

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ AMINO ACID VÙNG LIÊN KẾT CƠ CHẤT ĐẾN HOẠT TÍNH β -GALACTOSIDASE TỪ *BACILLUS SUBTILIS* G1

Nguyễn Thị Hồng Nhung², Nguyễn Thị Thảo¹, Vũ Văn Hạnh¹, Quyền Đình Thi^{1*},
Vũ Đình Hòa³, Nguyễn Hữu Đức²

¹*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam;*
²*Khoa công nghệ sinh học; ³Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Email*: quyen@ibt.ac.vn

Ngày gửi bài: 15.05.2013

Ngày chấp nhận: 26.09.2013

TÓM TẮT

β -Galactosidase từ *Bacillus subtilis* G1 (LacA), được mã hóa bởi gene *lacA* có mã số EU585783 trên Genbank, là enzyme tham gia xúc tác cho phản ứng thủy phân đường lactose trong sữa. Tuy nhiên, hoạt tính của LacA còn thấp. Vì vậy chúng tôi tiến hành tạo đột biến điểm suy biến tại một số vị trí amino acid tham gia liên kết trực tiếp với cơ chất trong quá trình thủy phân để đánh giá vai trò của một số amino acid tới hoạt tính enzyme, và mục đích xa hơn là tìm được dòng có hoạt tính cao để ứng dụng vào sản xuất. Trong bài báo này, chúng tôi đã sử dụng thông tin mô hình enzyme trên Swiss-Prot và xác định được 7 vị trí amino acid được dự đoán là liên kết trực tiếp với cơ chất của LacA là Arg120, Asn158, Trp331, Glu371, Lys372, Leu373, His374. Kết quả sàng lọc hoạt tính ban đầu của 7 thư viện đột biến cho thấy các vị trí này đều tác động đến hoạt tính enzyme với cơ chất ONPG. Phần lớn các sự thay thế amino acid đều làm giảm mạnh hoạt tính enzyme. Trong đó, vị trí Arg120 có đến 99,66% các dòng giảm và mất hoạt tính, cho thấy Arg120 có thể đóng vai trò quan trọng trong vùng liên kết cơ chất. Các đột biến Arg120Phe, Arg120Thr và Arg120Val đã làm mất hoạt tính thủy phân của LacA.

Từ khóa: *Bacillus subtilis* G1, β -Galactosidase, đột biến điểm suy biến.

Effect of Amino Acids of Substrate Binding Sites on β -galactosidase Activity from *Bacillus subtilis* G1

ABSTRACT

β -Galactosidase (LacA) encoded by *lacA* gene from *Bacillus subtilis* G1 (Accession No EU585783) is a hydrolitic enzyme that catalyzes the hydrolysis of lactose to produce lactose-free milk products. However, LacA has limited activity toward lactose. Therefore, we employed the method of site-saturation mutagenesis using PCR amplification with degenerate primers for generating mutants based on prediction of substrate binding sites to assess the effect of amino acids to the enzyme activity. Seven amino acid residues containing Arg120, Asn158, Trp331, Glu371, Lys372, Leu373 and His374 were identified as candidates for substrate binding sites using ExPASy program in Swiss-Prot. The screening results of the 7 libraries showed that these sites affect activity when ONPG was used as substrate. Most substitutions at these sites dramatically reduced the hydrolysis activity. Notably, 99.66% of colonies with Arg120 site showed decrease in and loss of hydrolysis activity. The result suggested that Arg120 may play an important role in substrate recognition. Mutants at Arg120 substituted by Phe, Thr and Val showed complete loss of β -galactosidase activity.

Keywords: *Bacillus subtilis* G1, β -galactosidase, site-saturation mutagenesis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

β -Galactosidase (β -D-galactohydrolase, E.C.3.2.1.23) là enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết β -1,4-D-galactosidase trong

phân tử đường lactose thành β -D-galactose và α -D-glucose (Ly and Withers, 1999). Các β -galactosidase được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất sữa cũng như sử dụng làm thuốc hỗ trợ tiêu hóa trong y dược. Một trong

những ứng dụng chính của β -galactosidase trong công nghiệp sữa là thủy phân đường lactose trong sữa dành cho những người dị ứng với lactose (Kang et al., 2005).

