

BIỂU HIỆN ENDO- β -1,4-MANNANASE TỪ CHỦNG *BACILLUS SUBTILIS* G1 Ở *ESCHERICHIA COLI* VÀ MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA ENZYME TÁI TỔ HỢP

Quyền Đình Thi, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Phạm Việt Cường

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* G1 sinh tổng hợp enzyme endo- β -1,4-mannanase được chọn để tạo ra mannanase tái tổ hợp. Gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase của *B. subtilis* G1 được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu MAF và MAR thiết kế dựa theo trình tự gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase AF324506. Sản phẩm PCR được nhân dòng T/A trong vector nhân dòng pTZ57R/T. Trình tự nucleotide của gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase dài 1101 bp đã được đăng ký trong GenBank: DQ309335. Gen này được cắt với hai enzyme hạn chế *NcoI* và *EcoRI* và chuyển vào vector biểu hiện pET22b(+) cũng được cắt bởi chính hai enzyme đó. Plasmid tái tổ hợp thu được pEMAG được biến nạp vào *E. coli* BL21 tạo ra hệ thống biểu hiện *E. coli* BL21/pEMAG. Endo- β -1,4-mannanase tái tổ hợp có nhiệt độ và pH phản ứng tối ưu lần lượt ở 45°C và pH 7,0. Các dung môi hữu cơ với nồng độ 10 - 30% đều ức chế enzyme, hoạt tính còn lại đạt 35 - 82%.

Từ khóa: *Bacillus subtilis* G1, biểu hiện, endo- β -1,4-mannanase, tính chất lý hóa

MỞ ĐẦU

Endo-1,4- β -mannanase (EC 3.2.1.78) là enzyme thủy phân đường glycosyl của mạch polymannan tạo ra các manno-oligosaccharide nên có vai trò phân hủy hemicellulose trong sinh khối thực vật. Nguồn thu endo- β -1,4-mannanase rất phong phú, từ vi khuẩn (Mendoza *et al.*, 1995), nấm mốc, nấm men, tảo biển, tảo nước ngọt, hạt nảy mầm (Mo, Bewley, 2003), và cả động vật (Xu *et al.*, 2002).

Trên thế giới, endo- β -1,4-mannanase đã được sản xuất trên quy mô công nghiệp. Chế phẩm enzyme thương mại có ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp như công nghiệp giấy (Kansoh, Nagieb, 2004), thực phẩm, chế biến thức ăn gia súc (Wu *et al.*, 2005), được phẩm cho đến dầu khí. Có ngành chỉ cần sử dụng riêng endo- β -1,4-mannanase là đủ nhưng cũng có ngành phải kết hợp mannanase với một số enzyme khác để đạt hiệu quả cao nhất. Việt Nam là một trong những nước xuất khẩu nhiều cà phê, một trong những loại đồ uống được ưa chuộng trong xã hội hiện đại. Sử dụng endo- β -1,4-mannanase để sản xuất cà phê tan là hướng ứng dụng chủ yếu sắp tới. Ngoài ra, với khả năng thủy phân bã cơm dừa, mannanase được sử dụng để sản xuất các oligosaccharide ứng dụng trong dược phẩm (tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh đường ruột).

Cho đến năm 1993 mới chỉ có 3 trình tự

nucleotide được công bố (Akino *et al.*, 1989; Luthi *et al.*, 1991; Arcand *et al.*, 1993). Nhưng từ khi thấy rõ công dụng của enzyme trong việc tẩy trắng giấy thì số trình tự nucleotide được công bố nhiều hơn. Các đoạn gen thường có kích thước trung bình từ 1,5 đến 4,5 kb. Các gen này đã được tách dòng, giải trình tự và biểu hiện ở các tế bào chủ khác như *E. coli* (Akino *et al.*, 1989), nấm men *S. cerevisiae* (Stalbrand *et al.*, 1995; Setati *et al.*, 2001) và *Pichia pastoris* (Xu *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005). Các tế bào tái tổ hợp sinh ra mannanase tái tổ hợp, mang các đặc tính tương tự với enzyme gốc. Người ta đã nhân dòng gen endo- β -1,4-mannanase ở vi khuẩn *Bacillus subtilis* (Mendoza *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006), *Streptomyces lividans* (Arcand *et al.*, 1993), *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* (Cann *et al.*, 1999) *Caldicellulosiruptor* (Gibbs *et al.*, 1996), nấm sợi (*Clostridium cellulovorans*), thực vật (Marraccini *et al.*, 2001; Mo, Bewley, 2003; Yuan *et al.*, 2006) và động vật (Xu *et al.*, 2002). Gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase chịu nhiệt chủng *Bacillus stearothermophilus* đã được nhân dòng bằng vector pUC18 và được biểu hiện ở tế bào *E. coli* BL21 nhờ vector pH6EX3 (Ethier *et al.*, 1998). Gen endo- β -mannanase từ nấm *Trichoderma reesei* được nhân dòng bằng vector uni-ZAP XR (được thiết kế từ Lambda ZAP II với *EcoRI* và *XhoI*) và biểu hiện nhờ vector pAJ401 ở nấm men *S. cerevisiae* (Stalbrand *et al.*, 1995).

