

TUYỂN CHỌN, ĐỊNH DANH VI KHUẨN *Bacillus* SINH ENZYME PROTEASE VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH CHỊU NHIỆT CỦA ENZYME

Nguyễn Hoàng Anh^{1*}, Nguyễn Văn Giang²

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: hoanganhcntp@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 02.08.2017

Ngày chấp nhận: 01.09.2017

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, bộ sưu tập gồm 180 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập từ tương ớt, dạ cỏ bò, lòng non lợn, sữa lên men, nước thải ở nhà máy sữa, đất ở các vùng khác nhau được sử dụng để sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease chịu nhiệt. Kết quả cho thấy 124 chủng *Bacillus* spp. có khả năng sinh protease ngoại bào, trong đó hai chủng vi khuẩn NT1.8 và NT 3.9.3 phân lập từ nước thải nhà máy sữa sinh protease có hoạt tính cao nhất đạt lần lượt là 423 U/l và 274.7 U/l. Đánh giá khả năng chịu nhiệt của protease từ chủng NT1.8 và NT3.9.3 cho thấy enzyme thu nhận từ chủng NT1.8 giữ được 80% hoạt độ khi ủ ở 50°C trong vòng 2 giờ và giữ được 78% hoạt độ khi ủ ở 55°C trong 30 phút. Trong khi đó, protease thu nhận từ chủng NT3.9.3 hoạt tính giảm mạnh khi xử lý enzyme ở nhiệt độ 50°C và 55°C. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA cho thấy chủng NT1.8 là *Bacillus amyloliquefaciens* NT1.8.

Từ khóa: *Bacillus* spp., protease chịu nhiệt, định tên, bền nhiệt.

Selection, Identification of *Bacillus* spp. Producing Protease, and Determination of Enzyme Thermostability

ABSTRACT

In this study, 180 *Bacillus* strains isolated from Chilli sources, cow rumens, pig small intestine, fermented milk, dairy industry effluent, soil have been used to determine protease activity. The data indicated that there were totally 124 strains producing extracellular protease, in which proteases from NT1.8 and NT3.9.3 isolated from dairy industry effluent were highest activity 423U/l and 274.7U/l, respectively. The evaluation of thermal stability showed that protease produced by NT 1.8 remained 80% after 2 hours incubation of enzyme at 50°C and remained 78% after enzyme incubation at 55°C for 30 min. Meanwhile, the activity of protease from strain NT 3.9.3 reduced dramatically after pre-treatment at 50 and 55°C. Strain NT1.8 was identified to be *Bacillus amyloliquefaciens* NT1.8 based on the comparison of sequence encoding for 16rRNA gene.

Keywords: *Bacillus* spp., thermostable protease, identification, thermostability.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu, sản xuất enzyme chịu nhiệt đã thu hút được sự quan tâm lớn của các nhà khoa học (Manachini & Fortina., 1998; Zakaria *et al.*, 2013). Trong đó, protease là một trong ba nhóm enzyme công nghiệp quan trọng, chiếm 60 - 65% tổng lượng enzyme trên toàn thế giới (Al Shehri *et al.*,

2004). Enzyme này được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, thức ăn gia súc, thuộc da, y học, mỹ phẩm và xử lý môi trường. Trong khoảng 3.000 loại enzyme protease đã được nghiên cứu, phần lớn đều thuộc nhóm trung tính và hoạt động ở nhiệt độ thường (Genckel *et al.*, 2006). Những enzyme này chỉ hoạt động tốt trong một khoảng nhiệt độ rất hạn chế, do vậy chúng vẫn chưa là nguồn enzyme lý

tuổi cho sản xuất công nghiệp. Chính vì lẽ đó, tìm kiếm những enzyme protease có khả năng chịu nhiệt mới là xu hướng chung đang được quan tâm trên thế giới và ở Việt Nam.