β -Galactosidase là một trong những enzyme được biết rõ, phổ biến trong tự nhiên và được tìm thấy ở thực vật (quả hạnh, đào, mơ, táo,...), các cơ quan động vật, nấm men, nấm mốc và vi khuẩn. β -Galactosidase được chia thành 4 nhóm trong gần 100 họ có hoạt tính thủy phân glycosyl (glycosyl hydrolases - GH) là GH1, GH2, GH35 và GH42 dựa vào trình tự amino acid tương đồng (Henrissat, 1991). Một số sinh vật sinh tổng hợp β -galactosidase thuộc họ 42 có thể sinh trưởng ở những điều kiện khắc nghiệt như nóng, lạnh, mặn và acid (<http://www.cazy.org/fam/GH42.html>).

Hiện nay, nguồn enzyme tự nhiên thường có hoạt tính đặc hiệu cũng như hiệu suất xúc tác thấp, vì vậy việc nâng cao hoạt tính cũng như khả năng xúc tác của enzyme được coi là một yếu tố quan trọng trong ứng dụng sản xuất công nghiệp. Trên thế giới, Dong et al., (2011) đã dựa vào vùng liên kết cơ chất nghiên cứu tạo đột biến β -galactosidase từ *Geobacillus stearothermophilus* trong đó E315R làm tăng hoạt tính 3,5 lần và R109Gly làm mất hoạt tính hoàn toàn (Dong et al., 2011). Placier et al., (2009) gây đột biến vị trí R109Lys của β -galactosidase từ *Geobacillus stearothermophilus*, làm tăng sự tổng hợp oligosaccharide (Placier et al., 2009).

Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã nhân dòng gene *lacA* mã hóa β -galactosidase

(LacA) từ *Bacillus subtilis* G1, đã tinh sạch và đánh giá tính chất LacA tái tổ hợp (Quyen et al., 2011). Đây là một enzyme thích hợp cho công nghiệp chế biến sữa. Trong bài báo này, chúng tôi sử dụng phương pháp tạo đột biến điểm suy biến để đánh giá ảnh hưởng của một số amino acid tham gia liên kết trực tiếp với cơ chất trong quá trình thủy phân, cũng như để chọn lọc được đột biến có hoạt tính cao để có thể ứng dụng trong công nghiệp.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Gene *lacA* (2061bp, mã số EU585783) mã hóa cho β -galactosidase (LacA) từ *Bacillus subtilis* strain G1 đã được đưa vào pET22b(+) tạo thành plasmid tái tổ hợp pELacA theo nghiên cứu trước đây (Quyen, et al., 2011).

Chủng *Escherichia coli* JM109(DE3) [*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI^qZAM15*], IDE3] (Promega Corp, Madison, WI) được sử dụng để tạo dòng các thể đột biến LacA.

Các hóa chất được cung cấp bởi các hãng có uy tín: *Pfu* polymerase, T4 ligase, *Bam*HI, *Dpn*I, *Not*I (Fermentas), ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG), peptone, yeast extract (Biobasic, Canada); cột trao đổi ion Ni^{2+} Probon resin (Invitrogen). Các bộ mồi dùng để tạo đột biến điểm suy biến trên gene *lacA* có trình tự như trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mồi gây đột biến điểm suy biến tại các điểm liên kết với cơ chất

Tên mồi	Trình tự
R120X	CAGCTGCACGGCGGANNKACAACCACTGCCTC
N158X	ATGTGGCACATTTCAANNKGAATACGGGGGAG
W331X	CCAAGCGCGGTCAATTNNKCATAACGTCAACAA
E371X	TCACGGGGGTCATCANNKAAATTACACGGAGC
K372X	CGGGGGTTCATCAGAAANNKTTACACGGAGCGGT
L373X	GGGTCATCAGAAAAANNKACGGAGCGGTTGTG
H374X	TCATCAGAAAAATTANNKGGAGCGGTTGTGGAT

