

# PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC MỘT SỐ CHỦNG *BACILLUS* SP. SINH PROTEASE TỪ NƯỚC THẢI

NGUYỄN THỊ KIM CỎ\*, TRẦN QUỐC DUNG  
Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế  
\*Email: nguyenthikimcow@dhsphue.edu.vn

**Tóm tắt:** Từ 6 mẫu nước thải, sau khi gia nhiệt chúng tôi đã phân lập được 47 chủng vi khuẩn khác nhau trong đó 16 chủng được xác định sơ bộ thuộc chi *Bacillus* theo khoá phân loại của Bergey (1957); và được kí hiệu từ B1 đến B16. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả 16 chủng này đều có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào thể hiện ở đường kính vòng thủy phân gelatin bằng phương pháp xác định kích thước vòng thủy phân với thuốc thử HgCl<sub>2</sub> 10%. Bốn chủng B6, B8, B9, B14 có đường kính vòng thủy phân cao lần lượt là 14,33; 18,33; 16,67 và 18,67 mm được chọn để xác định hoạt độ enzym theo phương pháp Sigma. Ở mức pH 7,9 với cơ chất cảm ứng gelatin 1%, sau 24h lên men lỏng ở 30°C chủng B14 cho thấy hoạt độ cao nhất (175,2 UI/ml), theo sau đó là chủng B6 (130,1 UI/ml). Sau 36 giờ nuôi cấy hoạt độ protease thu được cực đại của chủng B6 là 170,2 (UI/ml) và chủng B14 là 200,2 (UI/ml).

**Từ khoá:** *Bacillus* sp.; protease; nước thải; hoạt độ enzym.

## 1. MỞ ĐẦU

Enzym là chất xúc tác sinh học có vai trò quan trọng trong đời sống con người, trong đó protease chiếm khoảng 60% giá trị thương mại trên thị trường enzym thế giới [1, 5]. Ngày nay, protease trở thành enzym có vai trò quan trọng hàng đầu trong ngành công nghiệp bởi những ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, dệt, da, mỹ phẩm, dược phẩm và xử lí nước thải... [2, 6].

Protease được phân loại bao gồm exopeptidase (aminopeptidase và carboxypeptidase) và endopeptidase (serine, cysteine, aspartic, metallico, threonine, glutamic endopeptidase và asparagine peptide lyase) dựa trên vị trí của peptide. Dựa trên pH, protease có thể được phân loại thành kiềm, trung tính và axit [4]. Protease kiềm khá quan trọng trong thị trường công nghiệp toàn cầu vì chúng có khả năng chịu được các điều kiện pH cao [8, 9].

Trong tất cả các nguồn thu nhận protease, vi khuẩn được xem là nguồn thu nhận protease lý tưởng so với động vật và thực vật và nấm, đặc biệt *Bacillus* là một trong những chi quan trọng được nuôi cấy để thu nhận protease vì tốc độ tăng trưởng nhanh, khả năng tiết enzym ngoại bào vào môi trường cao và an toàn để kiểm soát [8].

Mặc dù các chế phẩm protease đã được thương mại hoá vào ứng dụng một cách rộng rãi, tuy nhiên trên thế giới ngày nay vẫn ghi nhận rất nhiều công trình nghiên cứu thu nhận, xác định điều kiện tối ưu cho sinh tổng hợp cũng như xác định các tính chất của chế phẩm thu được như W. Nascimento và cộng sự (2004); I. Muhammad và cộng sự

(2010); B.Asha và cộng sự (2014) nghiên cứu ứng dụng của protease ngoại bào từ *Bacillus* sp. trong làm sạch kính áp tròng; B.K.M. Lakshmi và cộng sự (2014) thu nhận protease từ *Bacillus licheniformis*; Gaurav Pant và cộng sự (2015) tiến hành tinh sạch protease từ *Bacillus subtilis*; N. Laili và cộng sự (2017) đánh giá hoạt tính protease thu nhận từ *Bacillus* sp. 140-B phân lập từ mẫu đất trồng dưa; B. Asha, M. Palaniswamy (2018) đã tối ưu hoá điều kiện để thu nhận protease cực đại trong quá trình nuôi cấy *Bacillus cereus* FT1 phân lập trong đất...

