

Tối ưu điều kiện sinh tổng hợp protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* Bs04 và xác định đặc tính của enzyme

Nguyễn Hữu Tuyển*, Phạm Tiến Dũng, Phan Thị Kim Ngân, Ngô Võ Kế Thành

Trung tâm Nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 10/12/2018; ngày chuyển phản biện 20/12/2018; ngày nhận phản biện 14/2/2019; ngày chấp nhận đăng 26/2/2019

Tóm tắt:

Protease là enzyme được sử dụng rộng rãi và phổ biến trong nhiều lĩnh vực như y dược, công nghiệp, nông nghiệp... Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành tối ưu các điều kiện lên men từ chủng *Bacillus subtilis* Bs04 nhằm thu nhận enzyme có hàm lượng và hoạt độ cao nhất. Các thành phần dinh dưỡng, yếu tố hóa - lý và đặc tính protease thu nhận lần lượt được khảo sát. Kết quả cho thấy, điều kiện tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp protease từ chủng Bs04: nguồn carbon và nitơ tốt nhất là glucose-anhydrous và cao nấm men với nồng độ tương ứng là 2% và 2,5%; pH môi trường 7,5; thu nhận enzyme sau 36 giờ lên men. Enzyme được thu nhận với hoạt độ cao nhất bằng phương pháp tủa muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với độ bão hòa 70%. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy thu nhận được enzyme với kích thước 24 kDa và 38 kDa.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, đặc tính protease, protease, tối ưu môi trường.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Protease là một trong những enzyme có nhiều ứng dụng rộng rãi phục vụ cho đời sống, trong các ngành công nghiệp thực phẩm, dệt may, dược phẩm. Protease có thể thu nhận từ các nguồn: thực vật, động vật và vi sinh vật. Trong đó, vi sinh vật là nguồn cho protease phong phú nhất. Một số loài vi sinh vật có khả năng tổng hợp protease như *B. subtilis*, *B. cereus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces rimosus* và *Aspergillus oryzae*... Mặc dù có nhiều nguồn vi khuẩn có sẵn để sản xuất protease nhưng chỉ có một số ít được nghiên cứu sử dụng trong sản xuất thương mại. Trong đó, lượng protease từ vi khuẩn *Bacillus* sp. được sản xuất với sản lượng lớn nhất [1-3].

Vi khuẩn *B. subtilis* có khả năng thích nghi cao và sinh tổng hợp được nhiều loại enzyme cần thiết trong quá trình sinh trưởng để thích nghi với điều kiện môi trường như protease, amylase, glucanase... Hàm lượng và hoạt tính protease tổng hợp từ *B. subtilis* phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: chủng vi khuẩn, điều kiện nuôi cấy, phương pháp thu nhận... Vì vậy, để thu nhận protease có hàm lượng và hoạt tính cao cần lựa chọn nguồn phân lập phù hợp và tối ưu về phương pháp, các điều kiện nuôi cấy, đặc biệt là thành phần và cơ chất cảm ứng trong môi trường nuôi [1, 2, 4-6]... Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm chủ động được nguồn protease từ chủng hoang dại để kết hợp với màng cellulose được

sinh tổng hợp từ vi khuẩn (bacterial cellulose) *Acetobacter xylinum* [7] phục vụ việc tạo vật liệu y sinh ứng dụng làm màng bao hỗ trợ phục hồi vết thương do bỏng gây ra. Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm tối ưu điều kiện trong quá trình nuôi lên men chủng vi khuẩn hoang dại Bs04 để thu protease với hàm lượng và hoạt độ cao, đây là tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng sau này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguồn vi khuẩn và điều kiện nuôi

Vi khuẩn *subtilis* Bs04 (phân lập từ đất) đã được nhóm tác giả sàng lọc dựa trên khả năng sinh tổng hợp protease từ 136 chủng vi khuẩn thu nhận từ đất, nước, nhà máy chế biến thủy hải sản tại các khu vực khác nhau ở TP Hồ Chí Minh và các tỉnh khu vực Đồng bằng sông Cửu Long và được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Trung tâm Nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh.

Môi trường sử dụng trong quá trình lên men và tối ưu thành phần dinh dưỡng là môi trường NB chứa: glucose 1%; casein 0,5%; yeast extract 0,5%; KH_2PO_4 0,2%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% (w/v). Môi trường đối chứng là TSB. Các nghiệm thức khảo sát được nuôi ở 37°C với tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau 48 giờ, protease thô được thu nhận và xác định hoạt độ theo phương pháp Anson cải tiến [8].

*Tác giả liên hệ: Email: tuyen.nguyenhuu@shiplabs.org

Optimisation of the conditions for protease synthesis from *Bacillus subtilis* Bs04 and characterisation of the enzyme

Huu Tuyen Nguyen*, Tien Dung Pham,
Thi Kim Ngan Phan, Vo Ke Thanh Ngo

Saigon Hi-Tech Park Research Laboratories

Received 10 December 2018; accepted 26 February 2019

Abstract:

Proteases are the most commonly used enzyme in many fields such as medicine, industry, agriculture, etc. In this study, we optimized fermentative conditions from *Bacillus subtilis* Bs04 to obtain the highest concentration and activity of the secreted protease. The effects of main medium ingredient, physicochemical parameter and characteristics of the protease were investigated. The result showed the optimal conditions for protease production from Bs04: the best organic carbon and nitrogen source are glucose-anhydrous and yeast extract with concentration of 2% and 2.5%, respectively; medium pH 7.5; enzyme obtained after 36 hours of fermentation. Maximum activity was obtained by ammonium sulfate precipitation method with the 70% saturation. The results of SDS-PAGE showed two bands with a molecular weight of 24 kDa and 38 kDa, respectively.

Keywords: *Bacillus subtilis*, medium optimization, protease, protease characteristics.

Classification number: 1.6

Phương pháp tối ưu nguồn dinh dưỡng trong môi trường lên men

Tối ưu nguồn carbon:

Ảnh hưởng của nguồn carbon trong quá trình sinh tổng hợp protease được xác định bằng cách lên men chủng Bs04 trong môi trường TSA và môi trường NB có thay đổi các nguồn saccharose, glucose-anhydrous, tinh bột, manitol, sucrose theo tỷ lệ 1% (w/v).

Sau khi xác định nguồn carbon phù hợp, tiến hành tối ưu

nồng độ nguồn carbon cho hiệu quả sinh tổng hợp protease có hoạt độ cao nhất. Nồng độ nguồn carbon khảo sát từ 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3%.

Tối ưu nguồn nitơ:

Ảnh hưởng của nguồn nitơ trong quá trình sinh tổng hợp protease được xác định bằng cách lên men chủng Bs04 trong môi trường TSA và môi trường NB có thay đổi các nguồn meat extract, yeast extract, peptone, glycine và trypton theo tỷ lệ 1% (w/v).

Sau khi xác định nguồn nitơ phù hợp, tiến hành tối ưu nồng độ nguồn nitơ cho hiệu quả sinh tổng hợp protease có hoạt độ cao nhất. Nồng độ nguồn nitơ khảo sát từ 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3%.

Phương pháp tối ưu các điều kiện hóa - lý trong quá trình lên men

Môi trường NB đã tối ưu thành phần dinh dưỡng được sử dụng trong quá trình khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện hóa - lý.

Tối ưu pH của môi trường:

Tiến hành lên men chủng Bs04 trong các nghiệm thức chứa môi trường NB với các giá trị pH lần lượt là 6; 6,5; 7; 7,5; 8 và 8,5.

Ảnh hưởng của độ thoáng khí trong quá trình lên men:

Độ thoáng khí được tính bằng tỷ lệ thể tích bình trống (không chứa môi trường) trên thể tích toàn bình, độ thoáng khí càng cao thì nồng độ oxy hòa tan vào môi trường càng lớn. Chủng Bs04 được lên men trong các bình 300 ml chứa môi trường với thể tích lần lượt 30; 60; 90; 120; 150 ml.

Tối ưu thời điểm thu nhận enzyme:

Tại mỗi thời điểm khác nhau của quá trình sinh trưởng, vi khuẩn sẽ sử dụng các nguồn cơ chất trong môi trường nuôi cấy bằng các enzyme thủy phân đặc hiệu. Tiến hành lên men chủng Bs04 trong môi trường NB đã tối ưu thành phần dinh dưỡng, giá trị pH và độ thoáng khí. Thu nhận và xác định hoạt độ protease ở các thời điểm 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 và 96 giờ.

Phương pháp xác định đặc tính protease tổng hợp từ chủng Bs04

Phương pháp tủa enzyme từ dịch enzyme thô:

Protease được tủa từ dịch enzyme thô với ethanol 96%, acetone và muối ammonium sunfate. Tỷ lệ dịch enzyme thô: dung môi lần lượt khảo sát là 1:2; 1:3; 1:4 và 1:5 (v/v) với dung môi ethanol và acetone. Phương pháp tủa với muối ammonium sunfate được tủa theo độ bão hòa từ 30 đến 80%. Sau đó dung dịch tủa được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Loại bỏ dịch nổi, sau đó hòa tan cặn với dung dịch đệm muối phosphate (PBS) 1X, thẩm tách loại tác nhân tủa và xác định hoạt độ enzyme.

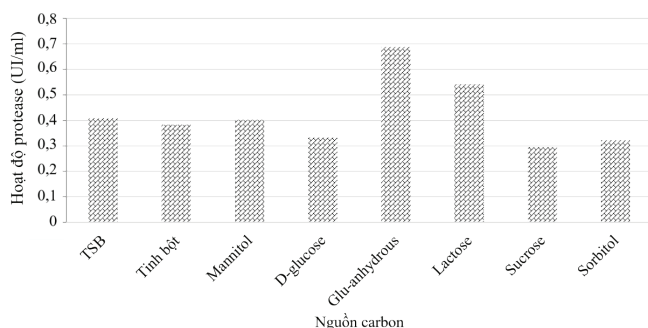
Phương pháp điện di SDS-PAGE:

Dịch protease được chạy điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12% để xác định đặc điểm, kích thước enzyme theo thang protein chuẩn.

Kết quả

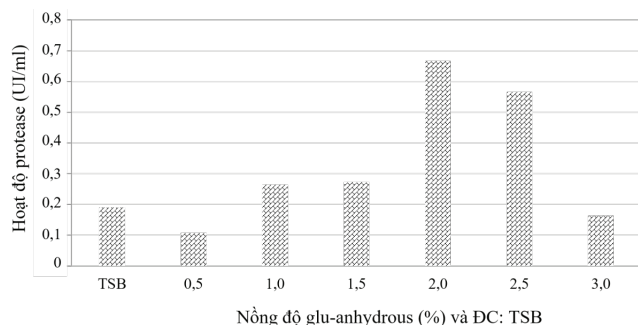
Tối ưu nguồn dinh dưỡng

Nguồn carbon:



Hình 1. Ảnh hưởng của các nguồn carbon đến hoạt độ protease.

Kết quả (hình 1) cho thấy, quá trình sinh tổng hợp protease của *B. subtilis* Bs04 đạt hiệu quả cao nhất khi sử dụng glucose-anhydrous là nguồn carbon chính với hoạt độ thu nhận được là 0,688 UI/ml. Tiếp tục khảo sát nồng độ nguồn glucose-anhydrous cho thấy, hiệu quả sinh tổng hợp protease từ Bs04 cao nhất ở nồng độ 2% (hình 2). Nồng độ glucose-anhydrous thấp hơn (0,5 đến 1,5%) không đủ để kích thích quá trình sinh tổng hợp protease mạnh, hoạt độ thu nhận được khoảng 0,107 đến 0,272 UI/ml. Ngược lại, khi bổ sung nồng độ cao, glucose-anhydrous sẽ ức chế quá trình sinh tổng hợp protease và hoạt độ enzyme thu nhận giảm (đạt 0,566 và 0,163 UI/ml) (hình 2). Trên cơ sở đó, glucose-anhydrous 2% được chọn là nguồn carbon cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo.

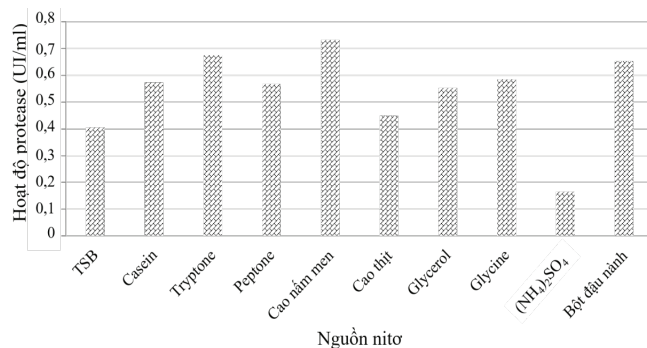


Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ glucose-anhydrous đến hoạt độ protease.

Nguồn nitơ:

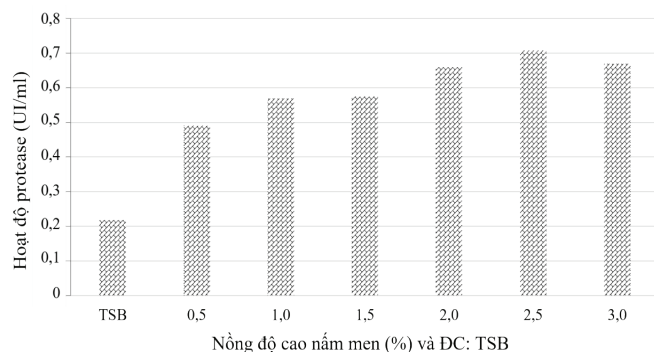
Sau khi kết luận được nguồn carbon và nồng độ tối ưu trong môi trường cho hiệu quả sinh tổng hợp protease cao

nhất, tiến hành khảo sát nguồn nitơ phù hợp bằng cách thay thế peptone 0,5% trong môi trường bằng các thành phần khác như casein, tryptone, cao nấm men, cao thịt, glycerol, glycine, bột đậu nành, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và đối chứng TSB. Kết quả cho thấy nguồn cao nấm men cho enzyme với hoạt độ tốt nhất (hình 3).



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt độ protease.

Sau khi kết luận được cao nấm men là nguồn nitơ hiệu quả nhất trong quá trình nuôi *B. subtilis* Bs04 thu nhận protease, tiến hành khảo sát nhằm chọn nồng độ cao nấm men tối ưu thu nhận protease cho hoạt độ enzyme cao nhất. Kết quả hình 4 cho thấy, với nồng độ 2,5% cao nấm men trong môi trường nuôi, *B. subtilis* Bs04 sẽ cho hiệu quả sinh tổng hợp protease hoạt độ enzyme cao nhất (đạt 0,708 UI/ml).

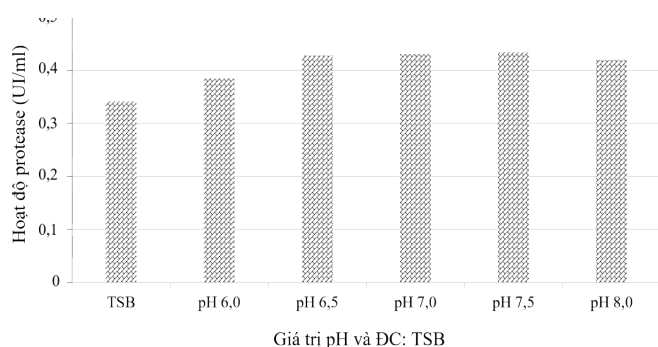


Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men đến hoạt độ protease.

Tối ưu điều kiện hóa - lý

Tối ưu pH môi trường lên men:

Quá trình sinh tổng hợp protease từ *B. subtilis* khi sử dụng phương pháp nuôi cấy chìm (nuôi cấy sâu), pH môi trường có ảnh hưởng lớn đến sự tổng hợp và tích lũy protease trong môi trường. Tùy vào chủng vi sinh vật sử dụng trong quá trình sinh tổng hợp enzyme khác nhau mà giá trị pH ban đầu sẽ khác nhau.

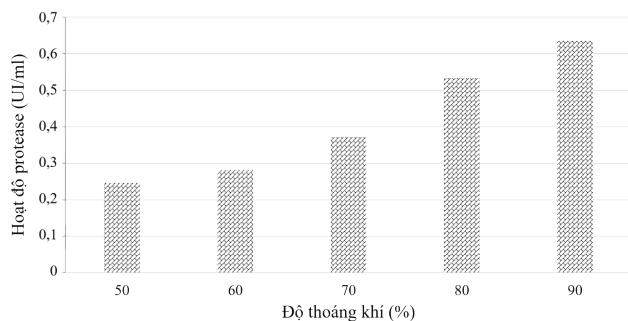


Hình 5. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi đến hoạt độ protease.

Kết quả cho thấy, hoạt độ protease thu nhận được khi nuôi cấy trong môi trường pH khác nhau từ 6 đến 8 có sự chênh lệch không đáng kể. Hoạt độ enzyme cao nhất ghi nhận được ở pH 7,5 đạt 0,434 UI/ml (hình 5).

Tối ưu độ thoáng khí trong quá trình lên men:

B. subtilis là vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí tùy nghi, vì vậy nồng độ oxy hòa tan trong quá trình nuôi ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Thông thường, đối với các vi khuẩn hiếu khí nồng độ oxy cao làm tăng khả năng sinh trưởng, rút ngắn pha tiềm phát. Nồng độ oxy thấp có thể ức chế, làm suy giảm khả năng sinh trưởng của vi sinh vật. Tuy nhiên, tùy từng mục đích thí nghiệm và tùy từng chủng vi khuẩn. Trong điều kiện môi trường thiếu oxy sẽ suy giảm khả năng sinh trưởng nhưng có thể kích thích sự sinh tổng hợp enzyme.



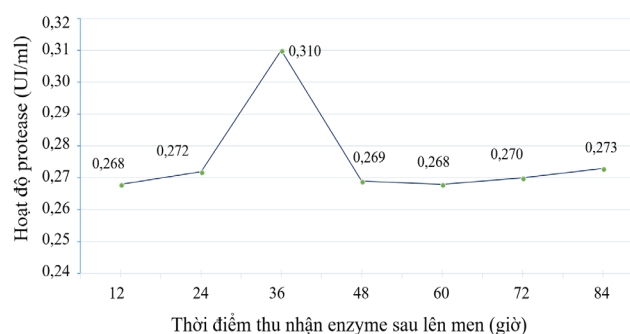
Hình 6. Ảnh hưởng của độ thoáng khí đến hoạt độ protease.

Kết quả ở hình 6 cho thấy, hoạt độ protease của chủng *B. subtilis* Bs04 sinh tổng hợp tỷ lệ thuận với độ thoáng khí trong bình nuôi. Hoạt độ protease cao nhất đạt 0,636 UI/ml khi nuôi cấy trong bình có độ thoáng khí 90%. Với đặc tính là vi khuẩn hiếu khí mạnh nên sự thoáng khí nhiều sẽ kích thích sự sinh trưởng và sinh tổng hợp protease ở vi khuẩn *B. subtilis* Bs04.

Tối ưu thời điểm thu nhận enzyme:

Protease thu nhận từ *B. subtilis* là enzyme ngoại bào được vi sinh vật sinh tổng hợp và tiết ra ngoài môi trường

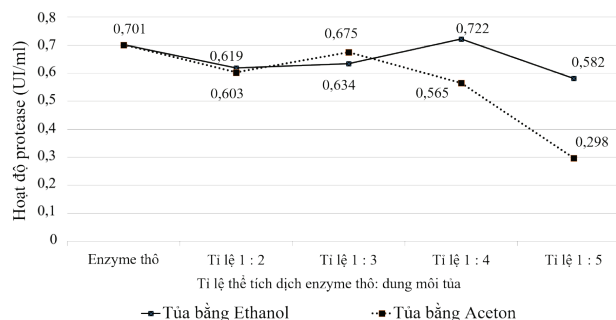
trong quá trình sinh trưởng. Mỗi thời điểm trong chu kỳ sinh trưởng vi khuẩn sẽ sinh tổng hợp enzyme với nồng độ và hoạt độ khác nhau. Nếu thu nhận enzyme quá sớm, nồng độ và hoạt độ enzyme sẽ thấp. Ngược lại, nếu kéo dài thời điểm thu nhận enzyme thì lượng enzyme tiết ra môi trường quá nhiều sẽ ảnh hưởng lẫn nhau và enzyme chịu tác động của các yếu tố môi trường bên ngoài sẽ làm giảm hoạt độ hay phá hủy cấu trúc tự nhiên của enzyme. Qua hình 7 cho thấy, hoạt độ protease cao nhất được thu nhận tại thời điểm 36 giờ sau nuôi cấy (đạt 0,31 UI/ml).



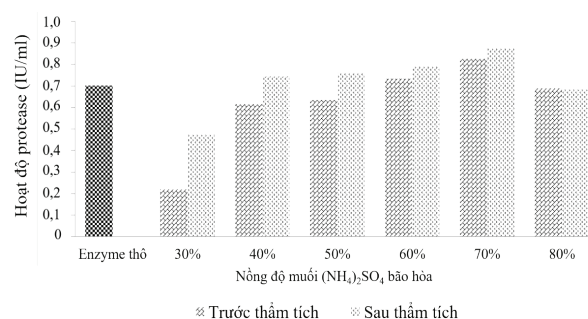
Hình 7. Ảnh hưởng của thời điểm thu nhận đến hoạt độ protease.

Đặc tính enzyme protease:

Sau khi thu nhận dịch protease thô từ canh trường nuôi cấy, tiến hành sử dụng các dung môi ethanol, acetone và muối ammonium sulfate nhằm tủa protease ngoại bào từ dịch enzyme thô.



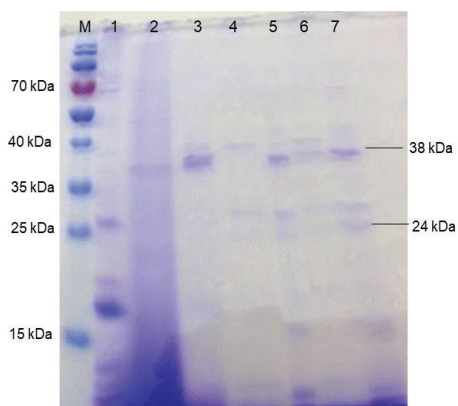
Hình 8. Hoạt độ protease khi tủa bằng ethanol và acetone.



Hình 9. Hoạt độ protease khi tủa bằng (NH₄)₂SO₄.

Kết quả cho thấy, khi rửa bằng dung môi hữu cơ hiệu quả tốt nhất khi sử dụng tỷ lệ 1:4 (v/v) với ethanol và 1:3 (v/v) với acetone. Hoạt độ protease thu nhận được lần lượt là 0,722 UI/ml và 0,675 UI/ml (hình 8). Đối với phương pháp rửa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hiệu quả cao nhất khi sử dụng nồng độ 70% bão hòa, hoạt độ enzyme sau khi thẩm tách đạt 0,874 UI/ml (hình 9). Từ kết quả hình 8 và hình 9 cho thấy, sử dụng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ rửa protease từ dịch enzyme thô cho hiệu quả tốt hơn sử dụng ethanol và acetone. Nồng độ muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70% bão hòa cho hiệu quả tốt nhất.

Sau khi thu nhận protease, tiến hành điện di SDS-PAGE nhằm xác định kích thước protease thu nhận. Qua hình 10 cho thấy, ở các giếng 2 đến giếng 7, dịch enzyme thô và enzyme sau khi rửa đều có sự hiện diện của băng protein với kích thước khoảng 24 kDa và 38 kDa. Qua đó cho thấy, trong nghiên cứu này đã thu nhận được protease ngoại bào của *B. subtilis* với kích thước 24 kDa và 38 kDa.



Hình 10. Kết quả điện di SDS-PAGE.

Giếng M: thang opti-protein; giếng 1: protein tổng số của *B. subtilis* Bs04; giếng 2, 3: dịch enzyme protease thô sau 1 và 2 ngày nuôi; giếng 4: enzyme sau khi rửa với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trước thẩm tách; giếng 5: enzyme sau khi rửa với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sau thẩm tách; giếng 6: enzymes sau khi rửa với ethanol; giếng 7: enzyme sau khi rửa với acetone.

Thảo luận

Vi khuẩn *B. subtilis* có thể sinh tổng hợp nhiều loại enzyme khác nhau trong quá trình sinh trưởng như: amylase, protease, levansucrase, RNase, phosphatase kiềm [9]... Trong quá trình lên men chìm, sự sinh tổng hợp protease chịu ảnh hưởng lớn bởi thành phần dinh dưỡng và chất cảm ứng bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Tùy vào đặc tính của từng chủng vi khuẩn sử dụng trong quá trình thí nghiệm và điều kiện nuôi biểu hiện mà nhu cầu về các thành phần dinh dưỡng sẽ khác nhau trong quá trình sinh tổng hợp enzyme. Trong nghiên cứu này, quá trình tổng hợp protease từ vi khuẩn *B. subtilis* Bs04 được cảm ứng bởi casein, nguồn carbon và nitơ tốt nhất cho quá trình sinh tổng hợp protease từ chủng Bs04 được ghi nhận là glucose-anhydrous và cao nấm men với nồng độ lần lượt là 2,5% và 2% (w/v). Kết quả

này tương đồng với các nghiên cứu trước đó khi thí nghiệm trên chủng *B. subtilis* MTCC 441 và chủng *Bacillus* sp. [3, 10]. Tuy nhiên, tùy mỗi chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. khác nhau được phân lập và sử dụng thì nhu cầu phù hợp về thành phần dinh dưỡng có thể sẽ khác nhau. Một số nguồn carbon và nitơ tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp protease phổ biến đã được báo cáo như: glucose, galactose, peptone, cao thịt bò [11-13]... Nhìn chung, bổ sung vào môi trường nuôi nguồn dinh dưỡng (carbon, nitơ) hữu cơ cho thấy hiệu quả hơn nguồn vô cơ vì sự đa dạng của các amino acid [2, 5, 12, 13]. Protease thu nhận từ *B. subtilis* trong quá trình lên men chìm có thể thu nhận được ở đây pH rộng từ 6 đến 11. Trong nghiên cứu này, pH 7,5 được ghi nhận phù hợp nhất trong quá trình sinh tổng hợp protease từ chủng Bs04. Một số điểm pH phù hợp khác đối với từng chủng *B. subtilis* đã được báo cáo như pH 7, pH 10-11 [12, 13]...

Dịch chiết enzyme thô thu nhận từ chủng Bs04 có hoạt độ 0,7 UI/ml. Kết quả này tương đương với một số nghiên cứu đã được báo cáo như: ứng dụng *Bacillus* trong xử lý phế phụ phẩm cá tra, hoạt độ protease được ghi nhận 0,012 UI/mg [14] và 1,15 UI/ml [15]; hay protease được tổng hợp từ *Bacillus* phân lập từ lò giết mổ đạt 0,7 UI/ml [16]. Tuy nhiên, so sánh với một số nghiên cứu khác trên thế giới, hoạt độ protease trong nghiên cứu này vẫn còn tương đối thấp. Một số nghiên cứu điển hình thu nhận protease hoạt độ cao đạt 20,2 UI/ml [5] hay hoạt độ protease đạt 86 UI/ml [17]... Kết quả này có thể do chủng vi khuẩn Bs04 được thu nhận tại khu vực không phải là nơi tối ưu nhất cho hoạt tính sinh protease (từ nguồn đất vườn).

Kích thước protease ngoại bào thu nhận từ *B. subtilis* từ 20-95 kDa tùy vào từng chủng vi khuẩn khác nhau. Trong nghiên cứu này, protease thu nhận từ dịch chiết enzyme thô có kích thước 24 kDa và 38 kDa. Kích thước protease từ một số báo cáo khác được ghi nhận như 32 kDa, 49 kDa, 30,9 kDa, 75 kDa [12, 13, 18, 19]...

Kết luận

Chủng *B. subtilis* Bs04 trong nghiên cứu này cho thấy khả năng sinh tổng hợp enzyme protease cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường chứa nguồn carbon và nitơ lần lượt là glucose-anhydrous và cao nấm men với nồng độ tương ứng 2,5% và 2%. Môi trường lên men với pH 7,5 và thời điểm thu nhận enzyme cho hoạt độ cao sau 36 giờ lên men. Enzyme protease thô được thu nhận theo phương pháp ly tâm với hoạt độ đạt 0,7 UI/ml. Kết quả rửa enzyme cho thấy hiệu quả nhất khi sử dụng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở độ bão hòa 70%. Protease thu nhận được có kích thước 24 kDa và 38 kDa.

Việc tối ưu các thành phần dinh dưỡng, điều kiện lên men giúp cải thiện đáng kể khả năng sinh tổng hợp protease từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* Bs04. Điều này mở ra tiềm

năng trong quá trình sản xuất protease từ chủng phân lập thực địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.A. Alekseev, P.K. Koutsenogiy, P.N. Miroshnikov, M.A. Shilova (2014), "Isolation and properties of fibrinolytic subtilisin-like serine protease secreted by the *Bacillus subtilis* strain B-2805", *Dokl. Biochem. Biophys.*, **455**(1), pp.72-75.
- [2] Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Oanh, Nguyễn Thúy Hương và Phan Thị Huyền (2010), *Công nghệ enzyme*, NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- [3] S. Navaneeth, B.S. Varun Bhaskar, P. Vijay Kumar, S.K.J. Kandaswamy, Anant Achary (2009), "Optimization of medium for the production of subtilisin from *Bacillus subtilis* MTCC 441", *African Journal of Biotechnology*, **8**(22), pp.6327-6331.
- [4] Khuất Hữu Thanh và Bùi Văn Đạt (2010), "Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* để tạo chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, **48**(5), tr.57-63.
- [5] J.-K. Yang, I.-L. Shih, Y.-M. Tzeng, S.-L. Wang (2000), "Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes", *Enzyme Microb. Technol.*, **26**(5-6), pp.406-413.
- [6] M.J. Zhu, J.R. Cheng, H.T. Chen, M.C. Deng, W.H. Xie (2013), "Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: using agroindustrial residues as substrates and response surface methodology", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **60**(3), pp.336-342.
- [7] N.T.K. Anh, H.T. Dương, T.T.K. Hòa, và N.T.T. Kiều (2016), "Đánh giá khả năng sử dụng màng cellulose do *Acetobacter xylinum* tạo ra làm giá đỡ (scaffold) nuôi cấy tế bào fibroblast chuột nhắt trắng", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **14**(3), tr.427-433.
- [8] M.L. Anson (1938), "The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin", *The Journal of General Physiology*, **22**(1), pp.79-89.
- [9] M. El-Samahy, A. El-Ghobary, and I. Khafagy (2014), "Using Silica Nanoparticles and Neem oil Extract as New Approaches to Control *Tuta absoluta* (Meyrick) in Tomato under Field Conditions", *International Journal of Plant & Soil Science*, **3**, pp.1355-1365.
- [10] R.S. Prakasham, C.S. Rao, and P.N. Sarma (2006), "Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation", *Bioresource Technology*, **97**(13), pp.1449-1454.
- [11] K. Adinarayana, and P. Ellaiah (2002), "Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp.", *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **5**(3), pp.272-278.
- [12] G. Pant, A. Prakash, J.V.P. Pavani, S. Bera, G.V.N.S. Deviram, A. Kumar, M. Panchpuri, and R.G. Prasuna (2015), "Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*", *Journal of Taibah University for Science*, **9**(1), pp.50-55.
- [13] A. Prihanto, A. Jaziri, and I.Y. Perwira (2016), "Purification and Characterization of Neutral Protease from *Bacillus subtilis* UBT7 Isolated from Terasi, Indonesian Fermented Fish", *Biosciences Biotechnology Research Asia*, **13**(3), pp.1409-1413.
- [14] T.T.H. Nghi, L.T. Hùng, và T.Q. Bình (2012), "Nghiên cứu ứng dụng enzyme protease từ vi khuẩn (*Bacillus subtilis*) để thủy phân phụ phẩm cá tra", *Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp*, **2**, tr.56-61.
- [15] V.H. Thi, N.H. Mỹ, và N.P. Huyền (2012), "Hoạt tính protease của một số chủng *Bacillus* phân lập từ nước thải chế biến thịt và thủy hải sản", *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, **28**, tr.116-124.
- [16] S. Mrudula, A. Apsana Begum, K. Ashwitha, and P.K. Pindi (2012), "Enhanced production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation", *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **3**(3), pp.619-631.
- [17] K. Krishnaveni, M. Kumar, M.D. Balakumaran, R.S. and P. Kalaichelvan (2012), "Production and optimization of extracellular Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* isolated from dairy effluent", *Der Pharmacia Lettre*, **4**(1), pp.98-109.
- [18] P. Chantawannakul, A. Oncharoen, K. Klanbut, E. Chukeatirote and S. Lumyong (2002), "Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand", *ScienceAsia*, **28**, pp.241-245.
- [19] B. Williams (2012), "Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus Subtilis*", *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, **2**(4), pp.612-618.