Vì sinh vật có nhiều đặc điểm ưu việt hơn so với sinh vật khác như khả năng sinh sản nhanh, vòng đời ngắn, vì thế thích hợp cho việc nghiên cứu sản xuất các sản phẩm thứ cấp nói chung và enzyme nói riêng. Trong số các vi sinh vật có khả năng sinh enzyme chịu nhiệt ngoại bào thì vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã và đang được nghiên cứu nhiều hơn do chúng có thể sử dụng được đa dạng nguồn cơ chất để tăng sinh khối và có khả năng sinh nhiều loại enzyme chịu nhiệt khác nhau (Zakaria *et al.*, 2013). Tuy nhiên, nghiên cứu về chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. an toàn trong thực phẩm có khả năng sinh protease chịu nhiệt đến nay vẫn còn hạn chế. Mục tiêu của nghiên cứu này là tuyển chọn được chủng *Bacillus* an toàn, có khả năng sinh tổng hợp enzyme protease chịu nhiệt, định hướng ứng dụng vào việc thủy phân một số loại thực phẩm giàu đạm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

180 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. được phân lập từ tương ớt, dạ cỏ bò, lòng non lợn, sữa lên men, nước thải ở nhà máy sữa, đất ở các vùng khác nhau đã định danh sơ bộ (theo hình thái, đặc tính sinh lý, sinh hóa) được sử dụng để tuyển chọn chủng có khả năng sinh enzyme protease chịu nhiệt.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định khả năng sinh protease ngoại bào

Khả năng sinh enzyme protease ngoại bào của các chủng *Bacillus* được xác định theo phương pháp đục lỗ thạch (Ponnuswamy *et al.*, 2013). Phương pháp được tóm tắt như sau: Môi trường CAP bổ sung 0,0015% Bromocresol xanh (BCG) được hấp khử trùng ở 121°C, trong 15 phút sau đó đổ ra đĩa, đợi thạch khô rồi tiến hành đục lỗ thạch có đường kính 3 mm. Dịch nuôi cấy đã được ly

tâm tách phần sinh khối tế bào (dịch enzyme thô) được nhỏ 100 µl vào lỗ trên đĩa thạch. Sau đó đưa đĩa thạch đã nhỏ dịch vào tủ lạnh 1 - 2 giờ để enzyme khuếch tán vào đĩa thạch và quan sát vòng thủy phân xung quanh lỗ thạch. Khả năng phân giải casein thể hiện ở vùng màu sáng xung quanh lỗ thạch, vùng không bị thủy phân có màu xanh. Tiến hành đo đường kính vòng phân giải (D) trừ đi đường kính lỗ thạch (d) để xác định định tính hoạt độ protease.

2.2.2. Xác định hoạt độ protease của chủng vi khuẩn *Bacillus* trong môi trường lỏng

Hoạt độ protease của các chủng *Bacillus* được xác định bằng phương pháp Sigma dựa trên nguyên tắc: Protease thủy phân casein trong môi trường kiềm tạo sản phẩm là các đoạn peptide ngắn và một số amino acid hòa tan trong tricloacetic acid (TCA). Các peptide và sản phẩm tạo thành có chứa tyrosin, tryptophan khi cho tác dụng với thuốc thử folin tạo dung dịch có màu. Cường độ màu tỉ lệ thuận với nồng độ chất đem phản ứng, cường độ màu được ghi nhận bằng giá trị mật độ quang OD ở $\lambda = 660$ nm. Xác định lượng tyrosin và tryptophan hòa tan bởi thuốc thử folin. Một đơn vị hoạt độ của protease được định nghĩa là lượng enzyme thủy phân casein giải phóng ra một lượng amino acid tương đương 1,0 mmol tyrosine trong vòng 1 phút, ở pH 7,5, nhiệt độ 37°C.

Cách tiến hành: 5 ml cơ chất casein 0,65% được đưa vào ống fancel 15 ml, ủ trong bể ổn nhiệt 37°C. Sau 5 phút, 1 ml enzyme được bổ sung và phản ứng được dừng lại sau 10 phút bằng cách thêm vào 5 ml tricloacetic acid 5%. Protein được kết tủa trong 30 phút. Sau đó hỗn hợp phản ứng được lấy đem đi ly tâm 6.000 vòng/phút trong vòng 10 phút, 4°C. 2 ml dịch sau ly tâm được trộn với 5 ml Na₂CO₃ 0,5 M cùng với 1,0 ml thuốc thử folin 1 M và ủ ở 37°C trong vòng 30 phút. Độ hấp thụ quang được đo bằng máy quang phổ tại bước sóng 660 nm. Dựa vào đường chuẩn tyrosin để tính toán kết quả.

