus* sp. 2319x1

Для изучения гидролитического потенциала мультидоменной гликозидазы ее ген МДГ, номер в геноме ADU37_CDS22600, состоящий из 3912 п.н., с предсказанной массой около 143кДа, как и его фрагменты, содержащие как отдельный домен GH5 (без СВМ мотивов, которые не обладают каталитическим действием), так и его связки с доменами GH12-1 и GH12-2 (Рис. 47) были заклонированы и экспрессированы в *E. coli* с использованием экспрессионного вектора (pET24a, с С-концевым His6x-тагом). Отдельные домены GH12-1 и GH12-2 были заклонированы в экспрессионный вектор pLATE51 с 6-ю гистидинами на N-конце белка.

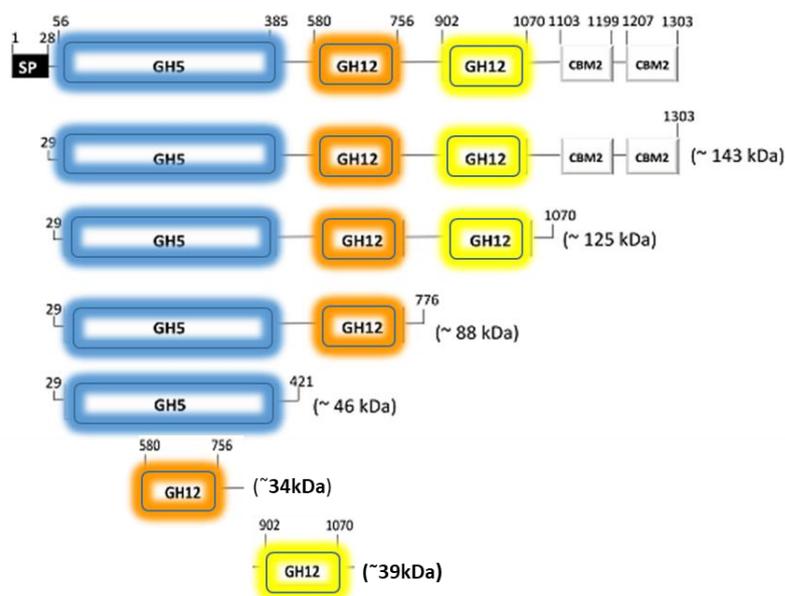


Рисунок 47. Структура МДГ и варианты рекомбинантных белков. Цветом отмечены каталитические домены.

Эксперименты с рекомбинантными белками GH5-12-12-CBM2-2, GH5-12-12, GH5-GH12 и GH5 были проведены ранее (Gavrilov et al., 2016) и будут кратко упомянуты в данной работе. Остальные домены GH12-1 и GH12-2, а также полная версия МДГ являются частями данной работы.

Домены GH5 и GH5-12 являлись полностью растворимыми белками, в то время как, всего лишь небольшое количество полной МДГ (GH5-12-12-CBM2-2) и версии GH5-12-12 было получено во фракции растворимых белков. На Рис. 48 представлен SDS-электрофорез в ПААГ, из которого видно, что молекулярная масса полученных белков совпадает с теоретически рассчитанной.

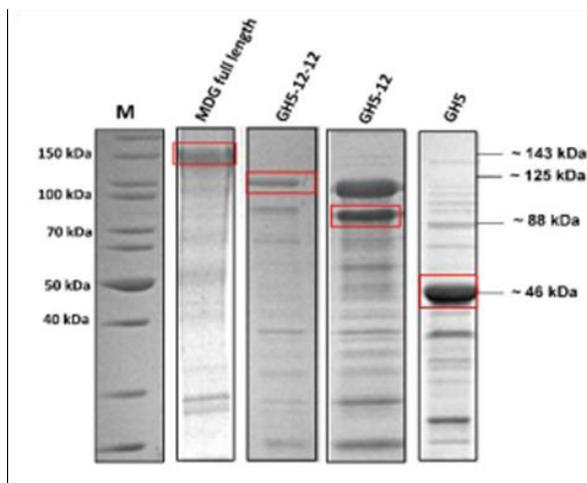


Рисунок 48. Экспрессия рекомбинантной МДГ и ее отдельных частей в *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus-pRII.

Гликозидазная активность по отношению к различным полисахаридам была измерена с помощью ДНСК метода в стандартных условиях – pH=6.0, T=60°C, время инкубации 30 мин (Рис. 49).

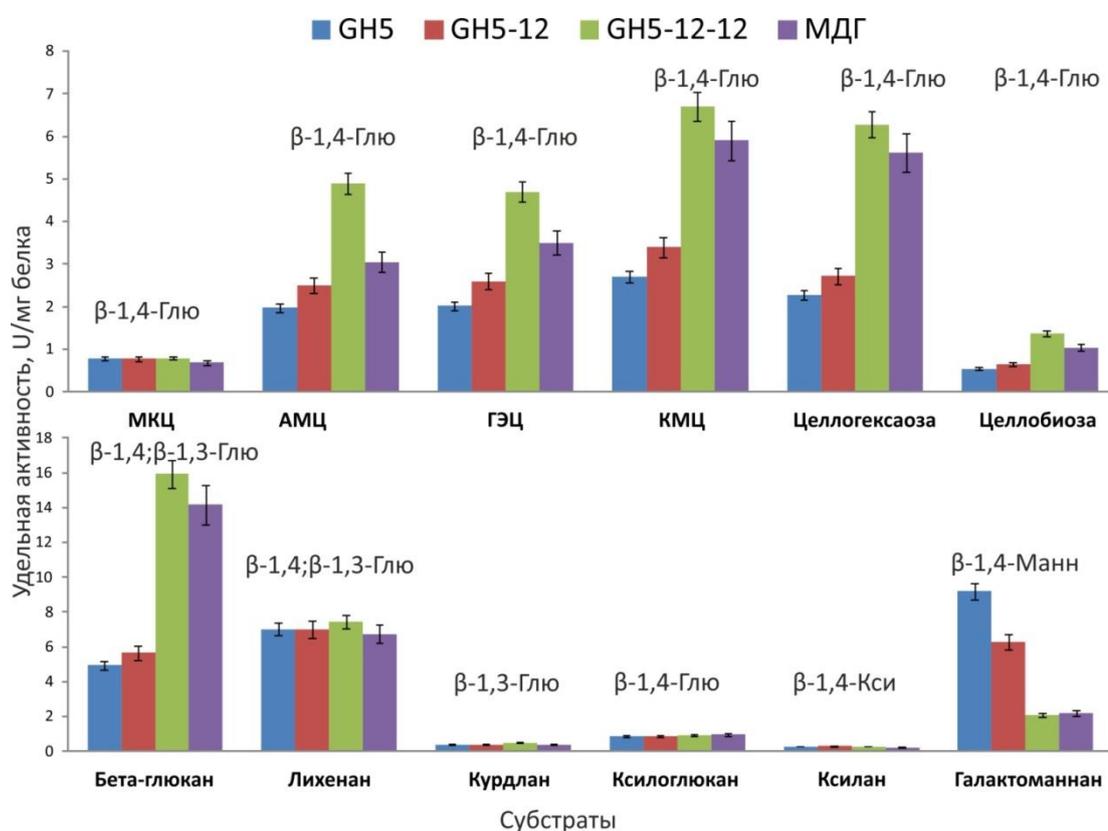


Рисунок 49. Субстратная специфичность МДГ и ее отдельных частей: GH5-GH12-GH12, GH5-GH12 и GH5. (ГЭЦ – гидроксиэтилцеллюлоза, КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза, АМЦ – аморфная целлюлоза, МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза).

Для всех четырех белков наибольшая активность была обнаружена по отношению к растворимым β -1,3/1,4-глюканам, например, к ячменному β -глюкану (4-16 U/мг) и к лихенану (7 U/мг). Эндо- β -1,4-эндоглюканазная активность на β -1,4-связанных глюканах была также высока: наибольшие значения удельной активности были получены для растворимых КМЦ (3–7 U/мг) и гидроксиэтилцеллюлозы (2–5 U/мг), на частично растворимой АМЦ активность была в пределах от 2 до 5 U/мг, а на нерастворимой МКЦ (Avicel) была наименьшей для всех версий белка и составляла примерно 1 U/мг. В дополнение к этому, все 4 белка показали значимую активность на целоолигосахаридах (целлогексаозе (2–6 U/мг)), но низкую активность на целлобиозе (0.5–1 U/мг). Достаточно низкая активность оказалась на ксилане (<1 U/мг), ксилоглюкане и курдлане (0.4 – 0.5 U/мг). Примечательно, что высокая активность (2–9 U/мг) была отмечена на галактоманнане. Вклад СВМ доменов в активность МДГ остался неясным, поскольку белок МДГ не был очищен из-за его плохой растворимости и данные удельной активности представлены для смеси белков (Gavrilov et al., 2016).

Такие характеристики как, оптимумы температуры и pH, а также стабильность к детергентам, были измерены для двух белков - GH5-12-12-CBM2-2 и GH5, в качестве субстрата использовался β -глюкан, измерения активностей проводили с помощью ДНС метода. Активности обоих белков были измерены и обнаружены в температурном диапазоне от 40 до 90°C и диапазоне pH от 4.5 до 9.5. Наибольшую активность МДГ (4 U/мг) показала при температуре 60°C и в диапазоне pH от 7.5 до 9.5 с максимальной активностью (8 U/мг) при pH=8.5. Единичный домен GH5 был наиболее активен при T=90 °C, а оптимум его pH находился в более кислой области – при pH=5.5.

7.2.1. Получение мультидоменной гликозидазы (МДГ)

При дальнейшей работе с целой МДГ возникла проблема ее очистки на Ni-агарозной колонке. Большая часть белка оказывалась во фракции несвязанных с колонкой белков (Рис. 50).

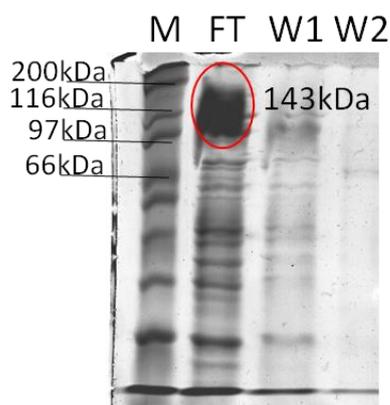


Рисунок 50. ПААГ с фракциями, полученными с колонки Ni-агарозной колонки. Расшифровка: М – маркер, FT – фракция несвязанных с колонкой белков, W1, W2, – фракции отмывки градиентом имидазола, фракции элюции помощью 500 мМ имидазола не показаны на рисунке, так как видимых полос белков не было видно.

Тем не менее, все фракции, элюированные с колонки, а также клеточный экстракт, содержащий растворимые белки, и дебрис (нерастворимые остатки клеток после их разрушения) были проверены на эндоглюканазную активность по отношению к карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ) при 80°C (Рис. 51). Эндоглюканазная активность наблюдалась во фракции не связанных с колонкой белков #1 на чашке, во фракции, элюированной со 100 мМ имидазола (#2), что говорит о том, что некоторая часть белка МДГ является растворимой.

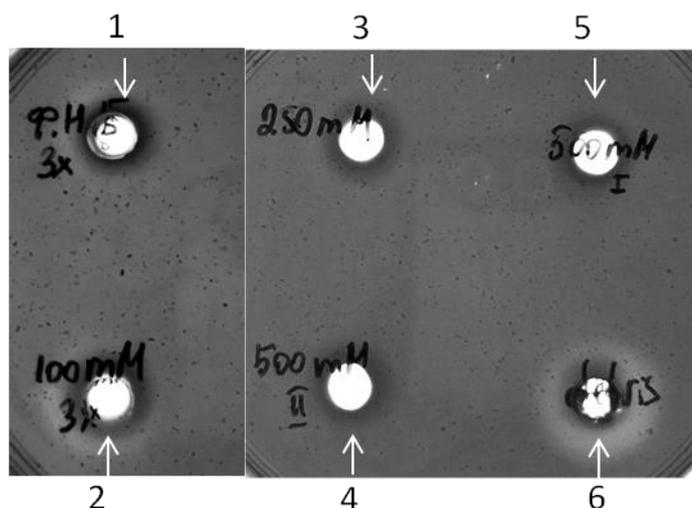


Рисунок 51. Эндоглиуказная активность фракций МДГ по отношению к 0.1% КМЦ. Время инкубирования 2.5 ч, при 80°C. Окраска Конго красным. Расшифровка проб: 1 - фракция несвязанных с колонкой белков, 2, 3 – фракции отмывки имидазолом с концентрациями 100 и 250 мМ, соответственно, 4, 5 – фракции элюции белков с помощью 500 мМ имидазола, 6 – дебрис.

Однако существенное количество МДГ оставалось в нерастворимой фракции остатков клеток, что говорит о том, что одним из этапов очистки должна быть солюбилизация белка и подбор условий очистки фермента. Поскольку эндоглиуказную активность фермента удалось подтвердить лишь качественным методом, а количественная оценка в случае с негомогенным препаратом фермента была бы не точной (что затрудняло определение кинетических параметров фермента), то следующей частью работы стало получение гомогенных препаратов обоих GH12x доменов и их подробная характеристика.

7.2.2. Характеристика GH12 доменов

Длина нуклеотидных последовательностей доменов GH12-1 и GH12-2 составили 1005 и 840 пар оснований, что соответствует длине в 335 и 280 аа, соответственно. Для домена GH12-1 была рассчитана теоретическое значение pI 4.55 и молекулярная масса 37.1 кДа, для GH12-2 теоретическая pI составила 4.43 и молекулярная масса 31.3 кДа.

Анализ белковой последовательности GH12-1 показал наиболее значительное сходство с архейными белками: 59.6% с предполагаемой гликозидазой GH12 из *Ignisphaera aggregans*, 33% с предполагаемой эндо-(бета)-1,4-глиуказной из *Pyrococcus furiosus*, 28% с предполагаемой гликозил-гидролазой GH12 из *Thermophilum pendens* и 28% с гипотетической GH12 из *Caldivirga maquilingensis*, что указывает на сходство домена GH12-1 с архейными белками. Более того, низкое значение сходства (27.8%) последовательности GH12-1 было показано с охарактеризованной эндоглиуказной CelA (Leibl et al., 1996; Forse et al., 2011) из гипертермофильной бактерии *Thermotoga maritima*.

Второй домен GH12-2 имел высокое сходство с охарактеризованной эндо-1,4-β-глюканазой (Bauer et al, 1999), кодируемой ORF PF0854 из археона *P. furiosus* (EGPf, 82.3% сходства) и демонстрировал высокое сходство в 43.5%, с предполагаемой эндоглюканазой из *Spirochaeta thermophila* и 40.3%, с эндоглюканазой из *Thermotoga maritima*.

Оба гена GH12-1 и GH12-2 были клонированы в экспрессионный вектор pLATE51 с N-концевым 6xHis-тегом и затем экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3). Очистку белка GH12-1 проводили из 38 л, а GH12-2 – из 10 л. Неочищенные экстракты клеток *E. coli* BL21(DE3) pLATE51::GH12-1 и *E. coli* BL21(DE3) pLATE51::GH12-2 после сонификации центрифугировали (30 мин при 13400 об/мин) и супернатанты последовательно подвергали Ni²⁺-NTA аффинной, анионообменной хроматографии и гель-фильтрации. В ходе многостадийной очистки на хроматографе низкого давления (FPLC Äkta Start, Cytiva) был получен ферментативные препараты GH12-1 и GH12-2 доменов.

