

TÁCH ĐỒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA KERATINASE CỦA CHỦNG *BACILLUS LICHENIFORMIS* DS23 TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Nguyễn Văn Hiếu, Phí Quyết Tiến, Nghiêm Ngọc Minh, Lê Gia Hy

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Keratinase (KER) thuộc nhóm protease kiềm có thể thủy phân casein, elastin và keratin nên được ứng dụng trong tẩy lông của ngành công nghiệp da, trong xử lý rác thải bằng phương pháp sinh học. Các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp mạnh keratinase được kể đến nhóm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, *Dermatophil*, *Thermoanaerobacter*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium* và *Vibrio*. Trong nhóm vi khuẩn *Bacillus* những chủng có khả năng tổng hợp keratinase gồm có *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*. Chủng *B. licheniformis* DS23 được phân lập ở Đồ Sơn. Hai Phòng có khả năng sinh keratinase cao. Gen mã hóa *ker* đã được tách đồng và giải trình tự chứa 1140 nucleotide mã hóa cho 379 amino acid. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn với trình tự amino acid tương tự từ các chủng *B. licheniformis* khác cho thấy độ tương đồng cao (99%). Đoạn gen đã được chuyển vào vector biểu hiện pET 22b (+) và biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Điều kiện thích hợp cho biểu hiện protein ở dạng hòa tan là, nhiệt độ 30°C, nồng độ IPTG cảm ứng là 0,4 mM khi OD_{600nm} là 0,6, thời gian thu hồi sau 4,0 h cảm ứng và protein tái tổ hợp thu được có khối lượng phân tử khoảng 28 kDa.

Từ khóa: *Bacillus licheniformis*, biểu hiện, keratinase, protease kiềm, tách đồng

MỞ ĐẦU

Một trong những nguồn rác thải gây ra ô nhiễm môi trường của ngành chế biến thực phẩm là lông gia súc và gia cầm. Lông với thành phần hơn 90% protein với chủ yếu là keratin, hợp chất này khá khó phân hủy, tuy nhiên với hàm lượng protein cao chúng có thể được sử dụng làm thức ăn bổ sung cho động vật, làm nguyên liệu thô cho các ngành công nghiệp khác (William et al., 1991). Để sử dụng lông làm nguồn thức ăn cho động vật, quá trình chế biến bao gồm bổ sung hóa chất, gia nhiệt, loại bỏ tạp chất cuối cùng thu được protein và các acid amin dễ hấp thụ. Tuy nhiên việc gia nhiệt trong quá trình chế biến dễ dẫn đến biến tính protein, giảm chất lượng thức ăn, đồng thời còn phát thải ra các hợp chất gây ô nhiễm khác. Sử dụng keratinase (KER) để thủy phân keratin thành acid amin và protein dễ hấp thụ không làm biến tính protein, hạn chế việc gia nhiệt đảm bảo chất lượng của sản phẩm, ngoài ra lại rất thân thiện với môi trường là một xu hướng tất yếu (Xu et al., 2009; Svetlana, Jain, 2010).

Keratinase thuộc nhóm protease kiềm, phân cắt các liên kết peptide nằm bên trong chuỗi polypeptide, đây là nhóm enzyme đặc biệt có thể thủy phân được casein, elastin, keratin và được ứng dụng nhiều trong công nghiệp da và xử lý rác thải bằng phương pháp sinh học của ngành nông nghiệp

(Lin et al., 1992; Svetlana, Jain, 2010). Các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp mạnh keratinase gồm có nhóm vi khuẩn như *Bacillus* (Manczinger et al., 2003; Zerdani et al., 2004, Suntornsuk et al., 2005; Svetlana, Jain, 2010), *Dermatophilus congolensis* (Hashemi, Davics, 2004) *Thermoanaerobacter* (Riessen, 2001), *Chryseobacterium* (Riffel et al., 2003), *Flavobacterium* (Riffel, Brandelli, 2002; Nam et al., 2002) and *Vibrio* (Sangali, Brandelli, 2000). Chủng *B. licheniformis* PWD-1 có khả năng sinh keratinase mạnh được phân lập từ quá trình phân hủy lông, gen mã hóa *ker* từ chủng đã được nghiên cứu tách đồng, biểu hiện trên *E. coli* (Williams et al., 1991; Cheng et al., 1995; Lin et al., 1999).