Công thức tính hoạt độ enzyme:

$$\text{Hoạt độ enzyme} = \frac{T \cdot 11}{1 \cdot 10 \cdot 2} \times 1.000$$

Trong đó:

Hoạt độ enzyme tính bằng U/l

T: số μM Tyrosine tương ứng được giải phóng ra

11: tổng thể tích phản ứng enzyme (ml)

2: thể tích dùng để đo cường độ quang sau khi phản ứng với thuốc thử folin (ml)

1: thể tích enzyme dùng cho phản ứng (ml)

10: thời gian phản ứng (phút)

2.2.3. Xác định độ bền nhiệt của protease từ chủng vi khuẩn có hoạt độ protease cao

Protease chịu nhiệt được xác định theo phương pháp mô tả bởi Nguyen *et al.* (2012). Các enzyme được ủ ở 50°C và 55°C . Tại các thời gian ủ khác nhau (0 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ...), enzyme lấy ra để xác định hoạt độ như mô tả ở mục 2.2.2. Độ bền nhiệt của enzyme được xác định bằng cách so sánh tỷ lệ (%) hoạt độ còn lại của enzyme tại thời điểm đo với thời điểm bắt đầu ủ.

2.2.4. Định danh chủng được tuyển chọn bằng phương pháp so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA

Gene mã hóa cho vùng 16S rRNA của chủng *Bacillus* được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 8F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5' - GGTTACCTTGTACGACTT - 3'). Sản phẩm PCR với kích thước khoảng 1500 bp được tinh sạch và giải trình tự. Kết quả giải trình tự

được so sánh với thông tin trên ngân hàng gen bằng công cụ BLAST.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả sàng lọc các chủng *Bacillus* có hoạt tính protease

Từ bộ sưu tập gồm 180 chủng vi khuẩn chúng tôi tiến hành nuôi cấy và xác định khả năng sinh enzyme protease bằng phương pháp đục lỗ thạch. Kết quả thu được 124 chủng có xuất hiện vòng thủy phân xung quanh lỗ thạch (Bảng 1). Các chủng này được cho là có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào. Tuy nhiên, đường kính vòng thủy phân chỉ có tính chất định tính, do đó 20 chủng phân lập từ dạ cỏ bò và nước thải nhà máy sữa sinh enzyme protease cho đường kính vòng phân giải cao nhất từ 11,10 - 17,20 mm (Bảng 2) được sử dụng để tiếp tục xác định hoạt độ của enzyme sử dụng cơ chất casein.

3.2. Kết quả xác định hoạt độ của protease của vi khuẩn *Bacillus*

Các chủng vi khuẩn có đường kính vòng thủy phân cao được nuôi cấy trong môi trường NB ở 37°C , lắc 200 vòng/phút. Sau 24 giờ, dịch nuôi cấy của 20 chủng vi khuẩn được ly tâm tách phần sinh khối tế bào và sử dụng để xác định hoạt tính protease theo phương pháp Sigma. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy khả năng sinh tổng hợp protease của các chủng *Bacillus* dao

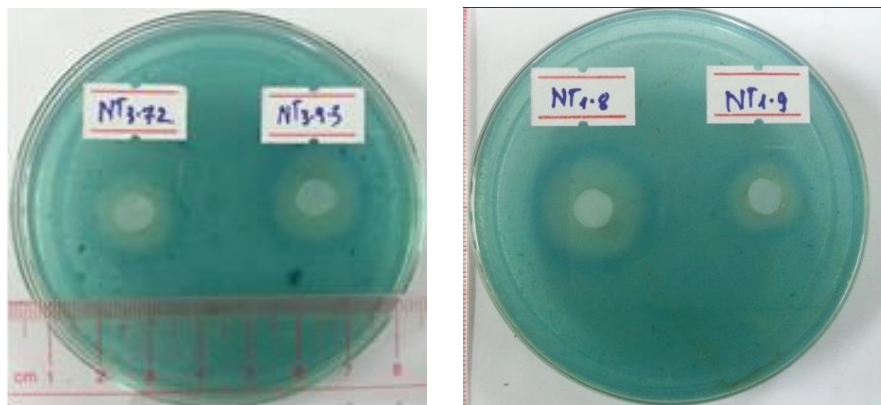
Bảng 1. Kết quả sàng lọc hoạt tính enzyme protease 180 chủng *Bacillus*