2.2. Tạo thư viện đột biến điểm

Sử dụng cặp môi có bộ ba suy biến 3 nucleotide 'NNK' để tạo một thư viện đột biến điểm thay thế amino acid tại các vị trí liên kết cơ chất bằng các amino acid khác nhau, bằng kỹ thuật tạo đột biến điểm định hướng - SDM (site directed mutation) (Zheng et al., 2004).

Khuôn plasmid mang gene *lacA* (pELacA) được nhân lên với các cặp môi đột biến tương ứng tại vị trí cần gây đột biến trong phản ứng PCR gồm 2,5 μ l 10x buffer, 1 μ l DNA khuôn (50 ng), 1 μ l mỗi môi (10 pmol/ μ l), 2 μ l 2,5mM dNTPs và 0,5 μ l *Pfu* polymerase, 2 μ l 25mM MgSO₄, 15 μ l H₂O. Phản ứng được thực hiện với chu trình nhiệt: 95°C/3 phút, 18 chu kỳ (95°C/30 giây, 54°C/1 phút và 72°C/8 phút) và 72°C/10 phút. Sau đó, khuôn plasmid pELacA ban đầu được phá bỏ bằng cách bổ sung 20U *DpnI*, ủ 37°C trong khoảng 2 giờ. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit tinh sạch PCR và được đóng vòng trở lại trong phản ứng nối ghép gồm: 3 μ l sản phẩm PCR tinh sạch, 1,5 μ l 10xbuffer, 1 μ l T4 ligase và 9,5 μ l H₂O. Phản ứng được ủ 22°C qua đêm.

Sản phẩm PCR sau phản ứng nối ghép được biến nạp vào *E. coli* JM109(DE3), chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung 50 μ g/ml ampicillin. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc tạo thành thư viện các dòng đột biến và được nuôi biểu hiện để sàng lọc hoạt tính.

2.3. Sàng lọc hoạt tính

Các dòng *E. coli* JM109(DE3) mang gene *lacA* đột biến được nuôi trong 300 μ l môi trường LB có bổ sung 50 μ g/ml ampicillin trên đĩa nuôi cấy 96 giếng, lắc 200rpm qua đêm ở 37°C. Tiếp theo, 15 μ l dịch nuôi cấy được tiếp vào 300 μ l môi trường LB mới có bổ sung 50 μ g/ml ampicillin và 0,5mM IPTG, lắc 200 rpm ở 37°C. Mẫu được thu sau 8 giờ nuôi lắc để xác định hoạt tính LacA biểu hiện.

Dùng 3 μ l dịch nuôi cấy (dịch và tế bào) chuyển sang đĩa 96 giếng có chứa 17 μ l đệm 0,1M Na-phosphate pH 7.0 và 5 μ l 0,1% SDS, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng để phá tế bào. Tiếp đó, 50 μ l cơ chất ONPG (4 mg/ml) được bổ sung, ủ phản ứng ở 50°C trong 10 phút và dùng phản

ứng với 25 μ l 1M Na₂CO₃. Phản ứng màu được đo ở bước sóng 420nm trên hệ thống máy đọc khay vi thể tự động Elx800TM. Mỗi mẫu được đo hoạt tính lặp lại 3 lần.