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về nuôi cấy, sinh tổng hợp và xác định các tính chất hóa lý của endo- β -1,4-mannanase từ các chủng vi sinh vật đã được công bố (Cao Thị Vân Hậu, 2003; Đặng Thị Thu *et al.*, 2003; Lê Thị Thu Giang *et al.*, 2003). Ở bài báo trước, chúng tôi đã công bố kết quả về chọn chủng, xác định động thái sinh trưởng, nhân dòng và phân tích trình tự gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase từ *B. subtilis* G1 (Nguyễn Sỹ Lê Thanh *et al.*, 2006). Trong bài báo này, chúng tôi tiếp tục công bố những kết quả về biểu hiện và đánh giá một số tính chất hóa lý của mannanase tái tổ hợp ở *E. coli*.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật và hóa chất

Chủng tế bào *B. subtilis* G1 sinh tổng hợp endo- β -1,4-mannanase do Phòng Vi sinh vật phân tử, Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Plasmid pTMan được sử dụng để phân lập phân đoạn gen man như đã mô tả trước đây (Nguyễn Sỹ Lê Thanh *et al.*, 2006). Tế bào *E. coli* BL21 và pET22b+ được dùng để biểu hiện Man.

D(+)-mannose, locust bean galactomannan, guar gum và 3,5 dinitrosalicylic acid mua từ Sigma (Mỹ); peptone, cao nấm men từ Difco (Mỹ); sodium dodecylsulfate từ Merck (Đức); *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, T4-ligase, agar, CIAP, proteinase K, DNA cloning kit, DNA extraction kit từ Fermentas.

Nuôi cấy vi sinh vật

E. coli BL21 được nuôi cấy trong LB (Luria-Bertani): 1% (w/v) bacto tryptone, 0,5% (w/v) cao nấm men, 1% (w/v) NaCl, pH 7,5, khử trùng, với môi trường rắn bổ sung 2% (w/v) agar. Đối với việc chọn lọc chủng mang plasmid, môi trường được bổ sung 100 μ g/ml ampicillin. *B. subtilis* G1 sinh tổng hợp endo- β -mannanase được nuôi cấy chìm trong bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường LB lỏng với 1,2% cơ chất guar gum, ở 30°C, lắc 200 vòng/phút.

Xác định hoạt tính

Hoạt tính endo- β -1,4-mannanase được xác định tương đối theo phương pháp khuếch tán enzyme trên đĩa thạch chứa cơ chất 0,5% LBG trong đệm KP như đã mô tả trước đây (Nguyễn Sỹ Lê Thanh *et al.*, 2006).

Hoạt tính endo- β -1,4-mannanase được xác định chính xác theo phương pháp quang phổ (Miller, 1959), với cơ chất 0,5% LBG trong đệm phosphate. Hàm lượng đường khử giải phóng ra trong dung dịch phản ứng ở 30°C trong 5 phút được đo bằng quang phổ bước sóng 540 nm. Độ hấp phụ được đổi chiều với đường chuẩn nồng độ đường mannose để tính hàm lượng đường giải phóng tương đương. Một đơn vị hoạt tính mannanase được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác thủy phân giải phóng 1 μ mol manose trong 1 phút ở điều kiện thích hợp.