Этапы очистки визуализировали с помощью SDS-PAGE (Рис. 52 А, Б), подтвердив, что предсказанные молекулярные массы были близки к эмпирическим: 42 кДа для GH12-1 и 37 кДа для GH12-2, а также их гомогенность. Гель-фильтрационная хроматография подтвердила, что оба домена были мономерами.

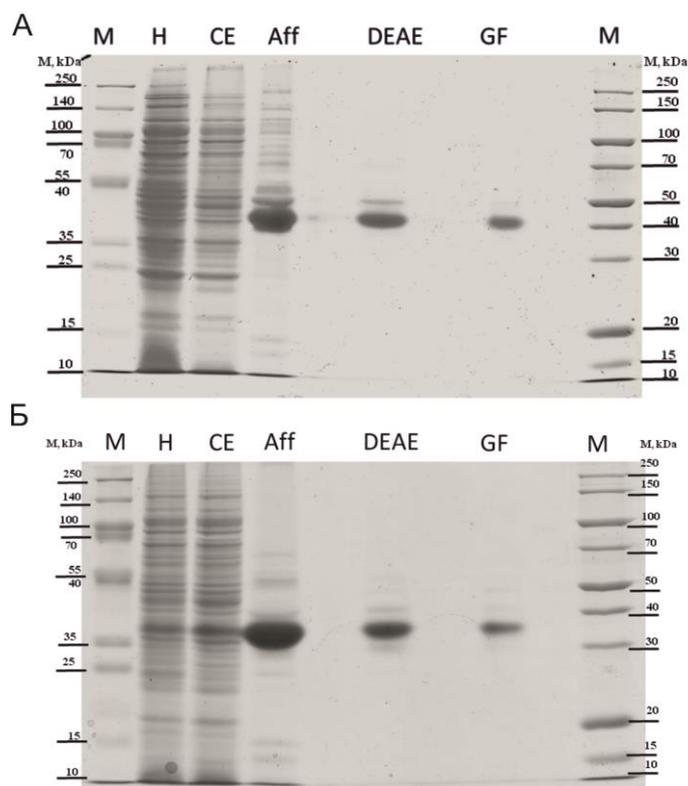


Рисунок 52. Фотографии ПААГ-электрофореза:
 А) фракций, содержащих GH12-1 домен. М- белковый маркер; Н – гомогенат; СЕ – клеточный экстракт; Aff – фракция после аффинной хроматографии; DEAE – фракция после ионнообменной хроматографии; GF – фракция эксклюзионной
 Б) фракций, содержащих GH12-2 домен. М- белковый маркер; Н – гомогенат; СЕ – клеточный экстракт; Aff – фракция после аффинной хроматографии; DEAE – фракция после ионнообменной хроматографии; GF – фракция после гель фильтрации

Для белка GH12-1 коэффициент очистки и выход от общего количества белка составляли 55.1 и 17.5%, соответственно, в то время как для GH12-2 коэффициент очистки равнялся 94.18, а выход – 25.1%. (Табл. 22)

Таблица 22. Степень очистки доменов GH12-1 и GH12-2

Фракция	Объем	Общий белок (мг)	Общая активность(U)	Удельная активность U/мг	Выход(%)	Фактор очистки
GH12-1						
Гомогенат	11.4	738.72	15.73	0.021	100	1
Клеточный экстракт	6.85	272.63	7.25	0.027	46.08	1.25
Аффинная хроматография	3.5	6.37	3.93	0.617	25.00	28.99
Анионообменная	1.8	3.42	2.68	0.784	17.05	36.82
Гель-фильтрация	2.5	2.33	2.76	1.183	17.52	55.55
GH12-2						
Гомогенат	8	406.4	87.4	0.215	100	1
Клеточный экстракт	6	168	62.8	0.374	71.86	1.74
Аффинная хроматография	6.5	7.358	45.25	6.15	51.77	28.6
Анионообменная	2	4.32	27.95	6.47	31.98	30.08
Гель-фильтрация	3	1.083	21.94	20.26	25.1	94.19

Измерения активности были проведены по отношению к 1%AZO-СМС в оптимальных условиях: для GH12-1 при 100С, рН=5, 50 мМ MES, для GH12-2 при 90С, рН=9.0, 50 мМ TrisHCl

Гидролитическая активность обоих ферментов была протестирована по отношению к различным субстратам с различными полисахаридами (нативными и AZO-окрашенными), а также некоторыми дисахаридами.

Наибольшая активность для обоих доменов наблюдалась с ячменным β -глюканом в качестве субстрата, с удельной активностью 156 ± 1.26 U/мг при температуре 100°C и рН 5 для домена GH12-1 и 3765.9 ± 87.23 U/мг для домена GH12-2 при 90°C и рН 9. Также для обоих ферментов выявлена высокая ферментативная активность в отношении лихенана: 30.63 ± 4.1 U/мг для GH12-1 и 1225 ± 95.9 U/мг для GH12-2, а также в отношении растворимой КМЦ: 8.93 ± 0.85 U/мг для GH12-1 и 83 ± 19.4 U/мг для GH12-2. По отношению к AZO-окрашенной КМЦ обе гликозидазы проявили довольно низкую активность по сравнению с КМЦ – 0.45 ± 0.05 U/мг для GH12-1 и 47 ± 2.17 U/мг для GH12-2. Домен GH12-1 был способен гидролизовать растворимые субстраты, такие как арабиноксилан (13.5 ± 0.58 U/мг), ксилан (2.4 ± 0.25 U/мг) и AZO-ксилан (0.035 ± 0.001 U/мг). Не было обнаружено активности обоих доменов к таким полисахаридам, как нерастворимая целлюлоза, галактоманнан, галактан и др. (Табл. 23), а также к олигосахаридам.

Таким образом, GH12-1 демонстрирует более широкую субстратную специфичность, чем домен GH12-2. Наибольшее сродство оба фермента имели к бета-глюкану и лихенану. Для GH12-1 домена сродство к ксилану и арабиноксилану было примерно одинаковым. Значения Км для обоих ферментов, измеренные на КМЦ, были высокими (5.42 мг/мл для GH12-1 и 2.8

мг/мл для GH12-2), что означает менее эффективный гидролиз, по сравнению с другими субстратами. Список гидролизуемых обеими гликозидазами субстратов указывает на то, что обе гликозидазы GH12-1 и GH12-2 обладают эндогликоканазной активностью – они способны гидролизовать полисахариды с β -(1-4)-связями, но не гидролизуют полисахариды β -(1-3)-связями, такие как пахиман и курдлан (Табл.23). Высокие значения k_{cat}/K_m наблюдались для ячменного β -глюкана и лихенана, что подтверждает предпочтительность этих субстратов. Для AZO-окрашенных КМЦ и КМЦ значения k_{cat}/K_m были значительно ниже для обоих ферментов (Табл. 24). Белок GH12-1 был способен гидролизовать арабиноксилан более эффективно, чем ксилан и AZO-ксилан.

Таблица 23. Субстратная специфичность GH12-1 и GH12-2 гликозидаз

Субстрат, %	Тип O-гликозидной связи и типы мономеров основной цепи	Активность (U/мг белка \pm SD)	
		GH12-1	GH12-2
КМЦ, 1%	Только β -1,4 - глюкоза	8.93 \pm 0.85	83 \pm 19.4
AZO-КМЦ, 1%		0.45 \pm 0.05	47 \pm 2.17
альфа-целлюлоза, 1%		нет активности	
наноцеллюлоза, 0,5%		нет активности	
АМЦ, 0,4%		нет активности	
β -глюкан, 1%	Смесь β -1,3 и β -1,4, глюкоза	156 \pm 1.26	3765.9 \pm 87.23
Лихенан, 1%		30.63 \pm 4.1	1225 \pm 95.9
Ксилан, 1%	β -1,4 ксилоза, боковые цепи 4-O-метилглюкуроновой к-ты	2.4 \pm 0.25	нет активности
AZO-ксилан, 1%		0.035 \pm 0.001	нет активности
Арабиноксилан, 1%		13.5 \pm 0.58	нет активности
	боковые цепи из арабинозы и ксилозы		
Ксилоглюкан, 1%	β -1,4 глюкоза, боковые цепи из ксилозы		нет активности
Глюкоманнан, 1%	β -1,4 глюкоза и манноза		нет активности
Хитозан, 1%		β -1,4 глюкозамин и N-ацетил-глюкозамин	нет активности
Галактан, 1%	Только β -1,4, галактоза		нет активности
Пахиман, 1%	Только β -1,3, глюкоза		нет активности
Маннан, 1%	Только β -1,4, манноза		нет активности
Крахмал, 1%	Смесь α -1,4 и α -1,6, глюкоза		
Целлобиоза, 0,5%	Дисахарид β -1,4 –D-глюкозы, β -D-фруктоза-O- α -D-глюкоза- (1 \rightarrow 6)- α -D-галактоза		нет активности
Раффиноза, 0,5%			нет активности
Трегалоза, 0,5%	Дисахарид α -1,1-D –глюкозы		нет активности

Активности были измерены при 100°C, pH 5 для GH12-1, и при 90°C, pH 9 для GH12-2 домена.

Таблица 24. Кинетические параметры GH12-1 и GH12-2 гликозидаз для различных субстратов.

Субстрат	Km (мг/ml)		Макс. скорость Vmax (μmol/min)		Каталитическая константа, kcat (s-1)		Константа специфичности, kcat/Km (ml/мг/s)	
	GH12-1	GH12-2	GH12-1	GH12-2	GH12-1	GH12-2	GH12-1	GH12-2
β-глюкан	1.59	1.29	0.09	0.84	113.4	4053.9	71.3	3142.568
Лихенан	1.08	1.03	0.08	0.47	100.8	2268.3	93.3	2202.2
КМЦ	5.42	2.8	0.044	0.11	27.7	265.4	5.1	94.8
AZO-КМЦ	4.22	2.2	0.011	0.5	2.8	1206.5	0.7	548.4
Ксилан	1.49	nd	0.028	nd	7.1	-	4.7	-
AZO-ксилан	2.03	nd	0.032	nd	4	-	1.99	-
Арабиноксилан	2.28	nd	0.039	nd	9.8	-	4.3	-

Влияние температуры и pH на активность доменов GH12-1 и GH12-2:

Домен GH12-1. Влияние температуры измеряли в диапазоне 30-120°C при pH=5.3 (50 мМ MES буфер) с бета-глюканом в качестве субстрата. Наибольшая активность GH12-1 была получена при температуре 100°C (Рис. 53Б). При 95°C относительная активность (РА) составляла 76%, при 110°C снижалась до 55%, а при 120°C она составляла 20% от максимальной. Снижение относительной активности более чем наполовину (<50%) наблюдалось при 85°C и более низких температурах. Минимальная относительная активность (около 1%) наблюдалась при 40°C. Влияние значения pH на активность домена GH12-1 измеряли при 90°C, используя ацетатный, MES, MOPS, Tris-HCl и CAPS буферы, охватывающие диапазон значений pH от 3.5 до 11.5. Домен GH12-1 показал самую высокую активность при pH 5 с использованием ацетатного и MES буферов (Рис. 53А). Стоит заметить, что хотя активность фермента быстро снижалась при pH 4 и 3.5 (86% и 5.5%, 100 мМ ацетатный буфер), относительная активность в нейтральных и щелочных условиях оставалась сравнительно высокой, достигая 91%, 78% и 49.8% при pH 6, 8 и 10, соответственно. При pH 11.5 относительная активность фермента составила 15.4%.

Домен GH12-2. Влияние температуры на активность домена GH12-2 измеряли в интервале 50-100°C при pH 9 (50 мМ Tris-HCl) с AZO-СМС в качестве субстрата. Наибольшая активность GH12-2 была получена при температуре 90°C (Рис.53, Б). При 95°C относительная активность снижалась до 45%, а при 100°C составляла всего 2.4%. При 85°C и 80°C относительная активность составляла ≥ 80%, что указывает на широкий температурный диапазон работы фермента GH12-2. Активность снижалась при 75°C и 60°C, составляя 48% и 12%, соответственно. При 50°C относительная активность была минимальной – 3.9%. Влияние pH на активность домена GH12-2 измеряли при 90°C, используя ацетатный, MES, Tris-HCl и CAPS буферы, охватывающие диапазон значений pH от 3.5 до 11. Оптимальным значением

pH для активности GH12-2 было значение pH 9 (50 mM Tris-HCl буфер, Рис. 53A). В диапазоне pH от 9.5 до 11 относительная активность заметно снижалась от 38% до 4%, соответственно. С другой стороны, относительная активность GH12-2 в диапазоне pH 8.5-4 постепенно снижалась с 74% (при pH 8.5), 65% (pH 8), 51% (pH 7), 32% (pH 6) и 26% (pH 5), 4% (pH 4). Таким образом, оба домена обладали наибольшей активностью в гипертермофильных условиях (от 80 до 100°C), но pH-оптимумы работы были разными: GH12-1 проявлял наибольшую активность при pH=5, а GH12-2 при pH=9.0.

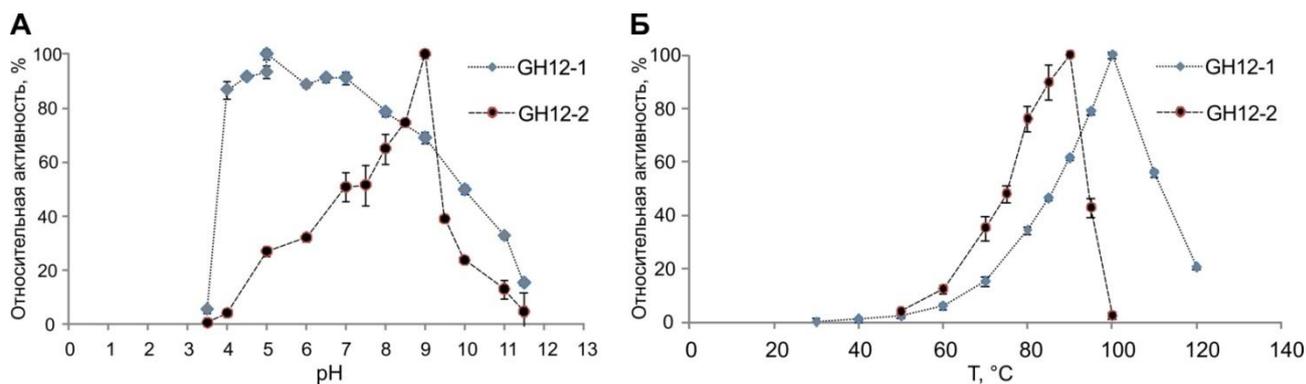


Рисунок 53. Влияние физико-химических параметров - pH (А) и температуры (Б) на активность GH12-1 и GH12-2 доменов.