Hoạt tính LacA của dịch nuôi cấy được tính theo công thức:

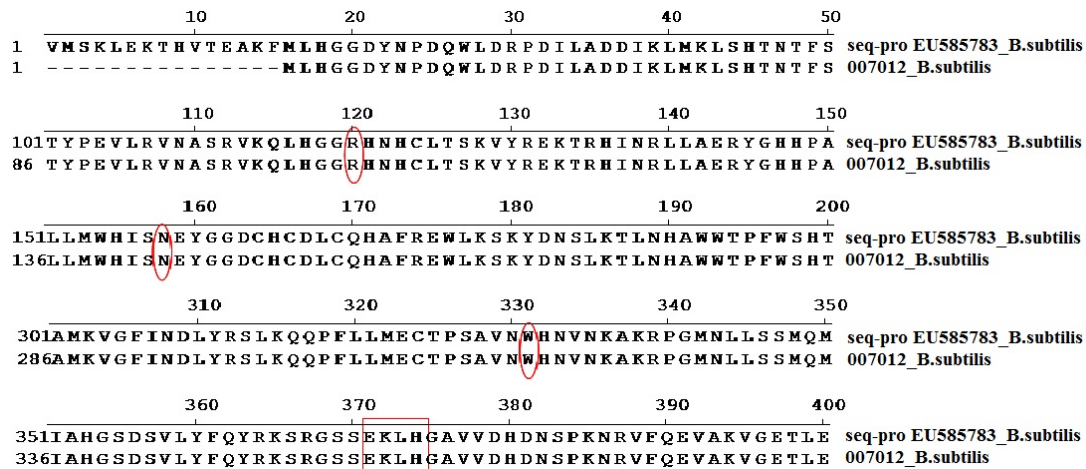
$$\text{Miller Unit (nmol/min/ml)} = [(\text{OD}_{420} - 1,75 \times \text{OD}_{550})] \times V_1 / (T \times V_2 \times \text{OD}_{600} \times 0,0045)$$

Trong đó, OD₄₂₀: bước sóng hấp thụ của ONP; OD₅₅₀: bước sóng tán sắc do tế bào có trong hỗn hợp phản ứng; OD₆₀₀: mật độ tế bào của dịch nuôi mang xác định hoạt tính; T: thời gian thực hiện phản ứng (phút); V₁: tổng thể tích phản ứng; V₂: thể tích dịch nuôi cấy tế bào mang thử hoạt tính; 0,0045: hệ số hấp thụ của ONP ở bước sóng 420nm.

2.4. Biểu hiện và tinh sạch enzyme

Các dòng *E. coli* tái tổ hợp mang gene *lacA* ban đầu và *lacA* đột biến được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung 50 μ g/ml ampicillin, lắc 200rpm ở 37°C, qua đêm. Sau đó tiếp giống 1% dịch nuôi preculture vào 50ml môi trường LB có bổ sung ampicillin, lắc ở cùng điều kiện để OD đạt 0,6 - 0,8 (khoảng 4 giờ) thì cảm ứng với 1mM IPTG. Tế bào được thu sau 6 giờ cảm ứng bằng ly tâm 4000rpm, 10 phút.

LacA tái tổ hợp có gắn đuôi 6 histidine được tinh sạch đặc hiệu qua cột trao đổi ion Ni²⁺. Để tinh sạch LacA, tế bào được thu từ dịch nuôi biểu hiện bằng ly tâm 4000rpm trong 10 phút ở 4°C và rửa với 8ml nước cất khử trùng rồi hòa lại trong 8ml đệm gắn cột (đệm 1x native purification 50mM NaH₂PO₄, 0,5mM NaCl có bổ sung 0,1M Imidazol, pH 8.0). Bổ sung lysozyme với nồng độ cuối cùng là 0,5 mg/ml, ủ trong đá 30 phút và phá siêu âm 10 lần, mỗi lần 30 giây. Sau đó, dịch phá siêu âm được ly tâm 13000 rpm, 10 phút để thu dịch protein và đưa lên cột có chứa 2ml resin đã được cân bằng với đệm gắn cột không biến tính, ủ 45 phút ở nhiệt độ phòng và thi thoảng đảo nhẹ. Cột được rửa 3 lần, mỗi lần với 8ml đệm rửa không biến tính. LacA tái tổ hợp được đẩy ra khỏi cột bằng 8ml đệm 1x native purification có bổ sung 250mM Imidazol. Dịch enzyme tinh sạch được dùng để xác định hoạt tính riêng. Xác định hoạt tính galactosidase.