Nguồn phân lập	Ký hiệu chủng	Số lượng chủng	Chủng có hoạt tính enzyme protease
Tương ớt	TO	36	27
Dạ cỏ bò	DC	94	68
Lòng non lợn	LN	8	1
Sữa lên men	SU	6	3
Nước thải nhà máy sữa	NT	25	19
Đất	Đ	11	6
Tổng số		180	124

Bảng 2. Đường kính vòng phân giải casein 20 chủng có vòng phân giải lớn

STT	Chủng	D-d (mm)	STT	Chủng	D-d (mm)
1	DC3.11	11,70	11	DC3.31	12,25
2	DC3.6	11,70	12	DC2.27	13,00
3	DC1.18	14,05	13	DC2.39	14,55
4	DC2.33	12,35	14	DC3.24	13,95
5	DC2.11	13,65	15	DC3.13	14,95
6	DC2.34	16,00	16	DC1.9	12,40
7	DC1.4	12,40	17	DC1.16	13,90
8	DC3	12,70	18	DC3.72	14,65
9	DC2.28	11,10	19	NT.3.9.3	16,25
10	DC3.32	15,05	20	NT1.8	17,20

Chú thích: + DC là các chủng phân lập từ dạ cỏ bò, NT là các chủng phân lập từ nước thải nhà máy sữa. D: đường kính vòng phân giải (mm); d: đường kính lỗ thạch (mm).



Hình 1. Hình ảnh vòng phân giải casein của protease từ chủng NT1.8, NT1.9, NT3.72 và NT3.9.3

Bảng 3. Hoạt tính protease của 20 chủng vi khuẩn *Bacillus*

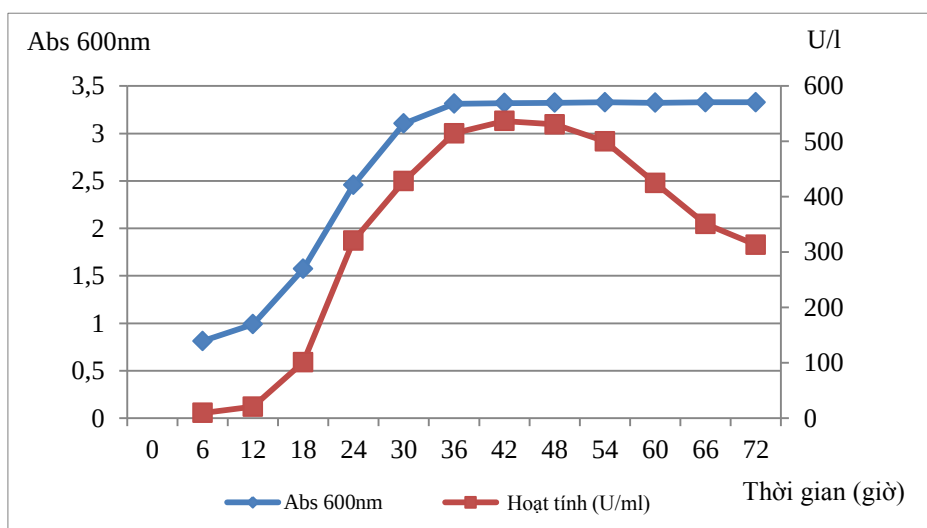
STT	Tên chủng	Hoạt tính (U/l)	STT	Tên chủng	Hoạt tính (U/l)
1	DC3.11	23.2	11	DC3.31	23.4
2	DC3.6	43.9	12	DC2.27	9.8
3	DC1.18	5.9	13	DC2.39	11.4
4	DC2.33	6.2	14	DC3.24	16.5
5	DC2.11	41.2	15	DC3.13	9.8
6	DC2.34	16.2	16	DC1.9	114.5
7	DC1.4	20.0	17	DC1.16	12.7
8	DC3	14.7	18	DC3.72	135.6
9	DC2.28	35.6	19	NT.3.9.3	274.7
10	DC3.32	12.9	20	NT1.8	321.9

