

BIỂU HIỆN CAO GEN MÃ HÓA ENZYME PECTATE LYASE TRONG *BACILLUS SUBTILIS* 168

Võ Hoài Bắc, Đỗ Thị Thu Hằng, Lê Trọng Tài, Lê Văn Trường*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *le_van_truong@yahoo.com

TÓM TẮT: Pectate lyase là enzyme phân hủy polygalacturonate của vách tế bào thực vật tạo ra các oligogalacturonates. Những năm gần đây, pectate lyase đã được nhiều nhà khoa học quan tâm bởi những tiềm năng ứng dụng to lớn của chúng trong công nghiệp dệt, công nghiệp sản xuất bột giấy. Gen *pel* mã hóa cho pectate lyase từ *Bacillus subtilis* VBS11 đã được dung hợp với promoter α -amylase của *B. amyloliquefaciens*. Thiết kế này được gắn vào vector pMSE3 và biến nạp vào chủng biểu hiện *Bacillus subtilis* 168 để biểu hiện gen với sự điều khiển của promoter *B_{Apro}* từ *Bacillus amyloliquefaciens*. Sau khi biểu hiện, lượng pectate lyase được tiết ra với mức độ cao, đạt 88,6 U/ml trên môi trường BMM.

Từ khóa: *Bacillus*, expression, pectate lyase, promoter.

MỞ ĐẦU

Endo pectate lyase (Pel), (EC 4.2.2.2) là một pectinase kiềm phân hủy polygalacturonate tạo ra các oligogalacturonate. Enzyme này phân cắt ngẫu nhiên liên kết α -1,4 glycosidic của polygalacturonate trong thành tế bào thực vật thông qua phản ứng β -elimination tạo ra các oligogalacturonate có liên kết đôi giữa C4 và C5 ở đầu đường không khử [3]. Trong công nghiệp dệt Pel có ứng dụng quan trọng là loại bỏ pectin trong vải bông thô, do đó có thể thay thế chất kiềm trong khâu nấu kiềm, làm tăng chất lượng của vải bông và giảm thiểu ô nhiễm môi trường do chất kiềm gây ra [4, 6, 10, 11, 14]. Ngoài ra Pel còn được ứng dụng trong công nghệ sản xuất bột giấy, tạo ra bột giấy chất lượng cao để dùng sản xuất các loại giấy cao cấp. Gene pectate lyase (*pel*) từ *B. subtilis* đã được biểu hiện trong *E. coli* nhưng mức độ biểu hiện rất thấp (chỉ đạt 1 U/ml) [7]. Gần đây, gene pectate lyase từ *B. subtilis* WSHB04-02 đã được biểu hiện trong nấm men *P. pastoris* cho hoạt tính cao đạt 100 U/ml [16]. Tuy nhiên, với hệ biểu hiện nấm men đòi hỏi thời gian lên men lâu, môi trường lên men giàu dinh dưỡng cho nên giá thành sẽ cao, vì vậy việc đi tìm một hệ biểu hiện mạnh để biểu hiện Pel tái tổ hợp đủ lớn phục vụ cho công nghiệp là rất cần thiết. Trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả biểu hiện gen *pel* của chủng *B. subtilis* VBS11 phân lập từ Việt Nam dưới sự điều khiển của promoter α -amylase từ *B. amyloliquefaciens* (*B_{Apro}*) sử dụng chủng biểu hiện *B. subtilis* 168.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng vi sinh vật: Chủng *Bacillus subtilis* 168 (BS168) được sử dụng làm chủng biểu hiện gen.

Các môi trường nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy *B. subtilis*: LB (1% Tryptone, 0,5% Yeast extract, 1% NaCl). Môi trường LB và môi trường tối thiểu Belisky được sử dụng làm môi trường biểu hiện PL trong BS168. Kháng sinh kanamycin (Km) được bổ sung vào môi trường nồng độ 10 μ g/ml khi cần thiết.