Hình 1. Vùng liên kết cơ chất của β -galactosidase từ *Bacillus subtilis* G1

Để xác định hoạt tính của β -galactosidase, 1 μ l enzyme tinh sạch cùng với 74 μ l 22mM ONPG pha trong 50mM đệm Z pH 7 được ủ ở 50°C trong 10 phút. Sau đó, dừng phản ứng với 25 μ l 1M Na₂CO₃. Độ hấp phụ màu phản ứng được đo ở bước sóng 420 nm. Ống đối chứng gồm ONPG, đệm Z và nước cất được thay cho enzyme.

Một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác thủy phân giải phóng 1 μ mol cơ chất ONPG trong thời gian 1 phút ở điều kiện thích hợp. Hoạt tính đặc hiệu của LacA là số đơn vị hoạt tính trên milligram protein enzyme.

Hoạt tính β -galactosidase tinh sạch được tính theo công thức:

$$U/ml = OD_{420} \times V_1 / (0,0045 \times 1000 \times T \times V_2)$$

Trong đó, OD₄₂₀: bước sóng hấp thụ của ONP (o-nitrophenol); T: thời gian thực hiện phản ứng (phút); V₁: thể tích phản ứng (ml); V₂: thể tích enzyme (ml); 0,0045: hệ số hấp thụ của ONP ở bước sóng 420nm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định vùng liên kết cơ chất

Sử dụng phần mềm ClustalX (version 1.81; Thompson et al., 2008) căn nhiều trình tự protein của β -galactosidase kết hợp với việc xác định cấu trúc protein trên ExpASY

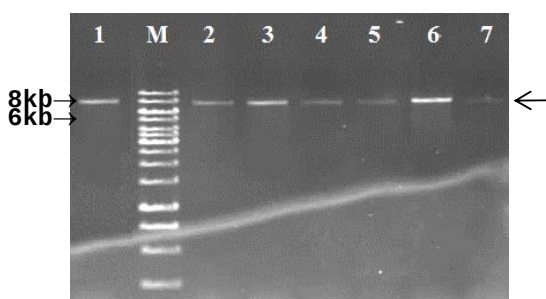
(<http://www.expasy.org>) và sử dụng cấu trúc của β -galactosidase từ chủng *B. subtilis* – 007012 để định hướng, chúng tôi đã xác định được các vị trí Arg120, Asn158, Trp331, Glu371, Lys372, Leu373 và His374 tham gia trực tiếp vào tương tác với galactose như liên kết hydro giữa enzyme và cơ chất (Hình 1). Từ đó, chúng tôi đã sử dụng 7 vị trí này để gây đột biến điểm định hướng ngẫu nhiên cho từng vị trí.

3.2. Tạo thư viện đột biến điểm suy biến và sàng lọc hoạt tính

Tại 7 vị trí được xác định có khả năng liên kết trực tiếp với cơ chất trong quá trình thủy phân là Arg120, Asn158, Trp331, Glu371, Lys372, Leu373 và His374, các thư viện đột biến được xây dựng theo mô tả ở phần phương pháp với các cặp mỗi đột biến tương ứng cho từng vị trí ở bảng 1.

Sản phẩm PCR với các cặp mỗi đột biến tương ứng với 7 vị trí cần tạo đột biến được khuếch đại đặc hiệu, có một băng duy nhất với kích thước khoảng 7500bp (Hình 1), tương ứng kích thước của plasmid tái tổ hợp pELacA (gồm pET22b+ có kích thước 5500 bp và gene lacA có kích thước 2061bp). Kết quả này chứng tỏ toàn bộ khuôn pELacA đã được khuếch đại với cặp mỗi đột biến và tạo thành plasmid tái tổ hợp hoàn chỉnh với các vị trí đột biến mong muốn khi đóng vòng trở lại với T4 ligase. Các plasmid sau phản