Термостабильность доменов GH12-1 и GH12-2

Температурная стабильность доменов GH12-1 и GH12-2 была проанализирована при 90°C и 100°C (Рис. 54 А, Б), после чего было проведено измерение активности при оптимальных условиях (100°C и pH=5 для GH12-1, 90°C и pH=9 для GH12-2). При 90°C домен GH12-1 показал время полужизни 284.5 часа, в то время как время полужизни домена GH12-2 составило 19 часов. При 100°C домен GH12-1 имел время полужизни 42 ч, а время полужизни GH12-2 составляло 30 мин. Домен GH12-1 был полностью инактивирован через 374 часа, при инкубировании при 90°C, а при 100°C он терял всю активность через 102 часа. Активности белка GH12-2 не наблюдалось после 135 ч инкубации при температуре 90°C, а при 100°C фермент был полностью инактивирован через 4.5 часа.

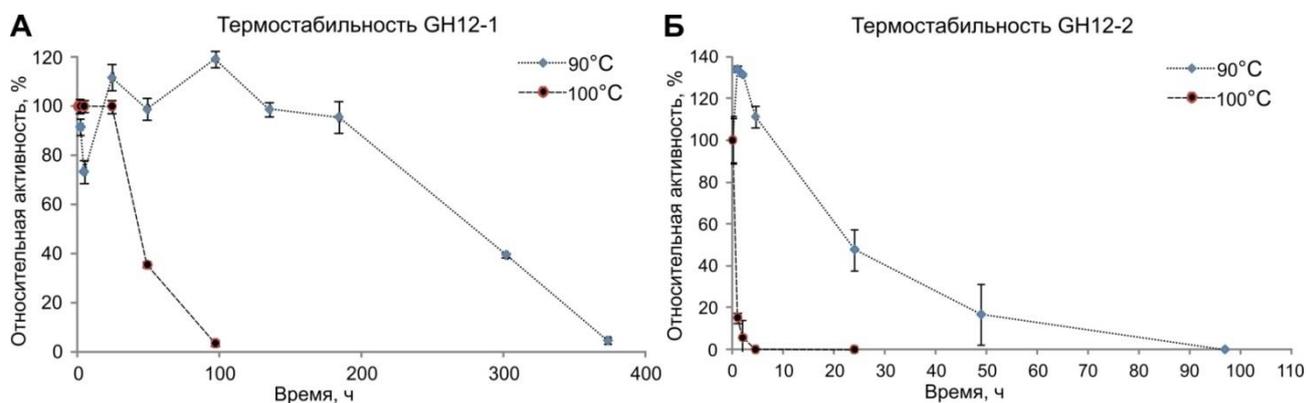


Рисунок 54. Термостабильность GH12 доменов при 90 и 100°C. А – GH12-1, Б-GH12-2.

Влияние ионов металлов и других реагентов

При добавлении ионов Na^+ , Mn^{2+} и Zn^{2+} активность домена GH12-1 существенно не изменялась, достигая относительной активности 89-91% (Рис.55). Добавление ионов Ca^{2+} , K^+ и Fe^{2+} снижало активность GH12-1 до 74%, 58% и 57%, соответственно. После добавления мочевины и ЭДТА изменений в активности домена GH12-1 не наблюдалось, но β -меркаптоэтанол и ДТТ (дителиотреитол) снижали активность до 46% и 51.7%, соответственно. Небольшой эффект увеличения активности был отмечен при добавлении Твин 80 (142%) и ДСН (137%).

Активность домена GH12-2 существенно не изменялась после добавления таких ионов металлов, как K^+ , Na^+ , Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} , достигая относительной активности 80-109% (Рис. 55). Незначительный эффект увеличения активности был отмечен при добавлении ионов Mn^{2+} и Ca^{2+} , в результате чего активность составила 127% и 117%, соответственно. Добавление мочевины, ДТТ, ЭДТА и β -меркаптоэтанола снижало активность GH12-2 от 69% до 52%. Интересно, что добавление 5 мМ ДСН и 5 мМ Твин 80 не влияли на активность фермента – сохраняя активность на уровне 99% и 83% от максимальной.

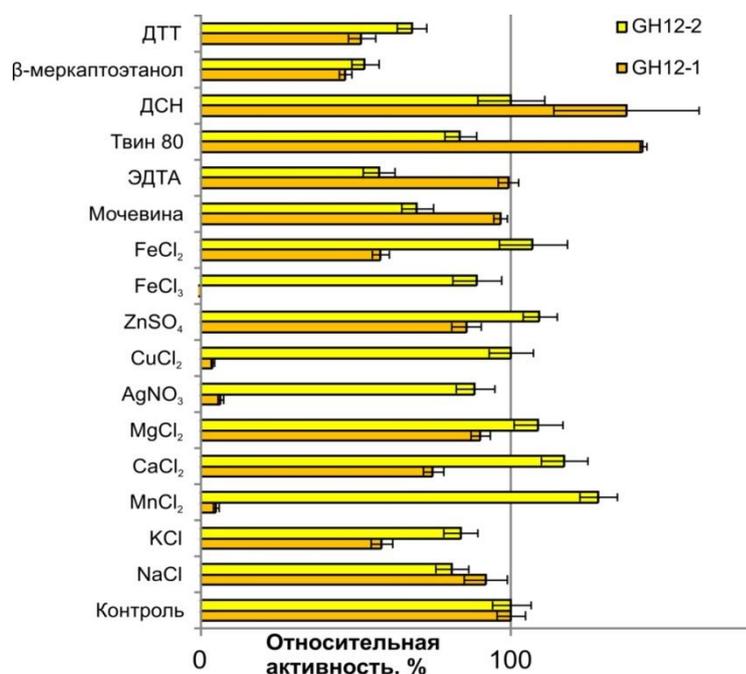


Рисунок 55. Влияние кофакторов и детергентов на активности GH12-1 и GH12-2.

Анализ продуктов разложения полисахаридов

Спектр олигосахаридов, выделяемых доменами GH12-1 и GH12-2, был визуализирован с помощью тонкослойной хроматографии (Рис. 56). После гидролиза β-глюкана, КМЦ и лихенана доменом GH12-1 высвобождался схожий набор олигосахаридов, состоящий из глюкозы, целлобиозы, целлотриозы, целлотетраозы и целлогексаозы, в отличие от спектра олигосахаридов, высвобождаемых доменом GH12-2 - от глюкозы до целлотетраозы на β-глюкане и от глюкозы до целлотриозы на КМЦ и лихенане. После гидролиза ксилана доменом GH12-1 наблюдался диапазон от ксилобиозы до ксилогексаозы и более высокомолекулярных олигосахаридов.

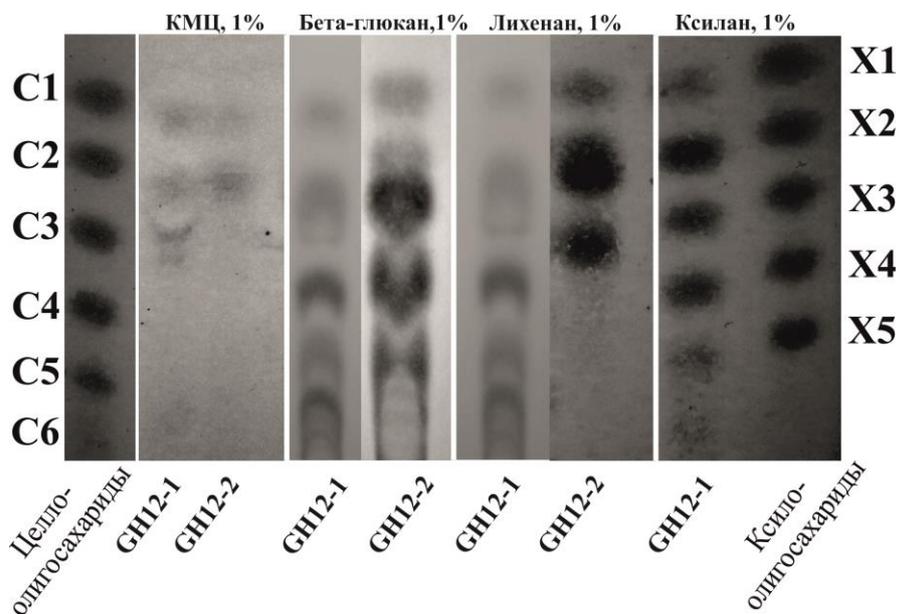


Рисунок 56. Анализ продуктов гидролиза полисахаридов доменами GH12-1 и GH12-2 с помощью ТСХ.

Как было обнаружено, ферменты GH12-1 и GH12-2 обладали совершенно разными оптимумами своей работы - GH12-1 показывал максимум активности при 100°C и pH 5, в то время как максимальная активность GH12-2 была при условиях 90°C и pH 9.0.

Субстратные спектры, выявленные для обоих ферментов, подтвердили, что обе гликозидазы GH12-1 и GH12-2 обладают эндоглюканазной активностью - они способны гидролизовать β -глюкан, лихенан, карбоксиметилцеллюлозу, но не гидролизуют β (1-3)-связанные полисахариды, такие как пахиман и курдлан. Более того, для GH12-1 была показана активность в отношении ксилана и арабиноксилана. В ранних исследованиях по характеристике архейных гликозидаз GH12 были показаны небольшие значения ферментативной активности по отношению к ксилану и арабиноксилану – 0.045 и 0.048 U/мг для гликозидазы EglA (Bauer et al., 1999), 4.6 U/мг в отношении ксилана для гликозидазы GH12 из *Sulfolobus solfataricus* (Maurelli et al., 2008) и 0.2 и 0.38 U/мг для Cel12E (Leis et al., 2015). Гликозидаза GH12-1 проявляет активность по отношению к ксилану с активностью 2.42±0.24 U/мг и к арабиноксилану со значением удельной активности 13.54±0.58 U/мг. Сравнение значений удельной активности между доменами показывает, что домен GH12-2 способен гидролизовать β -глюкан, лихенан и КМЦ более эффективно, чем GH12-1, и демонстрирует одно из высоких значений удельной активности в отношении бета-глюкана и лихенана, обнаруженных для архейных ферментов (Suleiman et al., 2019). Стоит отметить, что у GH12-2 оптимум работы находится в щелочных условиях, что является редкостью для термофильных GH12 гликозидаз (Табл.25). Спектр высвобождающихся олигосахаридов после гидролиза β -глюкана, лихенана и КМЦ был различным у ферментов, однако при воздействии обеих гликозидаз было выявлено образование глюкозы и целлобиозы, что должно указывать на то,

что оба домена обладают бета-глюкозидазной и/или целлодекстриназной активностью (Lynd et al., 2002).

Таблица 25. Сравнение параметров известных GH12х гликозидаз

Название	Организм	Т		рН		Субстрат	Ссылка
		мин/опт/макс	мин/опт/макс	мин/опт/макс	мин/опт/макс		
GH12-1	<i>Thermococcus</i> sp. 2319x1	40/100/110	3.5/5/11.5			β-глюкан, КМЦ, лихенан, ксилан, арабиноксилан	данная работа
GH12-2	<i>Thermococcus</i> sp. 2319x1	50/90/95	3.5/9/11			β-глюкан, КМЦ, лихенан	данная работа
EglA	<i>Pyrococcus furiosus</i>	45/100/105	6			β-глюкан, КМЦ, лихенан, ксилан, целлоолигосахариды (C2-C6)	Bauer et al., 1999
CelA	<i>Thermotoga maritima</i> DSM 3109	95	6-7.5			β-глюкан, КМЦ, PNP-глюкоза	Bronnenmeier et al., 1995; Liebl et al., 1996
SSO1949	<i>Sulfolobus solfataricus</i> MT 4	98	1.8			КМЦ, целлоолигосахариды (C2-C6)	Huang et al., 2005
cel12E	<i>Thermococcus</i>	92*	5.6			β-глюкан, КМЦ, лихенан, АМЦ, ксилоглюкан, глюкоманнан, ГЭЦ	Leis et al., 2015
EglD	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	55	5			β-глюкан, КМЦ, ксилоглюкан, маннан, арабиногалактан	Segato et al., 2017
EglA	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10574	50	4.5			β-глюкан, КМЦ, целлобиоза, ламинарин, МКЦ, фильтровальная бумага	Segato et al., 2017
EgpH	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	97	5			КМЦ, МКЦ, лихенан	Ando et al., 2002
Cmaq_1621	<i>Caldivirga maquilingsis</i> (strain ATCC 700844)	85-102	5.5			АМЦ, PNP-глюкоза	Wang et al., 2011

Оба фермента являлись высоко термостабильными, особенно GH12-1 с его временем полужизни при 90°C составившим 284.5 часов (около 11 дней), время полужизни GH12-2 составило 19 часов. При 100°C время полужизни домена GH12-1 составляло 42 часа, в то время как время полужизни GH12-2 было около 30 минут. По сравнению с другими охарактеризованными архейными гликозидазами оба фермента демонстрируют одни из самых высоких значений времени полужизни, особенно домен GH12-1. Ферментативная активность обоих доменов в присутствии детергентов, таких как Твин 80 и ДСН, была схожа с референсными значениями, что подтверждает высокую стабильность структуры обоих белков. Более того, добавление восстановителей, таких как β-меркаптоэтанол и дитиотреитол, снижало активность доменов GH12-х примерно в два раза от референсного значения.

Добавление одновалентных или двухвалентных катионов не привело к значительному увеличению активности доменов.

Рассматривая функции GH12 доменов в составе мультидоменной эндоглюканазы/эндоксилаказы, можно утверждать, что оба домена играют свою роль в общей активности мультидоменной эндоглюканазы/эндоксилаказы: помимо общей бета-глюкозидазной и экзоглюканазной активности GH12-1 также является ксиланазой, а GH12-2 эндоглюканазой (Табл. 26). Значения активности по отношению к АМЦ, КМЦ, бета-глюкану и лихенану становятся больше при наличии обоих доменов, также как и в случае активности на ксилане. Стоит заметить, что наличие как одного, так и обоих GH12 доменов не увеличивает ферментативную активность по отношению к ксилоглюкану, галактоманнану и курдлану, что говорит о вкладе лишь одного GH5го домена при разложении этих субстратов (по данным из исследования Gavrilov et al., 2016).

Таблица 26. Сравнение ферментативных активностей целой МДГ и различных ее вариантов.

Версии	АМЦ	КМЦ	Целло-биоза	β -глюкан	Лихенан	Курдлан	Ксило-глюкан	Ксилан	Галактоманнан
GH5	1.97	2.7	0.54	4.93	7.01	0.39	0.88	0.27	9.2
GH5-GH12	2.5	3.4	0.64	5.65	7.02	0.39	0.88	0.29	6.3
GH5-GH12-GH12	4.9	6.7	1.36	15.93	7.44	0.5	0.94	0.25	2.09
Полная МДГ	3.05	5.9	1.04	14.18	6.75	0.38	0.95	0.23	2.2
GH12-1	0	11	0	55	29	0	0	3.11	0
GH12-2	0.13	20.76	0	188	61	0	0	0	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день известно всего лишь 38 видов из 12 родов гипертермофильных архей, разлагающих полисахариды, большинство из которых способны расти только на крахмале и его производных. Данная работа вносит вклад в расширение сведений об этой группе микроорганизмов: как на количественном уровне – было выделено 10 штаммов гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах (Рис. 57), так и на качественном – некоторые из них были детально охарактеризованы, что привело к обнаружению принципиально новых свойств.