Plasmid, primer: Plasmid đa copy pMSE3 được sử dụng làm vector biểu hiện chủng BS168. Gen pectate lyase (*pel*) sử dụng trong biểu hiện từ chủng *B. subtilis* VBS11 đã được tách dòng và giải trình tự trong công bố trước đây [8]. Trình tự primer để nhân gen *pel* gồm cặp 1: B*Spe*I-F-*Hind*III: atcgaagctt atgaaaaagtgatgttagc và B*Spe*I-R-*Hind*III: atga agctttactgctgactgtt với gen được nhân lên là *pel*; cặp 2: *pel*-*B_{Apro}*-pMSE-*Xho*I: acttctcgagt cttgtaaatgagtgctag và *Pel*-pMSE-*Xba*I: atcg tctagaagctttactgctgactgtt với gen nhân lên là *B_{Apro}*-*pel*.

Phương pháp

Nhân gen bằng PCR

Chương trình nhân gen *pel* gồm 30 chu kỳ với 3 bước, bước 1: biến tính sợi DNA khuôn ở 94°C trong 2 phút; bước 2: biến tính ở 94 °C trong 20 giây, bắt cặp mỗi với sợi khuôn ở 50

°C trong 30 giây; bước 3: tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72 °C trong 90 giây. Phản ứng kết thúc ở 72 °C trong 6 phút và giữ mẫu ở 4 °C.

Các phương pháp thao tác với DNA

Tách chiết plasmid từ *Bacillus*: tế bào *Bacillus* được nuôi qua đêm trong môi trường LB bổ sung Km nồng độ 100 µg/ml ở 37 °C. Tế bào được thu nhận bằng li tâm 1,5 ml dịch nuôi cấy trong ống eppendorf ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch trên, hòa tế bào vào 300 µl đệm 50 mM tris, 5 mM EDTA, 50 µg/ml lysozyme pH 7,5. Ủ hỗn hợp trên ở 37°C trong 1 giờ sau đó DNA plasmid được tách chiết bằng phương pháp li giải với NaOH và SDS mô tả của Sambrook (1989) [13]. Biến nạp plasmid vào *Bacillus subtilis* được sử dụng phương pháp tế bào trần (protoplast) theo mô tả của Chang et al. (1979) [5].

Biểu hiện gen *pel* trong tế bào *B. subtilis* 168

Tế bào BS 168 mang vector pMSE3/*BAppro-pel* được nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh Km (nồng độ 6 µg/ml), lắc 200 vòng/phút, 37 °C qua đêm. Chuyển dịch nuôi cấy sang môi trường BMM theo tỉ lệ 1/100, nuôi cấy tiếp ở cùng điều kiện ban đầu. Các mẫu được thu ở các thời điểm khác nhau.

Thu nhận enzyme pectate lyase tái tổ hợp từ dịch lên men

Chủng *B. subtilis* tái tổ hợp sau khi biểu hiện trên môi trường lỏng được li tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại tế bào. Dịch nổi chứa Pel ngoại bào được thu nhận và cất giữ ở - 80 °C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Xác định hoạt tính pectinase bằng phương pháp đường khử

Hoạt tính pectinase được xác định bằng phương pháp đường khử như mô tả của Bernfeld (1955) [2]. 50 µl dịch enzyme ngoại bào được bổ sung vào 450 µl dung dịch phản ứng chứa 0,2% pectin từ citrus (Sigma) trong đệm Tris 50 mM, NaCl 20 mM, CaCl₂ 0,1 mM pH 10. Phản ứng được thực hiện ở 42 °C trong 1 giờ. Phản ứng enzyme được kết thúc bằng việc bổ sung 500 µl dung dịch 3,5 dinitrosalicylic acid (DNSA), đun sôi 10 phút sau đó dung dịch

phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Li tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút trước khi đo ở bước sóng 530 nm trên máy đo quang phổ. Một đơn vị hoạt tính enzyme (unit) được định nghĩa là lượng enzyme pectinase phân cắt cơ chất pectin tạo ra 1 µM glucose trong 1 phút.

Điện di protein trên gel biến tính SDS-PAGE

Dịch chứa enzyme ngoại bào sau khi biểu hiện (15 µl) được hoà trong 5 µl dung dịch đệm mẫu có 1% SDS và 1% DTT. Dịch mẫu được biến tính ở 95°C trong 10 phút sau đó làm lạnh trong đá tan và tra mẫu vào điện di trên gel polyacrylamide 12%. Sau khi kết thúc điện di, gel được nhuộm trong dung dịch nhuộm 0,1% coomassie brilliant blue trong 1 giờ và rửa trong đệm rửa 5% ethanol, 10% acetic acid để phát hiện băng protein.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dung hợp promoter *BAppro* vào gen *pel*