ứng đóng vòng tại mỗi vị trí đột biến được đưa vào JM109(DE3) tạo thành thư viện các dòng đột biến. Bước đầu sàng lọc hoạt tính các dòng trong 7 thư viện đột biến (tương ứng với 7 vị trí cần tạo đột biến) cho thấy hầu hết các dòng đột biến ở các vị trí đều giảm hoặc mất hoạt tính (Bảng 2). Trong đó, những đột biến tại vị trí Arg120 có ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme mạnh nhất. Tại vị trí này, có đến 84,33% các dòng mất hoạt tính hoàn toàn. Vị trí 331 có tỉ lệ các dòng mất hoạt tính ít nhất với 56,73%.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại khuôn pElacA với các cặp môi đột biến

R120X (1), N158X (2), W331X (3), E371X (4), K372X (5), L373X (6), H374X (7)

Theo nghiên cứu của Dong et al., (2011), về nâng cao hoạt tính β -galactosidase từ *Geobacillus stearothermophilus* (thuộc họ GH42), cũng cho thấy vị trí liên kết với cơ chất đầu tiên này (Arg109, tính từ đầu N) có vai trò rất quan trọng đối với hoạt tính thủy phân của enzyme. Tác giả đã tìm thấy đột biến Arg109Gly làm mất hoàn toàn hoạt tính enzyme. Cũng trong một nghiên cứu khác về việc cải biến β -galactosidase từ

Geobacillus stearothermophilus, Placier et al., (2009) đã tìm được đột biến Arg109Lys làm tăng hoạt tính chuyển hóa glycosyl (transglycosylation). Những kết quả này chứng tỏ vị trí liên kết cơ chất đầu tiên tính từ đầu N của phân tử β -galactosidase trong họ GH42 có vai trò quan trọng tới hoạt tính của enzyme.

3.3. Phân tích trình tự các dòng đột biến

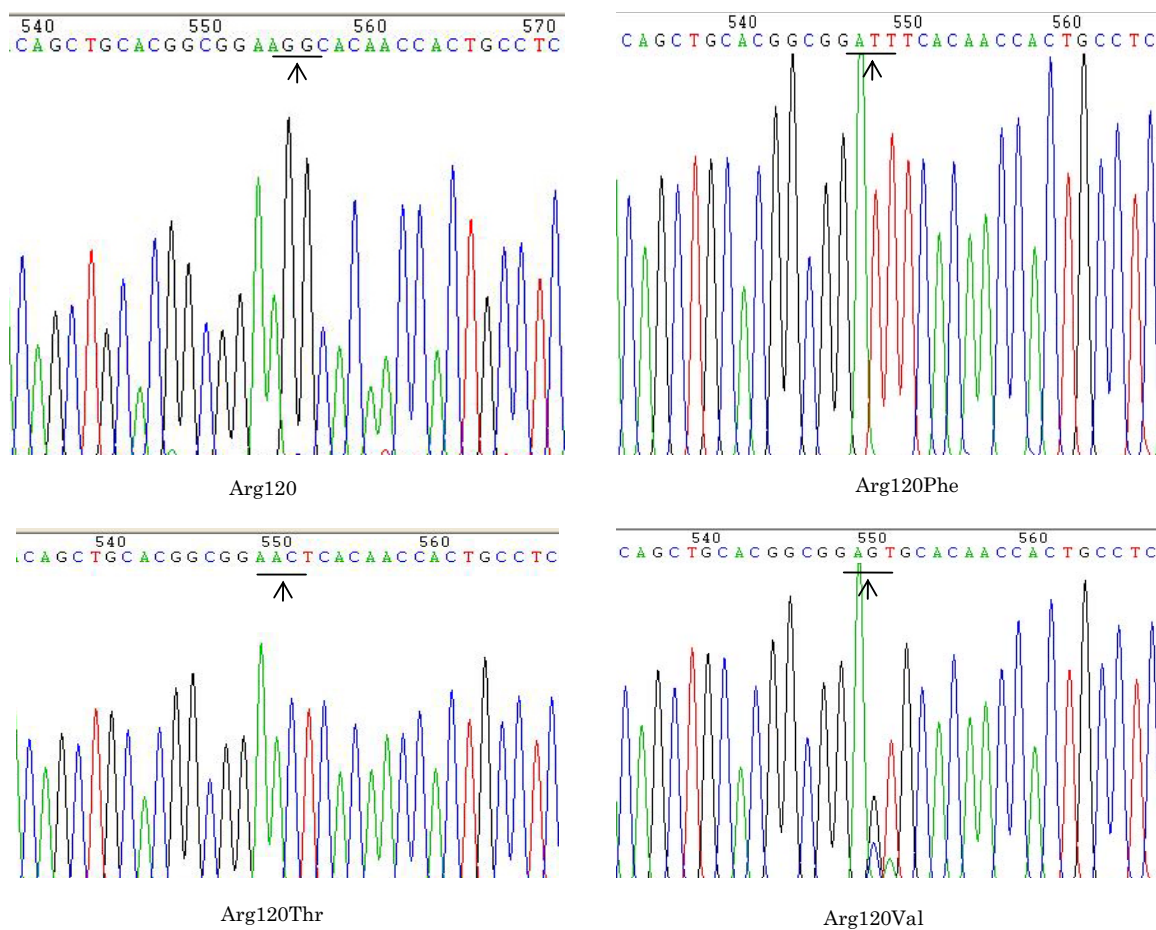
Bước đầu chúng tôi lựa chọn vị trí Arg120 để phân tích trình tự và đánh giá các amino acid đột biến thay thế. Khi phân tích trình tự 3 dòng hoạt tính không thay đổi cho thấy các dòng này không có đột biến. Với 4 dòng mất hoạt, kết quả đọc trình tự cho thấy có các bộ ba nucleotide đột biến TTT, ACT, GTG thay cho bộ ba AGG ban đầu (Hình 3). Kết quả này dẫn đến Arg ban đầu (thuộc nhóm basic) được thay thế lần lượt bằng Phe (thuộc nhóm vòng thơm), Thr (thuộc nhóm ái nhân) và Val (thuộc nhóm kỵ nước). Sự thay thế các amino acid thuộc các nhóm khác với amino acid ban đầu đã làm mất hoạt tính thủy phân của enzyme.

3.4. Tinh sạch và xác định hoạt tính LacA đột biến

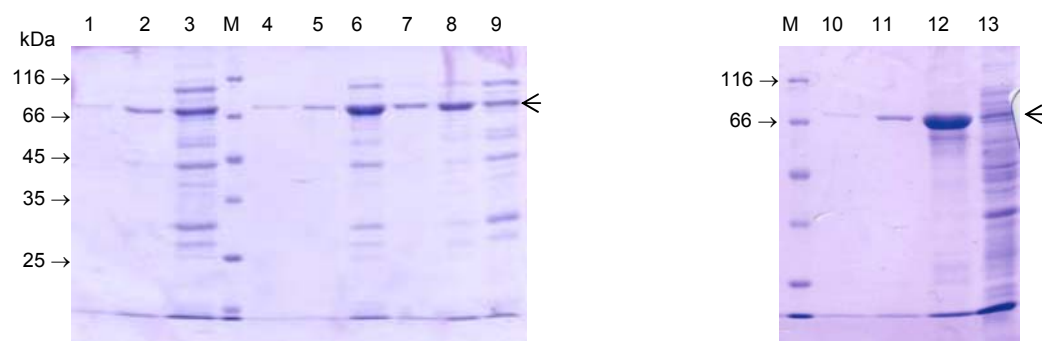
LacA ban đầu và LacA từ các dòng đột biến được biểu hiện nội bào và được tinh sạch qua cột trao đổi ion Ni²⁺. LacA ban đầu và LacA đột biến được tinh sạch một băng đều có kích thước khoảng 70 kDa. Các phân đoạn tinh sạch chỉ có một băng duy nhất của LacA ban đầu và LacA đột biến được chọn để xác định hoạt tính riêng với cơ chất ONPG (Hình 4).

