

## BIỂU HIỆN GEN CHỈ MÃ HÓA CHITINASE CỦA *BACILLUS LICHENIFORMIS* KNUC213 TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Quách Ngọc Tùng, Nguyễn Văn Hiếu, Phí Quyết Tiến\*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Chitinase (EC 3.2.1.132) là enzyme xúc tác quá trình thủy phân liên kết  $\beta$ (1,4) giữa các đơn phân N-acetyl D-glucosamine trong phân tử chứa nên chitinase được ứng dụng nhiều trong y học, công nghiệp, nông nghiệp và nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, gen chỉ mã hóa chitinase của *Bacillus licheniformis* KNUC213 được khuếch đại, tách dòng và giải trình tự. Kết quả phân tích trình tự cho thấy, gen chỉ gồm 1731 nucleotide, có độ tương đồng cao (đạt 97-98%) so với trình tự của gen tương ứng trên GenBank và mã hóa cho protein gồm 576 amino acid. Ngoài ra, gen chỉ trong nghiên cứu bị thiếu 3 nucleotide so với các gen chỉ của các chủng *B. licheniformis* khác. Phân tích trình tự protein suy diễn từ gen chỉ cho thấy chitinase từ chủng *B. licheniformis* KNUC213 thuộc họ 18 glycosyl hydrolase, có điểm đẳng điện (pI) là 5,6 và khối lượng phân tử khoảng 63-66 kDa. Gen chỉ được gắn vào vector pET22b(+) để biểu hiện trong *Escherichia coli* BL21 (DE3). Chitinase của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b(+)-chỉ tái tổ hợp bước đầu được biểu hiện trong môi trường lỏng Luria Bertani, cảm ứng bởi isopropylthiogalactoside 0,4 mM (khí OD<sub>600nm</sub> đạt 0,6 đơn vị) ở 28 °C. Sau 5 giờ cảm ứng, hoạt tính chitinase đạt 1150,3 U/ml, cao hơn 9,5 so với hoạt tính chitinase của chủng vi khuẩn gốc *B. licheniformis* KNUC213.

Từ khóa: *Bacillus licheniformis*, Biểu hiện enzyme, Chitinase tái tổ hợp, *Escherichia coli*, pET22b(+)

### MỞ ĐẦU

Chitinase (CHI) xúc tác quá trình phân hủy cơ chất chitin thành các sản phẩm chitooligosaccharide (COS) hòa tan trong nước thông qua quá trình thủy phân liên kết glycosyl. COS là sản phẩm có nhiều hoạt tính sinh học khác nhau (De et al., 2011) nên nó được sử dụng nhiều trong y học, công nghiệp, nông nghiệp và nghiên cứu (Mizuno et al., 1997). Chitinase có thể được thu nhận từ nhiều nguồn vi sinh vật khác nhau như: vi khuẩn (*Serratia* sp., *Bacillus* sp.), nấm sợi (*Trichoderma* sp., *Aphanociadium* sp.), xạ khuẩn (*Streptomyces griseus*, *S. pilcatus*) (Patidar et al., 2005). Trong những năm gần đây, nhu cầu sử dụng chitinase ứng dụng trong nông nghiệp và thủy sản chitin tạo COS có xu hướng gia tăng nhưng hiệu quả sản xuất CHI từ chủng tự nhiên chưa tạo enzyme có hoạt tính cao. Nhờ ứng dụng kỹ thuật di truyền, các gen chỉ mã hóa chitinase từ *Bacillus circulans* No. 4.1 (Patcharaporn et al., 2006), *Bacillus licheniformis* A1 (Cermal et al., 2008), *Clostridium paraputrificum* (Morimoto et al., 1997)... đã được tách dòng và biểu hiện thành công trong chủng vi sinh vật tái tổ hợp, bước đầu đáp ứng được nhu cầu ứng dụng ngày càng cao. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả bước đầu về tách dòng, biểu hiện gen chỉ mã hóa chitinase của *B. licheniformis* KNUC213 trong *E. coli* BL21 (DE3) với mục đích chúng tôi tái tổ hợp có hoạt tính CHI trong các đối tượng vật chủ khác nhau, tạo tiền đề cho sản xuất enzyme ở quy mô lớn.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Chủng giống vi sinh vật, plasmid và vật liệu khác

Chủng *Bacillus licheniformis* KNUC213 nhận từ bộ sưu tập giống vi sinh vật của phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng *E. coli* XL1-blue [ $\Delta$ (*morA*)183  $\Delta$ (*morC*)-*hsdSMR-mrr*]173 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac*] (Stratagene, Mỹ); Chủng *E. coli* BL21(DE3) [*F-omp hsd SB* (*Bm8*) *gal dcm* (DE3) *plysS* (Cam)] nhận từ phòng thí nghiệm Genomics, Khoa Vi sinh vật học, Trường đại học quốc gia Kyungpook, Hàn Quốc. Vector tách dòng pJET1.2/blunt (Fermentas, Mỹ), vector pET22b(+) (Invitrogen, Mỹ), enzyme hạn chế *Bam*HI và *Xho*I (Invitrogen, Mỹ), các hóa chất tinh khiết khác... của hãng Sigma, Merck, Invitrogen... Môi trường Luria Bertani (LB) (g/L): cao nấm men 5,0; trypton 10,0; NaCl 10,0; pH 7,0.

#### Khuếch đại gen chỉ mã hóa chitinase của *B. licheniformis* KNUC213

Chủng *B. licheniformis* KNUC213 được nuôi trong môi trường LB sau 20 giờ nuôi cấy, ly tâm thu tế bào ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút. DNA tổng số của chủng KNUC213 được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001). Gen chỉ được khuếch đại từ DNA tổng số của chủng *B. licheniformis* KNUC213 bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu trong vùng phân tử hợp phần ứng gồm: ChiBam1Eo-F (5'-GCGGATCCGATCCGGAAAAAATATAAAATCATCGG-3') 1,0  $\mu$ l và ChiXho1Eo-R (5'-GCGCTCGAGTTCGCGAGCTCCGATCAG-3') 1,0  $\mu$ l, DNA tổng số: 1,0  $\mu$ l; đệm phản ứng (10X): 2,0  $\mu$ l; MgCl<sub>2</sub> (50 mM): 0,6  $\mu$ l; Hỗn hợp các deoxyribonucleotide triphosphate (10 mM): 0,4  $\mu$ l; nước cất: 9,8  $\mu$ l. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 94 °C trong 5 phút, 30 chu trình (94 °C trong 60 giây, 53 °C trong 45 giây; 72 °C trong 90 giây), 72 °C trong 10 phút rồi giữ mẫu ở 4 °C.

#### Tách dòng phân tích trình tự gen chỉ

Tinh sạch sản phẩm PCR, tách dòng gen chỉ vào vector pJET1.2/blunt được thực hiện theo phương pháp Sambrook (2001). Trình tự nucleotide của gen chỉ xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM<sup>®</sup>3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Kết quả phân tích gen chỉ bằng phần mềm CLC DNA Workbench dịch mã sang protein ([www.expasy.org/translate](http://www.expasy.org/translate)).

**Tạo chủng *E. coli* BL21(DE3) và biểu hiện chitinase tái tổ hợp**

Thu nhận đoạn gen *chi* từ plasmid pJET1.2/blunt-*chi* và mở vòng vector biểu hiện pET22b(+) với cùng hai enzyme giới hạn *Bam*HI và *Xho*I. Phản ứng ghép nối gen *chi* vào pET22b(+) bằng enzym T4 ligase ở 14 °C trong thời gian 16 giờ, sau đó biến nạp vào chủng *E. coli* BL21(DE3) bằng sốc nhiệt.

Chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid pET22b(+)-*chi* được nuôi cấy qua đêm trên môi trường lỏng LB có chứa 100 µg/ml ampicillin, nuôi lắc 220 vòng/phút ở 37 °C. Chuyển 0,5 ml dịch nuôi cấy sang 5 ml môi trường LB có ampicillin 100 µg/ml và nuôi lắc 220 vòng/phút ở 37 °C. Khi mật độ tế bào OD<sub>600nm</sub> đạt 0,6 đơn vị, cảm ứng bằng isopropylthiogalactoside (IPTG) ở nồng độ là 0,4 mM và hạ nhiệt độ nuôi xuống các nhiệt độ 23 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, để chọn được nhiệt độ thích hợp cho biểu hiện protein tái tổ hợp. Dịch sau nuôi cấy, ly tâm ở 8 000 vòng/phút ở 4 °C trong 10 phút thu sinh khối. Sinh khối tế bào hòa trong đệm được hòa tan trong 1% Triton X-100 trong đệm PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Tiếp đó, tế bào được phá vỡ trong thiết bị VC-800 (Sonic & Materials Inc), sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4 °C trong 15 phút thu dịch nổi, dịch chitinase thô được điện di trên gel polyacrylamid 10% xác định trọng lượng phân tử protein tái tổ hợp theo phương pháp Laemmli (1970) và kiểm tra hoạt tính chitinase.

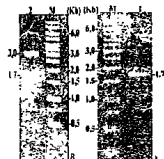
**Xác định hoạt tính chitinase**

Hoạt tính chitinase tái tổ hợp được xác định theo phương pháp so màu thông qua lượng N-acetyl D-glucosamine chuyển hóa cơ chất colloidal chitin (Thamthiankul *et al.*, 2001). Colloidal chitin được chuẩn bị theo phương pháp của Roberts và Sellitrennikoff (1988). Một đơn vị hoạt tính chitinase được xác định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 µmol N-acetyl D- glucosamine trong thời gian một phút ở 37 °C, pH 5,2.

**KẾT QUẢ THẢO LUẬN**

**Tách dòng và phân tích trình tự gen mã hóa chitinase**

Bằng kỹ thuật PCR, gen *chi* từ DNA tổng số của chủng *B. licheniformis* KNUC213 đã được khuếch đại, sản phẩm điện di đổ cho một băng DNA duy nhất có kích thước 1,7 kb (Hình 1A).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm DNA gel agarose 1,0%; (A): khuếch đại gen *chi* từ DNA tổng số với cặp mồi *ChiBam*I-Ec-F và *ChiXho*I-Ec-R và (B) plasmid pJET1.2/blunt-*chi* được xử lý bởi hai enzyme giới hạn *Bam*HI và *Xho*I; M: Thang DNA chuẩn, 1 sản phẩm gen *chi* sau PCR, 2 Sản phẩm cắt plasmid pJET1.2/blunt-*chi*

Bảng 1. Kết quả so sánh độ tương đồng trình tự amino acid của chitinase từ *B. licheniformis* KNUC213 (AEQ55312) với các trình tự tương ứng của các chủng *B. licheniformis* khác được đăng ký trên GenBank (NCBI)

|                 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ACU43581        | 100,0 |       |       |       |       |
| ACM46020        | 99,5  | 100,0 |       |       |       |
| ACK44109        | 95,6  | 96,5  | 100,0 |       |       |
| <u>AEQ55312</u> | 95,3  | 95,8  | 98,5  | 100,0 |       |
| ACW83016        | 93,8  | 96,7  | 96,7  | 97,0  | 100,0 |

Gh chú: ACU43581: chitinase từ chủng *B. licheniformis* N1; ACM46020: chitinase từ chủng *B. licheniformis* CBFO5-03; ACK44109: chitinase từ chủng *B. licheniformis* DSM 8785; AEQ55312: chitinase từ chủng *B. licheniformis* KNUC213; ACW83016: chitinase từ chủng *B. licheniformis* DSM 13

Sau phản ứng cắt nối gen *chi* và vector pJET1.2/blunt, biến nạp vào tế bào khả biến của *E. coli* để tạo plasmid pJET1.2/blunt-*chi* và plasmid tái tổ hợp bằng 2 enzyme hạn chế *Bam*HI và *Xho*I được cắt kiểm tra. Kết quả điện di đồ sau xử lý plasmid pJET1.2/blunt-*chi* với hai enzyme hạn chế cho thấy sản phẩm thu được gồm hai băng DNA rõ nét có kích thước lần lượt là 1,7 kb (thể hiện cho gen *chi*) và 3,0 kb (tương ứng với kích thước vector pJET1.2/blunt ban đầu) (Hình 1B). Gen *chi* trong vector pJET1.2/blunt được giải trình tự và cho kích thước 1731 bp (mã số truy cập trên GenBank (NCBI) là JN662350, mã hóa cho protein gồm 576 amino acid (Acc. No. AEQ55312) trên ngân hàng cơ dữ liệu GenBank (NCBI). Khi so sánh sự tương đồng trình tự amino acid suy diễn của enzyme *CHI* từ *B. licheniformis* KNUC213 (AEQ55312) với các trình tự amino acid của *CHI* từ các chủng *B. licheniformis* khác cho thấy tỷ lệ tương đồng cao (95+98,5%) (Bảng 1); trong đó độ tương đồng cao nhất của trình tự amino acid của *CHI* với trình tự protein tương ứng (*ChiA*) của *B. licheniformis* DSM 8785 (ACK44109) (98,5%).

Kết quả thu được cho thấy, gen *chi* mã hóa chitinase của chủng *B. licheniformis* KNU213 đã được tách dòng thành công. Ngoài ra, gen *chi* bị thiếu 3 nucleotide so với các gen *chi* của các chủng *B. licheniformis* khác (Hình 2). Tuy nhiên, việc thiếu 3 nucleotide không mã hóa cho amino acid tham gia vào trung tâm hoạt động của enzyme *CHI*. Ngoài ra, kết quả phân tích trình tự amino acid cho thấy endo-chitinase của nhóm vi khuẩn *B. licheniformis* thuộc nhóm chitin hydroxylase family 18 nên có ái lực mạnh với chitin từ vỏ tôm và có triển vọng ứng dụng trong chuyển hóa chitin có nguồn gốc từ vỏ tôm tạo chitin-oligosaccharide.

Hình 2. So sánh trình tự amino acid của *CHI* từ chủng *B. licheniformis* KNU213 (trình tự được gạch chân) với trình tự protein tương ứng từ các chủng *B. licheniformis* khác được đăng ký trên GenBank. Dấu sao (\*) thể hiện sự tương đồng trong trình tự

amino acid của các CHI. Khung chữ nhật thể hiện vùng trình tự amino acid của chúng gốc KNUC213 sai khác hoặc bị xóa 1 amino acid

```

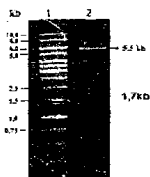
AC143511      ENGVDFDLSLEKRNYYNGGQYKRYVNDQAKVPLVNAENHGFCTYDDEQSGHKEKLN
AC143516      ENGVDFDLSLEKRNYYNGGQYKRYVNDQAKVPLVNAENHGFCTYDDEQSGHKEKLN
AC144030      ENGVDFDLSLEKRNYYNGGQYKRYVNDQAKVPLVNAENHGFCTYDDEQSGHKEKLN
AC144109      ENGVDFDLSLEKRNYYNGGQYKRYVNDQAKVPLVNAENHGFCTYDDEQSGHKEKLN
AEQ55312      ENGVDFDLSLEKRNYYNGGQYKRYVNDQAKVPLVNAENHGFCTYDDEQSGHKEKLN

AC143581      GLSGAMFVDFSGDSNRITLLNKLAAADLDFAPDGGAPFPPSPAPVAVVYTGKATVYSLAND
AC143586      GLSGAMFVDFSGDSNRITLLNKLAAADLDFAPDGGAPFPPSPAPVAVVYTGKATVYSLAND
AC144030      GLSGAMFVDFSGDSNRITLLNKLAAADLDFAPDGGAPFPPSPAPVAVVYTGKATVYSLAND
AC144109      GLSGAMFVDFSGDSNRITLLNKLAAADLDFAPDGGAPFPPSPAPVAVVYTGKATVYSLAND
AEQ55312      GLSGAMFVDFSGDSNRITLLNKLAAADLDFAPDGGAPFPPSPAPVAVVYTGKATVYSLAND

AC143581      APESVAVIAEYVYVSEFNRSIEVKE TSAEIGGLKPGTAYTSVYSAKDADGKLMAGPTVEVT
AC143586      APESVAVIAEYVYVSEFNRSIEVKE TSAEIGGLKPGTAYTSVYSAKDADGKLMAGPTVEVT
AC144030      APESVAVIAEYVYVSEFNRSIEVKE TSAEIGGLKPGTAYTSVYSAKDADGKLMAGPTVEVT
AC144109      APESVAVIAEYVYVSEFNRSIEVKE TSAEIGGLKPGTAYTSVYSAKDADGKLMAGPTVEVT
AEQ55312      APESVAVIAEYVYVSEFNRSIEVKE TSAEIGGLKPGTAYTSVYSAKDADGKLMAGPTVEVT

AC143581      TNSDQACSYDEWKE TSAYTGGERVAFNGQVYEAHWTKGDRPDSGGHNLIGGCE
AC143586      TNSDQACSYDEWKE TSAYTGGERVAFNGQVYEAHWTKGDRPDSGGHNLIGGCE
AC144030      TNSDQACSYDEWKE TSAYTGGERVAFNGQVYEAHWTKGDRPDSGGHNLIGGCE
AC144109      TNSDQACSYDEWKE TSAYTGGERVAFNGQVYEAHWTKGDRPDSGGHNLIGGCE
AEQ55312      TNSDQACSYDEWKE TSAYTGGERVAFNGQVYEAHWTKGDRPDSGGHNLIGGCE
    
```

Tạo chủng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp



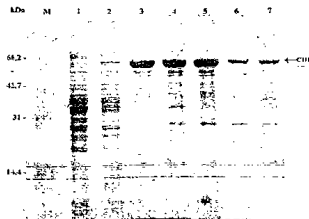
Hình 3. Điện di đồ sản phẩm cắt vector biểu hiện pET22b(+)-chi bằng enzyme BamHI và XhoI. 1: Thang DNA chuẩn; 2: pET22b(+)-chi được cắt bởi enzyme hạn chế

Đoạn gen *chi* trong vector pJET1.2/blunt-*chi* sau khi tinh sạch và vector pET22b(+)*chi* (đã mở vòng bằng hai enzyme hạn chế BamHI và XhoI) được ghép nối nhờ enzyme T4 ligase tạo plasmid tái tổ hợp pET22b(+)-*chi*. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp pET22b(+)-*chi* bằng hai enzyme hạn chế BamHI và XhoI, cho hai băng DNA có kích thước lần lượt là 1,7 kb (tương ứng kích thước của gen *chi*) và 5,5 kb ( tương ứng với kích thước vector gốc pET22b(+)) (Hình 3). Plasmid pET22b(+)-*chi* được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) để tạo chủng vi khuẩn tái tổ hợp có khả năng biểu hiện CHI.

Biểu hiện chitinase tái tổ hợp trong *E. coli* BL21(DE3)

Kết quả nghiên cứu biểu hiện CHI bởi *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-*chi* cho thấy, ở các mẫu được cảm ứng với IPTG có xuất hiện một băng protein có trọng lượng phân tử 60 kDa (Hình 4, ĐC 3, 4, 5, 6 và 7). Đối với mẫu khi thu nhận từ sinh khối tế bào *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-*chi* khi không cảm ứng IPTG và ở chủng *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)*chi* có cảm ứng IPTG đã không thấy xuất hiện băng protein này (Hình 4, ĐC 2). Băng protein tái tổ hợp thu được có trọng lượng 60 kDa tương đương với trọng lượng CHI theo tính toán lý thuyết từ gen *chi*. Kết quả trên hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu về chitinase có khối lượng khoảng 60kDa từ chủng *Enterobacter* sp. NRG4 được biểu hiện trong *E. coli* (Salam et al., 2008). Theo một số nghiên cứu về chitinase tái tổ hợp khác, chitinase từ

*Bacillus circulans* No. 4.1 (Patcharapom et al., 2006) có khối lượng là 66 kDa trong khi chitinase từ *Bacillus licheniformis* A1 có khối lượng khoảng 71 kDa (Cemal et al., 2008).



Hình 4. Điện di đồ protein của *E. coli* BL21 (pET22b(+)-*chi*) khi nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau trên gel SDS-PAGE 12,0%. ĐC M. Thang chuẩn protein. 1: Mẫu đối chứng (dịch phá tế bào của *E. coli* BL21/pET22b(+)) có cảm ứng IPTG; 2: Mẫu đối chứng (dịch phá tế bào của *E. coli* BL21/pET22b(+)-*chi* không cảm ứng IPTG); 3, 4, 5, 6, 7: dịch phá tế bào của chủng *E. coli* BL21/pET22b(+)-*chi* có cảm ứng IPTG và nuôi cấy ở các nhiệt độ 23 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C và 37 °C.

Bảng 2. So sánh hoạt độ enzyme CHI từ *B. licheniformis* KNUC213 và *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+)-*chi*

| Chủng giống                                     | Hoạt tính CHI |        |
|---|---------------|--------|
|   | U/mg protein  | U/ml   |
| <i>B. licheniformis</i> KNUC213                 | 69,0          | 120,6  |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET22b(+)- <i>chi</i> | 321,9         | 1150,3 |

Kiểm tra hoạt độ CHI thu nhận bởi *E. coli* BL21(DE3) pET22b(+)-*chi* và chủng *B. licheniformis* KNUC213 cho thấy cả hai vi khuẩn thể hiện hoạt độ CHI cao; trong đó hoạt độ CHI của chủng *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+)-*chi* (1150,3 U/ml) cao hơn chủng vi khuẩn gốc 9,5 lần (120,6 U/ml) (Bảng 2). Từ kết quả trên cho thấy, chủng *E. coli* BL21 (DE3) pET22b(+)-*chi* có khả năng sinh tổng hợp CHI cao hơn chủng gốc.

## KẾT LUẬN

Gen *chi* mã hóa chitinase từ chủng *B. licheniformis* KNU213 đã được khuếch đại và tách dòng thành công trong vector pJET1.2blunt. Trình tự nucleotide của gen *chi* (JN662350) và trình tự amino acid suy diễn (AEQ55312) đã được đăng ký trên GenBank. Trình tự amino acid của gen *chi* (JN662350), với trình tự enzyme tương ứng cho thấy có sự tương đồng cao (đạt 95+98,5%). Gen *chi* đã được tách dòng tiếp (subclone) vào vector pET22b(+) và biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* BL21(DE3). Enzyme CHI tái, tổ hợp (khi biểu hiện ở nhiệt độ 28°C, nồng độ IPTG 0,4 mM khi OD<sub>600nm</sub> là 0,6 sau 6 giờ cảm ứng) có khối lượng phân tử 60 kDa, hoạt độ chitinase đạt 1150,3 U/ml và hoạt độ này cao hơn so với chủng *B. licheniformis* KNU213 (120,6 U/ml) 9,5 lần.

## Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện thuộc đề tài mã số ĐT.08-10/CNSHCB thuộc Đề án "Phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020".

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cemal S, Murat K, Sabriye C, Ali OB (2008) Cloning, expression, purification and characterisation of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* A1. *Annals of Microbiology* 58 (2): 245-251.
- Dê HD, Hu WL, Huang GR, Li W (2011) Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *African Journal of Biotechnology* 10(13): 2476-2485
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Morimoto K, Karita S, Kimura KS and Ohnishi K (1997) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase CHB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *J Bacteriol* 179:7306-7314.
- Paillard P, Agrawal D, Banerjee T, Patel S (2005) Optimization of process, parameters for chitinase production by soil isolates of *Panacillium chrysogenum* under solid state fermentation. *Process Biochem* 40: 2962-2967.
- Patcharaporn S, Mongkon A, Kunio O, Chanpen W (2006) Purification and characterization of a *Bacillus circulans* No. 4.1 chitinase expressed in *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 331-335.
- Roberts WK, Selitrennikov CP (1988) Plant and bacterial chitinases offer in antifungal activity. *J Gen Microbiol* 134: 169-176.
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Salam M, Dahiya N, Sharma R, Soni SK, Hoondal GS, Tewari R (2008) Cloning, characterization and expression of the chitinase gene of *Enterobacter* sp. NRG4. *Indian J Microbiol* 48:358-364
- Thamthiankul S, Suan S, Tantmavanic S, Panbangred W (2001) Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Pakistani Appl Microbiol Biotechnol* 56: 395-410.

EXPRESSION OF GENE *CHI* ENCODING CHITINASE OF *BAÇILLUS LICHENIFORMIS* KNUC213 IN *ESCHERICHIA COLI*

Quach Ngoc Tung, Nguyen Van Hieu, Phi Quyet Tien\*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

## SUMMARY

Chitinase (EC 3.2.1.132) is the enzyme that catalyzes the hydrolysis of chitin, the linear polymer of  $\beta$ -(1,4) N-acetyl D-glucosamine. Therefore, chitinase is widely applied in pharmaceuticals, industry, agriculture and research. In this study, gene *chi* encoding chitinase of bacterium *Bacillus licheniformis* KNUC213 was amplified, cloned and sequenced. Analysis of gene *chi* sequence, consisting of 1,731 nucleotides coding for a 576-amino-acid protein, showed high similarity (approximately 97%-98%) to that of the corresponding genes in the Genbank. In addition, the gene *chi* lacked 3 nucleotides when compared with other *B. licheniformis* strains. Based on the deduced sequence of chitinase this enzyme could be classified into family 18 of glycosyl hydrolases. The enzyme had isoelectric point of 5.6 and molecular weight of 63-66 kDa. Gene *chi* was then inserted into pET22b(+) vector and transformed into strain of *Escherichia coli* BL21(DE3). The suitable conditions to express recombinant chitinase in *E. coli* BL21(DE3)/pET22b(+)-*chi* were: inducing with 0.4 mM IPTG at bacterial cell density at OD<sub>600nm</sub> of 0.6 unit for 5 hours at 28 °C. The activity of recombinant chitinase reached up 1150.3 U/ml, which was about 9.5-fold higher than that of wide-type strain *B. licheniformis* KNUC213.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, Expression of enzyme, recombinant chitinase, *Escherichia coli*, pET22b(+)

\*Author for correspondence: Tel: +84-9-76860676, Email: tienpq@ibt.ac.vn