Khuếch đại PCR

Để khuếch đại gen mã hóa mannanase từ chủng *B. subtilis* G1, các mồi xuôi MAF (5'- GGC CAT GGG GGA GTT GCA TTT -3') và ngược MAR (5'- GGGGA ATT CTC AAC GAT TGG CGT -3') được thiết kế dựa vào trình tự nucleotide của gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase chủng *B. subtilis* mã số AF324506, được bổ sung điểm cắt hạn chế *HindIII* và *EcoRI* để chèn vào vector biểu hiện pET22b+.

Hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm: 2,5 μ l đệm PCR, 0,5 μ l *Taq* polymerase, 2 μ l $MgCl_2$, 2 μ l 2,5 mM dNTP, 1 μ l khuôn DNA, 1 μ l mỗi mồi loại, bổ sung nước cất lên tổng thể tích 25 μ l. Phản ứng được thực hiện theo điều kiện: 94°C/3 phút, 35 chu kỳ: (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút), 72°C/10 phút.

Các phương pháp sinh học phân tử khác

Các phương pháp sinh học phân tử như tách chiết DNA tổng số, plasmid DNA, cắt DNA bằng enzyme hạn chế, tách phân đoạn DNA từ gel agarose, gắn dính DNA, biến nạp plasmid hóa học được mô tả trong công bố trước đây (Nguyễn Sỹ Lê Thanh *et al.*, 2006).

Giải trình tự DNA

Sau khi tinh sạch plasmid tái tổ hợp, phân đoạn chèn được giải trình tự theo nguyên lý của phương pháp Sanger cải tiến dựa trên các dideoxy trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Vector pET22b+ được gắn 2 trình tự mồi xuôi ngược để đọc trình tự phân đoạn chèn DNA ngoại lai.

Điện di polyacrylamide

Điện di protein được thực hiện trên gel

polyacrylamide 12,5% theo (Laemmli, 1970).

Phân tích nucleotide và amino acid

Chương trình DNASTar được sử dụng để phân tích trình tự nucleotide và amino acid của DNA và protein.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector biểu hiện endo- β -1,4-mannanase tái tổ hợp ở *E. coli*

Plasmid pTMan và pET22b+ tinh sạch được cắt bằng hai enzyme hạn chế *Nco*I và *Eco*RI. Băng *man*[NE] có kích thước khoảng 1,1 kb và plasmid pET22b(+)[NE] đã mở vòng được tinh sạch và gắn dính với nhau tạo ra plasmid tái tổ hợp pEMan. Dịch gắn dính được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α , nuôi lắc phục hồi, ria lên đĩa thạch và ủ qua đêm. Plasmid tái tổ hợp của một số khuẩn lạc được tách chiết và cắt với hai enzyme hạn chế *Nco*I và *Hind*III. Các plasmid tái tổ hợp đều chứa hai phân đoạn DNA tương ứng với các kích thước pET22b+ (5,4 kb) và gen *man* (1,1 kb).

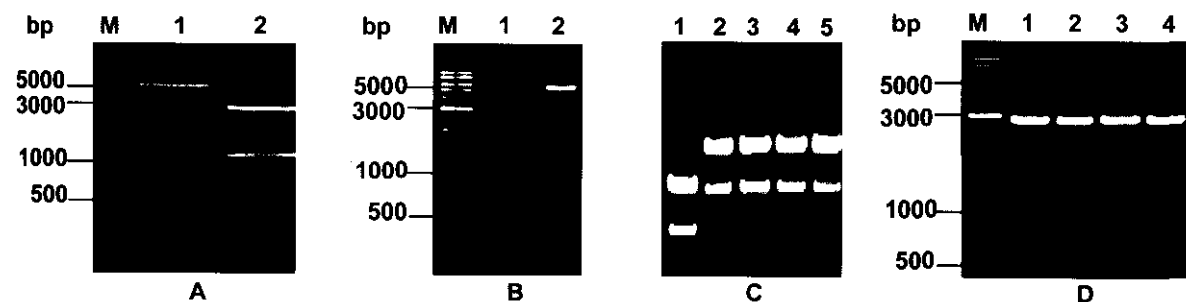
Biểu hiện gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase ở *E. coli*

Để biểu hiện gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase, plasmid tái tổ hợp pEMan được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 tạo ra hệ thống biểu hiện *E. coli* BL21/pEMan. Dòng *E. coli* BL21/pEMan được nuôi lắc trong môi trường LB bổ sung ampicillin và chất

cảm ứng IPTG để biểu hiện enzyme tái tổ hợp. Endo- β -1,4-mannanase được biểu hiện ở thời gian cảm ứng 1,5, 3 và 4,5 h (Hình 2, giếng 2 - 4), chưa biểu hiện ở thời gian cảm ứng 0 h (Hình 2, giếng 1) và hàm lượng protein tăng lên theo thời gian cảm ứng. Mức độ biểu hiện ước tính chỉ đạt 5% protein tổng số.