động từ 5,9 - 321,9 U/l. Trong đó, hai chủng có hoạt tính cao nhất là NT1.8 và NT3.9.3 với hoạt tính tương ứng là 321,9 U/l và 274,7 U/l. Kết quả này tương đồng với kết quả đo kích thước vòng phân giải được trình bày ở bảng 2 và hình 1. Hai chủng này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

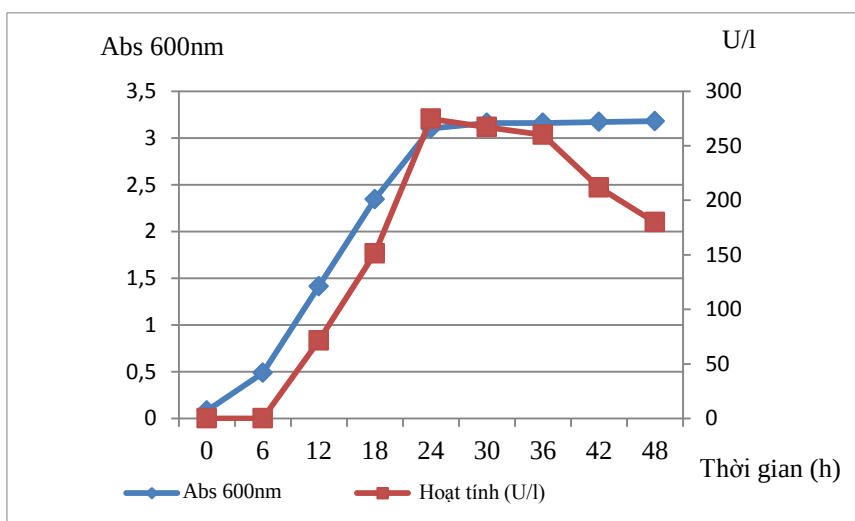
3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp protease của hai chủng NT1.8 và NT3.9.3

Hai chủng NT1.8 và NT3.9.3 được nuôi cấy trong môi trường NB ở điều kiện 37°C, lắc 200 vòng/phút đến 72 giờ. Từ thời điểm nuôi, cứ sau 6 giờ tiến hành lấy mẫu để đo mật độ quang ở 600 nm và ly tâm thu dịch để xác định hoạt độ protease ngoại bào. Kết quả được thể hiện ở hình 2 và 3.

Kết quả hình 2 cho thấy chủng NT 1.8 từ 0 - 6 giờ vi khuẩn ở giai đoạn thích nghi, lúc này sự tổng hợp protease ít, từ 6 - 30 giờ là vi khuẩn ở pha log, phát triển với tốc độ nhanh, giai đoạn



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme protease của chủng vi khuẩn NT1.8



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme protease của chủng vi khuẩn NT3.9.3

từ 36 - 72 giờ thuộc pha cân bằng và pha suy vong, mật độ quang ở mức ổn định. Khả năng sinh tổng hợp protease của chủng NT1.8 thể hiện tương đồng với mật độ sinh khối. Ở giai đoạn thích nghi hoạt độ protease thu được ở mức thấp, khi mật độ quang tăng dần thì hoạt độ protease tăng theo đến pha cân bằng hoạt độ enzyme thu được cao nhất đạt 432 U/l sau 42 giờ nuôi và hoạt tính của enzyme duy trì ở mức tương đối ổn định đến 54 giờ. Sau đó hoạt độ giảm dần cùng với sự giảm sinh khối.