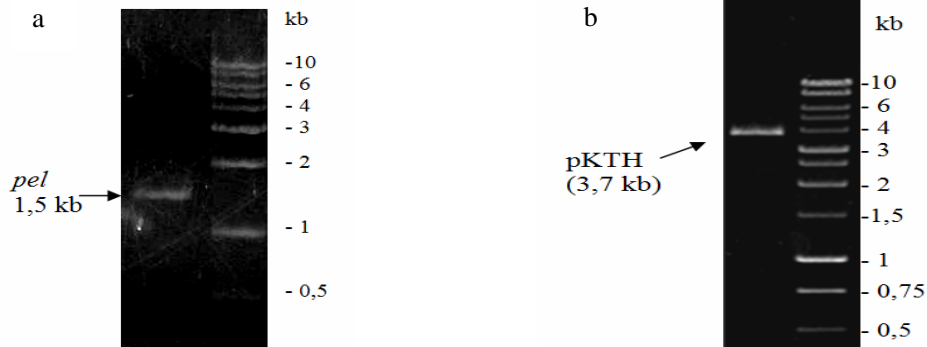
Plasmid pKTH/pUC là plasmid mang promoter *BAppro* được treo điểm *Hind*III ở đầu 3' do đó muốn nối gen biểu hiện vào promoter thì cần thiết phải tạo một điểm *Hind*III ở đầu 5' của gen. Để tạo gen *pel* mang *Hind*III, cặp primer (BSpelF: atcgaagcttAtgaaaaagtgtgtagc, BSpelR: atcgaagctttactgtgactgtt) và DNA của chủng VBS11 được sử dụng để nhân gen bằng PCR. Sản phẩm PCR được tách trên điện di agarose để thu băng 1,5 kb (hình 1a) sau đó xử lý bằng *Hind*III để tạo đầu dính. Để thu nhận pKTH-*BAppro* mang promoter *BAppro*, plasmid pKTH/pUC được cắt bằng *Hind*III, băng DNA 3,7 kb được thu nhận (hình 1b).

Để tạo gen dung hợp *BAppro-pel*, trước hết pKTH-*BAppro* và *pel* được nối với nhau bằng T4 ligase để tạo sợi khuôn cho phản ứng nhân gen bằng PCR, sử dụng cặp primer pel-BaP-pMSE-XhoI: acttctcgagctctgtaaagtgtgtagc và pel-pMSE-XbaI: atcgtctagaagctttactgtgactgtt. Phản ứng gắn *BAppro* với *pel* có hai khả năng xảy ra: khả năng thứ nhất là *BAppro* nối với *pel* thuận chiều, tức là promoter *BAppro* được nối trực tiếp với đầu 5' của gen *pel*. Khả năng thứ hai là *BAppro* nối với *pel* ngược chiều, tức là *BAppro* nối trực tiếp với đầu 3' của gen *pel*. Do primer thuận (primer F) được thiết kế bám vào vị trí đầu 5' của promoter *BAppro* còn primer

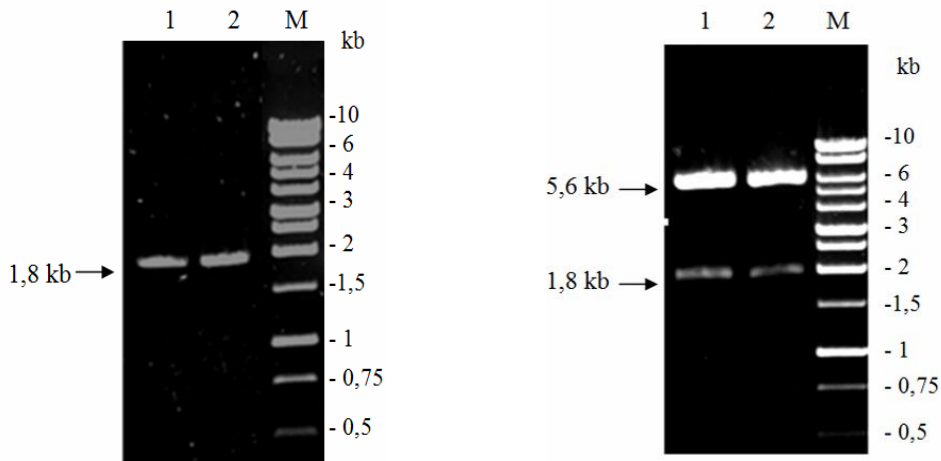
ngịch (primer R) bám vào vị trí đầu 3' của *pel* do đó khi làm phản ứng PCR thì chỉ *BApro-pel* nổi thuận chiều mới được nhân lên. Gen dung hợp *BApro-pel* sẽ mang promoter *BApro* và terminator của *pel*.