B. licheniformis DS23 được phân lập từ bãi rác Đồ Sơn có khả năng phân hủy lông gia cầm rất hiệu quả. Chúng tôi đã nghiên cứu tách đồng và biểu hiện gen mã hóa keratinase của chủng này trên *E. coli*, nhằm mục đích tạo ra các chế phẩm ứng dụng trong công nghiệp da và chất tẩy rửa.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống vi sinh vật, vector và vật liệu khác

Chủng *B. licheniformis* DS23 có hoạt tính keratinase được phân lập từ Đồ Sơn, Hải Phòng trong nghiên cứu này đã được đăng ký trình tự 16S

rRNA trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank mã số truy cập GU004539. Các chủng *E. coli* BL21(DE3), XLI-blue nhận từ Phòng thí nghiệm Genomics, Khoa Vi sinh vật học, Trường Đại học quốc gia Kyungpook, Hàn Quốc. Vector tách dòng pCR^{2.1}, vector biểu hiện pET22b(+), kit tinh sạch sản phẩm PCR, kit tách plasmid của hãng Invitrogen. Các hóa chất, enzyme giới hạn, dụng cụ sử dụng của hãng Sigma, Merck, Invitrogen.

Thiết kế mồi và khuếch đại gen *ker*

Dựa vào trình tự tương đồng của gen *ker* từ các chủng *B. licheniformis* khác nhau trên cơ sở dữ liệu GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kết hợp với chương trình Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) và Clone Manager (Sci-Ed Software, Ver. 8.0, NC, USA) để thiết kế các đoạn mồi đặc hiệu nhằm khuếch đại toàn bộ gen *ker* từ bộ ba mã khởi đầu ATG đến hết bộ ba mã kết thúc (stop codon) của gen. Phản ứng PCR được thực hiện trong hỗn hợp bao gồm: mồi xuôi *ker*-F1 (5'-TCCATGGATGATGAGGAAAAGAGITTTGGC-3'); 1,0 µl (10 pmol); mồi ngược *ker*-R1 (5'-TGGATCCTTATTGAGCGGCAGCTTCG-3'); 1,0 µl (10 pmol); đệm phản ứng (10X): 2,0 µl; MgCl₂ (50 mM): 0,6 µl; Hỗn hợp các deoxyribonucleotide triphosphate (10 mM): 0,4 µl; nước cất: 9,8 µl. 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. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, tinh sạch bằng kit PureLink™ - DNA Purification (Invitrogen).

Tách dòng phân tích trình tự gen *ker*

Gen *ker* có kích thước 1,2 kb khuếch đại từ DNA của chủng *B. licheniformis* DS 23 bằng phản ứng PCR được tinh sạch bằng kit PureLink™ - DNA Purification (Invitrogen). Sản phẩm PCR tinh sạch được gắn vào vector pCR^{2.1} (TA cloning Kit, Invitrogen) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Toàn bộ sản phẩm phản ứng được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* XLI-blue rồi nuôi cấy trên đĩa thạch (LB) có bổ sung ampicillin nồng độ 100 µg/ml. Vector tách dòng pCR2.1::*ker* được tách khỏi tế bào *E. coli* bằng kit PureLink™ - Plasmid Extraction (Invitrogen). Vector đã gắn gen *ker* được xử lý bằng enzyme hạn chế *EcoRI* và bằng hai enzyme *NcoI* và *BamHI*, kiểm tra trên gel agarose 1%. (Sambrook *et al.*, 1989). Trình tự nucleotide của đoạn gen *ker* trên vector tách dòng pCR^{2.1} được

xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sử dụng cặp mồi M13-F và M13-R. Kết quả đọc trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm phân tích DNA STAR (Lasergene Inc., Madison, WI, USA), so sánh với các gen tương ứng đăng ký trên ngân hàng dữ liệu cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Trình tự nucleotide của gen *ker* được dịch sang trình tự amino acid bằng công cụ translate trên <http://www.expasy.ch>. Trình tự amino acid được phân tích và so sánh với trình tự amino acid của các protein tương ứng bằng công cụ Clustal-X (version 1.83), vẽ cây phân loại bằng phần mềm TreeView.