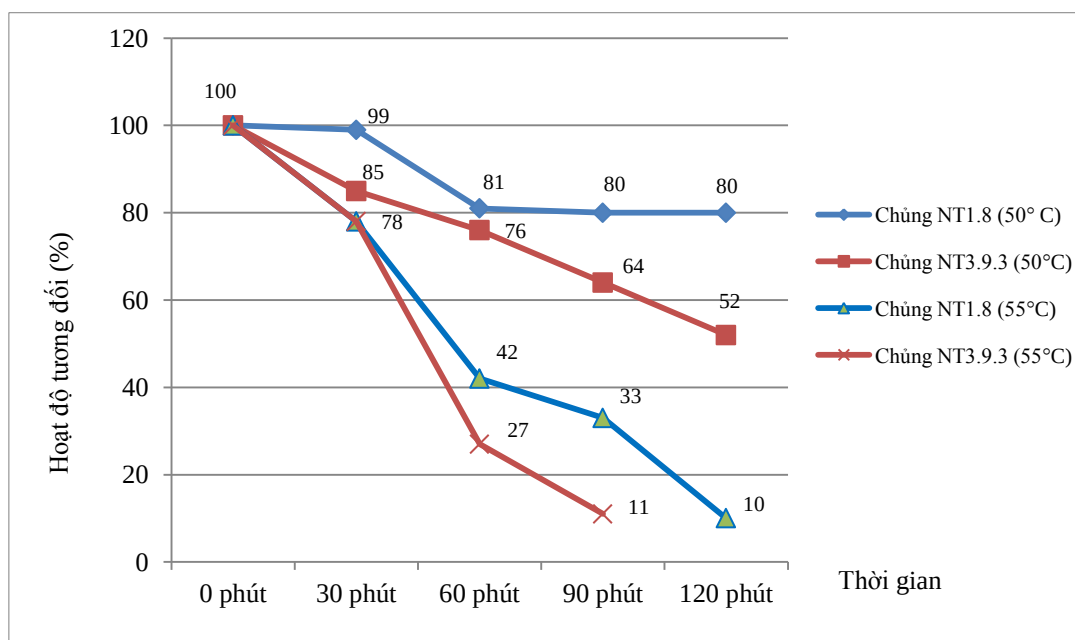
Khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng NT3.9.3 thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy lượng sinh khối và hoạt độ của enzyme bắt đầu tăng nhanh sau 12 giờ nuôi cấy và đạt mức cân bằng sau khi nuôi 24 giờ. Lúc này hoạt độ protease của chủng N3.9.3 đạt cực đại là 274,7 U/l. Mật độ vi khuẩn và hoạt độ enzyme tương đối ổn định đến 36 giờ, sau khoảng thời gian này vi khuẩn bắt đầu pha suy vong và giá trị OD của mật độ quang của tế bào không thay đổi và hoạt tính protease giảm đáng kể. Các kết quả nghiên cứu này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của Shumi *et al.* (2004), Sharmin *et al.* (2005). Chủng NT 1.8 được nuôi cấy ở 42 giờ và chủng NT 3.9.3 nuôi

cấy ở 24 giờ để thu nhận protease, sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Kết quả xác định độ bền nhiệt enzyme protease của hai chủng NT1.8 và NT3.9.3

Dựa theo phương pháp xác định đặc tính enzyme protease ở phần 2.2.3, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu độ bền nhiệt của hai chủng NT1.8 và NT 3.9.3 tại nhiệt độ 50°C và 55°C. Dịch enzyme thô được thu nhận và ủ ở nhiệt độ 50°C và 55°C, ở các thời gian ủ khác nhau (0 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ..), enzyme được lấy ra để xác định hoạt tính còn lại. Hoạt độ protease ở thời điểm ban đầu chưa xử lý nhiệt độ đạt giá trị cao nhất được đặt là 100%. Kết quả thu được thể hiện ở hình 4.

