ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46208

อนุกรมวิธานและโพรทิเอสของแบคทีเรียชอบเค็มจากปลาร้า

นางสาวนิษฐา จำนิญศักดิ์ศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00255975

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46208

อนุกรมวิธานและโพรทิเอสของแบคทีเรียชอบเค็มจากปลาร้า

นางสาว นิชชา จำเริญศักดิ์ศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4876952933

TAXONOMY AND PROTEASE OF HALOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM PLA-RA

Miss Nitcha Chamroensaksri

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	TAXONOMY AND PROTEASE OF HALOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM PLA-RA
By	Miss Nitcha Chamroensaksri
Field of Study	Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Advisor	Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.
Co-Advisor	Wonnop Visessanguan, Ph.D.
Co-Advisor	Takashi Itoh, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph.D.)

.....Advisor
(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

.....Co-Advisor
(Wonnop Visessanguan, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Ancharida Akaracharanya, Ph.D.)

.....External Examiner
(Somporn Moonmangmee, Ph.D.)

นิชชา จำเริญศักดิ์ศรี: อนุกรมวิธาน และ โพรทิเอสของแบคทีเรียชอบเค็มจากปลาร้า (TAXONOMY AND PROTEASE OF HALOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM PLA-RA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.วรรณพ วิเศษสงวน, MR. TAKASHI ITOH, Ph. D. 169หน้า

E46208

ในการคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างโพรทิเอสจากปลาร้าที่เก็บจากตลาดและผลิตภัณฑ์ครัวเรือน จำนวน 46 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียชอบเค็มได้จำนวน 57 ไอโซเลต จากผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และผลทางอนุกรมวิธานเคมีรวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNAของสายพันธุ์ตัวแทน สามารถแบ่งแบคทีเรียที่แยกได้เป็น 9 กลุ่ม โดยเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 55 สายพันธุ์ในสกุล *Virgibacillus* จำนวน 38 สายพันธุ์ *Halobacillus* 6 สายพันธุ์ *Gracilibacillus* 1 สายพันธุ์ และ *Bacillus* 10 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมลบในสกุล *Salinivibrio* และ *Chromohalobacter* สกุลละ 1 สายพันธุ์ พิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่แยกได้เป็น *V. dokdonensis* 10 สายพันธุ์ *V. halodenitrificans* 13 สายพันธุ์ *V. marismortui* 13 สายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. 1 สายพันธุ์ *Halobacillus* sp. 6 สายพันธุ์ *Bacillus* sp. 10 สายพันธุ์ และ *Chromohalobacter salexigens* 1 สายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าจากลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีของสายพันธุ์ ND1-1 ซึ่งมี ubiquinone-8 กรดไขมันเป็น $C_{16:0}$ และ $C_{12:0}$ polar lipids เป็น phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และ diphosphatidylglycerol (DPG) มีปริมาณ G+C ของ DNA เป็น 49.0 โมลเปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *S. costicola* และ *S. proteolyticus* (98.3-98.6 เปอร์เซ็นต์) และมีความคล้ายคลึงของ DNA ต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานของ *Salinivibrio* จึงเสนอเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ชื่อว่า *S. siamensis* ส่วนสายพันธุ์ TP2-8 มี menaquinone-7, กรดไขมันเป็น เป็น anteiso-$C_{15:0}$, iso-$C_{15:0}$ and anteiso-$C_{17:0}$ และมี polar lipids เป็น PG, DPG และ unidentified glycolipid ปริมาณ G+C ของ DNA เป็น 37.6 โมลเปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *Gracilibacillus* (94.9-99.2 เปอร์เซ็นต์) และมีความคล้ายคลึงของ DNA ต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานของ *Gracilibacillus* จึงเสนอเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ชื่อว่า *G. thailandensis*

การศึกษาโพรทิเอสจากสายพันธุ์ ND1-1 ที่คัดเลือกได้ พบว่า ND1-1 สามารถสร้างโพรทิเอสได้ทั้งในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ND1-1 เริ่มผลิตโพรทิเอสในระยะกลางของการเจริญเติบโต และสร้างสูงสุดในระยะ stationary phase เมื่อเลี้ยงในอาหาร JCM no. 377 ในเวลา 2 วัน นอกจากนี้พบว่าสามารถสร้างโพรทิเอสได้สูงสุดในอาหาร JCM no. 377 ที่ดัดแปรโดยแทนที่ casamino acids ด้วย skim milk 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 8.0 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลักษณะสมบัติของโพรทิเอสบริสุทธิ์ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 36.8 kDa และทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 5 เปอร์เซ็นต์ และ pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 5-30 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5.0-9.0 และที่อุณหภูมิ 30–55 องศาเซลเซียส กิจกรรมของโพรทิเอสถูกยับยั้งโดย EDTA แสดงให้ทราบว่าโพรทิเอสจาก ND1-1 เป็น metalloprotease