Điện di protein trên SDS-PAGE

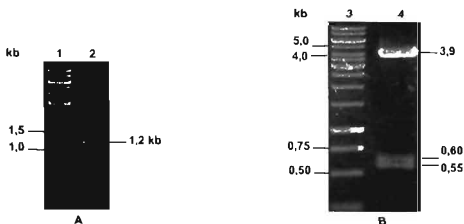
Điện di protein được tiến hành cơ bản theo Laemmli (1970) trên bộ điện di chuẩn của hãng Bio-Rad. Định lượng protein được xác định sơ bộ bằng máy VersaDoc Imaging system Model 4000 (Bio-Rad, USA) dựa trên hàm lượng protein chuẩn và được phân tích bằng phần mềm Quantity One, Version 4.6.1 (Bio-Rad, USA).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân dòng đoạn gen mã hóa keratinase

Bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu *ker*-F1 và *ker*-R1 được thiết kế dựa trên trình tự gen mã hóa cho keratinase của nhóm vi khuẩn *B. licheniformis*. Theo tính toán lý thuyết đoạn gen mã hóa keratinase sẽ có kích thước khoảng 1,2 kb (Hình 1A, giếng 2). Kết quả cho thấy đã khuếch đại thành công gen *ker* theo chu trình nhiệt đã mô tả ở phần phương pháp. Sản phẩm PCR trên gel agarose 1% là một băng đặc hiệu, có kích thước khoảng 1,2 kb đúng như kích thước mong đợi.

Sản phẩm của phản ứng PCR được tinh sạch và gắn vào vector pCR^{2.1}, biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* XLI-blue. Plasmid pCR^{2.1}::*ker* được xử lý với hai enzyme *NcoI* + *BamHI* và một enzyme hạn chế *EcoRI*. Kết quả điện di kiểm tra cho thấy, có 3 băng DNA rõ nét có kích thước tương ứng 0,55 kb và 0,6 kb và 3,9 kb trên gel agarose. Băng DNA 3,9 kb thể hiện cho vector pCR^{2.1}, băng 0,55 kb và 0,6 kb thể hiện cho đoạn gen *ker*. Do trong trình tự nucleotide của gen *ker* có vị trí cắt của enzyme *EcoRI* tại vị trí 600 nên khi xử lý pCR^{2.1}::*ker* với *EcoRI* sẽ tạo ra 3 băng (Hình 1B, giếng 4).



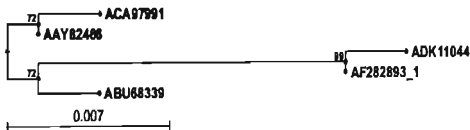
Hình 1. A. Sản phẩm PCR trên gel agarose 1% 1: Thang DNA chuẩn, 2. Sản phẩm của phản ứng PCR khuếch đại gen *ker* từ DNA lỏng số của chủng *B. licheniformis* DS23. B. Sản phẩm cắt vector pCR2.1:*ker* được cắt bởi enzyme *EcoRI*. 3. Thang DNA chuẩn; 4. Vector pCR2.1:*ker* được cắt bởi enzyme *EcoRI*.