Ở Việt Nam, có một số nghiên cứu về khả năng sinh protease ngoại bào ở *Bacillus subtilis* (Trần Thị Hồng Nhi và cộng sự (2012)) và ứng dụng tạo chế phẩm để thủy phân phụ phẩm cá tra (Đỗ Thị Bích Thủy (2012); thủy phân phụ phẩm thức ăn gia cầm (Trần Ngọc Hùng và cộng sự (2013)); nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự thu nhận chế phẩm protease ngoại bào của *Bacillus amyloliquefaciens* (Đỗ Thị Bích Thủy, 2012). Tuy nhiên, những nghiên cứu ở nước ta vẫn hạn chế về quy mô, đối tượng và cả hướng ứng dụng thực tế; chính vì thế cần thiết phải khảo sát đặc điểm protease trên nhiều đối tượng *Bacillus* khác nhau làm cơ sở để sử dụng nguồn enzym này rộng rãi và mang lại hiệu quả kinh tế cao.

## 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. được phân lập và giữ giống từ mẫu nước thải thu tại bể chứa nước thải chưa qua xử lý trên môi trường LB (Luria- Bertani) lỏng và rắn có bổ sung 1.5% agar. Cơ chất cảm ứng cho sinh tổng hợp protease là gelatin (Merck).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập và thuần khiết các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Mẫu nước thải được thu từ bể chứa của nhà máy sản xuất sữa chua ở thành phố Huế bằng các dụng cụ vô trùng và bảo quản ở 4°C trước khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Nước thải được xử lý gia nhiệt ở 80°C (bằng Wish Bath) trong vòng 20 phút nhằm loại bỏ tế bào sinh dưỡng và các chủng vi sinh vật không sinh bào tử. Sau khi gia nhiệt, mẫu nước thải được pha loãng đến  $10^{-6}$  bằng nước cất vô trùng và dần đều 100  $\mu$ l mỗi nồng độ trên môi trường thạch LB rồi tiến hành nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí, nhiệt độ 30°C trong thời gian từ 24-48 giờ. Các khuẩn lạc đơn riêng lẻ được thuần khiết trên môi trường LB rắn. Những khuẩn lạc này sơ bộ được xác định là *Bacillus* sp. dựa trên khả năng di chuyển, các đặc điểm sinh hoá và hình thái của khuẩn lạc (màu sắc, độ cao, hình dạng, rìa, độ đồng nhất...) qua kính hiển vi soi nổi; khả năng sinh catalase cũng như bao gồm kết quả nhuộm Gram và nhuộm bào tử theo đối chiếu khoá phân loại của Bergey (1957).

Các chủng vi khuẩn thuần khiết được lưu trữ trong dung dịch glycerol 30% ở -20°C và duy trì trong các ống môi trường LB thạch nghiêng bằng cách cấy truyền hai tuần một lần.

#### 2.2.2. Xác định hoạt tính protease

50 ml môi trường dịch thể LB có chứa cơ chất cảm ứng gelatin 1% được phân phối vào các bình tam giác 250 ml và hấp vô trùng ở 121°C trong 15 phút; sau đó bổ sung 1%

dung dịch chứa vi khuẩn *Bacillus* sp. được tăng sinh sau 24 giờ. Các chủng vi khuẩn này được lên men lỏng bằng cách đặt các bình tam giác lên máy lắc (Voxter) với tốc độ 200 rpm ở 30°C trong vòng 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy bề sâu, tiến hành thu protease thô bằng ly tâm 14000 rpm trong 10 phút ở 4°C. Dịch enzym thô được bảo quản ở 4°C và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Khả năng sinh protease ngoại bào của các chủng *Bacillus* được xác định theo phương pháp đục lỗ thạch (Ponnuswamy và cộng sự, 2013). 100 µl enzym protease của mỗi chủng được cho vào lỗ khoan đường kính 6 mm trên đĩa thạch LB có bổ sung cơ chất là gelatin 1% và ủ ở 30°C. Hoạt tính protease của các chủng *Bacillus* được xác định thông qua đo đường kính vòng phân giải gelatin sau 24 giờ với thuốc thử HgCl<sub>2</sub> 10%. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* có đường kính thủy phân lớn sẽ được chọn lựa để tiến hành xác định hoạt độ protease ngoại bào.