Tế bào của các chủng vi khuẩn *E. coli* BL21/pEMan, BL21/pET22b(+), BL21 và *B. subtilis* G1 được phá vỡ và cho vào lỗ đĩa thạch với cơ chất LBG. Sau khi xử lý theo phương pháp khuếch tán enzyme, kết quả định tính được thể hiện trên hình 3.

Các mẫu phá tế bào có vòng thủy phân cơ chất sáng màu trên đĩa thạch giống với vòng thủy phân cơ chất của chủng *B. subtilis* G1 (đối chứng dương tính) được coi là chủng có hoạt tính. Vòng thủy phân cơ chất của chủng *E. coli* BL21/pEMan tái tổ hợp rộng hơn của *B. subtilis* G1. Các chủng *E. coli* BL21 và *E. coli* BL21/pET22b(+) đều là đối chứng âm tính, không có hoạt tính endo- β -1,4-mannanase. Điều này có thể kết luận rằng gen *man* tái tổ hợp trên plasmid pEMan đã biểu hiện trong hệ thống *E. coli* BL21/pEMan. Mannanase được biểu hiện ở *E. coli* BL21/pEMan phần lớn ở dạng nội bào chiếm tới 99% (340 U/ml), trong khi đó có rất ít enzyme được tiết ra môi trường (3,2 U/ml) chiếm khoảng 1%. Trong cặn tế bào có hoạt tính tương đối cao, có thể là enzyme còn ở dạng thể vùi do phá tế bào chưa triệt để. Hoạt tính dịch phá tế bào BL21/pEMan cao gấp 48 lần so với hoạt tính trong chủng gốc *B. subtilis* G1 tính theo đơn vị trên 1 g tế bào. Điều này chứng tỏ đoạn gen *man* đã được biểu hiện tốt ở *E. coli* BL21.



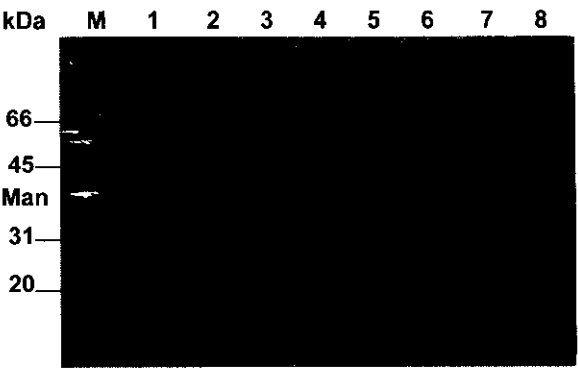
Hình 1. Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid pET22b(+)[NE] (1A) và pTMan[NE] (2A) với *Nco*I và *Eco*RI; sản phẩm tinh sạch phân đoạn gen *man*[NE] (1B) và plasmid pET22b(+)[NE] (2B); plasmid đối chứng pET22b(+)(1C) và các plasmid tái tổ hợp pEMan tinh sạch (2 - 5C); sản phẩm cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp tinh sạch pEMan số 2 - 5 với *Nco*I và *Hind*III (1 - 4D) với marker (M).