Phân tích trình tự gen *ker* từ *B. licheniformis* DS23

Với kết quả đọc trình tự theo hai chiều của gen *ker* khuếch đại từ DNA của *B. licheniformis* DS23 khi phân tích toàn bộ gen *ker* từ mã khởi đầu ATG tới mã kết thúc TAG có chiều dài 1140 bp mã hóa cho protein gồm 379 amino acid và trình tự đã được đăng kí trên GenBank với mã số truy cập HM154527, trình tự của các amino acid tương ứng của gen *ker* có mã số truy cập ADK11044. Kết quả khi so sánh trình tự gen *ker* khuếch đại từ DNA của chủng vi khuẩn *B. licheniformis* DS23 với các gen *ker* khuếch đại từ DNA của các chủng *B. licheniformis* khác cho thấy độ tương đồng cao trong trình tự nucleotide (97- 99%). Đặc biệt trình tự

nucleotide của gen *ker* trong nghiên cứu cho độ tương đồng gần 99,04 và 99,21% so với trình tự của gen *ker* tương ứng có mã số truy cập AY940167 và QG339614.

Kết quả so sánh độ tương đồng trong trình tự amino acid các KER từ các chủng *B. licheniformis* khác nhau cho thấy có sự khác biệt, tuy nhiên vẫn có độ tương đồng cao (>98%). Dựa vào cây phát sinh chủng loại cho thấy KER từ chủng *B. licheniformis* DS23 có độ tương đồng cao về trình tự amino acid với KER từ *B. licheniformis* có mã số truy cập AF282893_1 là 99,74% còn 3 trình tự được chọn (ACA97991, AAY82466 và ABU68339) khi so sánh đều có sự tương đồng acid amin là 12,98,42% (Hình 2).



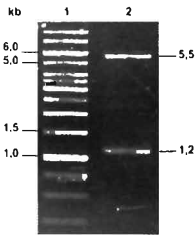
Hình 2. Cây so sánh sự tương đồng trình tự amino acid suy diễn từ trình tự nucleotide của gen *ker* từ chủng *B. licheniformis* DS23 (mã số ADK11044 trên GenBank) với các trình tự khác từ các chủng *B. licheniformis* (tên của trình tự amino acid được ghi bằng số đăng kí trên GenBank). Giá trị bootstrap thể hiện như là tỷ lệ phần trăm

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

Gen *ker* đã được tách dòng của chủng *B. licheniformis* DS23 mã hóa KER gồm 379 amino

acid và có độ tương đồng cao so với trình tự của KER từ các chủng *B. licheniformis* khác. Kết quả của phản ứng PCR khuếch đại đã được thực hiện tốt, không bị lỗi và mất nucleotide trong quá trình nhân.

Đoạn gen *ker* sau đó được cắt khỏi vector tách dòng bằng hai enzyme hạn chế *Nco*I và *Bam*HI và gắn vào vector biểu hiện pl-F-22b(+) ở hai vị trí cắt tương ứng để tạo vector biểu hiện trong *E. coli*. Sau khi chuyển vào chủng *E. coli* XL1-blue và tách plasmid để kiểm tra, vector biểu hiện pET-22b-*ker* được chuyển vào chủng *E. coli* BL 21(DE3). Kết quả kiểm tra plasmid tách từ tế bào *E. coli* BL21(DE3) đã xử lý với *Nco*I và *Bam*HI cho các đoạn DNA mong muốn gồm đoạn gen *ker* được ghép nối và vector gốc pl-F-22b(+) có kích thước lần lượt là 1,2 kb và 5,5 kb. Do vậy vector biểu hiện đã được thiết kế đúng như mong đợi và chủng *E. coli* BL 21(DE3) đã dung hợp được vector trên.

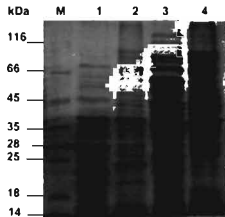


Hình 3. Sản phẩm cắt pET-22b-*ker* bằng *Nco*I và *Bam*HI 4: Thang DNA chuẩn; 5 pET-22b-*ker* được cắt bởi *Nco*I và *Bam*HI.