### 2.2.3. Xác định hoạt độ protease

Phương pháp này dựa trên sự thủy phân protein bằng protease, tiếp đó làm ngừng phản ứng bằng dung dịch acid trichloroacetic 110 mM (TCA). Định lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng thủy phân bằng phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin 0.5 M. Sau đó, dựa vào đồ thị chuẩn của tyrosin để tính lượng sản phẩm do enzym xúc tác tạo nên. Đồ thị đường chuẩn tyrosin và hoạt độ enzym được xác định theo mô tả quốc tế của Sigma.

Mỗi đơn vị hoạt độ protease (UI) là lượng enzym tối thiểu trong điều kiện thí nghiệm (30°C, pH = 7,9) thủy phân gelatin (0.65%) trong 1 phút tạo thành sản phẩm hòa tan trong TCA, phản ứng với thuốc thử Folin cho độ hấp thụ OD ở bước sóng 660 nm tương ứng với 1µM tyrosin trong đường chuẩn. Hoạt độ protease được xác định theo công thức:

$$\text{Hoạt độ enzym (UI/ml)} = \frac{T * 11}{1 * 10 * 2}$$

Trong đó:

T: số 1µM tyrosin tương ứng được giải phóng ra

11: tổng số thể tích phản ứng (ml)

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

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

10: thời gian phản ứng (phút)

### 2.2.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. có hoạt độ protease cao được lựa chọn tiếp tục nuôi cấy trong điều kiện môi trường ban đầu cơ chất cảm ứng gelatin, pH 7.9, nhiệt độ 30 ± 2°C và thay đổi thời gian nuôi cấy từ 12 giờ đến 72 giờ. Sau mỗi khoảng thời gian 12 giờ, dịch nuôi cấy được sử dụng để thu protease thô và xác định hoạt độ enzym theo phương pháp của Sigma.

### 2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn xung quanh giá trị trung bình. Số liệu được phân tích bằng ngôn ngữ lập trình R 3.5.1.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

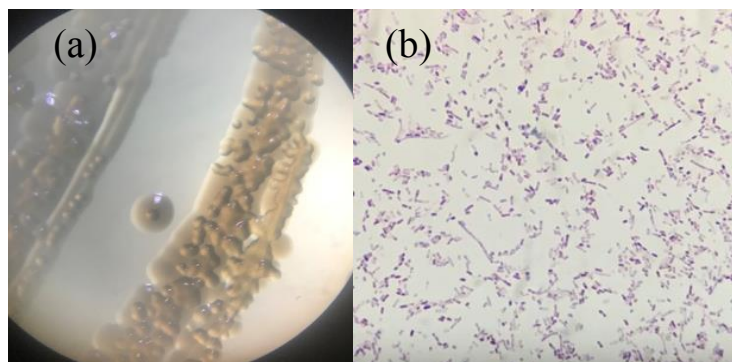
### 3.1. Phân lập các chủng *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease

Từ 6 mẫu nước thải sản xuất, đã phân lập được 47 chủng vi khuẩn khác nhau trên môi trường LB sau 24-48 giờ nuôi cấy ở 30°C trong điều kiện hiếu khí. Các chủng được thuần khiết trên môi trường LB rắn sau đó tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc dưới kính hiển vi soi nổi, hình thái kích thước tế bào, nhuộm gram và nhuộm quan sát nội bào tử dưới kính hiển vi quang học, thử hoạt tính catalase và oxidase. Sau khi đối chiếu với khoá phân loại vi khuẩn của Bergey (1957) thì 16 trong số 47 chủng được kết luận sơ bộ thuộc chi *Bacillus* và được kí hiệu từ B1 đến B16 (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm của các chủng *Bacillus* sp. phân lập từ nước thải sản xuất