Đặc tính của endo- β -1,4-mannanase tái tổ hợp

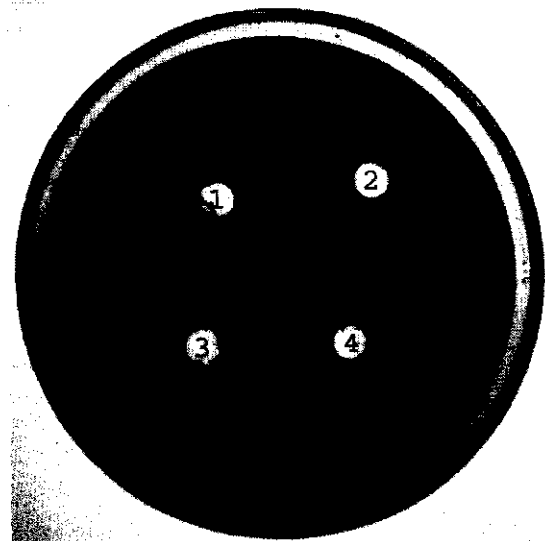
Nhiệt độ tối ưu

Khi tăng nhiệt độ phản ứng từ 30°C lên 45°C thì hoạt tính mannanase cũng tăng dần từ 84% lên 100%, hoạt tính enzyme đạt cao nhất ở 45°C (321

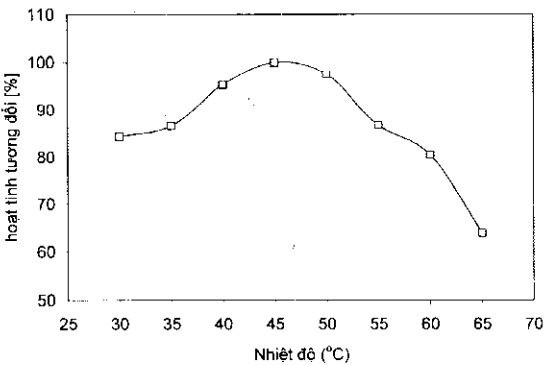
U/ml) (Hình 4). Khi nhiệt độ phản ứng tiếp tục tăng trên nhiệt độ tối ưu 45°C thì hoạt tính lại theo chiều hướng giảm dần. Nhiệt độ phản ứng tối ưu cho mannanase tái tổ hợp là 45°C, kết quả này phù hợp với công bố của một số tác giả (Mendoza *et al.*, 1995).



Hình 2. Điện di đồ protein tổng số của dịch tế bào BL21/pEMan sau 0; 1,5; 3; 4,5 h cảm ứng IPTG (1-4) và không cảm ứng IPTG (5-8) với protein chuẩn (M).



Hình 3. Hoạt tính mannanase trong dịch nổi BL21/pEMan (1); các đối chứng âm tính BL21 (2) và BL21/pET22b(+) (3); đối chứng dương tính *B. subtilis* G1 (4).



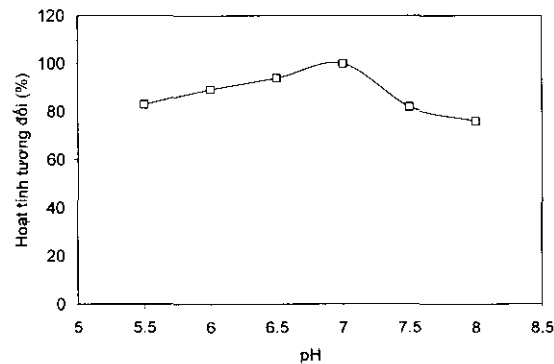
Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt tính mannanase.

Bảng 1. Hoạt tính mannanase trong tế bào *E. coli* BL21.

Dịch	Hoạt tính U/ml
Dịch nổi môi trường	3,2
Cặn tế bào	13,5
Dịch phá tế bào	340,1
Dịch rửa lần 1	2,5
Dịch phá tế bào chủng <i>B. subtilis</i> G1	7,0

Ảnh hưởng pH đến hoạt tính

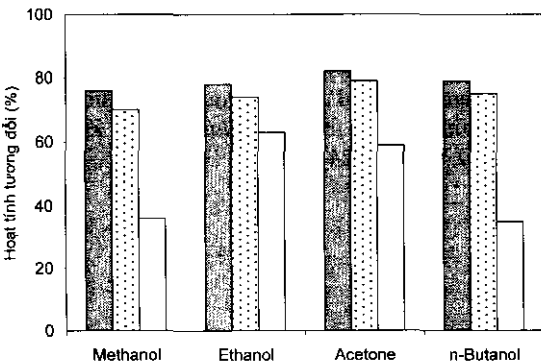
Ở pH 5,0 hoạt tính tương đối của mannanase là 58% (Hình 5). Khi pH phản ứng tăng lên thì hoạt tính enzyme tăng đều theo tới pH 7,0 thì đạt cực đại. Độ pH phản ứng tiếp tục tăng lên thì hoạt tính lại giảm đều xuống còn 75% ở pH 8. Vậy mannanase tái tổ hợp hoạt tính tối ưu ở môi trường trung tính. Điều này phù hợp với tài liệu công bố rằng các mannanase từ vi khuẩn hoạt tính thích hợp ở pH trung tính đến kiềm yếu (Mendoza *et al.*, 1995).