Sau khi thực hiện phản ứng nhân gen bằng cặp mồi trên với khuôn mẫu là sản phẩm gen

dung hợp ở trên, sản phẩm PCR được kiểm tra trên điện di agarose 0,8%. Kết quả cho thấy cặp primer này đều nhân lên một đoạn gen khoảng 1,8 kb đúng bằng tổng chiều dài của promoter *BApro* (0,384 kb) và gen *pel* (1,438 kb). Điều này chứng tỏ promoter *BApro* đã được nối thuận chiều với gen *pel* và gen dung hợp *BApro-pel* đã được nhân lên bằng PCR (hình 2).



Hình 1. Nhân gen *pel* từ VBS11 (a) và thu nhận pKTH-*BApro* từ pKTH/pUC (b).



Hình 2. Nhân gen dung hợp *BApro-pel* bằng PCR

1-2. *BApro-pel* được nhân lên bằng PCR; M. DNA marker 1 kb (EUR). Băng DNA 1,8 kb được chỉ bằng mũi tên.

Hình 3. Kiểm tra gen dung hợp *BApro-pel* trong pMSE/*BApro-pel*

1-2. pMSE/*BApro-pel* được cắt bằng *XhoI* và *XbaI*; M. DNA marker 1 kb (EUR). Băng DNA 5,6 kb và 1,8 kb được chỉ bằng mũi tên.

Tạo vector đa copy pMSE/*BApro-pel*

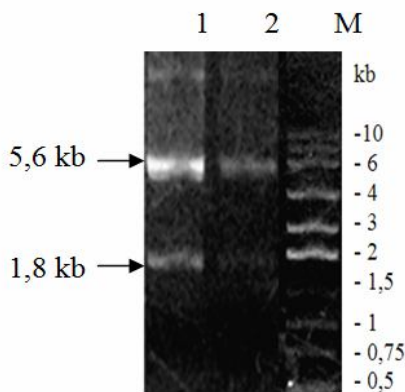
Vector pMSE3 là vector con thoi, có thể nhân lên trong tế bào *E. coli* và *Bacillus*. Để đưa gen dung hợp *BApro-pel* vào pMSE3, *BApro-pel* và vector được xử lý với *XhoI* và *XbaI* sau

đó gắn với nhau bằng T4 ligase ở 16°C qua đêm. Sản phẩm gắn được biến nạp vào *E. coli* DH10b bằng phương pháp xung điện, chọn lọc trên môi trường LB thạch đĩa bổ sung 50 µg/ml kanamycin và 20 µg/ml streptomycin. Các thể biến nạp sinh trưởng được trên môi trường chọn

lọc được nuôi cấy trong môi trường lỏng để tách chiết plasmid và kiểm tra gen dung hợp bằng enzyme giới hạn. Kết quả trên điện di agarose cho thấy các plasmid sau khi cắt bằng *XhoI* và *XbaI* đều cho 1 băng vector kích thước khoảng 5,6 kb và một băng gen dung hợp kích thước 1,8 kb. Điều này chứng tỏ gen dung hợp *BAppro-pel* đã được đưa thành công vào vector pMSE3 (hình 3).

Biến nạp plasmid đa copy pMSE3/BAppro-pel vào *B. subtilis* 168

Plasmid pMSE3/BAppro-pel được biến nạp vào tế bào *B. subtilis* 168 theo phương pháp tế bào trần như mô tả trong phần phương pháp. Lượng plasmid sử dụng để biến nạp là 5 µg trong thể tích 50 µl. Sau khi biến nạp, các thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường thạch đĩa bổ sung 20 µg/ml kanamycin. Những khuẩn lạc sinh trưởng được trên môi trường chọn lọc được cấy chuyển sang môi trường LB lỏng 20 µg/ml kanamycin qua đêm để tách plasmid và kiểm tra sự có mặt của plasmid pMSE3/BAppro-pel bằng *XhoI* và *XbaI*. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu kiểm tra đều có một băng 5,6 kb (là băng vector pMSE3) và một băng 1,8 kb (là băng gen dung hợp *BAppro-pel*). Điều này chứng tỏ pMSE3/BAppro-pel đã được biến nạp thành công vào *B. subtilis* 168 (hình 4).