Chủng	Hình dạng TB	Kích thước TB ( $\mu\text{m}$ )	Vị trí nội bào tử	Nhuộm Gram	Catalase	Oxidase	Khả năng di động
B1	Que	0,5-0,8 x 1,5-2,3	Giữa	+	+	+	+
B2	Que	0,9-1,0 x 2,7-3,1	Giữa	+	+	+	+
B3	Que	0,2 - 0,5 x 1,2-1,9	Giữa	+	+	+	+
B4	Que	0,6 -1,1 x 1,8- 2,7	Giữa	+	+	+	+
B5	Que	0,3 – 0,8 x 1,2- 2,1	Giữa	+	+	+	+
B6	Que	0,5- 0,9 x 1,4- 2,3	Giữa	+	+	+	+
B7	Que	0,3- 0,8 x 1,3- 2,6	Lệch tâm	+	+	+	+
B8	Que	0,5- 0,9 x 1,3 -2,6	Giữa	+	+	+	+
B9	Que	0,4- 0,7 x 1,2- 2,2	Lệch tâm	+	+	+	+
B10	Que	0,5- 0,8 x 1,1- 2,1	Giữa	+	+	+	+
B11	Que	0,3- 0,9 x 1,2- 2,6	Giữa	+	+	+	+
B12	Que	0,7- 1,1 x 1,9- 3,1	Giữa	+	+	+	+
B13	Que	0,6- 0,8 x 1,4- 2,6	Giữa	+	+	+	+
B14	Que	0,5- 0,8 x 1,5- 2,8	Giữa	+	+	+	+
B15	Que	0,4-0,6 x 1,6- 3,0	Giữa	+	+	+	+
B16	Que	0,5- 0,7 x 1,3- 2,8	Giữa	+	+	+	+

Khuẩn lạc của đại đa số các chủng là hình tròn, hoặc một số có bờ rìa răng cưa, phẳng hoặc đắp nổi, bề mặt nhẵn, mờ; màu sắc khuẩn lạc có thể là trắng đục hoặc vàng kem trên môi trường thạch dinh dưỡng (hình 1). Tế bào vi khuẩn *Bacillus* có hình que, kích thước tế bào dao động trung bình từ 0,5-0,9 x 1,4-2,6  $\mu\text{m}$ , gram dương, catalase và oxidase dương tính. Tất cả 16 chủng phân lập được đều cho thấy khả năng di động và khả năng hình thành nội bào tử; vị trí bào tử nằm giữa hoặc lệch tâm tế bào.



Hình 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc (a) và tế bào nhìn dưới kính hiển vi quang học x.1000 (b) của chủng B6

## 2.2. Sàng lọc các chủng *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease cao

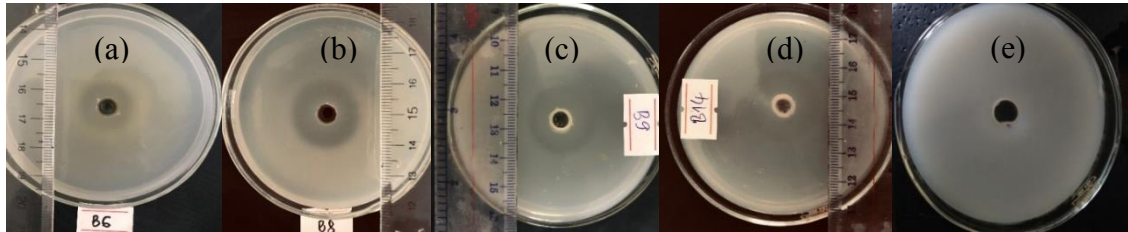
Bảng 2. Đường kính vòng thủy phân gelatin

STT	KH chủng	Đường kính (mm)
1	B1	5,67 ± 1,15
2	B2	5,33 ± 1,15
3	B3	12,33 ± 1,53
4	B4	2,33 ± 0,58
5	B5	7,33 ± 0,58
6	B6	14,33 ± 0,58
7	B7	1,33 ± 1,15
8	B8	18,33 ± 1,53
9	B9	16,67 ± 1,15
10	B10	13,33 ± 1,53
11	B11	12,33 ± 1,53
12	B12	10,67 ± 1,15
13	B13	11,67 ± 1,15
14	B14	18,67 ± 1,15
15	B15	13,33 ± 1,15
16	B16	11,67 ± 1,53

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả 16 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được đều có khả năng sinh protease ngoại bào thể hiện ở đường kính vòng thủy phân gelatin (1%) trên đĩa thạch với thuốc thử là dung dịch HgCl<sub>2</sub> (10%).