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

Để biểu hiện protein KER tái tổ hợp ở dạng protein hòa tan và có hoạt tính, chủng *E. coli* BL21(DE3) [pET-22b-*ker*] được nuôi cấy ở các điều kiện khác nhau bằng cách thay đổi các thông số về độ thông khí, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian cảm ứng IPTG, nồng độ IPTG thích hợp và thời gian thu tế bào sau khi cảm ứng. Trong một số trường hợp, protein KER tái tổ hợp nhận được có dạng không hòa tan một phần khi kiểm tra bằng điện di protein trên gel SDS-PAGE. Qua các kết quả nghiên cứu, chủng *E. coli* BL21(DE3) [pET-22b-*ker*] đã biểu hiện một lượng lớn protein KER hòa tan khi nuôi ở 30°C, giá trị OD_{600nm} đạt 0,6 đơn vị thì cảm ứng bằng IPTG, nồng độ IPTG cuối cùng là 0,4 mM và sẽ thu hồi sau 4.0 h cảm ứng.

Kết quả trên hình 4 cho thấy, chủng *E. coli* BL21(DE3) [pET-22b-*ker*] sẽ không biểu hiện protein KER tái tổ hợp trong điều kiện không cảm ứng. Khi cảm ứng IPTG thì protein KER tái tổ hợp nhận thấy rõ và có khối lượng phân tử là 28 kDa trên gel hình 1. Khối lượng phân tử protein này lớn hơn so với nghiên cứu của Jiang và đồng tác giả công bố năm 2007 là 25 kDa và của Hsin và đồng tác giả là 25 kDa. Tuy nhiên protein KER tái tổ hợp trong nghiên cứu Jiang và đồng tác giả có nguồn gốc gen *ker* dùng để biểu hiện được tách từ xạ khuẩn *Streptomyces fradiae* và Hsin và đồng tác giả có gen *ker* được tách ra từ *Pseudomonas aeruginosa*. Khối lượng phân tử protein tái tổ hợp nhận được tương đương với khối lượng phân tử kartinase của chủng *B. licheniformis* trong nghiên cứu của Lin và đồng tác giả công bố năm 1992. Sự khác nhau về nguồn gốc sẽ dẫn đến quá trình biểu hiện protein có những điểm không tương đồng nhau về kích thước cũng như khả năng thủy phân với từng cơ chất điều này đã được chứng minh qua các nghiên cứu trên.



Hình 4. Protein tổng số trên gel polyacrylamide. M: Thang protein chuẩn của hãng Fermentas; 1 và 3: Protein hoà tan/không hòa tan của chủng *E. coli* BL21(DE3)[pET-22b-*ker*] cảm ứng IPTG nồng độ cuối 0,2mM; 2 và 4 Protein hoà tan/không hòa tan của chủng *E. coli* BL 21 (DE3)[pET-22b-*ker*] không cảm ứng

KẾT LUẬN

Đã thiết kế được cặp mồi đặc hiệu, khuếch đại và tách dòng gen mã hóa KER từ chủng vi khuẩn *B.licheniformis* DS23. Trình tự của gen *ker* sử dụng đã được đăng ký tại ngân hàng dữ liệu GenBank dưới mã số truy cập HM154527. Đã xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự amino acid của KER với trình tự amino acid của các KER tương ứng