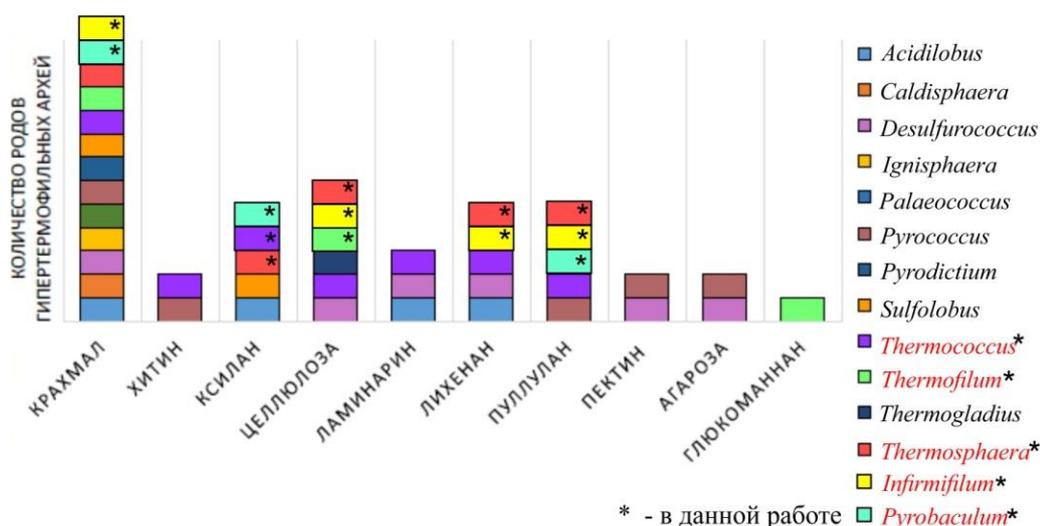


Рисунок 57. Количество гетеротрофных гипертермофильных архей, растущих на полисахаридах. (*) отмечены рода архей, для которых был показан рост в данной работе.

В ходе сравнительно-геномного и протеомного исследований были выявлены новые ферменты, участвующие в разложении полисахаридов и реконструированы пути центрального метаболизма сахаров. Биохимическая характеристика нескольких рекомбинантных гликозидаз выявила их высокую удельную активность, широкую субстратную специфичность, выдающуюся термостабильность и устойчивость к различным детергентам.

Так, в данной работе было впервые показано разложение ксилоглюкана археями на примере штамма *Thermococcus* sp. 2319x1, который также способен расти на широком спектре полисахаридов (целлюлозе, хитине, альгинате, бета-глюкане, крахмале, пуллулане). Выявлен рост и подтверждена утилизация крахмала и его производных, а также потребление моносахаридов для *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2, что показано впервые для представителей рода *Pyrobaculum*. Для штаммов *Thermosphaera* sp. 3507, 3507L и 3507L2 был показан рост на ксилане, лихенане, ксилоглюкане и крахмале, что значительно расширяет представление о гидролитическом потенциале этого рода. Кроме того, 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*, проведена реклассификация семейства и предложен новый порядок – *Thermofilales*.

Приведены доказательства роста на целлюлозе штамма *Thermofilum adornatum* 1910b. С помощью протеомного и сравнительно-геномного подходов, были выявлены белки данной археи, участвующие в разложении целлюлозы и ее остатков. Белки Cel30 и Cel45 не имеют охарактеризованных гомологов среди гликозидаз или каких-либо других ферментов. Другие две гликозидазы, Cel25 и Cel40, содержат каталитические домены из семейств GH3 и GH1, соответственно, среди которых до этого не было известно эндоглюканаз. Предполагается, что эти четыре фермента действуют синергически, позволяя *T. adornatum* 1910b эффективно разлагать целлюлозу и расти на продуктах её гидролиза.

Анализ геномов трех штаммов *Thermococcus* sp. 2319x1, *P. arsenaticum* 2319x2 и *T. adornatum* 1910b показал, что все три археи имеют гены ферментов метаболизма глюкозы. Для штаммов 2319x2 и 1910b также был обнаружен путь окисления маннозы. При этом у штаммов 2319x1 и 2319x2 остается неясным катаболизм ксилозы, поскольку в их геномах не было найдено генов, кодирующих ключевые ферменты известных путей окисления ксилозы.

Были выявлены активности нативных ферментов из *Thermococcus* sp. 2319x1, *P. arsenaticum* 2319x2 и *T. adornatum* 1910b. У всех трех штаммов внеклеточные целлюлазы/ксиланазы были заякорены на мембранах, что указывает на то, что для эффективного разложения полисахаридов данным археям нужен максимально плотный контакт с субстратом. Также было показано, что эти гликозидазы являются индуцибельными.

Гены четырех новых целлюлаз *T. adornatum* 1910b были успешно экспрессированы в *E.coli* и охарактеризованы. Оптимальными условиями для активности всех белков являются температура 80-82°C и pH 5.6. В гидролизе целлюлозы участвуют все четыре гликозидазы. Ключевыми ферментами являются Cel25 и Cel45: Cel45 является эндоглюканазой, а Cel25, имеющий в своей структуре два домена GH3, показывает свойства и эндо- и экзоглюканазы и бета-гликозидазы, благодаря способности разлагать целлобиозу. Ферменты Cel30 и Cel40, как и Cel25, проявляют экзо-, эндоглюканазную и β -гликозидазную активности, но их удельные активности меньше. Помимо целлюлозы, все 4 фермента гидролизуют β -глюкан и лихенан, при этом, наибольшую активность все белки проявляли именно по отношению к β -глюкану. Кроме того, все исследуемые белки разлагают глюкоманнан, а Cel30 и Cel45 способны разлагать ксилоглюкан.

Была выделена и детально охарактеризована уникальная широко специфичная мультидоменная гликозидаза (МДГ) *Thermococcus* sp. 2319x1, а также ее фрагменты и

индивидуальные каталитические домены (в виде индивидуальных ферментов). Показано, что все три каталитических домена являются термостабильными ферментами с отличающимися друг от друга оптимумами активности: GH5 ($T=90^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5.5$), GH12-1 ($T=100^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$) и GH12-2 ($T=90^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=9$). Для GH12-х доменов и особенно, для фермента GH12-1, показано продолжительное время полужизни при высоких температурах (в частности, время полужизни GH12-1 при 90°C составило 11 суток). Оба фермента GH12 высокоактивны и устойчивы к наличию в реакционной смеси детергентов. Для всех доменов был показан гидролиз β -глюкана, лихенана и КМЦ. Кроме того, GH5-й домен был способен катализировать гидролиз галактоманнана и ксилоглюкана. Для белка GH12-1 приведены доказательства разложения ксилана и арабиноксилана, что является новым свойством для представителей семейства GH12.

Примечательно, что кренархеота *T. adornatum* 1910b и эвриархеота *Thermococcus* sp. 2319x1 достигали схожего результата – разложения разнообразных полисахаридов за счет синергического действия нескольких гликозидаз, – только в одном случае было задействовано 4 разных белка, а в другом – один мультидоменный белок, содержащий 3 каталитических домена, отличающихся происхождением и ролью.

Суммируя вышеизложенное, можно утверждать, что использование в данной работе различных подходов, как традиционных микробиологических, молекулярно-биологических и биохимических, так омиксных и биоинформатических позволило выделить и охарактеризовать новых гипертермофильных архей-полисахаридолитиков, а также найти, выделить и охарактеризовать новые семейства гликозидаз и/или гликозидазы с новыми свойствами.

ВЫВОДЫ:

1. Выделены 10 штаммов гипертермофильных архей из родов *Pyrobaculum*, *Thermosphaera*, *Thermofilum* и *Infirmifilum*, растущих на различных олиго- и полисахаридах, что позволило расширить представление о метаболических возможностях и экологической роли представителей филума *Crenarchaeota*.
2. Подробно охарактеризованы гипертермофильные археи, растущие на полисахаридах с β -(1,4)-связью: *Thermococcus* sp. 2319x1 (впервые для эвриархей выявлен рост на ксилане и ксилоглюкане), *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2 (впервые для рода *Pyrobaculum* показан рост на полисахаридах) и *Thermofilum adornatum* 1910b (впервые для рода *Thermofilum* показан роста на целлюлозе). У всех трех штаммов были обнаружены заякоренные на мембранах внеклеточные индуцибельные целлюлазы/ксиланазы.
3. С помощью сравнительно-геномного и протеомного подходов у *Thermofilum adornatum* 1910b были обнаружены четыре целлюлазы, две из которых не относятся к известным семействам гликозидаз и вообще не имеют родственников с предсказанной функцией, а две другие относятся к семействам для которых целлюлазной активности не было показано. В геноме штамма 2319x1 обнаружен ген, кодирующий мультидоменную гликозидазу (МДГ) с уникальной доменной организацией GH5-GH12-GH12-CBM2-CBM2. Для штаммов *T. adornatum* 1910b, *Thermococcus* sp. 2319x1 и *P. arsenaticum* 2319x2 реконструированы пути катаболизма моносахаридов.
4. Четыре рекомбинантные гликозидазы из *Thermofilum adornatum* 1910b способны гидролизовать целлюлозу, играя следующие роли: Cel45 является эндоглюканазой, в то время как остальные три – более широкоспецифичными целлюлазами. Помимо целлюлозы, все 4 фермента гидролизуют β -глюкан, лихенан и глюкоманнан, Cel30 и Cel45, кроме того, еще и ксилоглюкан.
5. Рекомбинантная мультидоменная гликозидаза *Thermococcus* sp. 2319x1, ее фрагменты и отдельные каталитические домены – GH5, GH12-1 и GH12-2 – способны гидролизовать широкий спектр β -(1-4)-полисахаридов. Белок GH12-1 является самой термостабильной известной целлюлазой и в целом одним из самых термостабильных известных ферментов: время полужизни при 100°C составляет 42 часа, а при 90°C – 284.5 часов. Также три домена отличаются по субстратной специфичности, таким образом, дополняя друг друга и делая МДГ таким широкоспецифичным ферментом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

CAZymes – ферменты, которые участвуют в метаболизме углеводов

АТФ (АТР) – аденозинтрифосфорная кислота;

АДФ (АДР) – аденозиндифосфорная кислота

АМЦ – аморфная целлюлоза

ГЭЦ – гидроксиэтилцеллюлоза

ГН – гликозил-гидролаза (гликозидаза)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИПТГ – индолилтиогалактопиранозид

КМЦ – карбоксиметил целлюлоза

МАГ – геном, собранный из метагеномных данных

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

КФ (ЕС) – классификационный номер фермента

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

СПБА (АВРР) – скрининг белков по их активности (activity-based protein profiling)

ФМБ – фракция мембран-связанных белков

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонч-Осмоловская Е.А., Слесарев А.И., Мирошниченко М.Л., Светличная Т.П., и Алексеев В.А. Характеристика *Desulfurococcus amyloliticus* n. sp. – новой экстремально-термофильной археобактерии, выделенной из гидротерм Камчатки и острова Кунашир // *Микробиология*, 1988, т. 57, № 1, с. 94–101.
2. Заварзин Г.А. Развитие микробных сообществ в истории Земли // *Проблемы доантропогенной эволюции биосферы*. М.: Наука, 1993. с. 212–222.
3. Лебединский А.В., Черных Н.А., и Бонч-Осмоловская Е.А. Геносистематика микроорганизмов термальных местообитаний // *Биохимия*, 2007, т. 72, № 12, с. 1594–1609.
4. Ленинджер А. *Основы биохимии*, Москва: Мир, 1978.
5. Логинова Л.Г., Головачева Р.С., и Егорова Л.А. *Жизнь микроорганизмов при высоких температурах*, Москва: Наука, 1966.
6. Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // *Биохимия*, 2011, т. 76, № 6, с. 764–780.
7. Adam P.S., Borrel G., Brochier-Armanet C., and Gribaldo S. The growing tree of *Archaea*: new perspectives on their diversity, evolution and ecology // *ISME J.*, 2017, vol. 11, no. 11, pp. 2407–2425, doi: 10.1038/ismej.2017.122.
8. Ahmed H., Ettema, T.J.G., Tjaden, B., Geerling, A.C.M., van der Oost, J., and Siebers B. The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation // *Biochem. J.*, 2005, vol. 390, Pt 2, pp. 529–540, doi: 10.1042/BJ20041711.
9. Albers S.V., Koning S.M., Konings W.N., and Driessen A.J. Insights into ABC transport in archaea // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2004, vol.36, no. 1, pp. 5–15, doi: 10.1023/B:JOBV.0000019593.84933.e6
10. Amin K., Tranchimand S., Benvegnu T., Abdel-Razzak Z., and Chamieh H., Glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophilic archaea: Insights on their characteristics and applications in biotechnology // *Biomolecules*, 2021, vol. 11, 1557, doi: 10.3390/biom11111557.
11. Anderson I., Rodriguez J., Susanti D., Porat I., Reich C., Ulrich L.E., Elkins J.G., Mavromatis K., Lykidis A., Kim E., Thompson L.S., Nolan M., Land M., Copeland A., Lapidus A., Lucas S., Detter C., Zhulin I.B., Olsen G.J., Whitman W., Mukhopadhyay B., Bristow J., Kyripides N. Genome sequence of *Thermofilum pendens* reveals an exceptional loss of biosynthetic pathways without genome reduction // *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 8, pp. 2957–65, doi: 10.1128/JB.01949-07.

12. Ando S., Ishida H., Kosugi Y., and Ishikawa K. Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii* // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, vol. 68, no. 1, pp. 430–433, doi: 10.1128/aem.68.1.430-433.2002.
13. Andrade C.M., Aguiar W.B., and Antranikian G. Physiological aspects involved in production of xylanolytic enzymes by deep-sea hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi* // *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2001, vol. 91–93, pp. 655–669.
14. Arab H., Volker H., and Thomm M. *Thermococcus aegaeicus* sp. nov. and *Staphylothermus hellenicus* sp. nov., two novel hyperthermophilic archaea isolated from geothermally heated vents off Palaeochori Bay, Milos, Greece // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, vol. 50, Pt 6, pp. 2101–2108, doi: 10.1099/00207713-50-6-2101.
15. Atomi H., Fukui T., Kanai T., Morikawa M., and Imanaka T. Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1 // *Archaea*, 2004, vol. 1, no. 4, pp. 263–267.
16. Auchtung T.A., Takacs-Vesbach C.D., and Cavanaugh C.M. 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division "*Korarchaeota*"., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no.7, pp. 5077–5082, doi: 10.1128/AEM.00052-06.
17. Barbier G., Godfroy A., Meunier J.R., Querellou J., Cambon M.A., Lesongeur F., Grimont P.A., and Raguenes G. *Pyrococcus glycovorans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from the East Pacific Rise // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, vol. 49, Pt 4, pp. 1829–1837, doi: 10.1099/00207713-49-4-1829.
18. Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., and Pace N.R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, vol. 93, no. 17, pp. 9188–9193, doi: 10.1073/pnas.93.17.9188.
19. Baross J.A. and Deming J.W. Growth of “black smoker” bacteria at temperatures of at least 250 °C // *Nature*, 1983, vol. 303, no. 5916, pp. 423–426, doi: 10.1038/303423a0.
20. Bateman A., Martin M., O’Donovan C., Magrane M., Apweiler R., Alpi E., Antunes R., Arganiska J., Bely B., Bingley M., Bonilla C., Britto R., Bursteinas B., Chavali G., Cibrian-Uhalte E., et al., UniProt: a hub for protein information // *Nucleic Acids Res.*, 2015, vol. 43, Database issue, pp. D204–212, doi: 10.1093/nar/gku989.
21. Bauer M.W., Bylina E.J., Swanson R.V, and Kelly R.M. Comparison of a beta-glucosidase and a beta-mannosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Purification, characterization, gene cloning, and sequence analysis // *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, no. 39, pp. 23749–23755, doi: 10.1074/jbc.271.39.23749.
22. Baumeister W. and Lembcke G. Structural features of archaebacterial cell envelopes // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1992, vol. 24, no. 6, pp. 567–575.