Hình 5. Ảnh hưởng của pH phản ứng lên hoạt tính mannanase.

Ảnh hưởng của dung môi

Tất cả các dung môi hữu cơ đều làm giảm hoạt tính của mannanase (Hình 6). Hoạt tính còn lại giảm mạnh xuống 35 - 36% đối với 30% (v/v) methanol và n-butanol và xuống 59 - 63% đối với ethanol acetone. Các dung môi hữu cơ với nồng độ 10% và 20% đã ức chế nhẹ endo- β -1,4-mannanase. Hoạt tính còn lại đã giảm khoảng 18 - 30%.



Hình 6. Ảnh hưởng của dung môi hữu cơ lên hoạt tính mannanase.

KẾT LUẬN

Hệ thống biểu hiện *E. coli* BL21/pEMAG đã được thiết kế thành công và endo- β -1,4-mannanase tái tổ hợp đã được biểu hiện.

Một số đặc tính của endo- β -1,4-mannanase tái tổ hợp đã được xác định: nhiệt độ và pH phản ứng tối ưu: 45°C và pH 7; bền ở dải nhiệt độ 30 - 55°C và pH 6 - 7; các dung môi hữu cơ với nồng độ 10 - 30% đều ức chế enzyme, hoạt tính còn lại 30 - 80%.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu cơ bản 6-116-06, "Nhân dòng, phân tích gen mã hóa endo- β -1,4-mannanase từ *Bacillus* sp., biểu hiện cao và nghiên cứu ứng dụng" năm 2006 - 2007, Đề tài: "Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm đa enzyme có chất lượng từ vi sinh vật tái tổ hợp nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng thức ăn chăn nuôi", Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2007 - 2010. Nhóm tác giả cảm ơn PGS. TS. Đinh Duy Kháng, Trưởng phòng Vi sinh vật học phân tử (Viện Công nghệ sinh học) và ThS. Nguyễn Thị Hà, Phòng Vi sinh (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam) đã cung cấp chủng *B. subtilis* G1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akino T, Kato C, Horikoshi K (1989) Two *Bacillus* beta-mannanases having different COOH termini are produced in *Escherichia coli* carrying pMAH5. *Appl Environ Microbiol* 55: 3178-3183.

Arcand N, Kluepfel D, Paradis FW, Morosoli R, Shareck F (1993) Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the manA gene and characterization of the enzyme. *Biochem J* 290: 857-863.

Cann IK, Kocherginskaya S, King MR, White BA, Mackie RI (1999) Molecular cloning, sequencing, and expression of a novel multidomain mannanase gene from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. *J Bacteriol* 181: 1643-1651.

Cao Thị Vân Hậu (2003) Tìm chủng có khả năng tổng hợp endo- β -1,4-mannanase, nuôi cấy, xác định các đặc tính endo- β -1,4-mannanase chủng *Bacillus thuringiensis* DDH2 và nhân dòng gene này. *Luận án Tốt nghiệp Đại học. Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.*

Ethier N, Talbot G, Sygusch J (1998) Gene cloning,

DNA sequencing, and expression of thermostable beta-mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 64: 4428-4432.

Gibbs MD, Elinder AU, Reeves RA, Bergquist PL (1996) Sequencing, cloning and expression of a beta-1,4-mannanase gene, *manA*, from the extremely thermophilic anaerobic bacterium, *Caldicellulosiruptor* Rt8B.4. *FEMS Microbiol Lett* 141: 37-43.

Kansoh AL, Nagieb ZA (2004) Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85: 103-114.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lê Thị Thu Giang, Quyền Đình Thi, Vũ Thị Cao Hậu, Đặng Thị Thu (2003) Sinh tổng hợp và xác định một số tính chất của endo- β -mannanase chủng *Bacillus thuringiensis* DDH2. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc 2003, Hà Nội, 16-17/12/2003*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật: 1204-1208.