สาขาวิชา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

487 6952933: MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
KEYWORDS: TAXONOMY/ PROTEASE/ HALOPHILIC BACTERIA/ PLA-RA

NITCHA CHAMROENSAKSRI: TAXONOMY AND PROTEASE OF HALOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM PLA-RA ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D., CO-ADVISOR: WONNOP VISESSANGUAN, Ph.D., MR. TAKASHI ITOH, Ph.D., 169 pp.

E46208

In the isolation for protease-producing halophilic bacteria, fifty seven isolates from 46 samples of fermented fish, pla-ra collected from the markets and home made factories were isolated. These bacteria were divided into nine groups based on their phenotypic and chemotaxonomic characteristics including 16S rDNA sequences of the representative strains. Fifty-five strains were Gram-positive rods belonged to genus *Virgibacillus* 38 isolates, *Halobacillus* 6 isolates, *Gracilibacillus* 1 isolate and *Bacillus* 2 isolates. Two of Gram-negative rods were *Salinivibrio* and *Chromohalobacter*. They were identified as *V. dokdonensis* 10 isolates, *V. halodenitrificans* 13 isolates and *V. marismortui* 13 isolates and *Virgibacillus* sp. 1 isolate, *Bacillus* sp. 10 isolates, and *C. salexigens* 1 isolate. In addition, ND1-1 contained ubiquinone with 8 isoprene unit, cellular fatty acids of $C_{16:0}$ and $C_{12:0}$, phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), and diphosphatidylglycerol (DPG). DNA G+C content was 49.0 mol%. The 16S rDNA sequence analyses indicated that strain ND1-1 was closely related to *S. costicola* and *S. proteolytica* 98.3-98.6%. Based on its low levels of DNA-DNA relatedness to the type strains of *Salinivibrio*, therefore it was proposed as *S. siamensis* sp. nov. TP2-8 contained MK-7, cellular fatty acids of anteiso-$C_{15:0}$, iso-$C_{15:0}$ and anteiso-$C_{17:0}$, and the polar lipids of PG, DPG and unidentified glycolipid. DNA G+C content was 37.6 mol %. The 16S rDNA sequence analyses indicated that strain TP2-8 was different from *Gracilibacillus* (96.2-99.2%). Based on its low levels of DNA-DNA relatedness to the type strains of *Gracilibacillus*, therefore it was proposed as *G. thailandensis* sp. nov.

Strain ND1-1 was selected for further study due to the high protease production. The moderately halophilic bacterium, strain ND1-1 produced extracellular protease at the middle of exponential phase. The maximum protease production of ND1-1 was at the beginning of stationary phase and could be achieved when cultivated in a JCM no.377 medium (pH 8.0) that replaced casamino acids with 0.5% skim milk and incubated at 37°C for 2 days. At the optimal condition, the crude protease produced by strain ND1-1 increased 6.25 times. The purified protease from ND1-1 was monomeric protein with the molecular mass of about 36.8 kDa. The enzyme had a maximal activity in the presence of 5% w/v NaCl, pH 8.0 at 55°C. Stability remained more than 50% in the presence of 5-30% w/v NaCl, pH 5.0-9.0 and at 30–55 °C. The ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was found to inhibit the protease activity strongly, suggesting that the ND1-1 protease was metalloprotease.

Field of Study: Pharmaceutical Chemistry and Natural Products

Academic Year 2008

Student's Signature Nitcha

Advisor's Signature Somboon Tanasupawat

Co-Advisor's Signature

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express the deepest gratefulness to my thesis advisor, Associate. Professor Dr. Somboon Tanasupawat, for his suggestions, comments, and patience, understand and kindly accept me as his graduate student to discover the halophiles' world. He's my great teacher. All of his advice is very valuable for my life and future career.