23. Beam J.P., Jay Z.J., Kozubal M.A., and Inskeep W.P. Niche specialization of novel *Thaumarchaeota* to oxic and hypoxic acidic geothermal springs of Yellowstone National Park // *ISME J.*, 2014, vol. 8, no. 4, pp. 938–951, doi: 10.1038/ismej.2013.193.
24. Beam J.P., Jay Z.J., Schmid M.C., Rusch D.B., Romine M.F., de M Jennings R., Kozubal M.A., Tringe S.G., Wagner M., and Inskeep W.P. Ecophysiology of an uncultivated lineage of *Aigarchaeota* from an oxic, hot spring filamentous “streamer” community // *ISME J.*, 2016, vol. 10, no. 1, pp. 210–224, doi: 10.1038/ismej.2015.83.
25. Biely P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides // *Biotechnol. Adv.*, 2012, vol. 30, no. 6, pp. 1575–1588, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.04.010.
26. Birrien J.L., Zeng X., Jebbar M., Cambon-Bonavita M.A., Querellou J., Oger P., Bienvenu N., Xiao X., and Prieur D. *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, vol. 61, Pt 12, pp. 2827–2831, doi: 10.1099/ijs.0.024653-0. 1.
27. BLAST tool and database of proteins // URL: <http://www.uniprot.org/>
28. Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H.W., Stetter K.O. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C // *Extremophiles*, 1997, vol. 1, no. 1, pp. 14–21, doi: 10.1007/s007920050010.
29. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Chernych N.A., and Zavarzin G.A., *Thermoproteus uzoniensis* sp. nov., a new extremely thermophilic archaebacterium from Kamchatka continental hot springs // *Arch. Microbiol.*, 1990, vol. 154, no. 6, pp. 556–559, doi: 10.1007/BF00248836.
30. Boyce A. and Walsh G. Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 99, no. 18, pp. 7515–7525, doi: 10.1007/s00253-015-6474-8.
31. Boyd E.S., Jackson R.A., Encarnacion G., Zahn J.A., Beard T., Leavitt W.D., Pi Y., Zhang C.L., Pearson A., and Geesey G.G. Isolation, characterization, and ecology of sulfur-respiring crenarchaea inhabiting acid-sulfate-chloride-containing geothermal springs in Yellowstone National Park // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 20, pp. 6669–6677, doi: 10.1128/AEM.01321-07.
32. Bräsen C., Esser D., Rauch B., Siebers B. Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2014, vol.78, no.1, pp. 89-175. doi:10.1128/MMBR.00041-13

33. Brochier C., Gribaldo S., Zivanovic Y., Confalonieri F., and Forterre P. *Nanoarchaea*: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to *Thermococcales*? // *Genome Biol.*, 2005, vol. 6, no. 5, p. R42, doi: 10.1186/gb-2005-6-5-r42.
34. Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., and Forterre P. Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota* // *Nature reviews. Microbiology*, 2008, vol. 6, no. 3, pp. 245–252, doi: 10.1038/nrmicro1852.
35. Brock T.D., Brock K.M., Belly R.T., and Weiss R.L. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature // *Arch. Mikrobiol.*, 1972, vol. 84, no. 1, pp. 54–68.
36. Bronnenmeier K., Kern A., Liebl W., Staudenbauer W.L. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials // *Appl Environ Microbiol.*, 1995 vol.61, no.4, pp. 1399-1407, doi: 10.1128/aem.61.4.1399-1407.1995
37. Brouns S.J., Walther J., Snijders A.P., van de Werken H.J., Willems H.L., Worm P., de Vos M.G., Andersson A., Lundgren M., Mazon H.F., van den Heuvel R.H., Nilsson P., Salmon L., de Vos W.M., Wright P.C., Bernander R., van der Oost J. Identification of the missing links in prokaryotic pentose oxidation pathways: evidence for enzyme recruitment // *J. Biol. Chem.*, 2006, v. 281, no. 37, pp. 27378–27388.
38. Budgen N. and Danson M.J. Metabolism of glucose via a modified Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum* // *FEBS Lett.*, 1986, vol. 196, no. 2, pp. 207–210, doi: 10.1016/0014-5793(86)80247-2.
39. Burmeister W.P., Henrissat B., Bosso C., Cusack S., and Ruigrok R.W. Influenza B virus neuraminidase can synthesize its own inhibitor // *Structure*, 1993, vol. 1, no. 1, pp. 19–26.
40. Butt M.S., Tahir-Nadeem M., Ahmad Z., and Sultan M. Xylanases and their applications in baking industry // *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, vol. 46., no. 1, pp. 22–31.
41. Cabrera M.Á., Blamey J.M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments // *Biol Res*, 2018, vol.51, no.37, doi: org/10.1186/s40659-018-0186-3
42. Callac N., Oger P., Lesongeur F., Rattray J.E., Vannier P., Michoud G., Beauverger M., Gayet N., Rouxel O., Jebbar M., and Godfroy A. *Pyrococcus kukulkanii* sp. nov., a hyperthermophilic, piezophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, vol. 66, no. 8, pp. 3142–3149, doi: 10.1099/ijsem.0.001160.
43. Canganella F., Jones W.J., Gambacorta A., and Antranikian G. *Thermococcus guaymasensis* sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic archaea isolated from the Guaymas Basin hydrothermal vent site // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, vol. 48, Pt 4, pp. 1181–1185, doi: 10.1099/00207713-48-4-1181.

44. Cannio R., Di Prizito N., Rossi M., and Morana A. A xylan-degrading strain of *Sulfolobus solfataricus*: isolation and characterization of the xylanase activity // *Extremophiles*, 2004, vol. 8, no. 2, pp. 117–124, doi: 10.1007/s00792-003-0370-3.
45. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., ... Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature methods*, 2010, vol. 7, no. 5, pp. 335–336, doi.org/10.1038/nmeth.f.303
46. Cario A., Lormières F., Xiang X., Oger P. High hydrostatic pressure increases amino acid requirements in the piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus* // *Res. Microbiol.*, 2015, vol.166, no.9, pp. 710-716. doi:10.1016/j.resmic.2015.07.004
47. Castelle C.J., Wrighton K.C., Thomas B.C., Hug L.A., Brown C.T., Wilkins M.J., Frischkorn K.R., Tringe S.G., Singh A., Markillie L.M., Taylor R.C., Williams K.H., and Banfield J.F. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling // *Curr. Biol.*, 2015, vol. 25, no. 6, pp. 690–701, doi: 10.1016/j.cub.2015.01.014.
48. Chen I.A., Chu K., Palaniappan K., Pillay M., Ratner A., Huang J., Huntemann M., Varghese N., White J.R., Seshadri R., Smirnova T., Kirton E., Jungbluth S.P., Woyke T., Ivanova N.N., Kyrpides N.C. IMG/M v. 5.0: an integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes // *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 47, pp. 666–77, doi: 10.1093/nar/gky901.
49. Chothia C. and Lesk A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins // *EMBO J.*, 1986, vol. 5, no. 4, pp. 823–826.
50. Cijssouw T., Ramsey A.M., Lam T.T., Carbone B.E., Blanpied T.A., Biederer T. Mapping the proteome of the synaptic cleft through proximity labeling reveals new cleft proteins // *Proteomes.*, 2018, vol. 6, no. 4, pp. 48, doi:10.3390/proteomes6040048
51. Cobucci-Ponzano B., Rossi M., and Moracci M. Translational recoding in archaea // *Extremophiles*, 2012, vol. 16, no. 6, pp. 793–803, doi: 10.1007/s00792-012-0482-8.
52. Comfort D.A., Chou C.J., Connors S.B., VanFossen A.L., and Kelly R.M. Functional-genomics-based identification and characterization of open reading frames encoding alpha-glucoside-processing enzymes in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, no. 4, pp. 1281–1283, doi: 10.1128/AEM.01920-07.
53. Crennell S.J., Garman E.F., Laver W.G., Vimr E.R., and Taylor G.L. Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium* LT2) shows the same fold as an influenza

virus neuraminidase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 90, no. 21, pp. 9852–9856, doi: 10.1073/pnas.90.21.9852.

54. D'Auria S., Morana A., Febbraio F., Vaccaro C., De Rosa M., and Nucci R. Functional and structural properties of the homogeneous β -glycosidase from the extreme thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* // *Protein Expr. Purif.*, 1996, vol. 7, pp. 299–308, doi: 10.1006/prev.1996.0043.

55. Database of carbohydrate active enzymes // URL: <http://www.cazy.org/>

56. Database of metabolic pathways // URL: <http://metacyc.org/>

57. Database of protein domains and motifs // URL: <http://pfam.xfam.org/>

58. Davies G. and Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // *Structure*, 1995, vol. 3, no. 9, pp. 853–859, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9.

59. de Miguel Bouzas T., Barros-Velazquez J., and Villa T.G. Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review // *Protein Pept. Lett.*, 2006, vol. 13, no. 7, pp. 645–651.

60. de Vos W.M., Kengen S.W., Voorhorst W.G., and van der Oost J. Sugar utilization and its control in hyperthermophiles // *Extremophiles*, 1998, vol. 2, no. 3, pp. 201–205.

61. Deutschland collection of microorganisms and cell cultures // URL: <http://www.dsmz.de/>

62. Dong G., Vieille C., and Zeikus J.G. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63, no. 9, pp. 3577–3584.

63. Dyballa N., Metzger S. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels // *J Vis Exp.*, 2009, vol. 30, pp. 1431, doi: 10.3791/1431

64. Elcock A.H. The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins // *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 284, no. 2, pp. 489–502, doi: 10.1006/jmbi.1998.2159.

65. Elkins J.G., Podar M., Graham D.E., Makarova K.S., Wolf Y., Randau L., Hedlund B.P., Brochier-Armanet C., Kunin V., Anderson I., Lapidus A., Goltsman E., Barry K., Koonin E.V, Hugenholtz P., Kyrpides N., Wanner G., Richardson P., Keller M., Stetter K.O. A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the *Archaea* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, vol. 105, no. 23, pp. 8102–8107, doi: 10.1073/pnas.0801980105.

66. Ferrer M., Martínez-Martínez M., Bargiela R., Streit W.R., Golyshina O.V., and Golyshin P.N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends // *Microbial biotechnology*, 2016, v. 9, no. 1, pp. 22–34. doi: 10.1111/1751-7915.12309

67. Fiala G. and Stetter K.O. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C // *Arch. Microbiol.*, 1986, vol. 145, pp. 56–61, doi: 10.1007/BF00413027.
68. Fiala G., Stetter K.O., Jannasch H.W., Langworthy T.A., and Madon J. *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98 °C // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1986, vol. 8, pp. 106–113, doi: 10.1016/S0723-2020(86)80157-6.
69. Fitz-Gibbon S.T., Ladner H., Kim U.J., Stetter K.O., Simon M.I., and Miller J.H. Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, vol. 99, no. 2, pp. 984–989, doi: 10.1073/pnas.241636498. 56.
70. Forse G.J., Ram N., Banatao D.R., et al. Synthetic symmetrization in the crystallization and structure determination of CelA from *Thermotoga maritime* // *Protein Sci.*, 2011, vol. 20, no.1, pp. 168-178, doi: 10.1002/pro.550
71. Frank Y.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Banks D., Gerasimchuk A.L., Podosokorskaya O.A., Merkel A.Y., Chernyh N.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. Stable and variable parts of microbial community in Siberian deep subsurface thermal aquifer system revealed in a long-term monitoring study // *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, 2101. doi: 10.3389/fmicb.2016.02101.
72. Frey P.A. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose // *J FASEB.*, 1996, vol. 10, no. 4, pp. 461–70, doi: 10.1096/fasebj.10.4.8647345.
73. Gacesa P. Alginate-modifying enzymes: A proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases // *FEBS Lett.*, 1987, vol. 212, no. 2, pp. 199–202, doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81344-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81344-3).
74. Garrity G.M., and Holt J.G. *Euryarchaeota* phyl. nov., *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.*, Whitman W.B., Rainey F., Kämpfer P., Trujillo M., Chun J., DeVos P., Hedlund B., Dedysh S., Eds., John Wiley & Sons, 2015, vol. 1, doi: 10.1002/9781118960608.pbm00014.
75. Garron M.-L. and Cygler M. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases // *Glycobiology*, 2010, vol. 20, no. 12, pp. 1547–1573, doi: 10.1093/glycob/cwq122. 59.
76. GenomeNet is a Japanese network of database and computational services for genome research and related research areas in biomedical sciences // URL: <http://www.genome.jp/>
77. Gihring T.M., Moser D.P., Lin L.H., Davidson M., Onstott T.C., Morgan L, Milleson M., Kieft T.L., Trimarco E., Balkwill D.L. & Dollhopf M.E. The distribution of microbial taxa in

the subsurface water of the Kalahari Shield, South Africa // *J. Geomicrobiol.*, 2006, vol. 23, no.6, pp. 415-430, doi: 10.1080/01490450600875696

78. Ghai R., Pasic L., Fernandez A.B., Martin-Cuadrado A.B., Mizuno C.M., McMahon K.D., Papke R.T., Stepanauskas R., Rodriguez-Brito B., Rohwer F., Sanchez-Porro C., Ventosa A., and Rodriguez-Valera F. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments // *Sci. Rep.*, 2011, vol. 1, p. 135, doi: 10.1038/srep00135. 1.

79. Gonzalez J.M., Sheckells D., Viebahn M., Krupatkina D., Borges K.M., and Robb F.T. *Thermococcus waiotapuensis* sp. nov., an extremely thermophilic archaeon isolated from a freshwater hot spring // *Arch. Microbiol.*, 1999, vol. 172, no. 2, pp. 95–101.

80. Goodman I., Fouts J.R., Bresnick E., Menegas R. and Hitchings G.H. A mammalian thioglucosidase // *Science*, 1959, vol. 130, no. 3373, pp. 450–451.

81. Graham J.E., Clark M.E., Nadler D.C., Huffer S., Chokhawala H.A., Rowland S.E., et al. Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment // *Nat Commun.* 2011, vol. 2, pp. 375–379, doi: 10.1038/ncomms1373.

82. Green M.R. & Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition), Volume 1, 2 & 3, 4th Edition, 2019. ISBN-10: 1936113422.

83. Grogan D.W. Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains // *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171, no. 12, pp. 6710–6719, doi: 10.1128/jb.171.12.6710-6719.1989.