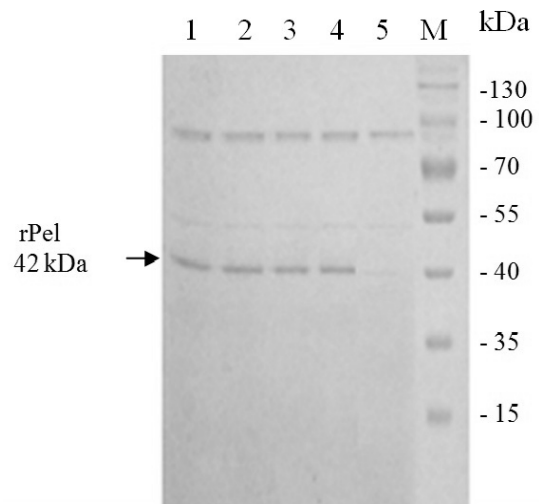
Hình 4. Kiểm tra pMSE/BAppro-pel trong tế bào *B. subtilis* 168 tái tổ hợp

1-2. pMSE/BAppro-pel được cắt bằng *XhoI* và *XbaI*; 3. DNA marker 1 kb. Băng vector (5,6 kb) và *BAppro-pel* (1,8 kb) được chỉ bằng mũi tên.

Để kiểm tra khả năng biểu hiện pectate lyase của các thể biến nạp, các thể biến nạp

khác nhau được nuôi cấy trên môi trường LB + 20 µg/ml Kan. Sau 24 giờ nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 37°C, enzyme ngoại bào được thu nhận bằng li tâm loại bỏ sinh khối và kiểm tra protein trên điện di SDS-PAGE cũng như khả năng phân hủy cơ chất pectin.

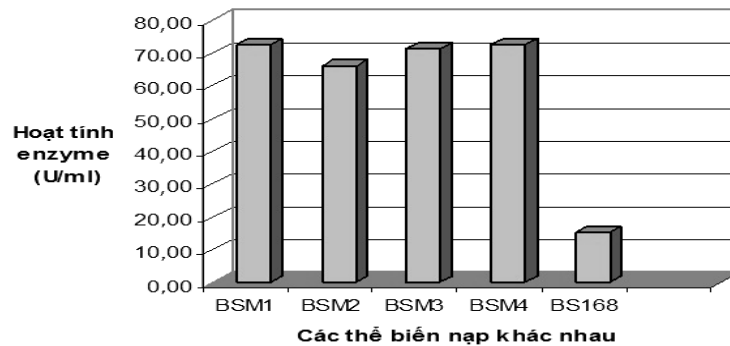
Kết quả cho thấy, dịch enzyme của cả 4 thể biến nạp được kiểm tra đều xuất hiện 1 băng protein khá đậm kích thước 42 kDa đúng với kích thước của pectate lyase như tính toán. Mẫu đối chứng dịch enzyme từ chủng BS168 chỉ xuất hiện băng mờ, điều này chứng tỏ băng protein 42 kDa chính là pectate lyase tái tổ hợp đã được biểu hiện, mẫu 5 (dịch enzyme từ chủng *B. subtilis* 168 do pectate lyase được sinh ra tự nhiên nên nồng độ enzyme quá thấp (hình 5). Kiểm tra hoạt tính pectate lyase của các mẫu này với cơ chất pectin cho thấy, hoạt tính pectinase của chủng đối chứng *B. subtilis* 168 chỉ đạt 15 U/ml trong khi các mẫu từ chủng tái tổ hợp đạt từ 66-72 U/ml, cao hơn 4,6-4,8 lần so với chủng *B. subtilis* 168 (hình 6). Điều này chứng tỏ gen *pel* đã được biểu hiện thành công trong *B. subtilis* 168 dưới sự điều khiển của promoter *BAppro*. Chủng tái tổ hợp được đặt tên là BSM.



Hình 5. Điện di SDS-PAGE dịch enzyme ngoại bào của chủng *B. subtilis* tái tổ hợp đa copy trên môi trường LB+Km

1-4: 15 µl dịch enzyme ngoại bào của các thể biến nạp khác nhau; 5. dịch lên men từ chủng *B. subtilis* 168.