My deepest gratitude also to my three thesis co-advisors, Dr. Wonnop Visessanguan, He is a scientist actively engaged in research and development. Besides teaching, pushing, stimulating suggestions throughout my work and given me opportunities to do research in field of enzymology. During my research at JCM, I had great deal help from Dr.Takashi Itoh and Dr Takuji Kudo. They kindly provided me the laboratory facilities, chemicals and microbiological media. They also correct the manuscripts.

I have been fully indebted to my past advisor Associate Professor Dr. Ancharida Achăracharanya for supporting, consulting and suggestion. She also read and corrected my thesis. Moreover, she introduced and recommended me to Dr. Somboon, my supervisor.

I also would like to thank Associate Professor Dr. Nongluk Sriubolmas for serving as thesis committee chairperson and Associate Professor Dr. Pintip Pongpech Associate Professor Dr. Ancharida Acharacharanya and Dr. Somporn Moonmangmee for serving as thesis committee members and their recommendations for the research.

The Royal Golden Jubilee Ph.D. program, 2005 is gratefully acknowledged.

I can never forget the help provided to me by my friends at Dr. Somboon's lab and Biotec, especially P'Pook, P'Tan, P'Poo and P'Mc for all their kind help, suggest and be the best sisters and brother.

Special thank is directed to my dear for his understanding and sharing the stressful moments with me and helping me whenever I needed.

Lastly, and most importantly, I wish to thank my parents for their greatest love, encouragement, help and support me to overcome all the challenges and difficulties in this work. I dedicate this thesis to them.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai)....iv

ABSTRACT (English)....v

ACKNOWLEDGEMENTS....vi

CONTENTS....vii

LIST OF TABLES....x

LIST OF FIGURES....xiii

LIST OF ABBREVIATIONS....xv

CHAPTERS

I INTRODUCTION....1

II LITERATURE REVIEW....4

2.1 Overview of fermented fish (pla-ra)....4

2.1.1 Fermentation of pla-ra....5

2.1.2 Nutrient compositions of pla-ra....7

2.1.3 Microbiology of pla-ra....8

2.2 Overview of halophilic Bacteria....9

2.2.1 Physiology of halophilic bacteria....11

2.2.3 Habitat of halophilic bacteria....13

2.2.4 Systematics of halophilic bacteria....14

2.2.4.1 Extremely halophilic bacteria....15

2.2.4.2 Moderately halophilic bacteria....16

2.2.4.3 Halotolerant bacteria....29

2.2.5 Application of halophilic microorganisms....32

2.2.5.1 Compatible solutes....32

2.2.5.2 Halophilic bacteria in food products....33

2.2.5.3 The biodegradative potential....34

2.2.5.4 Polymers....35

2.2.5.5 Enzymes....35

Page

2.3 Overview of protease....36
2.3.1 Classification of protease....37
2.3.2 Proteases of halophilic bacteria....39
III EXPERIMENTAL....43
3.1 Sample collection and isolation of halophilic bacteria....43
3.2 Identification methods....43
3.2.1 Cell morphology and cultural characteristics....43
3.2.2 Physiological and biochemical characteristics....44
3.2.3 Chemotaxonomic characteristics....46
3.2.4 DNA-DNA hybridization....50
3.2.5 16S rDNA sequence analysis....51
3.3 Protease producing halophilic bacteria....52
3.3.1 Primary screening of protease-producing halophilic bacteri....52
3.3.2 Protease production and the effect of various parameters....53
3.3.3 Purification of protease from ND1-1....55
3.3.4 Characterization of the purified protease from strain ND1-1....56
IV RESULTS AND DISSCUSSION....59
4.1 Bacterial isolation and source of samples....59
4.2 Identification and characterization of isolates.... 60
4.3 Protease producing halophilic bacteria....100
4.3.1 Primary screening of protease-producing halophilic bacteria....100
4.3.2 Protease production and the effect of various parameters....102
4.3.3 Purification of protease from ND1-1....108
4.3.4 Characterization of the purified protease from strain ND1-1....112
V CONCLUSION....120
REFFERENCES....123
APPENDICES....139
APPENDIX A....140
APPENDIX B....144
APPENDIX C....146