Ngoại trừ các chủng B1, B2, B4, B5 và B7 thì tất cả các chủng còn lại đều có đường kính vòng thủy phân protein lớn hơn 10 mm (bảng 2); đặc biệt các chủng được ghi nhận

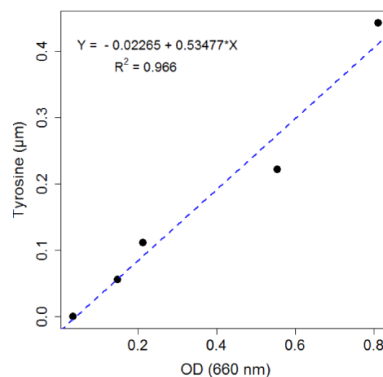
có khả năng sinh enzyme protease cao bao gồm B6, B8, B9 và B14 với đường kính vòng phân giải lần lượt là 14,33; 18,33; 16,67 và 18,67 mm (hình 2) được chọn để xác định hoạt độ protease ở thí nghiệm tiếp theo. G. Pant và cộng sự (2015) đã từng ghi nhận đường kính vòng thủy phân protein ở vi khuẩn *Bacillus subtilis* là 22 mm trong khi N. Laili và S. Antonius (2017) khi tiến hành đo vòng phân giải protein ở các chủng *Bacillus* sp. phân lập trong đất kết luận chủng có vòng thủy phân lớn nhất là 15 mm.



Hình 2. Đường kính vòng thủy phân gelatin của các chủng B6 (a), B8 (b), B9(c), B14 (d) và đối chứng (e)

### 2.3. Hoạt độ protease của các chủng *Bacillus* sp. phân lập được

Một đơn vị hoạt độ protein (UI) được định nghĩa là lượng enzyme mà trong một phút ở 30 °C có khả năng phân giải protein tạo thành các sản phẩm hòa tan trong acid tricloacetic cho phản ứng màu với 1µm tyrosine. Hoạt độ protein thu được từ thực nghiệm và tính toán theo phương trình  $y = - 0.02265 + 0.53477x$  có độ tương thích cao ở giá trị  $R^2 = 0,966$  (hình 3).



Hình 3. Đồ thị đường chuẩn Tyrosine (µm) ở OD = 660nm

Khả năng sinh tổng hợp của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. được đánh giá sau 24 giờ lên men lỏng trong bình tam giác 250 ml với nguồn cơ chất cảm ứng sinh enzyme là gelatin (1%). Hoạt độ protease thô của bốn chủng *Bacillus* sp. được thể hiện ở bảng 3 cho thấy chủng B14 có hoạt độ cao nhất 175,2 (UI/ml), theo sau đó là chủng B6 với hoạt độ là 130,1 (UI/ml); hoạt độ của hai chủng B8, và B9 ghi nhận được lần lượt là 98,2 và 102,5 (UI/ml). So với các công trình nghiên cứu về hoạt độ enzyme protease ngoại bào được sinh tổng hợp từ vi khuẩn *Bacillus cereus* thì kết quả của chúng tôi thấp hơn. B. Asha và cộng sự (2018) ghi nhận hoạt độ của protease sinh tổng hợp từ *Bacillus*

*cereus* là 187 UI/ml trong khi cũng với đối tượng này C. Kotlar (2015) đo được hoạt độ cực đại đạt 295 UI/ml. So sánh với các nghiên cứu trên nhiều đối tượng vi khuẩn *Bacillus* khác thì kết quả nghiên cứu thu được là tương đương. N. Laili và cộng sự (2017) xác định hoạt độ protease của *Bacillus* sp. 140-B đạt cực đại 119 UI/ml sau 22 giờ nuôi cấy. Nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp protease của *Bacillus subtilis* của G. Pant và cộng sự (2015) cho thấy chủng này đạt hoạt độ trong điều kiện tối ưu là 143,73 (UI/ml). Tuy nhiên hoạt độ enzym còn phụ thuộc chặt chẽ vào từng đối tượng vi sinh vật cũng như các điều kiện môi trường nuôi cấy [2, 4, 5].

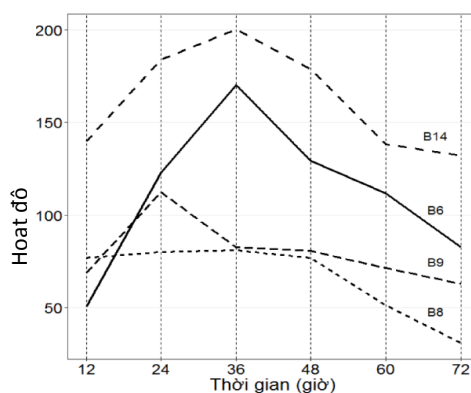
Bảng 3. Hoạt độ protease của 4 chủng *Bacillus* sp. phân lập được

KH chủng	Đường kính vòng thủy phân (mm)	Hoạt độ protease (UI/ml)
B6	14,33 ± 0,58	130,1 <sup>b</sup>
B8	18,33 ± 1,53	98,2 <sup>c</sup>
B9	16,67 ± 1,15	102,5 <sup>c</sup>
B14	18,67 ± 1,15	175,2 <sup>a</sup>

(Các chữ cái trên các số khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa, Duncan's test ( $P < 0,05$ )).

#### 2.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đối với khả năng sinh tổng hợp protease được thể hiện trong đồ thị hình 4. Kết quả cho thấy chủng B6 và B14 có hoạt độ protease cực đại sau 36 giờ nuôi cấy sau đó giảm xuống. Trong khi chủng B9 khả năng sinh tổng hợp đạt cực đại ở 24 giờ nuôi cấy thì hoạt độ protease ở chủng B8 gần như duy trì tương đối ổn định từ 12 giờ cho đến 48 giờ nuôi cấy trước khi giảm dần.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease

Chủng B14 đạt hoạt độ cực đại 200,2 (UI/ml) sau 36 giờ lên men lỏng, ở thời điểm này hoạt độ protease đo được ở chủng B6 là 170,2 (UI/ml) cao gấp ba lần ở thời điểm 12 giờ và gấp đôi kết quả đo được ở thời điểm 72 giờ. Kết quả này tương đương với ghi nhận của Đỗ Thị Bích Thủy (2012) trên đối tượng *Bacillus amyloliquefaciens* N1. Sau 24 giờ lên men, hoạt độ protease thô đo được ở hai chủng B8 và B9 lần lượt là 80,2 và 112,5

(UI/ml). Sự giảm hoạt độ enzym trong môi trường nuôi cấy có thể được giải thích bởi nhiều lí do khác nhau như khi thời gian nuôi cấy kéo dài thì hàm lượng chất dinh dưỡng cũng như cơ chất cảm ứng giảm xuống; thành phần môi trường thay đổi do quá trình trao đổi chất của vi khuẩn; hoặc do vi sinh vật tổng hợp nên các chất gây kìm hãm quá trình sinh tổng hợp enzym; vi khuẩn ở cuối pha sinh tổng hợp tế bào bắt đầu tự phân huỷ và tốc độ tích lũy enzym bị chậm lại... [1, 3, 6]. Nghiên cứu của B.K.M. Lakshmi và cộng sự trên đối tượng *Bacillus licheniformis* cho thấy thời gian tối ưu để thu nhận protease là sau 72 giờ. Với vi khuẩn *Bacillus subtilis*, hoạt độ protease cao nhất được xác định sau 36 giờ (G. Pant và cộng sự) và sau 48 giờ (A. Jadhav và cộng sự). Như vậy, hoạt độ protease rõ ràng không chỉ phụ thuộc mật thiết vào đối tượng vi khuẩn mà còn là mối tương quan giữa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp trong quá trình nuôi cấy như thành phần môi trường, nhiệt độ, pH, thời gian và cơ chất cảm ứng...

#### 4. KẾT LUẬN

Từ 47 chủng vi khuẩn phân lập từ nước thải sản xuất đã xác định sơ bộ được 16 chủng thuộc chi *Bacillus* theo khoá phân loại của Bergey (1957). Cả 16 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. đều có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào với cơ chất cảm ứng gelatin. Bốn chủng có đường kính vòng thủy phân cao bao gồm B6 (14,33 mm), B8 (18,33 mm), B9 (16,67 mm) và B14 (18,67 mm) được lựa chọn để xác định hoạt độ enzym. Kết quả cho thấy, mức pH 7,9 với cơ chất cảm ứng gelatin 1%, sau 24h lên men lỏng ở 30°C chủng B14 cho thấy hoạt độ cao nhất (175,2 UI/ml), theo sau đó là chủng B6 (130,1 UI/ml). Sau 36 giờ nuôi cấy hoạt độ protease thu được cực đại của chủng B6 là 170,2 (UI/ml) và chủng B14 là 200,2 (UI/ml).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Thị Bích Thủy (2012). Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự thu nhận chế phẩm protease ngoại bào của *Bacillus amyloquelofaciens* N1, *Tạp chí khoa học, Đại học Huế*, tập 71, số 2, 279-290.
- [2] Trần Ngọc Hùng, Lê Phi Nga (2013). Nghiên cứu tạo chế phẩm protease từ *Bacillus subtilis* sử dụng trong chế biến thức ăn gia cầm, *Tạp chí đại học Thủ Dầu Một*, số 4 (11), 235-243.
- [3] Trần Thị Hồng Nhi, Lê Thanh Hùng, Trương Quang Bình, Trương Phước Thiên Hoàng (2012). Nghiên cứu ứng dụng enzyme protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* để thủy phân phụ phẩm cá tra, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp*, số 2, 56-61.
- [4] A. Jadhav, K. Ismail, M. Harale, S. Gadre, M. Williamson (2014). Study of protease enzyme from bacillus species and its application as a contact lens cleanser, *British biomedical bulletin*, Vol. 2(2), 293-302.
- [5] B. Asha. M. Palaniswamy (2018). Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT1 isolated from soil, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 8(02), 119-127.
- [6] B.K.M. Lakshmi, P.V. Ratna Sri, K. Ambika Devi, KP.J. Hemalatha (2014). Media optimization of protease production by *Bacillus licheniformis* and partial characterization of alkaline protease, *International Journal of current microbiology and applied sciences*, Vol. 3 (5), 650-659.



- [7] Dong Ho Ahn, Hoon Kim, Back My (1993). Cleavage of *Bacillus subtilis* endo- $\alpha$ -gluconane by *B. Megaferian*, *Biotechnology letters GBR*, Vol. 15(2), 127-132.
- [8] G. Pant, A. Prakash, J.V.P. Pavani, S. Bera, G.V.N.S. Deviram, A. Kumar, M. Panchpuri & R. Prasuna (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*, *Journal of Taibah University for Science*, Vol. 9(1), 50-55.
- [9] M. Irfan, M. Nadeem, Q. Syed, W. Nawaz, S. Baig, A. Mahmood (2010). Relationship of process parameters for the production of alkaline protease by *Bacillus* sp, *IJAVMS* Vol.4 (4), 114-120.
- [10] N. Laili, S. Antonius, (2017). Production and Characterization of Extracellular Protease from *Bacillus* sp. 140-B Isolated from Pineapple Plantation in Lampung, Indonesia, *ICBS Conference Proceedings, International Conference on Biological Science*, Vol. 2(2), 170-176.

**Title:** ISOLATION AND SCREENING OF *Bacillus* sp. STRAINS FOR BIOSYNTHESIS OF PROTEASE FROM WASTEWATER

**Abstract:** From 6 wastewater samples, after heating, we have isolated 47 different bacterial strains, of which 16 strains have been preliminarily identified in genus *Bacillus* according to Bergey 's classification key (1957); and designated as B1 to B16. Research results show that all 16 strains are capable of biosynthesis of extracellular protease by gelatin hydrolysis ring size determination with HgCl<sub>2</sub> reagent 10%, of which 4 strains B6, B8, B9, B14 with the diameter of hydrolysis rings are 14.33; 18.33; 16.67 and 18.67 mm, respectively were selected to determine enzyme activity following Sigma method. At pH 7.9 with 1% gelatin inducers, after 24 hours of liquid fermentation at 30°C, strain B14 showed the highest activity (175.2 UI / ml), followed by strain B6 (130.1) UI / ml). After 36 hours of culture, the maximum protease activity of B6 and B14 strains were 170.2 (UI / ml) and 200.2 (UI / ml), respectively.

**Keywords:** *Bacillus* sp.; protease; wastewater; enzyme activity.