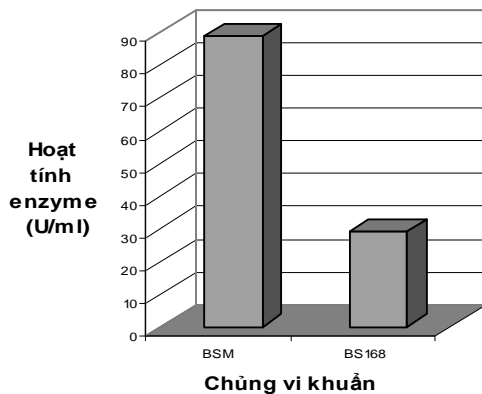
Hoạt tính pectate lyase của *B. subtilis* tái tổ hợp đa copy



Hình 6. Kiểm tra sự biểu hiện pectate lyase của các thể biến nạp đa copy trong tế bào *B. subtilis* 168 sau 24 giờ nuôi cấy

BSM 1-5. các thể biến nạp đa copy; BS168. chủng *B. subtilis* 168 không được biến nạp gen.

Biểu hiện chủng *B. subtilis* tái tổ hợp trên môi trường BMM



Hình 7. So sánh hoạt tính pectate lyase của chủng tái tổ hợp BSM, chủng BS168 (chủng *B. subtilis* 168 không được biến nạp gen)

Để kiểm tra khả năng biểu hiện trên môi trường khoáng BMM, chủng tái tổ hợp BSM được hoạt hóa trên môi trường LB + 20 µg/ml Km qua đêm sau đó cấy chuyển 1% sang môi trường BMM + 20 µg/ml Km. Sau 26 giờ nuôi cấy, dịch enzyme ngoại bào được thu nhận và kiểm tra hoạt tính enzyme trên có chất pectin citrus. Kết quả thu được cho thấy hoạt tính pectinase của chủng tái tổ hợp đạt 88,6 U/ml, trong khi chủng đối chứng *B. subtilis* 168 chỉ

đạt 29 U/ml (hình 7). Hoạt tính pectate lyase khi biểu hiện chủng BSM trên môi trường BMM cũng cao hơn khi biểu hiện trên môi trường LB (cao nhất chỉ đạt 72 U/ml). Điều này chứng tỏ môi trường BMM thích hợp hơn môi trường LB. Lý giải điều này có thể do môi trường LB tuy giàu dinh dưỡng nhưng không được bổ sung khoáng chất cần thiết cho nên khả năng sản xuất *rPel* bị hạn chế, ngược lại môi trường BMM do có đầy đủ khoáng chất cho nên bộ máy sản xuất *rPel* hoạt động hiệu quả cho nên khả năng sản xuất *rPel* tốt hơn.

Bacillus subtilis là vi khuẩn đã được nghiên cứu khá sâu về sinh học phân tử. Hệ tiết của *B. subtilis* được biết là một trong những hệ tiết tốt nhất để ứng dụng sản xuất protein tái tổ hợp. Vì vậy, nhiều tác giả đã chọn hệ biểu hiện *B. subtilis* để sản xuất protein tái tổ hợp. Nhiều nghiên cứu cho thấy *B. subtilis* biểu hiện các enzyme tái tổ hợp cho sản lượng cao [1, 9, 12, 15]. Trước đây, pectate lyase từ *B. subtilis* đã được biểu hiện trong *E. coli* nhưng mức độ biểu hiện rất thấp (1 U/ml) [7]. Gần đây, gene pectate lyase từ *B. subtilis* WSHB04-02 đã được biểu hiện trong nấm men *P. pastoris* cho hoạt tính cao đạt 100 U/ml [16]. Nghiên cứu của chúng tôi tạo chủng BSM tái tổ hợp có hoạt tính đạt 88,6 U/ml trên môi trường BMM mở ra triển vọng ứng dụng chủng này để sản xuất enzyme qui mô công nghiệp.

KẾT LUẬN

Gen mã hóa pectate lyase phân lập từ chủng VBS11 đã được biểu hiện thành công trong tế bào *B. subtilis* 168 dưới sự điều khiển của promoter *B_Apro* trong vector đa copy pMSE3. Mức độ biểu hiện enzyme *rPel* của chủng *B. subtilis* tái tổ hợp khá cao, trên môi trường BMM cho hoạt tính pectate lyase đạt 88,6 U/ml môi trường.