Hình 4 cho thấy ở 55°C hoạt độ enzyme giảm nhiều hơn so với 50°C đối với cả hai chủng thí nghiệm. Tuy nhiên, tỉ lệ hoạt độ còn lại sau thời gian xử lý nhiệt của hai chủng có sự khác nhau. Cụ thể, protease thu nhận từ chủng NT1.8 gần như không bị giảm hoạt độ sau 30 phút ủ ở 50°C sau đó hoạt độ giảm dần còn 80% sau 60 phút và duy trì mức hoạt độ này đến 120 phút xử lý nhiệt. Trong khi đó enzyme protease thu nhận từ chủng NT 3.9.3 có hoạt độ giảm



Hình 4. Độ bền nhiệt (50°C, 55°C) của enzyme protease chủng NT1.8 và NT3.9.3

dẫn tương ứng với thời gian xử lý nhiệt. Sau 30 phút ủ ở 50°C hoạt độ giảm còn 85% và sau 120 phút hoạt độ tương đối thu được chỉ còn 52%.

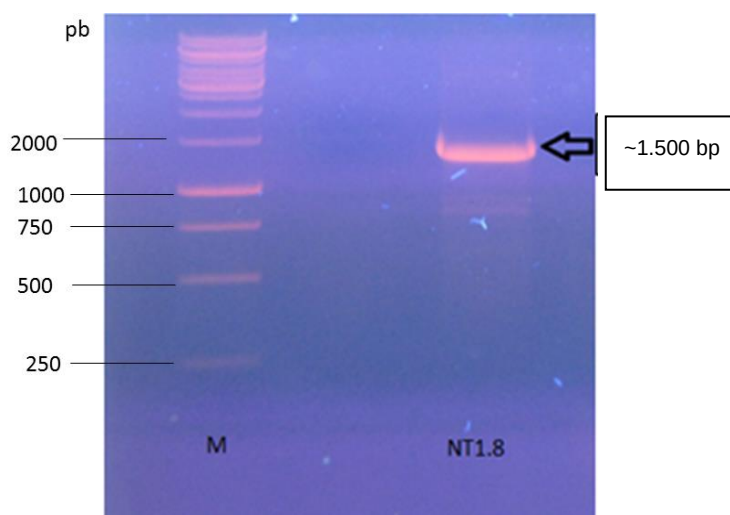
Ở 55°C hoạt độ enzyme protease thu nhận từ cả 2 chủng giảm nhanh sau 30 phút xử lý nhiệt, chỉ còn 78%, sau đó tiếp tục giảm khi thời gian xử lý nhiệt tăng. Kết quả là sau 90 phút hoạt độ tương đối của enzyme thu từ chủng NT 3.9.3 chỉ còn 11% và sau 120 phút hoạt độ enzyme thu nhận từ chủng NT1.8 còn 10%.

Với kết quả này enzyme protease thu nhận từ chủng NT1.8 được coi là bền nhiệt ở 50°C. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Joo *et al.* (2002); Manachini & Fortina (1998). Ngoài ra, một số công bố về khả năng chịu nhiệt của protease cho thấy phổ chịu nhiệt của protease dao động trong khoảng từ 45 - 70°C (Bae *et al.*, 2005), hay công bố của Zakaria *et al.* (2013) cho thấy protease thu nhận từ *Bacillus pumilus* phân lập từ suối nước nóng ở Jordan có khả năng duy trì hoạt tính hơn 50% sau khi xử lý nhiệt 2,5 giờ ở 50°C. Như vậy với mức duy trì hoạt tính 80% sau 2 giờ xử lý nhiệt ở 50°C thì enzyme protease được coi là bền ở nhiệt độ này và đây là một loại enzyme có triển vọng cao có thể áp dụng trong công nghiệp chế biến thực phẩm. Chủng NT1.8 sẽ được tiếp tục định tên bằng việc so sánh trình tự vùng gen mã hóa 16S rRNA.