đã đăng ký trên ngân hàng dữ liệu GenBank cho thấy có độ tương đồng cao (99%). Gen ker đã chuyển được vào vector biểu hiện pET 22b (+) và biến nạp thành công vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Điều kiện tối ưu cho biểu hiện protein ở dạng hòa tan là: nhiệt độ 30°C, nồng độ IPTG cảm ứng là 0,4 mM khi OD_{600nm} là 0,6, thời gian thu hồi sau 4,0 h cảm ứng phần từ 28 kDa.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ kinh phí của đề tài CNHD.DT.08.08/CNSHCB thuộc Chương trình KH & CN trọng điểm quốc gia phát triển công nghiệp chế biến đến năm 2020 và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hashemi TGR, Davies R (2004) Detection of the Keratinolytic Activity of Agriculture and Mount Barker Strain *Dermatophilus congolensis* Serine Proteases. *Arch Razi Ins* 57: 45-54.
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>
- <http://www.expasy.ch>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Hsin HL, Li JY, Shann TJ (2009) Cloning, expression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system. *J Agric Food Chem* 57(9): 3506-3511
- Jiang L, Peng JS, Xiao YH, Kin M, Pei LY, Ya RW, Hui YL, Ning FW, Bin Y, Yun LF (2007) Functional expression of the keratinolytic serine protease gene *Sfp2* *Streptomyces fradiae* var.k11 in *Pichia pastoris*. *Prot Expr Purif* 54 (1): 79-86.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 227: 680-685.
- Lin X, Lee CG, Casale ES, Shih JCH (1992) Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl Environ Microbiol* 58: 3271- 3275.
- Lin X, Inglis GD, Yanke LJ, Cheng KJ (1999) Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23: 149-153.
- Manzinger L, Ros M, Vágvolgyi C, Kevei F (2001) Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *Fems Microbiol Lett* 205: 221-224.
- Nam GW, Lee DW, Lee HS, Lee NJ, Kim BC, Choe EA, Hwang JK, Suhartono MT, Pyun YR (2002) Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch Microbiol* 178: 538- 547.
- Riessen S, Antranikian G (2001) Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophy* 5: 399-408.
- Riffel A, Brandelli A (2002) Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29: 255-258
- Riffel A, Lucas F, Heeb P, Brandelli A (2003) Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch Microbiol* 179: 258-265.
- Sareen R, Bornscheuer UT, Mishra P (2005) Cloning, functional expression and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biotech Lett* 27: 1901-1907.
- Sangali S, Brandelli A (2000) Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J Appl Microbiol* 89: 735-743.
- Suntornsuk W, Tongjun J, Onnim P, Oyama H, Ratanakanokchai K, Kusamran T, Oda K (2005) Purification and characterization of keratinase from a thermotolerant featherdegrading bacterium. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21: 1111-1117.
- Swetlana N, Jain PC (2010) Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. *Brazil J Microbiol* 41: 196-200.
- Xu B, Zhong Q, Tang X, Yang Y and Huang Z (2009) Isolation and characterization of a new keratinolytic bacterium that exhibits significant feather-degrading capability. *Afr J Biotech* 8 (18): 4590-4596.
- Williams CM, Lee CG, Garlich JD, Shih JCH (1991) Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. *Poult Sci* 70: 85-94.
- Zerdani I, Faid M, Malki A (2004) Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in Morocco. *Afr J Biotech* 3: 67-70.

CLONING AND EXPRESSION THE KERATINASE FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS* DS23 IN *ESCHERICHIA COLI*

Nguyen Van Hieu, Phi Quyet Tien, Nghiem Ngoc Minh, Le Gia Hy*

*Institute of Biotechnology***SUMMARY**

Feather waste is generated in large amounts as a by-product of commercial poultry processing. This residue is almost pure keratin, which is not easily degradable by common proteolytic enzymes. A group of proteolytic enzymes which are able to hydrolyze insoluble keratins more efficiently than other proteases are called keratinases produced by some microorganisms, such as *Bacillus*, *Thermoanaerobacter*, *Chryseobacterium* and *Vibrio*. Keratinolytic enzymes have important utilities in biotechnological processes involving keratin-containing wastes from poultry and leather industries, through the development of non-polluting processes. After hydrolysis, the feathers can be converted to feedstuffs, fertilizers, glues, films and as the source of rare amino acids, such as serine, cysteine and proline. The strain *B. licheniformis* DS23, isolated from Do Son coastal area, was characterized as an KER producer. The sequence of amplified gene *ker*, consisting of 1,140 nucleotides coding for an 379-amino-acid protein, was analyzed and showed high homology (99%) with that from other *B. licheniformis* strains. Gene *ker* was then cloned into *Escherichia coli* expression vector pET-22b(+) to yield pET-22b-*ker*. When expressing recombinant KER 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 4.0 h at 32°C. On the SDS-PAGE gel, the molecular mass of the overexpressed KER showed about 28 kDa, corresponding closely to the expected one.

Keywords: Alkaline protease, *Bacillus licheniformis*, cloning, gene expression, keratinase

* Author for correspondence: Tel: +84-4-38363257; Fax: +84-4-38363144; E-mail: legiahy2002@yahoo.com