Page

APPENDIX D.....152
APPENDIX E.....156
APPENDIX F.....165
APPENDIX G.....167
BIOGRAPHY.....169

LIST OF TABLES

Table **Page**

2.1 Nutrient compositions of pla-ra powder.....7

2.2 Nutrient compositions of pla-ra submerge (100g).....8

2.3 Microbiological quality of pla-ra from 29 provinces of Thailand.....9

2.4 Classification of microorganisms according to salt resistance.....10

2.5 Characteristics of species belonging to the genus *Virgibacillus*.....19

2.6 Characteristics of species belonging to the genus *Gracilibacillus*.....20

2.7 Characteristics of species belonging to the genus *Halobacillus* species.....22

2.7 Table Characteristics of species belonging to the genus *Halobacillus* species (Cont.).....23

2.8 Characteristics of species belonging to the genus Salinivibrio species.....26

2.9 Characteristics of species belonging to the genus *Chromohalobacter* 28

2.10Characteristics of *B. vietnamensis* JCM11124^T, *B. marisflavi* TF-11^T and *B. aquimaris* TF-12^T.....31

3.1 Conditions for high-performance liquid chromatography.....49

3.2 The composition of modified medium.....54

4.1 Location, isolate number, and number of isolates.....59

4.2 DNA-DNA relatedness of the isolates in Group I and *V. dokdonensis* KCTC 3933^T.....61

4.3 DNA-DNA relatedness of the isolates in Group II and *V. halodenitrificans* JCM 12304^T.....62

4.4 DNA-DNA relatedness of the isolates in Group III and *V. marismortui* KCTC 3867^T.....64

Table **Page**

4.5 Fatty acid compositions of strain MS3-4, *V. carmonensis* KCTC 3819^T and related species 66

4.6 Percentage similarities of MSK2-1 (Group I), CHM1-4 (Group II), TP3-3(Group III), MS3-4 (Group IV) and related taxa..... 68

4.7 Differential characteristics of MS3-4 and isolates in Group I, II, III, IV and *V.dokdonensis* KCTC 3933^T, *V. halodenitrificans.* JCM 12304^T, *V. marismortui* KCTC 3867^T..... 69

4.8 Cellular fatty acid composition of strain TP2-8T and related *Gracilibacillus* species..... 72

4.9 Percentage similarities of Group V (TP2-8) and related taxa..... 75

4.10Differential characteristics of Group V, TP2-8 and related *Gracilibacillus* species..... 76

4.11Cellular fatty acid composition of strain TPA 3-2, MS2-6 and related *Halobacillus* species..... 78

4.12 Percentage similarities of TPA3-2 (Group VI) and related taxa..... 80

4.13 DNA-DNA relatedness of the isolates in Group VI and *H. locisalis* KCTC 3788^T..... 81

4.14 Differential characteristics between Group VI and *Halobacillus* species..... 81

4.15 Percentage similarities of N20-1 (Group VII) and related taxa..... 84

4.16 DNA-DNA relatedness of the isolates in Group VII..... 85

4.17. Diferential characteristics of Group VII isolates and *B. vietnamemsis* JCM 11124^T and related species..... 86

4.18. Cellular fatty acid composition of strain ND1-1and related *Salinivibrio* species..... 90

4.19 Percentage similarities of ND1-1 (Group VI) and related taxa..... 92

4.20 Differential characteristics of ND1-1 and related *Salinivibrio* species..... 95

4.21 Phenotypic characteristics of Group IX and *Chromohalobacter salexigens* KCTC 12941^T..... 97

Table **Page**

4.22 Cellular fatty acid composition of R5-7 and *C. salexigens* KCTC 12941^T.....97

4.23 Percentage similarities of R5-7 (Group IX) and related taxa.....99

4.24 DNA-DNA relatedness of the Group IX isolates.....100

4.25 The caseinolytic halo-forming colonies of isolates.....101

4.26 Preparation of Purification purifed enzyme for characterization.....110

4.27 The effect of various protease inhibitors on protease activity of ND1-1 protease.....118

4.28 The effect of divalent metal ion on activity of purified ND1-1 protease 119

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

2.2 Scheme representing growth rate patterns of salt resistance categories.....11

2.3 Phylogenetic tree of six *V. costicola* strains and other species of the genus *Vibrio* based on 16S rDNA sequences.....25