Luthi E, Jasmat NB, Grayling RA, Love DR, Bergquist PL (1991) Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a beta-mannanase from the extremely thermophilic bacterium "*Caldocellum saccharolyticum*". *Appl Environ Microbiol* 57: 694-700.

Marraccini P, Rogers WJ, Allard C, Andre ML, Caillet V, Lacoste N, Lausanne F, Michaux S (2001) Molecular and biochemical characterization of endo-beta-mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213: 296-308.

Mendoza NS, Arai M, Sugimoto K, Ueda M, Kawaguchi T, Joson LM (1995) Cloning and sequencing of beta-mannanase gene from *Bacillus subtilis* NM-39. *Biochim Biophys Acta* 1243: 552-554.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428. Mo B, Bewley JD (2003) The relationship

between beta-mannosidase and endo-beta-mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of seed populations and individual seeds. *J Exp Bot* 54: 2503-2510.

Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Quyền Đình Thi, Phạm Việt Cường, Đặng Thị Thu (2006) Endo- β -1,4-mannanase từ *B. subtilis* G1: Chọn chủng, xác định động thái sinh trưởng, nhân dòng và phân tích trình tự gene mã hóa. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4: 327-334.

Setati ME, Ademark P, van Zyl WH, Hahn-Hagerdal B, Stalbrand H (2001) Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo-beta-1,4-mannanase encoding gene (*man1*) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr Purif* 21: 105-114.

Stalbrand H, Saloheimo A, Vehmaanpera J, Henrissat B, Penttilä M (1995) Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* beta-mannanase gene containing a cellulose binding domain. *Appl Environ Microbiol* 61: 1090-1097.

Tan XH, Wu YY, Ma LX, Jiang SJ (2005) Cloning and expression in *Pichia pastoris* of an alkaline mannanase gene. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 45: 543-546.

Wu G, Bryant MM, Voitle RA, Roland DAS (2005) Effects of beta-mannanase in corn-soy diets on commercial leghorns in second-cycle hens. *Poult Sci* 84: 894-897.

Xu B, Sello D, Janson JC (2002) Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) beta-mannanase gene. *Eur J Biochem* 269: 1753-1760.

Yuan JS, Yang X, Lai J, Lin H, Cheng ZM, Nonogaki H, Chen F (2006) The Endo-beta-Mannanase gene families in *Arabidopsis*, rice, and poplar. *Funct Integr Genomics* Epub ahead of print

Zhang Q, Yan X, Zhang L, Tang W (2006) Cloning, sequence analysis and heterologous expression of a beta-mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2. *Mol Biol (Mosk)* 40: 418-424.

EXPRESSION OF AN ENDO- β -1,4-MANNANASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* G1 IN *E. COLI* AND ITS PROPERTIES

Quyen Dinh Thi*, Nguyen Sy Le Thanh, Pham Viet Cuong

Institute of Biotechnology

SUMMARY

The bacterial strain *Bacillus subtilis* G1 producing an enzyme endo- β -1,4-mannanase was selected to create a recombinant mannanase. The gene encoding endo- β -1,4-mannanase from *B. subtilis* G1 was amplified with the specific primer pair MAF and MAR designed on the basis of the nucleotide sequence encoding the endo- β -1,4-mannanase AF324506. The PCR product was cloned into the T/A cloning vector pTZ57R/T. The nucleotide sequence of the gene encoding endo- β -1,4-mannanase with a length of 1101 bp was deposited in the GenBank: DQ309335. This gene was digested by two restriction enzymes *Nco*I and *Eco*RI and inserted into the expression vector pET22b(+) also cut by the same enzymes. The obtained recombinant plasmid pEMAG was transformed into *E. coli* BL21 resulted in the expression system *E. coli* BL21/pEMAG. The recombinant endo- β -1,4-mannanase had an optimal reaction temperature and pH at 45°C and pH 7.0, respectively. Organic solvents at the concentration of 10 - 30% all inhibited the enzyme, activity remained 35 - 82%.

Keywords: *Bacillus subtilis* G1, endo- β -1,4-mannanase, expression, physicochemical properties

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37568260; Fax: 84-4-38363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn