

TÁCH ĐỒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN *CSN* MÃ HÓA CHITOSANASE CỦA *BACILLUS CEREBUS* HN90 TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Vũ Văn Lợi, Nguyễn Thị Ngọc Liên, Đỗ Tất Thịnh, Quách Ngọc Tùng, Nguyễn Văn Hiếu, Phí Quýết Tiến

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

TÓM TẮT

Gen *csn* mã hóa chitosanase của chủng *Bacillus cereus* HN90 được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu (thiết kế dựa trên trình tự gen *csn* của các chủng *B. cereus* công bố trên GenBank (NCBI)). Kết quả giải và phân tích trình tự nucleotide cho thấy, *csn* của chủng HN90 gồm 1362 nucleotide mã hóa cho 453 amino acid, có độ tương đồng cao (96 - 99%) so với trình tự của các gen tương ứng trên GenBank. Từ kết quả nhân được, chúng tôi đã xây dựng cây phân loại dựa trên phân tích trình tự *CSN* nhân được trong nghiên cứu. Gen *csn* được gắn vào vector biểu hiện pET22b(+) tạo plasmid tái tổ hợp pET22b-*csn* và biến nạp vào *Escherichia coli* BL21 (DE3). Chúng tái tổ hợp *E. coli* [pET22b-*csn*] biểu hiện hoạt tính *CSN* cao trong môi trường LB, đạt 648,73 U/ml sau 5 giờ cam ứng bởi 0.4 mM isopropylthiogalactoside (IPTG). Gen mã hóa chitosanase từ chủng *Bacillus cereus* HN90 được đăng ký trong GenBank với mã số FJ682391

Từ khóa: *Bacillus cereus*, Biểu hiện enzyme, Chitosanase tái tổ hợp *Escherichia coli*

MỞ ĐẦU

Chitosanase (EC 3.2.1.123) là enzyme ngoại bào có khả năng thủy phân liên kết β -(1-4)-glycosidic trong nội phân tử chitosan tạo các oligomer chitooligosaccharides (COSs) có kích thước khác nhau (Lee *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010). Các nghiên cứu đã chứng minh COSs là sản phẩm có giá trị cao và được ứng dụng nhiều trong thực phẩm chức năng, y học, dược học... do COSs hỗ trợ quá trình tăng cường miễn dịch, kháng khuẩn, kháng nấm, đào thải chất độc... trong cơ thể người (Masako *et al.*, 1999; Juan, Pierre, 2005; Yan *et al.*, 2007). Ngoài ra, khi nghiên cứu đặc tính kháng khuẩn, COSs cho kết quả ứng dụng cao hơn chitosan hay chitin do mức độ polyme hóa và khối lượng phân tử của COSs thấp, dễ xâm nhập và tác động đến vi sinh vật gây bệnh (No *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007).

Chitosanase (*CSN*) được sinh tổng hợp bởi nhiều sinh vật khác nhau, bao gồm vi khuẩn, nấm, côn trùng và thực vật. Trong những năm gần đây, nhu cầu sử dụng *CSN* nhằm sản xuất COSs từ chitosan có xu hướng gia tăng tại nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, giá thành sản xuất *CSN* cao đã làm hạn chế khả năng ứng dụng của nó. Vì vậy, để sản xuất *CSN* trong công nghiệp, cần tiếp cận theo nhiều cách khác nhau, tuyển chọn chủng giống, thành phần môi trường, điều kiện lên men... để sản xuất enzyme

nhanh, giá thành rẻ và có hoạt tính cao. So với tuyến chọn chủng tự nhiên, ứng dụng kỹ thuật di truyền và công nghệ lên men là một cách tiếp cận hiệu quả để sản xuất *CSN* trong thực tế (Yang *et al.*, 2010).

Trong bài báo này, nghiên cứu tập trung vào tách đồng, biểu hiện gen *csn* mã hóa chitosanase của *B. cereus* HN90 trong *E. coli* BL21 (DE3) nhằm sinh tổng hợp *CSN* hoạt tính cao, tạo tiền đề cho sản xuất enzyme ở quy mô lớn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chung giống vi sinh vật, plasmid và vật liệu khác

Chủng *Bacillus cereus* HN90 có hoạt tính chitosanase cao, phân lập tại Việt Nam nhận từ bộ sưu tập giống phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ sinh học. Trình tự gen 16S rDNA của chủng *B. cereus* HN90 được đăng ký trên ngân hàng GenBank (NCBI) dưới mã số [HQ438588](#). Chủng *Escherichia coli* XL1-blue [*Δ*micA183 Δ*micC* B-hsdR^{SMV} mrr1173 endA1 supE44 thr-1 gvs196 relA1 lac] (Stratagene, Mỹ) được sử dụng để nhân đồng gen. Chủng *E. coli* BL21(DE3) [*F-omp^h hsd SB (pBmB)* gel don (DE3) *phvS* (CamI)] nhân từ phòng thí nghiệm Genomics, Khoa Vi sinh vật học, Trường đại học quốc gia Kyungpook, Hàn Quốc được sử dụng làm chủng chủ để biểu hiện enzyme tái tổ hợp chitosanase.

Vector tách dòng pCR⁺2.1 (Invitrogen, Mỹ) được sử dụng để tách dòng gen, plasmid pET22b(+)
(Invitrogen, Mỹ) được sử dụng để thiết kế vector biểu hiện. Enzyme giới hạn *Xho*I, *Eco*RI, T4 DNA ligase, RNase (Invitrogen, Mỹ)

Khuếch đại gen *csn* mã hóa chitosanase của *B. cereus* HN90

Chung *Bacillus cereus* HN90 được nuôi trong môi trường có thành phần sau (g/l): chitosan 10 g, Na₂HPO₄ 1.3 g, KH₂PO₄ 3.0 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1.0 g, MgSO₄ 0.24 g và CaCl₂ 0.01 g. Sau 20 giờ nuôi cấy, ly tâm thu tế bào ở 10 000 vòng/phút trong 5 phút. DNA tổng của chủng HN90 được tách chiết theo phương pháp của Sambrook và Russell (Sambrook, Russell, 2001)

Tách dòng và giai trình tự gen *csn* mã hóa chitosanase

Gen *csn* mã hóa chitosanase được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng DNA tổng số của chủng HN90 làm khuôn, cặp mồi (có vị trí enzyme giới hạn *Eco*RI và *Xho*I) *csn*-F: 5'-**(G)AATCCGCTGACAACATAATGAATGG-3'** và *csn*-R2: 5'-**GCTCGAGTCTTCTTAAAGTAA** (CATTCTC-3' theo chu trình nhiệt 94°C trong 5 phút, 30 chu trình (94°C trong 90 giây, 53°C trong 90 giây; 72°C trong 90 giây), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, tinh sạch bằng kit PureLinkTM – DNA Purification (Invitrogen, Mỹ). Gen *csn* có kích thước khoảng 1,4 kb sau khi tinh sạch được gắn vào vector pCR⁺2.1 (TA cloning Kit, Invitrogen, Mỹ) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Trình tự nucleotide của gen *csn* trên vector tách dòng pCR⁺2.1: *csn* được xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM⁺3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả giai trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm phân tích DNA STAR (Lasergene Inc., Madison, WI, Mỹ), so sánh với các gen tương ứng đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Trình tự amino acid suy diễn của *csn* được phân tích và so sánh với trình tự amino acid của các protein tương ứng lần lượt bằng công cụ trên website <http://www.expasy.ch> và Clustal-X (ver. 1.83); xây dựng cây phân loại bằng phần mềm TreeView ver 1.6.6.

Thiết kế vector biểu hiện *csn* trong *E. coli*

Xử lý vector pCR2.1::*csn*, vector biểu hiện pET22b(+)
với đồng thời hai enzyme giới hạn *Eco*RI và *Xho*I. Tách và tinh sạch đoạn gen *csn* và vector pET22b(+)
có kích thước lần lượt khoảng 1,4 kb và 5,5 kb. Gắn đoạn gen *csn* vào vector pET22b(+)
bằng enzyme T4 DNA ligase ở 22°C trong thời gian 1 giờ. Biến nạp sản phẩm nhận được sau phản ứng ghép nối vào chủng *E. coli* XL1-blue. Tách plasmid thu được trong tế bào *E. coli*, xử lý bằng enzyme giới hạn để kiểm tra kích thước của đoạn gen được chèn trong vector biểu hiện pET22b(+). Vector biểu hiện pET22b::*csn* sau khi đã kiểm tra được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21(DE3). Tách plasmid từ chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21(DE3) mang vector pET22b::*csn* để kiểm tra tinh chỉnh xác của vector đã được biến nạp. Chủng *E. coli* BL21(DE3) mang vector pET22b::*csn* được sử dụng để biểu hiện chitosanase tái tổ hợp

Biểu hiện chitosanase tái tổ hợp

Gen *csn* được biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21 theo quy trình sau: 1 khuẩn lạc *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid pET22b::*csn* được nuôi cấy qua đêm trên môi trường lỏng Luria-Bertani (LB) có bổ sung 100 µg/ml ampicillin ở 37°C trên máy lắc 220 vòng/phút. Chuyển 0,5 ml dịch nuôi cấy sang 5 ml môi trường LB có bổ sung ampicillin và nuôi trên máy lắc ở 37°C cho đến khi kết quả đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 600 nm đạt 0,6 đơn vị. Quá trình gây cảm ứng bằng isopropylthiogalactoside (IPTG) thực hiện ở nồng độ tối ưu là 0,4 mM, ở các nhiệt độ 20°C, 22°C, 25°C, 30°C và 37°C trong các khoảng thời gian khác nhau. Sau khi nuôi cấy, ly tâm dịch lên men ở 8.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu sinh khối vi khuẩn. Sinh khối được hòa tan trong 1% Triton X-100 trong đêm PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ và 1,8 mM KH₂PO₄), bổ sung lysozyme (100 µg/ml) và ủ trong đá trong 15 phút. Tiếp đó, tế bào được phá bằng sóng siêu âm ở 20 Hz trong 2 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút thu dịch nổi và điện di kiểm tra trên gel polyacrylamid 10%.

Xác định hoạt tính chitosanase

Hoạt tính chitosanase xác định bằng cách sử dụng colloidal-chitosan (Sigma, Đức) làm cơ chất. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 0,4 ml colloidal-

chitosan 1.0% và 0.4 ml dung dịch enzyme CSN, u ở 37°C trong 30 phút. Phản ứng được dừng lại bằng 20 µl NaOH 10N. Tiếp đó, ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 5 phút. Lượng đường khử giải phóng ra trong phản ứng được xác định bằng phương pháp DNS (Miller, 1959) Một đơn vị hoạt tính chitosanase được xác định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 µmol D - glucosamine trong thời gian một phút ở pH 6.0 (Pyoung et al., 2004)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại gen *csn* của *B. cereus* HN90

DNA tổng số của chủng *B. cereus* HN90 sau khi xử lý với Rnase được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại gen *csn*. Các cặp mồi *csn*-F và *csn*-R2 có hai vị trí giới hạn *EcoRI* và *XhoI* nhằm tạo vector biểu hiện trên nền pET22b(+).

Sản phẩm khuếch đại gen *csn* bằng phản ứng PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước 1,4 kb trên bản gel agarose 1%, tương ứng với kích thước mong đợi khi thiết kế mỗi khuếch đại gen *csn* của *B. cereus* HN90 (Hình 1A). Kết quả khuếch đại gen *csn* bằng phản ứng PCR cho thấy cặp mồi được thiết kế trong thí nghiệm là phù hợp và đặc hiệu. Do vậy, sản phẩm PCR tiếp tục được sử dụng trong thí nghiệm nhân dòng và giải trình tự gen.

Tách dòng và phân tích trình tự gen *csn* của chủng *B. cereus* HN90

Sản phẩm của phản ứng PCR khuếch đại gen *csn* được tinh sạch và gắn vào vector pCR².1. Sau khi được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* XL1-blue, plasmid pCR².1:*csn* được tách khỏi tế bào *E. coli* XL1-blue, xử lý các enzyme giới hạn *EcoRI* (Hình 1B). Kết quả sản phẩm sau xử lý với enzyme giới hạn trên bản điện di cho thấy hai băng DNA rõ nét có kích thước 1,4 kb và 3,9 kb. Băng DNA có kích thước 3,9 kb thể hiện cho vector pCR².1 và đoạn gen *csn* có kích thước 1,4 kb (Hình 1B). Kết quả nhận được phù hợp với kích thước mong đợi. Vì vậy, plasmid pCR².1:*csn* được sử dụng để giải trình tự hai chiều cho đoạn gen *csn* sử dụng cặp mồi M13-F và M13-R

Kết quả phân tích trình tự gen *csn* trong vector tách dòng pCR².1:*csn* cho thấy, gen *csn* có độ dài 1362 bp, mã hóa cho protein gồm 453 amino acid. Khi so sánh trình tự gen *csn* của chủng *B. cereus*

HN90 với các gen tương ứng của các chủng *B. cereus* khác trên GenBank (NCBI) cho thấy độ tương đồng trình tự nucleotide cao, đạt 96% - 99% (kết quả không công bố). Trình tự gen *csn* của *B. cereus* HN90 được đăng ký trên GenBank (NCBI) dưới mã số truy cập JF682391

Khi so sánh độ tương đồng trình tự amino acid của CSN từ *B. cereus* HN90 (đăng ký dưới mã số truy cập trên GenBank là [AEC329421](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AEC329421)) với các trình tự amino acid của CSN từ các chủng *B. cereus* khác cho tỷ lệ tương đồng cao (đạt trung bình 99%). Kết quả trên cây phân loại di truyền cho thấy, trình tự CSN của chủng HN90 thể hiện độ tương đồng cao nhất với trình tự protein tương ứng của *B. cereus* KNUC52 (mã số truy cập AAQ19679) (Hình 2)

Thiết kế vector biểu hiện *csn* trong *E. coli* BL21

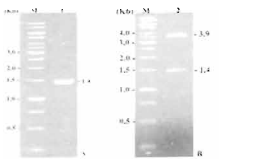
Gen *csn* được cắt khỏi vector pCR2.1:*csn* bằng hai enzyme giới hạn *EcoRI* và *XhoI*, đoạn gen *csn* được gắn vào vector biểu hiện pl:T22b(-) tại hai vị trí giới hạn tương ứng để tạo vector biểu hiện trong *E. coli*. Vector biểu hiện pET22b:*csn* được biến nạp vào chủng *E. coli* XL1-blue. Khuẩn lạc đặc trưng mọc trên môi trường chứa ampicillin 100 µg/ml được nuôi cấy, tách plasmid và cắt kiểm tra bằng hai enzyme giới hạn *EcoRI*, *XhoI* (Hình 3)

Kết quả hình 3 cho thấy, vector biểu hiện pl:T22b:*csn* sau khi xử lý với *EcoRI*, *XhoI* cho hai băng DNA có kích thước lần lượt là 1,4 kb và 5,5 kb, tương ứng với kích thước của gen *csn* và vector gốc pl:T22b(+). Do vậy, vector biểu hiện tái tổ hợp pl:T22b:*csn* đã được thiết kế thành công

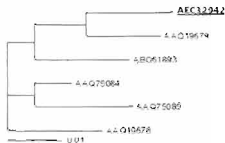
Biểu hiện chitosanase tái tổ hợp trong *E. coli*

Plasmid tái tổ hợp pET22b:*csn* được biến nạp vào chủng biểu hiện *E. coli* BL21 (DE3) nhằm tạo chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng sinh CSN. Các đồng thể bào biểu hiện CSN được nuôi trong môi trường LB chứa ampicillin 100 µg/ml, trên máy lắc 220 vòng/phút ở 37°C cho đến khi OD_{600nm} đạt 0,6 đơn vị

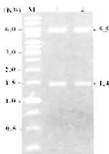
Sau khi cảm ứng với IPTG nồng độ 0,4 mM, các chủng *E. coli* BL21 [pET22b:*csn*] được nuôi ở các nhiệt độ 20°C, 22°C, 25°C, 30°C và 37°C. Thu mẫu sau các thời gian gây cảm ứng khác nhau để xác định hoạt tính chitosanase và điện di kiểm tra trên gel polyacrylamid



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen *csn* (A) và plasmid pCR2.1-*csn* (B) trên gel agarose 1,0% Bảng M⁺ Thang DNA chuẩn. 1. Sản phẩm phản ứng PCR khuếch đại gen *csn* từ DNA tổng số của *B. cereus* HN90. 2. Plasmid pCR2.1-*csn* được cắt bởi enzyme giới hạn *EcoRI*



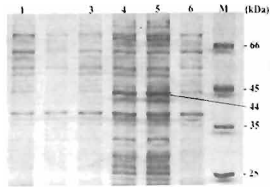
Hình 2. Cây phân loại dựa trên phân tích trình tự amino acid suy diễn của CSN từ chủng *B. cereus* HN90 (mã số truy cập trên GenBank được gạch chân) và các trình tự CSN tương ứng của các chủng *B. cereus* khác (tên của trình tự amino acid được ghi bằng số đăng ký trên GenBank). Giá trị bootstrap (%) thể hiện tỷ lệ sai khác về di truyền



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm cắt vector biểu hiện pET22b-*csn* bằng enzyme giới hạn M⁺ Thang DNA chuẩn. Bảng 1 và 2. Vector biểu hiện pET22b-*csn* được cắt bởi hai enzyme giới hạn *EcoRI* và *XhoI*.

Bảng 1. So sánh hoạt tính enzyme CSN từ *Bacillus cereus* HN90 và *E. coli* BL21 (DE3) [pET22b-*csn*]

Chủng giống	Hoạt tính CSN	
	U/mg protein	U/ml
<i>B. cereus</i> HN90	207,2	352,3
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pET22b- <i>csn</i>]	519,0	648,7



Hình 4. Điện di xác định protein của *E. coli* BL21 [pET22b-*csn*] khi nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau trên gel SDS-PAGE Bảng M⁺ Thang chuẩn protein Bảng 1 Mẫu đối chứng (dịch phá tế bào của *E. coli* BL21 [pET22b]); Bảng 2, 3, 4, 5, 6 lần lượt là dịch phá tế bào của chủng *E. coli* BL21 [pET22b-*csn*] nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 30°C, 28°C, 25°C và 22°C.

Kết quả trên hình 4 cho thấy, các mẫu cảm ứng với IPTG ở đường chạy 3 – 6 có xuất hiện một băng protein có khối lượng 44 kDa khác biệt so với mẫu đối chứng (đường chạy 1). Băng protein thu được có kích thước 44 kDa tương đương với kích thước CSN theo tính toán lý thuyết. Kết quả phân tích điện di enzyme không biến tính (zymography) trên bản điện di có bổ sung cơ chất chitosan cho thấy enzyme CSN tái tổ hợp có kích thước 44 kDa (kết quả không công bố). Như vậy, có thể kết luận rằng protein tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trong *E. coli* BL21. Sau khi lựa chọn điều kiện biểu hiện CSN thích hợp, chủng *E. coli* BL21 [pET22b-*csn*] tái tổ hợp được gây cảm ứng IPTG ở nồng độ 0.4 mM, nuôi ở 25°C trên máy lắc 220 vòng/phút và thu mẫu sau 5 giờ cảm ứng.

Xác định hoạt tính của chitosanase tái tổ hợp

Khi so sánh hoạt tính enzyme CSN sinh tổng hợp bởi tái tổ hợp *E. coli* BL21 [pET22b-*csn*] và chủng gốc cho thấy, hoạt tính CSN của chủng tái tổ hợp cao hơn chủng vi khuẩn gốc lần lượt là 2,5 lần (U/mg protein) và 1,84 lần (U/ml dịch lên men) (Bảng 1).

Từ kết quả trên cho thấy, chủng tảo tảo hợp nhận được đã thể hiện khả năng sinh tổng hợp CSN có hoạt tính cao hơn chủng gốc. Để nâng cao khả năng sinh tổng hợp CSN tảo tảo hợp nữa, cần có những nghiên cứu tiếp theo về lựa chọn môi trường, điều kiện cảm ứng, dòng thái lên men.

