**TRANG THÔNG TIN VỀ LUẬN ÁN**

(1 bản tiếng Anh và 1 bản tiếng Việt

soạn bằng font Timer New Romanl, bảng mã Unicode, size 13, khoảng 1 – 2 trang giấy khổ A4)

Tên đề tài luận án: **Nghiên cứu tạo mini-cellulosome từ các protein tái tổ hợp của *Clostridium* được biểu hiện trong hệ thống *Bacillus subtilis***

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 62 42 40 01

Họ tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Hoàng Ngọc Phương

Người hướng dẫn khoa học:

**GS.TS. Trần Linh Thước** & **PGS.TS. Phan Thị Phượng Trang**

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN:**

Cellulosome là phức hệ protein ngoại bào có kích thước lớn, phức tạp nhất được biết đến trong tự nhiên do một số vi khuẩn và vi nấm kị khí sinh ra. Nhờ vào sự phối hợp của nhiều tiểu đơn vị cellulase khác nhau có hoạt tính đa dạng trong phức hệ mà cellulosome có khả năng thủy phân hiệu quả cellulose định hình mà các cellulase đơn lẻ hoặc hóa chất không tác động được. Việc nuôi cấy các chủng vi sinh vật kị khí nhằm thu nhận cellulosome trực tiếp gặp nhiều khó khăn do điều kiện nuôi cấy nghiêm ngặt và hiệu quả thu nhận thấp. Giải pháp dùng kỹ thuật tái tổ hợp gen để biểu hiện các protein thành phần cần thiết nhất của cellulosome có kích thước nhỏ nhưng vẫn đảm bảo hiệu quả thủy phân cellulose (gọi là mini-cellulosome) trong các chủng chủ vi sinh vật dễ nuôi cấy, an toàn, có thể sản xuất quy mô công nghiệp là một hướng nghiên cứu nhiều tiềm năng ứng dụng và đang rất được quan tâm.

Một số nghiên cứu về biểu hiện mini-cellulosome ở chủng chủ vi khuẩn đã được thực hiện, tuy nhiên chỉ mới tập trung biểu hiện nội bào ở *Escherichia coli* nhằm tìm hiểu cấu trúc, chức năng và đặc tính của cellulosome. Một số nghiên cứu khác về biểu hiện mini-cellulosome trên bề mặt tế bào nấm men hoặc tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy của các chủng vi khuẩn *Corynebacterium* hoặc *Bacillus subtilis* cũng đã được thực hiện, tuy nhiên mini-cellulosome được tiết ra môi trường có thể bị phân cắt bởi các protease ngoại bào do chính chủng chủ tiết ra. Ngoài ra, việc nghiên cứu khảo sát sự biểu hiện, tương tác giữa các thành phần trong mini-cellulosome và giữa mini-cellulosome với cơ chất gặp nhiều hạn chế do sự phân tán của protein trong dịch nuôi cấy.

Luận án hướng đến giải quyết những trở ngại trong quá trình nghiên cứu tạo mini-cellulosome thể khảm dạng tiết từ nguồn gen của *Clostridia* trong hệ thống biểu hiện *B. subtilis*, với các đặc điểm protein giá đỡ (mini-CipA) từ *C. thermocellum,* endoglucanase từ *C. thermocellum* và endoglucanase thể khảm từ *C. cellulolyticum*; phân tích tương tác giữa các thành phần chức năng trong mini-cellulosome tái tổ hợp và hiệu quả thủy phân cellulose tan dạng cơ chất carboxymethyl cellulose (CMC).

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN:**

Tạo thành công các chủng *B. subtilis* WB800N biểu hiện tiết hai thành phần cơ bản của một phức hệ cellulosome: (i) các tiểu đơn vị xúc tác Cel8A, Cel5CCA, cCel5CCA thể khảm; (ii) scaffoldin mini-CipA

Hai tương tác quan trọng trong mini-cellulosome đã được kiểm chứng trong dịch ngoại bào: (i) Tương tác cohesin-dockerin: khi thay thế dockerin type 1 của Cel5CCA từ *C. cellulolyticum* bằng dockerin type 1 từ *C. thermocellum*, cCel5CCA thể khảm có thể gắn đặc hiệu với mini-CipA. (ii) Tương tác giữa CBM và cơ chất cellulose: CBM giúp cho protein dung hợp Cel8A-CBM bám chặt và đặc hiệu lên cơ chất cellulose không tan RAC.

Khi có mini-CipA hỗ trợ, hoạt tính CMCase của từng endoglucanase gia tăng trung bình 30% và hỗn hợp hai endoglucanase gia tăng trung bình khoảng 50% so với dạng tự do.