Bảng 2. Sàng lọc hoạt tính các dòng đột biến

Mẫu	Số khuẩn lạc sàng lọc	% các dòng đột biến có hoạt tính so với ban đầu			
		Tăng	Không đổi	Giảm	Mất
R120X	300	0	0,33	15,33	84,33
N158X	92	0	5,43	18,48	76,09
W331X	278	0	0,36	30,58	69,06
E371X	57	0	0	19,30	80,70
K372X	57	0	0	28,07	71,93
L373X	104	0	1,92	41,35	56,73
H374X	220	0	0,45	19,55	80,00



Hình 3. Kết quả xác định trình tự một số dòng đột biến tại vị trí Arg120X.



Hình 4. SDS-PAGE protein tinh sạch LacA ban đầu (7-9), Arg120Val (1-3), Arg120Thr (4-6), Arg120Phe (10-13)

Bảng 3. Hoạt tính đặc hiệu của LacA ban đầu và LacA đột biến với cơ chất ONPG

Mẫu	Bộ ba nucleotide thay đổi	Hoạt tính đặc hiệu U/mg protein	% Hoạt tính so với ban đầu
Wild-type	AGG → AGG	1,02 ± 0,02	100
Arg120Phe	TTT → UUU	0,016 ± 0,02	1,6
Arg120Thr	ACT → ACU	0,02 ± 0,04	2,8
Arg120Val	GTG → GUG	0,03 ± 0,01	2,9

Kết quả cho thấy enzyme đột biến Arg120 Phe, Arg120Thr và Arg120Val gần như bị mất hoạt tính hoàn toàn so với LacA ban đầu. Hoạt tính của các LacA đột biến chỉ bằng 1,6-2,9% so với LacA ban đầu (Bảng 3).

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xác định được 7 vị trí amino acid của β -galactosidase từ *B. subtilis* G1 có khả năng liên kết trực tiếp với cơ chất trong quá trình thủy phân. Từ đó, đã tạo được 7 thư viện đột biến định hướng ngẫu nhiên tương ứng với 7 vị trí liên kết cơ chất và bước đầu đã xác định được ảnh hưởng của một số amino acid tại vị trí 120, trong đó sự thay thế arganine thành phenyl, threonine và valine làm mất hoạt tính enzyme β -galactosidase.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu cơ bản Nafosted: “Nâng cao hoạt tính xúc tác của enzyme tái tổ hợp β -galactosidase bằng kỹ thuật sao chép lỗi DNA vòng và đột biến điểm định hướng” (2011-2012).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ly, H.D., Withers S.G. (1999). Mutagenesis of glycosidases. *Annu Rev Biochem*, 68: 487-522.
- Kang, S.K., Cho K.K., Ahn J.K., Bok J.D., Kang S.H., Woo J.H., Lee H.G., You S.K., Choi Y.J. (2005). Three forms of thermostable lactose-hydrolase from *Thermus* sp. IB-21: Cloning, expression, and enzyme characterization. *J Biotechnol*, 116: 337-346.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *J Biochem*, 280: 309-316.
- Dong, Y.N., Liu X.M., Chen H.Q., Xia Y., Zhang H.P., Zhang H., Chen W. (2011). Enhancement of the hydrolysis activity of β -galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* by saturation mutagenesis. *J Dairy Sci*, 94: 1176-1184.
- Placier, G., Watzlawick H., Rabiller C., Mattes R. (2009). Evolved β -Galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with improved transgalactosylation yield for galacto-oligosaccharide production. *Appl Environ Microbiol*, 75: 6312-6321.
- Quyen, D.T., Nguyen T.T., Nguyen S.L.T., Vu V.H. (2011). Cloning, high-level expression and characterization of a β -galactosidase from *Bacillus subtilis* G1. *Austr J Basic Appl Sci*, 7: 193-199.
- Zheng, L., Baumann U., Reymond J.L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucl Acids Res*, 32: 115.