3.5. Kết quả định tên chủng NT1.8

Đoạn gen mã hóa vùng 16S rRNA của chủng NT1.8 được nhân lên bằng cặp mồi 8F và 1492R (Lane, 1991). Kết quả PCR cho thấy sản phẩm thu được có một vạch duy nhất sáng, rõ có kích thước khoảng 1500 bp (Hình 5). Kết quả vạch băng này phù hợp với tính toán lý thuyết khi sử dụng cặp mồi 8F và 1492R (1485 bp). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự

Trình tự thu được từ vùng gen mã hóa 16S rRNA có kích thước 1.235 bp, tín hiệu rõ không nhòe, không bị trùng các đỉnh tín hiệu. Sau khi tiến hành xử lý loại mồi và các tín hiệu nhiễu, trình tự đoạn gen được so sánh trên ngân hàng Gen (Genebank) sử dụng công cụ BLAST. Kết quả so sánh trình tự cho thấy mẫu NT1.8 có mức tương đồng 97% với vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*, hệ số kỳ vọng là 0.0. Điều này cho thấy kết quả thu được là đáng tin cậy nên chủng vi khuẩn NT1.8 được đặt tên là *Bacillus amyloliquefaciens* NT1.8. Một số công trình đã công bố cho thấy *Bacillus amyloliquefaciens* được biết đến từ rất sớm nhờ khả năng sản sinh các loại enzyme ngoại bào đa dạng. Từ những năm 1943, *B. amyloliquefaciens* đã được sử dụng để sản xuất hai loại enzyme công nghiệp là α -amylase và protease (Cho *et al.*, 2003).



Hình 5. Kết quả PCR với cặp mồi 8F và 1492R nhân vùng gen mã hóa 16S rRNA chủng NT1.8

Chú thích: M (marker): Thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas)

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tuyển chọn và định danh được chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* NT1.8 từ nguồn nước thải của nhà máy sữa sinh protease có đặc tính chịu nhiệt. Hoạt độ protease của chủng này vẫn còn 80% sau khi ủ ở 50°C trong vòng 2 giờ và còn 78% sau khi ủ enzyme ở 55°C trong vòng 30 phút. Chủng *B. amyloliquefaciens* NT1.8 này là một chủng vi khuẩn tiềm năng trong việc sản xuất protease chịu nhiệt, ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al Shehri Abdulrahman, M.M., Yasser S. (2004). Production and some properties of protease produced by *B. licheniformis* isolated from Tihamet Aseer. Saudi Arabia. Pak. Journal of Biological Science, 7(9): 1631-1635.
- Bae, S.S., Lee, J.H., Kim, S.J. (2005). *Bacillus alveyensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 1211-1215.
- Cho, S.J., Oh, S.H., Pridmore, R.D., Juillerat, M.A., Lee, C.H. (2003). Purification and characterization of proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from traditional soybean fermentation starter. J Agric Food Chem., 51(26): 7664-70
- Genckel, H and Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from nature habitats. Enzyme and Microbial technology, 39: 703-710.
- Joo, H., Kumar G., Park, G., Kim, K. T., Paik, S. R., Chang, C. (2002). Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. Process Biochemistry, 38(2): 155-159.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. London: Wiley, pp. 115-175.
- Manachini, P. L and Fortina, M. G. (1998). Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. Biotechnol. Letters, 20(6): 565-568.
- Nguyen, H. A., Nguyen, T. H., Kren V., Eijsink, V. G. H., Haltrich D., Peterbauer, C. K. (2012). Heterologous Expression and Characterization of an N-Acetyl- β -D-hexosaminidase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Journal of Agricultural Food Chemistry, 60(12): 3275-81.
- Ponnuswamy V., Samuel G., Prakash V. (2013). A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. Journal of Biochemical technology, 4(3): 628-630.
- Sharmin, S., Hossain, M. T., Anwar, M. N. (2005). Isolation and characterization of a protease producing bacteria *Bacillus amovivorus* and optimization of some factors of culture conditions for protease production. Journal of Biological Sciences, 5(3): 358-362.
- Shumi, W., Hossain, M. T., Anwar, M. N. (2004). Proteolytic activity of a bacterial isolate *Bacillus fastidiosus* den Dooren de Jong. Journal of Biological Sciences, 4(3): 370-374.
- Zakaria A., Hala D., Kholoud A. (2013). Isolation and characterization of thermostable protease producing *Bacillus pumilus* from thermal spring in Jordan. African Journal of Microbiology Research, 7(29): 3711-3719.