KẾT LUẬN

Gen *csn* từ chủng *B. cereus* HN90 được khuếch đại bằng phản ứng PCR, tách động và phân tích trình tự nucleotide. Trình tự gen *csn* nhận được trong nghiên cứu thể hiện độ tương đồng cao (đạt 96%-99%) so với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI). Gen *csn* của chủng *B. cereus* HN90 được đăng ký tại ngân hàng dữ liệu GenBank dưới mã số truy cập FJ682391. Từ kết quả nhận được, chúng tôi đã xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự acid amin của CSN trong nghiên cứu và trình tự acid amin của các CSN khác trên GenBank. Đã tạo chủng tảo tảo hợp và biểu hiện CSN thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Hoạt tính CSN tảo tảo hợp gốc khi biểu hiện ở 25°C sau 5 giờ cảm ứng bởi 0,4 mM IPTG đạt 648,73 U/ml, cao hơn 1,84 lần so với hoạt tính CSN của chủng gốc.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của Bộ Công thương cấp cho đề tài mã số DT 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". Xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trong Viện Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

CLONING AND EXPRESSION OF GENE *CSN* ENCODING CHITOSANASE OF *BACILLUS CEREUS* HN90 IN *ESCHERICHIA COLI*

Vu Van Loi, Nguyen Thi Ngoc Lien, Do Tat Thinh, Quach Ngoc Tung, Nguyen Van Hieu, Phi Quyet Tien*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Gene *csn* encoding chitosanase of bacterial strain *Bacillus cereus* HN90 isolated from Vietnam was amplified by PCR using specific primers that were designed on the basis of similar sequences encoding *csn* of other *B. cereus* strains deposited on GenBank (NCBI). The experimental results revealed that *csn* gene sequence of strain HN90, consists of 1362 nucleotides coding for a 453-amino-acid protein. showed high

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Juan CC, Pierre VC (2005) Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochem Engin J* 25:165-172.
- Lee YS, Yoo JS, Chung SY, Lee YC, Cho YS, Choi YL (2006) Cloning, purification, and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101. *Appl Microbiol Biotechnol* 73 113-121
- Masako KO, Jae KP, Kumki S, Nubuhisa O (1999) Purification, characterization and gene analysis chitosanase (ChoA) from *Mastotectacter chitosanotubidus* 3001. *J Bacteriol*, 6642-6649
- Miller L (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31 426-431
- No HK, Park NY, Lee SH, Hwang HJ, Meyers SP (2002) Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomer with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tolu. *J Food Sci* 67(4) 1511-1514
- Pyoung IK, Tae HK, Kyoung JC, In SK, Ki-chul C (2004) Purification of a constitutive chitosanase produced by *Bacillus* sp. MET 1299 with cloning and expression of the gene. *FEBS Microbiol Lett* 240 31-39
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor NY
- Yang L, Yang P, Wang M (2010) Expression of chitosanase gene from *Aspergillus fumigatus* JXSJ-97 in *Pichia pastoris*. *Acta J Biochem Res* 4(8) 204-209
- Yan WDAG, Peigen Z, Jianxing YMS, Xiaorong PMS, Pingping WMS, Weiqing LMS, Shendan TMS (2007) Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition* 16 (1) 174-177

* Author for correspondence. Tel. 84-4-38363257, Fax 84-4-38363144. E-mail: tiengpq@vibt.ac.vn

homology (approximately 96%-99%) with that from other *B. cereus* strains. The *csn* gene sequence in the present study was deposited onto GenBank under the accession number FJ682391. Gene *csn* was then subcloned into expression vector pET22b(+) to yield plasmid pET22b::*csn*. The obtained plasmid was then transferred into host bacterium to generate recombinant strain *E. coli* BL21 [pET22b::*csn*]. When expressing recombinant chitosanase in *E. coli* BL21(DE3), the optimal conditions were found by inducing with 0.4 mM IPTG at bacterial cell density at OD_{600nm} of 0.6 unit for 5 h at 25°C. On the SDS-PAGE gel, the molecular mass of the overexpressed chitosanase showed about 44 kDa, corresponding closely to the expected one. Under the optimized conditions, the activity of recombinant chitosanase reached up 519.0 U (mg of protein)⁻¹ which was about 2.5-fold higher than that of wide-type strain *B. cereus* HN90.

Keywords: *Bacillus cereus*, expression of enzyme, recombinant chitosanase, *Escherichia coli*