**3. CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU**

Để tiếp tục phát triển và có thể ứng dụng mini-cellulosome ngoại bào, một số hướng nghiên cứu cần triển khai như:

* Tạo dòng và biểu hiện nhiều tiểu đơn vị xúc tác với lõi hoạt tính thuộc họ GH khác nhau dung hợp với dockerin type 1 của *C. thermocellum* để đánh giá hoạt tính của phức hệ mini-cellulosome trên nhiều đối tượng cơ chất cellulose.
* Xây dựng quy trình đánh giá hoạt tính các họ GH khác nhau trên các đối tượng cơ chất tinh và thô khác nhau.
* Tạo chủng *B. subtilis* biểu hiện SdbA bề mặt mang cohesin type 2 để mini-CipA mang dockerin type 2 có thể gắn lên bề mặt chủng chủ.

|  |  |
| --- | --- |
| **CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**  (Ký tên, họ tên)  GS.TS. Trần Linh Thước PGS.TS. Phan Thị Phượng Trang | **NGHIÊN CỨU SINH**  (Ký tên, họ tên)  Nguyễn Hoàng Ngọc Phương |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**

**INFORMATION OF DOCTORAL THESIS**

Thesis title: **Design of recombinant mini-cellulosome from *Clostridium* in *Bacillus subtilis* expression system**

Major: Microbiology

Major's code: 62 42 40 01

Doctoral candidate: **Nguyễn Hoàng Ngọc Phương**

Doctoral thesis's advisors:

**Prof. Trần Linh Thước** & **Assoc. Prof. Phan Thị Phượng Trang**

**1. ABSTRACT:**

Cellulosome, one of natural largest protein complexes secreted by several of anaerobic bacteria and fungi, can degrade efficiently wide range of recalcitrant biomass substrates based on the synergistic activities of their catalytic units. Culturing those strictly anaerobic microbes for collecting cellulosomes is unproductive. Therefore, designing a recombinant mini-cellulosome, a truncated form of cellulosome keeping its fundamental functions and activity, has been attracting many researchers and scientists.

Some reports about intracellular expression of designed mini-cellulosomes in Escherichia coli to investigate their cellulosomal biochemical characteristics of protein structures and activity. Other research on mini-cellulosomes displaced on cell surface also reported in Corynebacterium or Bacillus subtilis. While designing extracellular recombinant mini-cellulosome can reduce downstream harvest, some obstacles include but are not limited to the proteolytic cleavage or cell inclusions. Besides, analysis of the expression and interaction of the protein complex in culture media is dauting because of the dispersion and low yield of extracellular protein in culture media.

This thesis aims to design a fundamental chimeric mini-cellulosome comprising mini-CipA from C. thermocellum, endoglucanase Cel8A from C. thermocellum and chimeric Cel5CCA endoglucanase from C. cellulolyticum in B. subtilis; and investigate their interaction and catalytic activity in degradation of carboxymethyl cellulose (CMC).

**2. INNOVATIONS OF THE THESIS:**

Design recombinant strains *B. subtilis* WB800N secreting two of fundamental components of mini-cellulosome: (i) catalytic units Cel8A, Cel5CCA, chimeric cCel5CCA; (ii) scaffoldin mini-CipA

Investigate two of interactions of mini-cellulosome in cullture media: (i) The interaction between cohesin-dockerin: altering dockerin type 1 of Cel5CCA from *C. cellulolyticum* with dockerin type 1 of Cel8A from *C. thermocellum*, chimeric cCel5CCA can attach on mini-CipA. (ii) The interaction between CBM and cellulose: protein Cel8A fused with CBM can bind on cellulose RAC.

With the mini-CipA, CMCase activities of each endoglucanase increased approximately 30% and their mixture reached 50% in comparison with non-complex forms.

**3. THE OUTCOME AND UPCOMING RESEARCH**

* Create and express multiple catalytic subunits with active cores of different GH families with dockerin type 1 of C. thermocellum to evaluate the activities of mini-cellulosome complexes on many cellulose substrates.
* Develop procedures for evaluating different GH families' activities on different pure cellulose substrates.
* Create B. subtilis strain expressing SdbA surface with cohesin type 2 so that mini-CipA carrying dockerin type 2 can be attached to the surface of the host-cell.

|  |  |
| --- | --- |
| **CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**  (Ký tên, họ tên)  GS.TS. Trần Linh Thước PGS.TS. Phan Thị Phượng Trang | **NGHIÊN CỨU SINH**  (Ký tên, họ tên)  Nguyễn Hoàng Ngọc Phương |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**