84. Grogan D., Palm P., and Zillig W. Isolate B12, which harbours a virus-like element, represents a new species of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*, *Sulfolobus shibatae*, sp. nov. // *Arch. Microbiol.*, 1990, vol. 154, no. 6, pp. 594–599.

85. Gueguen Y., Voorhorst W.G., van der Oost J., and de Vos W.M. Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3- glucanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* // *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 50, pp. 31258–31264, doi: 10.1074/jbc.272.50.31258.

86. Guy L. and Ettema T.J.G. The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes // *Trends Microbiol.*, 2011, vol. 19, no. 12, pp. 580–587, doi: 10.1016/j.tim.2011.09.002.

87. Hall T., BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 1999, vol. 41, pp. 95–98, doi: 10.1021/bk-1999-0734.ch008. 70.

88. Hancock S.M. and Withers S.G. *Glycosidases: Functions, Families and Folds* // *eLS*, 2007, doi: 10.1002/9780470015902.a0020548.pub2.

89. He Z.G., Zhong H., Li Y. *Acidianus tengchongensis* sp. nov., a new species of acidothermophilic archaeon isolated from an acidothermal spring // *Curr Microbiol.*, 2004, vol. 48, no. 2, pp. 159–163, doi:10.1007/s00284-003-4155-9.
90. Henrissat B. and Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J.*, 1993, vol. 293, Pt 3, pp. 781–788, doi: 10.1042/bj2930781.
91. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J.*, 1991, vol. 280, Pt 2, pp. 309–316, doi: 10.1042/bj2800309.
92. Henrissat B., Claeysens M., Tomme P., Lemesle L., and Mornon J.P. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis // *Gene*, 1989, vol. 81, 83–95.
93. Hensel R., Matussek K., Michalke K., Tacke L., Tindall B.J., Kohlhoff M., Siebers B., and Dielenschneider J. *Sulfophobococcus zilligii* gen. nov., spec. nov. a novel hyperthermophilic archaeum isolated from hot alkaline springs of Iceland // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1997, vol. 20, pp. 102–110, doi: 10.1016/S0723-2020(97)80054-9.
94. Huber R., Dyba D., Huber H., Burggraf S., and Rachel R. Sulfur-inhibited *Thermosphaera aggregans* sp. nov., a new genus of hyperthermophilic archaea isolated after its prediction from environmentally derived 16S rRNA sequences // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, vol. 48, no. 1, pp. 31–38, doi: 10.1099/00207713-48-1-31.
95. Huber R., Sacher M., Vollmann A., Huber H., and Rose D. Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, vol. 23, no. 3, pp. 305–314, doi: 10.1016/S0723-2020(00)80058-2.
96. Huber R., Stöhr J., Hohenhaus S., Rachel R., Burggraf S., Jannasch H.W., and Stetter K.O. *Thermococcus chitonophagus* sp. nov., a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal vent environment // *Arch. Microbiol.*, 1995, vol. 164, pp. 255–264, doi: 10.1007/BF02529959.
97. Huber R., Stotters P., Cheminee J.L., Richnow H.H., and Stetter K.O. Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open-sea plume of erupting Macdonald Seamount // *Nature*, 1990, vol. 345, no. 6271, pp. 179–182, doi: 10.1038/345179a0. 80.
98. Hugenholtz P., Goebel B.M., and Pace N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity // *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, no. 18, pp. 4765–4774, doi: 10.1128/JB.180.18.4765-4774.1998.
99. Hwang S., Choi K.H., Yoon N., and Cha J. Improvement of a *Sulfolobus-E. coli* shuttle vector for heterologous gene expression in *Sulfolobus acidocaldarius* // *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 25, no. 2, pp. 196–205.

100. Inagaki F, Hinrichs K.U, Kubo Y, Bowles M.W, Heuer V.B, HongInagaki W.L, et al. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor // *Science*. 2015, vol. 349, pp. 420–4. doi: 10.1126/science.aaa6882.
101. Imam S., Greene R.V., and Hockridge M.E. Zymographic analyses of carboxymethylcellulases secreted by the bacterium from wood-boring marine shipworms // *Biotechnol. Tech.*, 1993, vol. 7, pp. 579–584, doi: 10.1007/BF00156333.
102. Imanaka T., Fukui T., and Fujiwara S. Chitinase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 // *Methods Enzymol.*, 2001, vol. 330, pp. 319–329.
103. Itoh T., Suzuki K., and Nakase T. *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, vol. 48, Pt 3, pp. 879–887, doi: 10.1099/00207713-48-3-879.
104. Itoh T., Suzuki K., and Nakase T. *Vulcanisaeta distributa* gen. nov., sp. nov., and *Vulcanisaeta souniana* sp. nov., novel hyperthermophilic, rod-shaped crenarchaeotes isolated from hot springs in Japan // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, vol. 52, Pt 4, pp. 1097–1104, doi: 10.1099/00207713-52-4-1097.
105. Itoh T., Suzuki K., Sanchez P.C., and Nakase T. *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt Maquiling, Philippines // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, vol. 53, Pt 4, pp. 1149–1154, doi: 10.1099/ijs.0.02580-0.
106. Itoh T., Suzuki K., Sanchez P.C., and Nakase T. *Caldivirga maquilingensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, vol. 49, Pt 3, pp. 1157–1163, doi: 10.1099/00207713-49-3-1157.
107. Jain S., Caforio A., and Driessen A.J.M. Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids // *Front. Microbiol.*, 2014, vol. 5, p. 641, doi: 10.3389/fmicb.2014.00641.
108. Jan R.L., Wu J., Chaw S.M., Tsai C.W., and Tsen S.D. A novel species of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, vol. 49, Pt 4, pp. 1809–1816, doi: 10.1099/00207713-49-4-1809.
109. Jay Z.J., Beam J.P., Kozubal M.A., Jennings R. de M., Rusch D.B., Inskeep W.P., The distribution, diversity and function of predominant Thermoproteales in high-temperature environments of Yellowstone National Park // *Environ. Microbiol.*, 2016 vol. 18, no. 12, pp. 4755–69, doi: 10.1111/1462-2920.13366.
110. Jiao Y.L., Wang S.J., Lv M.S., Xu J.L., Fang Y.W., and Liu S. A GH57 family amylopullulanase from deep-sea *Thermococcus siculi*: expression of the gene and characterization of the recombinant enzyme // *Curr. Microbiol.*, 2011, vol. 62, no. 1, pp. 222–228, doi: 10.1007/s00284-010-9690-6.

111. John E.St, Liu Y., Podar M., Stott M.B., Meneghin J., Chen Z., Lagutin K., Mitchell K., and Reysenbach A.L. A new symbiotic nanoarchaeote (*Candidatus Nanoclepta minutus*) and its host (*Zestosphaera tikiterensis* gen. nov., sp. nov.) from a New Zealand hot spring // *Syst. Appl. Microbiol.*, 2019, vol. 42, no. 1, pp. 94–106, doi: 10.1016/j.syapm.2018.08.005. 190.
112. Johnsen U. and Schönheit P. Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* // *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 18, pp. 6198–6207, doi: 10.1128/JB.186.18.6198-6207.2004.
113. Johnsen U., Dambeck M., Zaiss H., Fuhrer T., Soppa J., Sauer U., and Schönheit P. D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* // *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 40, pp. 27290–27303, doi: 10.1074/jbc.M109.003814.
114. Johnsen U., Selig M., Xavier K.B., Santos H., and Schönheit P. Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus* // *Arch. Microbiol.*, 2001, vol. 175, no. 1, pp. 52–61.
115. Jorgensen B.B. and Bak F. Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (kattogat, denmark) // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, no. 3, pp. 847–856.
116. Jorgensen S.L., Hannisdal B., Lanzen A., Baumberger T., Flesland K., Fonseca R., Ovreas L., Steen I.H., Thorseth I.H., Pedersen R.B., and Schleper C. Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, vol. 109, no. 42, pp. E2846-55, doi: 10.1073/pnas.1207574109.
117. Jung J.H., Seo D.H., Holden J.F., and Park C.S. Maltose-forming alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. ST04 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 98, no. 5, pp. 2121–2131, doi: 10.1007/s00253-013-5068-6. 100.
118. Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Banks D., Pimenov N.V., Frank Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V. A metagenomic window into the 2-km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition // *FEMS Microbiol Ecol.*, 2018, vol. 94, no. 10, fiy152, doi: 10.1093/femsec/fiy152.
119. Kall L., Krogh A., and Sonnhammer E.L.L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server // *Nucleic Acids Res.*, 2007, vol. 35, no. Web Server issue, pp. W429-32, doi: 10.1093/nar/gkm256. 102.
120. Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // *ISME J*, 2019, vol. 13, pp. 1947–1959. doi:10.1038/s41396-019-0402-3.

121. Kashefi K., Lovley D.R. Extending the upper temperature limit for life // *Scien.*, 2003, vol. 301, no.5635, pp. 934, doi: 10.1126/science.1086823.
122. Kashefi K., Tor J.M., Holmes D.E., Gaw Van Praagh C.V, Reysenbach A.L., and Lovley D.R. *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, vol. 52, Pt 3, pp. 719–728, doi: 10.1099/00207713-52-3-719. 103.
123. Kato S., Ohnishi M., Nagamori M., Yuki M., Takashina T., Ohkuma M., Takashi Itoh T. *Conexivisphaera calida* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur- and iron-reducing archaeon, and proposal of *Conexivisphaeraceae* fam. nov., *Conexivisphaerales* ord. nov., and *Conexivisphaeria* class. nov. in the phylum *Thaumarchaeota* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2021, vol. 71, no. 1, doi:10.1099/ijsem.0.004595.
124. Kengen S., Stams A.J.M., and De Vos W. Sugar metabolism of hyperthermophiles // *FEMS Microbiol. Rev.*, 1996, vol. 18, pp. 119–137, doi: 10.1111/j.1574-6976.1996.tb00231.x.107.
125. Kengen S.W., Luesink E.J., Stams A.J., and Zehnder A.J. Purification and characterization of an extremely thermostable beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* // *Eur. J. Biochem.*, 1993, vol. 213, no. 1, pp. 305–312.
126. Kevbrin V.V., Zavarzin G.A. Effect of sulfur-compounds on the growth of the halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum* // *Microbiololgy*, 1999, vol. 61., no. 5, pp. 812–817.
127. Kim M., Oh H., Park S., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014, vol. 64, no. 2, pp. 346–51, doi: 10.1099/ijms.0.059774-0.
128. Klingl A. S-layer and cytoplasmic membrane - exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes // *Front. Microbiol.*, 2014, vol. 5, 624, doi: 10.3389/fmicb.2014.00624.
129. Kobayashi T., Kwak Y.S., Akiba T., Kudo T., and Horikoshi K. *Thermococcus profundus* sp. nov. A new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1994, vol. 17, pp. 232–236, doi: 10.1016/S0723-2020(11)80013-5.
130. Kochetkova T.V., Zayulina K.S., Zhigarkov V.S., Minaev N.V., Chichkov B.N., Novikov A.A., Toshchakov S.V., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. *Tepidiforma bonchosmolovskayae* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic *Chloroflexi* bacterium from a Chukotka hot spring (Arctic, Russia), representing a novel class, Tepidiformia, which includes the previously uncultivated lineage OLB14 // *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2020, vol. 70, no. 2, pp. 1192-1202, doi:10.1099/ijsem.0.003902.

131. Konstantinidis K.T., Rossello-Mora R., Amann R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy // *ISME J.*, 2017, vol. 11, pp. 2399–406, doi: 10.1038/ismej.2017.113
132. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes // *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, no.18, pp.6258–64, doi: 10.1128/JB.187.18.6258.
133. Koshland D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions // *Biol Rev. Camb. Philos. Soc.*, 1953, vol. 28, pp. 416–436.
134. Kouril T., Wieloch P., Reimann J., Wagner M., Zaparty M., Albers S.V., Schomburg D., Ruoff P., and Siebers B. Unraveling the function of the two Entner-Doudoroff branches in the thermoacidophilic Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 // *FEBS J.*, 2013, vol. 280, no. 4, pp. 1126–1138, doi: 10.1111/febs.12106.
135. Krogh A., Larsson B., von Heijne G., and Sonnhammer E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes // *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 305, no. 3, pp. 567–580, doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.
136. Krüger A., Schäfers C., Schröder C., and Antranikian G. Towards a sustainable biobased industry – Highlighting the impact of extremophiles // *N. Biotechnol.*, 2018, vol. 40, pp. 144–153, doi: 10.1016/j.nbt.2017.05.002.
137. Kubo K., Lloyd K.G., Biddle J.F., Amann R., Teske A., and Knittel K. Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments // *ISME J.*, 2012, vol. 6, no. 10, pp. 1949–1965, doi: 10.1038/ismej.2012.37.
138. Kufner K. and Lipps G. Construction of a chimeric thermoacidophilic beta-endoglucanase // *BMC Biochem.*, 2013, vol. 14, p. 11, doi: 10.1186/1471-2091-14-11.116.
139. Kuhad R.C., Gupta R., and Singh A. Microbial cellulases and their industrial applications // *Enzyme research*, 2011, 280696, doi: 10.4061/2011/280696.
140. Kulak N.A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., Mann M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells // *Nat Methods.*, 2014, vol. 11, no.3, pp. 319-324, doi: 10.1038/nmeth.2834.
141. Kurosawa N., Itoh Y.H., Iwai T., Sugai A., Uda I., Kimura N., Horiuchi T., and Itoh T. *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, vol. 48 Pt 2, pp. 451–456, doi: 10.1099/00207713-48-2-451.
142. McNeil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P. Structure and function of the primary cell walls of plants // *Annual Review of Biochemistry*, 1984, vol. 53, pp. 625–663.
143. Laderman K.A., Asada K., Uemori T., Mukai H., Taguchi Y., Kato I., and Anfinsen C.B. Alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Cloning

and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, no. 32, pp. 24402–24407.

144. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–6855.

145. Lairson L.L., Henrissat B., Davies G.J., and Withers S.G. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms // *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, vol. 77, pp. 521–555, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322.

146. Lebbink J.H.G. Molecular characterisation of the thermostability and catalytic properties of enzymes from hyperthermophiles // *Thesis Wageningen University*, 1999. ISBN: 90-5808-093-5.

147. Lee H.S., Kang S.G., Bae S.S., Lim J.K., Cho Y., Kim Y.J., Jeon J.H., Cha S.S., Kwon K.K., Kim H.T., Park C.J., Lee H.W., Kim S.I., Chun J., Colwell R.R., Kim S.J., Lee J.-H. The complete genome sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals a mixed heterotrophic and carboxydrotrophic metabolism // *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 22, pp. 7491–7499, doi: 10.1128/JB.00746-08.

148. Liebl W., Ruile P., Bronnenmeier K., Riedel K., Lottspeich F., Greif I. Analysis of a *Thermotoga maritima* DNA fragment encoding two similar thermostable cellulases, CelA and CelB, and characterization of the recombinant enzymes // *Microbiology*, 1996, vol. 142, no. 9, pp. 2533-2542, doi: 10.1099/00221287-142-9-2533

149. Leigh J.A., Albers S.V., Atomi H., and Allers T. Model organisms for genetics in the domain *Archaea*: methanogens, halophiles, *Thermococcales* and *Sulfolobales* // *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011, vol. 35, no. 4, pp. 577–608, doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00265.x.

150. Leis B., Heinze S., Angelov A., Pham V.T.T., Thürmer A., Jebbar M., Golyshin P.N., Streit W.R., Daniel R., Liebl W. Functional screening of hydrolytic activities reveals an extremely thermostable cellulase from a deep-sea archaeon // *Front Bioeng Biotechnol.*, 2015, vol. 3, no. 95, doi: 10.3389/fbioe.2015.00095.

151. Letsididi R., Hassanin H.A., Koko M.Y., Zhang T., Jiang B., and Mu W. Lactulose production by a thermostable glycoside hydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Caldivirga maquilingensis* IC-167 // *J. Sci. Food Agric.*, 2018, vol. 98, no. 3, pp. 928–937, doi: 10.1002/jsfa.8539.

152. Li X., Li D., and Park K.H. An extremely thermostable amylopullulanase from *Staphylothermus marinus* displays both pullulan- and cyclodextrin-degrading activities // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, vol. 97, no. 12, pp. 5359–5369, doi: 10.1007/s00253-012-4397-1.

153. Li X.G., Tang H.Z., Zhang W.J., Qi X.Q., Qu Z.G., Xu J., and Wu L.F. *Thermococcus aciditolerans* sp. nov., a piezotolerant, hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea

hydrothermal vent chimney in the Southwest Indian Ridge // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2021, vol. 71, no. 8, doi:10.1099/ijsem.0.004934.

154. Lim J.K., Kim Y.J., Yang J.A., Namirimu T., Yang S.H., Park M.J., Kwon Y.M., Lee H.S., Kang S.G., Lee J.H., and Kwon K.K. *Thermococcus indicus* sp. nov., a Fe(III)-reducing hyperthermophilic archaeon isolated from the Onnuri Vent Field of the Central Indian Ocean ridge // *J Microbiol.*, 2020, vol. 58, no. 4, pp. 260–267, doi: 10.1007/s12275-020-9424-9.

155. List of archaea // URL: <http://www.archaea.ucsc.edu/>

156. List of prokaryotic names // URL: <http://www.bacterio.net/>

157. Littlechild J.A. Enzymes from extreme environments and their industrial applications // *Front Bioeng Biotechnol.*, 2015, vol. 3, no. 161, doi:10.3389/fbioe.2015.00161.

158. Lloyd K.G., Schreiber L., Petersen D.G., Kjeldsen K.U., Lever M.A., Steen A.D., Stepanauskas R., Richter M., Kleindienst S., Lenk S., Schramm A., and Jorgensen B.B. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins // *Nature*, 2013, vol. 496, no. 7444, pp. 215–218, doi: 10.1038/nature12033.

159. Lopez C.G., Rogers S.E., Colby R.H., Graham P., Cabral J.T. Structure of sodium carboxymethyl cellulose aqueous solutions: A SANS and rheology study // *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.*, 2015, vol. 53, no. 7, pp. 492–501, doi:10.1002/polb.23657.

160. Lv J., Wang S., Zeng C., Huang Y., and Chen X. Construction of a shuttle expression vector with a promoter functioning in both halophilic *Archaea* and *Bacteria* // *FEMS Microbiol. Lett.*, 2013, vol. 349, doi: 10.1111/1574-6968.12278.

161. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [published correction appears in *Microbiol Mol Biol Rev* 2002 Dec; 66(4):739 // *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2002, vol. 66, no. 3, pp. 506-577, doi: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002

162. Mardanov A.V., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., and Skryabin K.G. Complete genome sequence of the thermoacidophilic crenarchaeon *Thermoproteus uzoniensis* 768-20 // *J. Bacteriol.*, 2011, vol. 193, no. 12, pp. 3156–3157, doi: 10.1128/JB.00409-11.

163. Mardanov A.V., Kochetkova T.V., Beletsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., and Skryabin K.G. Complete genome sequence of the hyperthermophilic cellulolytic crenarchaeon “*Thermogladius cellulolyticus*” 1633 // *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 16, pp. 4446–4447, doi: 10.1128/JB.00894-12.

164. Mardanov A.V., Ravin N.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., and Skryabin K.G. Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome

analysis // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 13, pp. 4580–4588, doi: 10.1128/AEM.00718-09.

165. Marsh R.M. and Norris P.R. The isolation of some thermophilic, autotrophic, iron- and sulphur-oxidizing bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.*, 1983, vol. 17, no. 1, pp. 311–315.

166. Maurelli L., Giovane A., Esposito A., Moracci M., Fiume I., Rossi M., and Morana A. Evidence that the xylanase activity from *Sulfolobus solfataricus* Oalpha is encoded by the endoglucanase precursor gene (sso1354) and characterization of the associated cellulase activity // *Extremophiles*, 2008, vol. 12, no. 5, pp. 689–700, doi: 10.1007/s00792-008-0175-5.

167. McCarter J.D. and Withers S.G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis // *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1994, vol. 4, no. 6, pp. 885–892.

168. Medina-Chávez N.O. and Travisano M. Archaeal communities: the microbial phylogenomic frontier // *Front. Genet.*, 2022, vol. 12, pp. 1–13, doi: 10.3389/fgene.2021.693193.

169. Melendez-Hevia E., Waddell T.G., Heinrich R., and Montero F. Theoretical approaches to the evolutionary optimization of glycolysis--chemical analysis // *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 244, no. 2, pp. 527–543.141.

170. Melo-Silveira R.F., Fidelis G.P., Costa M.S.S.P, Telles C.B.S., Dantas-Santos N., de Oliveira Elias S., Ribeiro V.B., Barth A.L., Macedo A.J., Leite E.L., Rocha H.A.O. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs // *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, vol. 13, no. 1, pp. 409–26.

171. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Anal. Chem.*, 1959, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, doi: 10.1021/ac60147a030.

172. Minegishi H., Shimane Y., Echigo A., Ohta Y., Hatada Y., Kamekura M., Maruyama T., and Usami R. Thermophilic and halophilic beta-agarase from a halophilic archaeon *Halococcus* sp. 197A // *Extremophiles*, 2013, vol. 17, no. 6, pp. 931–939, doi: 10.1007/s00792-013-0575-z.

173. Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Neuner A., Kostrikina N.A., Chernykh N.A., and Alekseev V.A. *Thermococcus stetteri* sp. nov., a new extremely thermophilic marine sulfur-metabolizing archaeobacterium // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1989, vol. 12, no. 3, pp. 257–262, doi: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(89\)80071-2](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(89)80071-2).

174. Miroshnichenko M.L., Gongadze G.M., Rainey F.A., Kostyukova A.S., Lysenko A.M., Chernykh N.A., and Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermococcus gorgonarius* sp. nov. and *Thermococcus pacificus* sp. nov.: heterotrophic extremely thermophilic archaea from New Zealand submarine hot vents // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, vol. 48 Pt 1, pp. 23–29, doi: 10.1099/00207713-48-1-23.

175. Miroshnichenko M.L., Hippe H., Stackebrandt E., Kostrikina N.A., Chernykh N.A., Jeanthon C., Nazina T.N., Belyaev S.S., and Bonch-Osmolovskaya E.A. Isolation and

characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir // *Extremophiles*, 2001, vol. 5, no. 2, pp. 85–91.

176. Moser D.P., Gihring T.M., Brockman F.J., Fredrickson J.K., Balkwill D.L., Dollhopf M.E., Lollar B.S., Pratt L.M., Boice E., Southam G., Wanger G., Baker B.J., Pfiffner S.M., Lin L.H., and Onstott T.C. *Desulfotomaculum* and *Methanobacterium* spp. dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, no. 12, pp. 8773–8783. doi:10.1128/AEM.71.12.8773-8783.2005.

177. Nakagawa S., Takai K., Horikoshi K., and Sako Y. *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, vol. 54, no. Pt 2, pp. 329–335, doi: 10.1099/ijs.0.02826-0.

178. Narasingarao P., Podell S., Ugalde J.A., Brochier-Armanet C., Emerson J.B., Brocks J.J., Heidelberg K.B., Banfield J.F., and Allen E.E. *De novo* metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of *Archaea* in hypersaline microbial communities // *ISME J.*, 2012, vol. 6, no. 1, pp. 81–93, doi: 10.1038/ismej.2011.78.

179. NCBI BLAST tools // URL:<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

180. Nercessian O., Reysenbach A.L., Prieur D., and Jeanthon C. Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 degrees N) // *Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 5, no. 6, pp. 492–502.

181. Nesbø C.L., Dlutek M., Zhaxybayeva O., and Doolittle W.F. Evidence for existence of "mesotogas," members of the order *Thermotogales* adapted to low-temperature environments // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 7, pp. 5061–5068, doi: 10.1128/AEM.00342-06.

182. Neuner A., Jannasch H.W., Belkin S., and Stetter K.O. *Thermococcus litoralis* sp. nov.: A new species of extremely thermophilic marine archaeobacterial // *Arch. Microbiol.*, 1990, vol. 153, pp. 205–207, doi: 10.1007/BF00247822.152.

183. Niederberger T.D., Gotz D.K., McDonald I.R., Ronimus R.S., and Morgan H.W. *Ignisphaera aggregans* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic crenarchaeote isolated from hot springs in Rotorua and Tokaanu, New Zealand // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, vol. 56, Pt 5, pp. 965–971, doi: 10.1099/ijs.0.63899-0.

184. Nunn C.E.M., Johnsen U., Schonheit P., Fuhrer T., Sauer U., Hough D.W., and Danson M.J. Metabolism of pentose sugars in the hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius* // *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 44, pp. 33701–33709, doi: 10.1074/jbc.M110.146332.

185. Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J., Nishi S., Sugahara J., Kazama H., Chee G.J., Hattori M., Kanai A., Atomi H., Takai K., and Takami H. Insights into the evolution of *Archaea* and

eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group // *Nucleic Acids Res.*, 2011, vol. 39, no. 8, pp. 3204–3223, doi: 10.1093/nar/gkq1228.

186. Öner E.T., Hernández L., and Combie J. Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects // *Biotechnol. Adv.*, 2016, vol. 34, no. 5, pp. 827–844, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.002.

187. Osburn M.R. and Amend J.P. *Thermogladius shockii* gen. nov., sp. nov., a hyperthermophilic crenarchaeote from Yellowstone National Park, USA // *Arch. Microbiol.*, 2011, vol. 193, no. 1, pp. 45–52, doi: 10.1007/s00203-010-0639-8.

188. Park Y.U., Jung J.H., Seo D.H., Jung D.H., Kim J.H., Seo E.J., Baek N.I., and Park C.S. GH57 amylopullulanase from *Desulfurococcus amylolyticus* JCM 9188 can make highly branched cyclodextrin via its transglycosylation activity // *Enzyme Microb. Technol.*, 2018, vol. 114, pp. 15–21, doi: 10.1016/j.enzmictec.2018.03.005.

189. Parks D.H., Rinke C., Chuvochina M., Chaumeil P.A., Woodcroft B.J., Evans P.N., Hugenholtz P., Tyson G.W. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life // *Nat. Microbiol.*, 2017, vol. 2, no. 11, pp. 1533–42, doi: 10.1038/s41564-017-0083-5.

190. Peptide predictions // URL: <http://www.cbs.dtu.dk/>

191. Perevalova A.A., Bidzhieva S.K., Kublanov I.V., Hinrichs K.U., Liu X.L., Mardanov A.V., Lebedinsky A.V., and Bonch-Osmolovskaya E.A. *Fervidicoccus fontis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of *Fervidicoccaceae* fam. nov. and *Fervidicoccales* ord. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, vol. 60, Pt 9, pp. 2082–2088, doi: 10.1099/ijs.0.019042-0.

192. Perevalova A.A., Svetlichny V.A., Kublanov I.V., Chernyh N.A., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., and Bonch-Osmolovskaya E.A. *Desulfurococcus fermentans* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon from a Kamchatka hot spring, and emended description of the genus *Desulfurococcus* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005, vol. 55, no. Pt 3, pp. 995–999, doi: 10.1099/ijs.0.63378-0.

193. Pester M., Schleper C., and Wagner M. The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology // *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011, vol. 14, no. 3, pp. 300–306, doi: 10.1016/j.mib.2011.04.007.

194. Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., and Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions // *Nature methods*, 2011, vol. 8, no. 10. United States, pp. 785–786, doi: 10.1038/nmeth.1701.

195. Phobius. A combined transmembrane topology and signal peptide predictor // URL: <http://phobius.sbc.su.se/>

196. Pley U., Schipka J., Gambacorta A., Jannasch H.W., Fricke H., Rachel R., and Stetter K.O. *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C // *Syst Appl Microbiol*, 1991, vol. 14, doi: 10.1016/S0723-2020(11)80376-0.167.
197. Podar M., Makarova K.S., Graham D.E., Wolf Y.I., Koonin E.V., Reysenbach A.L. Insights into archaeal evolution and symbiosis from the genomes of a nanoarchaeon and its inferred crenarchaeal host from Obsidian Pool, Yellowstone National Park // *Biol. Direct.*, 2013, vol. 8, no. 9, doi:10.1186/1745-6150-8-9168.
198. Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae* // *Environ. Microbiol.*, 2013, vol. 15, no. 6, pp. 1759–1771, doi: 10.1111/1462-2920.12067.
199. Pollo S.M.J., Zhaxybayeva O., and Nesbø C.L. Insights into thermoadaptation and the evolution of mesophily from the bacterial phylum *Thermotogae* // *Can. J. Microbiol.*, 2015, vol. 61, no. 9, pp. 655–670, doi: 10.1139/cjm-2015-0073.
200. Pramanik S., Semenova M.V., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Korotkova O., Sinitsyn A.P., and Davari M.D. An engineered cellobiohydrolase I for sustainable degradation of lignocellulosic biomass // *Biotechnol. Bioeng.*, 2021, vol. 118, no. 10, pp. 4014–4027, doi: 10.1002/bit.27877.
201. Prokofeva M.I., Kostrikina N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Lysenko A.M., Lebedinsky A.V., and Bonch-Osmolovskaya E.A. Isolation of the anaerobic thermoacidophilic crenarchaeote *Acidilobus saccharovorans* sp. nov. and proposal of *Acidilobales* ord. nov., including *Acidilobaceae* fam. nov. and *Caldisphaeraceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, vol. 59, no. Pt 12, pp. 3116–3122, doi: 10.1099/ijs.0.010355-0.
202. Prokofeva M.I., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Kuznetsov B.B., Tourova T.P., and Bonch-Osmolovskaya E.A. *Acidilobus aceticus* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic thermoacidophilic archaeon from continental hot vents in Kamchatka // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, vol. 50, Pt 6, pp. 2001–2008, doi: 10.1099/00207713-50-6-2001.
203. QServer: QUalitative BIClustering server // URL: <http://csbl.bmb.uga.edu/>
204. Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) // URL: <https://www.thermoFisher.com/order/catalog/product/Q33211> -
205. Rapid Annotation using Subsystem Technology // URL: <http://rast.nmpdr.org/>

206. Reher M., Fuhrer T., Bott M., and Schonheit P. The nonphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-keto-3-deoxygluconate-specific aldolase // *J. Bacteriol.*, 2010, vol. 192, no. 4, pp. 964–974, doi: 10.1128/JB.01281-09.
207. Sakai H.D. and Kurosawa N. *Saccharolobus caldissimus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic iron-reducing hyperthermophilic archaeon isolated from an acidic terrestrial hot spring, and reclassification of *Sulfolobus solfataricus* as *Saccharolobus solfataricus* comb. nov. and *Sulfolobus shibatae* as *Saccharolobus shibatae* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 68, no. 4, pp. 1271–1278, doi: 10.1099/ijsem.0.002665.175.
208. Sakai H.D. and Kurosawa N. *Sulfodiicoccus acidiphilus* gen. nov., sp. nov., a sulfur-inhibited thermoacidophilic archaeon belonging to the order *Sulfolobales* isolated from a terrestrial acidic hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017, vol. 67, no. 6, pp. 1880-1886, doi:10.1099/ijsem.0.001881.
209. Schroder C., Elleuche S., Blank S., and Antranikian G. Characterization of a heat-active archaeal beta-glucosidase from a hydrothermal spring metagenome // *Enzyme Microb. Technol.*, 2014, vol. 57, pp. 48–54, doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.01.010.
210. Schulein M. Protein engineering of cellulases // *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, vol. 1543, no. 2, pp. 239–252.
211. Schut G., Lipscomb G.L., Han Y., Notey J., Kelly R.M., and Adams M.M.W. The Order *Thermococcales* and the Family *Thermococcaceae* // In: *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, 2014, pp. 363–383, doi: 10.1007/978-3-642-38954-2_324.
212. Schwarz W.H., Bronnenmeier K., Grabnitz F., and Staudenbauer W.L. Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage beta-glucans // *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 164, no. 1, pp. 72–77.
213. Scott R.W. Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials // *Anal. Chem.*, 1979, vol. 51, doi: 10.1021/ac50043a036.
214. Seitz K.W., Lazar C.S., Hinrichs K.U., Teske A.P., and Baker B.J. Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction // *ISME J.*, 2016, vol. 10, no. 7, pp. 1696–1705, doi: 10.1038/ismej.2015.233.
215. Sidorenko S.V., Ziganshin R.H., Luneva O.G., Deev L.I., Alekseeva N.V., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. Proteomics-based identification of hypoxia-sensitive membrane-bound proteins in rat erythrocytes // *J Proteomics.*, 2018, vol. 184, pp. 25-33, doi: 10.1016/j.jprot.2018.06.008.

216. Sinha S.K. and Datta S. Beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. is a salt-tolerant enzyme that is stabilized by its reaction product glucose // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol. 100, no. 19, pp. 8399–8409, doi: 10.1007/s00253-016-7601-x.
217. Sinnott M.L. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer // *Chem. Rev.*, 1990, vol. 90, no. 7, pp. 1171–1202, doi: 10.1021/cr00105a006.
218. Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Querellou J., Bonch-Osmolovskaya E.A., and Slobodkin A.I. *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, vol. 59, no. Pt 11, pp. 2880–2883, doi: 10.1099/ijs.0.011080-0.
219. Smith B.J. SDS Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins // *Methods Mol. Biol.*, 1984, vol. 1, pp. 41–55.
220. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., and Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid // *Anal. Biochem.*, 1985, vol. 150, no. 1, pp. 76–85.
221. Spang A., Caceres E.F., and Ettema T.J.G. Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life // *Science*, 2017, vol. 357, no. 6351, eaaf3883, doi: 10.1126/science.aaf3883.
222. Spoehr H.A. The oxidation of carbohydrates with air // *J. Am. Chem. Soc.*, 1924, vol. 46, no. 6, pp. 1494–1502, doi: 10.1021/ja01671a021.
223. Stetter K.O., Huber R., Blöchl E., Kurr M., Eden R.D., Fielder M., Cash H., and Vance I. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs // *Nature*, 1993, vol. 365, no. 6448, pp. 743–745, doi: 10.1038/365743a0.
224. Stetter K. Life at the upper temperature border // *Atlantica Séguier Frontières*, 1992, pp. 195-217
225. Stetter K.O. History of discovery of the first hyperthermophiles // *Extremophiles*, 2006, vol. 10, no. 5, pp. 357–362, doi: 10.1007/s00792-006-0012-7.
226. Stetter K.O. Hyperthermophilic prokaryotes // *FEMS Microbiol. Rev.*, 1996, vol. 18, pp. 149–158, doi: 10.1016/0168-6445(96)00008-3.
227. Stieglmeier M., Klingl A., Alves R.J.E., Rittmann S.K.M.R., Melcher M., Leisch N., and Schleper C. *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum *Thaumarchaeota* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014, vol. 64, no. Pt 8, pp. 2738–2752, doi: 10.1099/ijs.0.063172-0.
228. Suleiman M, Krüger A, Antranikian G. Biomass-degrading glycoside hydrolases of archaeal origin. *Biotechnol Biofuels*. 2020 vol.13, 153, doi:10.1186/s13068-020-01792-y

229. Suleiman M., Schröder C., Klippel B., Schäfers C., Krüger A., Antranikian G. Extremely thermoactive archaeal endoglucanase from a shallow marine hydrothermal vent from Vulcano Island // *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2018, vol. 103, no. 3, pp. 1267-1274, doi: 10.1007/s00253-018-9542-z.
230. Sutherland I.W. Polysaccharide lyases // *FEMS Microbiol. Rev.*, 1995, vol. 16, no. 4, pp. 323–347, doi: 10.1111/j.1574-6976.1995.tb00179.x.
231. Swan B.K. and Valentine D.L. Diversity of *Archaea* // *eLS*, 2009, doi: 10.1002/9780470015902.a0000444.pub2.
232. Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nakagawa S., Nunoura T., and Horikoshi K. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, vol. 105, no. 31, pp. 10949–10954, doi: 10.1073/pnas.0712334105.
233. Takai K., Sugai A., Itoh T., and Horikoshi K. *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, vol. 50, Pt 2, pp. 489–500, doi: 10.1099/00207713-50-2-489.
234. Tanaka T., Fukui T., Atomi H., and Imanaka T. Characterization of an exo-beta-D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 // *J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, no. 17, pp. 5175–5181, doi: 10.1128/jb.185.17.5175-5181.2003.
235. Tawara E. and Kamo N. Glucose transport of *Haloferax volcanii* requires the Na⁺-electrochemical potential gradient and inhibitors for the mammalian glucose transporter inhibit the transport // *BBA - Biomembr.*, 1991, vol. 1070, no. 2, pp. 293–299, doi: 10.1016/0005-2736(91)90069-K.
236. Toshchakov S.V., Korzhenkov A.A., Samarov N.I., Mazunin I.O., Mozhey O.I., Shmyr I.S., Derbikova K.S., Taranov E.A., Dominova I.N., Bonch-Osmolovskaya E.A., Patrushev M.V., Podosokorskaya O.A., & Kublanov I.V. Complete genome sequence of and proposal of *Thermofilum uzonense* sp. nov. a novel hyperthermophilic crenarchaeon and emended description of the genus *Thermofilum* // *Standards in genomic sciences*, 2015, vol. 10, no. 122, doi.org/10.1186/s40793-015-0105-y
237. Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in Thiorhodaceae I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek*, 1964, vol. 30, pp. 225–238, doi.org/10.1007/BF02046728
238. Tsuboi K., Sakai H.D., Nur N., Stedman K.M., Kurosawa N., and Suwanto A. *Sulfurisphaera javensis* sp. nov., a hyperthermophilic and acidophilic archaeon isolated from Indonesian hot spring, and reclassification of *Sulfolobus tokodaii* Suzuki et al. 2002 as

Sulfurisphaera tokodaii comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 68, no. 6, pp. 1907–1913.

239. Uhl A.M. and Daniel R.M. The first description of an archaeal hemicellulase: the xylanase from *Thermococcus zilligii* strain AN1 // *Extremophiles*, 1999, vol. 3, no. 4, pp. 263–267.

240. Usov A. Alginic acids and alginates: analytical methods used for their estimation and characterization of composition and primary structure // *Russ. Chem. Rev. (RUSS CHEM REV-ENGL TR)*, 1999, vol. 68, pp. 957–966, doi: 10.1070/RC1999v068n11ABEH000532.

241. Vázquez-Campos X, Kinsela, A.S., Bligh, M.W., Payne, T.E., Wilkins, M.R., Waite, T.D. Genomic Insights Into the *Archaea* Inhabiting an Australian Radioactive Legacy Site. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12, 732575., doi:10.3389/fmicb.2021.732575.

242. Vázquez-Campos X., Kinsela A.S., Bligh M.W., Payne T.E., Wilkins M.R., Waite T.D. Genomic insights into the *Archaea* inhabiting an Australian Radioactive Legacy Site // *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12, 732575., doi:10.3389/fmicb.2021.732575.

243. Volkl P., Huber R., Drobner E., Rachel R., Burggraf S., Trincone A., and Stetter K.O. *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, no. 9, pp. 2918–2926.

244. Walker C.B., de la Torre J.R., Klotz M.G., Urakawa H., Pinel N., Arp D.J., Brochier-Armanet C., Chain P.S.G., Chan P.P., Gollabgir A., Hemp J., Hugler M., Karr E.A., Konneke M., Shin M., Lawton T.J., Lowe T., Martens-Habbena W., Sayavedra-Soto L.A., Lang D., Sievert S.M., Rosenzweig A.C., Manning G., and Stahl D.A. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, vol. 107, no. 19, pp. 8818–8823, doi: 10.1073/pnas.0913533107.

245. Wang H., Squina F., Segato F., Mort A., Lee D., Pappan K., Prade R. High-temperature enzymatic breakdown of cellulose // *Appl Environ Microbiol.*, 2011, vol. 77, no. 15, pp. 5199-5206, doi: 10.1128/AEM.00199-11.

246. Wang M.W., van Vliet T., and Hamer R. Evidence that pentosans/xylanase affects the re agglomeration of the gluten network // *J. Cereal Sci.*, 2004, vol. 39, no. 3, pp. 341–349, doi: 10.1016/S0733-5210(04)00002-5.

247. Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Krichevsky M.I., Truper H.G. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 1987, vol. 37, no. 4, pp. 463–464.

248. Whitman W.B., Coleman D.C., and Wiebe J.W. Prokaryotes: the unseen majority // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, vol. 95, no. 12, pp. 6578–6583, doi: 10.1073/pnas.95.12.6578.

249. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Comput Biol.*, 2017 vol. 13, no. 6, e1005595, doi:10.1371/journal.pcbi.1005595
250. Wilkins L.G.E., Ettinger C.L., Jospin G., Eisen J.A. Metagenome-assembled genomes provide new insight into the microbial diversity of two thermal pools in Kamchatka, Russia // *Sci Rep.*, 2019, vol. 9, pp. 3059, doi.org/10.1038/s41598-019-39576-6
251. Woese C.R. and Fox G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, vol. 74, no. 11, pp. 5088–5090, doi: 10.1073/pnas.74.11.5088.
252. Woese C.R., Kandler O., and Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, vol. 87, no. 12, pp. 4576–4579, doi: 10.1073/pnas.87.12.4576.
253. Wolin E.A., Wolin M.J., and Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.*, 1963, vol. 238, pp. 2882–2886.
254. Wurch L., Giannone R.J., Belisle B.S., Swift C., Utturkar S., Hettich R.L., Reysenbach A.L., Podar M. Genomics-informed isolation and characterization of a symbiotic *Nanoarchaeota* system from a terrestrial geothermal environment // *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7, 12115, doi:10.1038/ncomms12115.
255. Yim K.J., Song H.S., Choi J.S., and Roh S.W. *Thermoproteus thermophilus* sp. nov., a hyperthermophilic crenarchaeon isolated from solfataric soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, vol. 65, no. 8, pp. 2507–2510, doi: 10.1099/ijs.0.000293.
256. Yin Y., Mao X., Yang J., Chen X., Mao F., and Xu Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation // *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, Web Server issue, pp. W445-51, doi: 10.1093/nar/gks479.
257. Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., Saw J.H., Backstrom D., Juzokaite L., Vancaester E., Seitz K.W., Anantharaman K., Starnawski P., Kjeldsen K.U., Stott M.B., Nunoura T., Banfield J.F., Schramm A., Baker B. J., Spang A., Ettema T.J.G. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity // *Nature*, 2017, vol. 541, no. 7637, pp. 353–358, doi: 10.1038/nature21031.
258. Zeikus J.G. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria // *Ann. Rev. Microbiol.*, 1980, vol. 34, pp. 423-464, doi.org/10.1146/annurev.mi.34.100180.002231
259. Zeikus J.G., Dawson M.A., Thompson T.E., Ingvorsen K., Hatchikian E.C., Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis: isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 1983, vol. 129, no. 4, pp. 1159-1169, doi.org/10.1099/00221287-129-4-1159

260. Zeng X., Zhang X., Jiang L., Alain K., Jebbar M., and Shao Z. *Palaeococcus pacificus* sp. nov., an archaeon from deep-sea hydrothermal sediment // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2013, vol. 63, no. Pt 6, pp. 2155–2159, doi: 10.1099/ijs.0.044487-0.
261. Zhao W., Zeng X., and Xiao X. *Thermococcus eurythermalis* sp. nov., a conditional piezophilic, hyperthermophilic archaeon with a wide temperature range for growth, isolated from an oil-immersed chimney in the Guaymas Basin // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, vol. 65, no. Pt 1, pp. 30–35, doi: 10.1099/ijs.0.067942-0.
262. Zillig W., Holz I., Janekovic D., Klenk H.P., Insel E., Trent J., Wunderl S., Forjaz V.H., Coutinho R., and Ferreira T. *Hyperthermus butylicus*, a hyperthermophilic sulfur-reducing archaeobacterium that ferments peptides // *J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, no. 7, pp. 3959–3965, doi: 10.1128/jb.172.7.3959-3965.1990.
263. Zillig W., Holz I., Janekovic D., Schäfer W., and Reiter W.D. The archaeobacterium *Thermococcus celer* represents, a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacterial // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1983, vol. 4, no. 1, pp. 88–94, doi: 10.1016/S0723-2020(83)80036-8.
264. Zillig W., Holz I., Klenk H.P., Trent J., Wunderl S., Janekovic D., Insel E., and Haas B. *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaeobacterium, representing a novel order, *Thermococcales* // *Syst. Appl. Microbiol.*, 1987, vol. 9, pp. 62–70, doi: 10.1016/S0723-2020(87)80057-7.
265. Zillig W., Stetter K.O., Schäfer W., Janekovic D., Wunderl S., Holz I., and Palm P. *Thermoproteales*: A novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from Icelandic solfataras // *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abteilung, Originalien, Angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 1981, vol. 2, pp. 205–227, doi: 10.1016/S0721-9571(81)80001-4.
266. Zweerink S., Kallnik V., Ninck S., Nickel S., Verheyen J., Blum M., Wagner A., Feldmann I., Sickmann A., Albers S.V., Bräsen C., Kaschani F., Siebers B., and Kaiser M. Activity-based protein profiling as a robust method for enzyme identification and screening in extremophilic *Archaea* // *Nat. commun.*, 2017, vol. 8, 15352, doi: 10.1038/ncomms15352.