2.4 Catalytic reaction of protease.....36

4.1 Thin-layer chromatogram of the total polar lipids of MS3-4.....65

4.2 Phylogenetic tree showing the relationships between strain MSK2-1, CHM1-4, TP3-3 and MS3-4.....67

4.3 Scanning electron micrograph of TP2-8.....70

4.4 Thin-layer chromatogram of the total polar lipids of TP2-8.....71

4.5 Phylogenetic tree showing the relationships between strain TP2-8 and related species.....74

4.6 Phylogenetic tree showing the relationships between strain TPA3-2 and *Halobacillus* species 79

4.7 Phylogenetic tree showing the relationships between strain N20-1 and related species.....83

4.8 Scaning electron micrograph of strain ND1-1.....87

4.9 Thin-layer chromatogram of the total polar lipids of ND1-1.....88

4.10 Phylogenetic tree showing the relationships between strain ND1-1 and related species.....91

4.11 Alignment of 16S rDNA at positions 165 to 225 (*Escherichia coli* 16S DNA genes sequence numbering) of ND1-1 and related species.....93

4 12 Comparison of the secondary 16S rDNA structures of ND1-1.....93

4.13 Phylogenetic tree showing the relationships between strain R5-7,Chromohalobacter species.....98

4.14 The kinetic of growth and protease production of strain ND1-1 in the JCM no. 377 medium containing.....102

Figure **Page**

4.15 Effect of different nutrient on protease production.....104
4.16 Effect of skim milk concentration on protease production.....104
4.17 Effect of NaCl concentration on protease production 105
4.18 Effect of pH on protease production 106
4.19 Effect of temperature on protease production 107
4.20 Elution profile of protease from strain ND1-1
on the HiTrap Q XL column.....108
4.21 Elution profile of protease enzyme on Superose
12 column.....109
4.22 Protein pattern (A) and activity staining
(B) of the purified protease from ND1-1 on native gel electrophoresis.....111
4.23 SDS-PAGE pattern (with reducing agent; 2% β-mercaptoethanol)
of the purified protease from ND1-1.....112
4.24 Calibration curve for the molecular weight determination on
Superose 12 10/300 GL chromatography.....113
4.25 The effect of temperature on protease activity (A) and stability
(B) of the purified protease from ND1-1.....114
4.26 The effect of pH on protease activity (A) and stability
(B) of the purified protease from ND1-1.....115
4.27 The effect of NaCl on protease activity (A) and stability
(B) of the purified protease from ND1-1.....117

LIST OF ABBREVATIONS

α	=	Alpha
ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.
ATP	=	Adenosine triphosphate
°C	=	Degree celsius
mm	=	miliimeter
DAP	=	Diaminopimelic acid
DDBJ	=	DNA Data Bank of Japan
DNase	=	Deoxyribonuclease
DSM	=	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E 64	=	L-3-carboxytrans 2,3-epoxypropyl-leucylamido (4-guanidine) butane
EDTA	=	Disodiumethylenediaminetetraacetate
EMBL	=	European Molecular Biology Laboratory
g	=	Gram
GenBank	=	National Institute of Health genetic sequence database
h	=	Hour
HCl	=	Hydrochloric acid
HPTLC	=	High performance thin layer chromatograhphy
JCM	=	Japan Collection of Microorganisms
kDa	=	kilo Dalton
KOH	=	Potassium hydroxide
L	=	Liter
MEGA	=	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MeOH	=	Methanol
meso-DAP	=	*meso*-Diaminopimelic acid
M	=	molar
Min	=	Minute
µg	=	Microgram
mg	=	Milligram
µl	=	Microliter

ml	=	Milliliter
µm	=	Micrometer
mm	=	Millimeter
NaCl	=	Sodium chloride
NaOH	=	Sodium hydroxide
NAG	=	N-acetly glucose amine
NAM	=	N-acetyl muramic acid
nm	=	Nanometer
%	=	Percent
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
PE	=	Phosphatidylethanolamine
PG	=	Phosphatidylglycerol
PMSF	=	Phenylmethylsulfonyl fluoride
rDNA	=	Ribosomal deoxynucleic acid
rRNA	=	Ribosomal ribonucleic acid
rpm	=	Round per minute
sec	=	Second
SEM	=	Scanning electron microscope
SDS	=	Sodium dodesylsulfate
sp.	=	Species
SSC	=	Standard sodium citrate
TCA	=	Trichloroacetic acid
TLC	=	Thin layer chromatography
TCA	=	Trichloroacetic acid
UV	=	Ultraviolet
v/v	=	volume / volume
v/w	=	volume / weigh