Lời cảm ơn: Công trình hỗ trợ về kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học công nghệ tiềm năng thuộc chương trình “Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học” của Bộ Khoa học và Công nghệ. Các thí nghiệm được tiến hành có sử dụng trang thiết bị của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aiba S., Kitai K., Imanaka T., 1983. Cloning and expression of thermostable α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol., 46: 1059-1065.
- Bernfeld P., 1955. Amylases a and b. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) Methods in enzymology. Academic, New York. 149-155.
- Birch G. G., Blakebrough N., Parker K. J., 1981. Enzymes and Food Processing, Applied Science Publishers Ltd., London. 296 pages.
- Buchert J., Pere J., 2000. Scouring of cotton with pectinases, proteases and lipases. Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter, 31(5): 48- 52.
- Chang S., Cohen S. N., 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA. Molec. Gen. Genet., 168: 111-115.
- Etters J. N., Husain P. A., Lange N. K., 1999. Alkaline pectinase: an eco-friendly approach to cotton preparation. Textile Asia, 83-86.
- Gummadi S. N., Kumar D. S., 2005. Microbial pectic transeliminases, Biotechnol. Lett., 27: 451-458.
- Đỗ Thị Thu Hằng, Võ Hoài Bắc, Lê Văn Trường, 2012. Sàng lọc và nhân dòng gen mã hóa pectate lyase từ *Bacillus subtilis* có nguồn gốc Việt Nam. Tạp chí Sinh học, 34(4): 485-492.
- Kallio P., Palva A., Palva I., 1987. Enhancement of α -amylase production by integrating and amplifying the α -amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 27: 64-74.
- Liu J., Showmaker L. H., Condon B., 2000. Patent: Single-bath in scouring and dyeing of textiles. Document Number CA Patent 2372972.
- Nierstrasz V. A., Warmoeskerken M. M. C. G., 2003. Textile Processing with Enzymes. (Cavaco-Paulo A., and Gübitz, G.M., Eds.), ISBN 1-85573-610-1, Woodhead PublisHing Ltd., Cambridge, England.
- Ortlepp S. A., Ollington J. F., McConnell D. J., 1983. Molecular cloning in *Bacillus subtilis* of a *Bacillus licheniformis* gene encoding a thermostable alpha amylase. Gene, 23: 267-276.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Solbak A. I., Richardson T. H., McCann R. T., Kline K. A., Bartnek F., Tomlinson G., Tan X., Parra-Gessert L., Frey G. J., Podar M., Luginbühl P., Gray K. A., Mathur E. J., Robertson D. E., Burk M. J., Hazlewood G. P., Short J. M., Kerovuo J., 2005. Discovery of pectin-degrading enzyme and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. J. Biol. Chem., 280(10): 9431-9438.
- Lê Văn Trường, Hoàng Việt, Trương Nam Hải, 1998. Tách dòng và biểu hiện cao của gen alpha-amylase từ *Bacillus amyloliquefaciens* trong *Bacillus subtilis*, Tạp chí Khoa học Công nghệ, 36(2): 12-18.
- Zhuge B., Du Guo Ch., Shen W., Zhuge J., Chen J., 2008. Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris*. Bioch. Eng. J., 40: 92-98.

**HIGH LEVEL EXPRESSION OF A GENE CODING
FOR PECTATE LYASE IN *BACILLUS SUBTILIS* 168**

Vo Hoai Bac, Do Thi Thu Hang, Le Trong Tai, Le Van Truong

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Pectate lyase degrade polygalacturonate of plant cell wall productes oligogalacturonates. In recent years, pectate lyase has attracted the considerable research interest because of their potential industrial application, for instance in the textile industry, paper making. Gene *pel* coding for pectate lyase from *Bacillus subtilis* VBS11 was subcloned and fused with α -amylase promoter from *B. amyloliquefaciens* (*B_{Apro}*). This construct was ligated into vector pMSE3 and transformed into the host strain BS168 for over expression under control of *B_{Apro}* promoter from *B. amyloliquefaciens*. rPel was produced in high level of 88,6 U/ml in Belisky minimal medium.

Keywords: *Bacillus*, expression, pectate lyase, promoter.

Ngày nhận bài: 3-1-2013