

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ƯA NHIỆT SINH α -AMYLaza BỀN NHIỆT PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

Nguyễn Thế Trang*, Nguyễn Thị Đà, Trần Đình Mẫn

Viện Công nghệ sinh học, Viện KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: thetrang67@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 10/3/2011; Chấp nhận đăng: 24/6/2012

TÓM TẮT

Trong số 9 chủng vi khuẩn ưa nhiệt sinh α -amylaza được kí hiệu ML04, ML05, ML06, ML07, ML08, ML09, LP09, LP10 và LP11 ở suối nước nóng Mỹ Lâm (Tuyên Quang) và La Phù (Phú Thọ) đã chọn được chủng kí hiệu LP09 có vòng phân giải tinh bột cao nhất. Chủng vi khuẩn LP09 có đặc điểm sinh học Gram dương, không có khả năng di động và thích hợp ở nhiệt độ 75 °C. Sử dụng Kit API 50 CHB cho kết quả gần với chi *Geobacillus* và được kí hiệu *Geobacillus* sp. LP09. Chủng *Geobacillus* sp. LP09 có thể sinh tổng hợp α -amylaza tốt nhất trên môi trường có: nhiệt độ 65 °C, pH 7, thời gian nuôi cấy 48 giờ. Nồng độ tinh bột tan 1 % cho hoạt tính α -amylaza cao nhất (14,6 UI/ml). Alpha-amylaza bền nhiệt của LP09 có những đặc tính: pH hoạt động ở 7 ÷ 8, nhiệt độ 80 ÷ 90 °C, ảnh hưởng của ion kim loại rõ rệt đến α -amylaza và khả năng thủy phân tinh bột cao của α -amylaza, đặc biệt là CaCl_2 .

Từ khóa: Enzym chịu nhiệt; α -amylaza; thủy phân tinh bột; *Geobacillus* sp. LP09

1. MỞ ĐẦU

Alpha-amylaza là một trong số những enzym được nghiên cứu sớm, cùng với proteaza, α -amylaza có vai trò quan trọng và được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp [1, 2, 3, 4]. Ngày nay có nhiều loại α -amylaza mới được tìm ra với các tính chất đặc biệt như bền nhiệt, bền axit, thích nghi lạnh, kiềm tính. Nhờ các tính chất này mà lĩnh vực ứng dụng và nhu cầu về α -amylaza không ngừng tăng lên. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về vi sinh vật ưa nhiệt sinh tổng hợp α -amylaza còn ít [5]. Đặc biệt chúng ta có rất nhiều suối nước nóng ở hầu khắp cả nước, đây chính là nguồn lý tưởng để phân lập các chủng vi sinh vật ưa nhiệt, trong đó có các chủng sinh các enzym bền nhiệt. Công trình này trình bày về nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn ưa nhiệt sinh α -amylaza bền nhiệt phân lập ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Chủng giống vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn kí hiệu: ML04, ML05, ML06, ML07, ML08, ML09, LP09, LP10 và LP11 được phân lập từ mẫu nước ở suối nước nóng Mỹ Lâm - Tuyên Quang và La Phù - Phú

Thọ được lưu trong Bộ sưu tập giống Phòng Công nghệ vật liệu sinh học thuộc Viện Công nghệ sinh học.

2.1.2. Môi trường nghiên cứu

Tinh bột - khoáng (g/l): Na_2SO_4 4 ; KH_2PO_4 0,5 ; NH_4Cl 0,3; NaCl 5; MgCl_2 0,4; KCl 0,5; CaCl_2 0,15; cao men 0,4; pepton 0,4; nước khoáng 1.000 ml; tinh bột 1%; pH 7. LB (g/l): Pepton 5; cao nấm men 5; NaCl 3, nước 1.000 ml, agar 24; pH 7 ÷ 7,2. MPA (g/l): Pepton 5; NaCl 5; cao thịt 1,5; agar 24 g/l; nước 1.000ml.

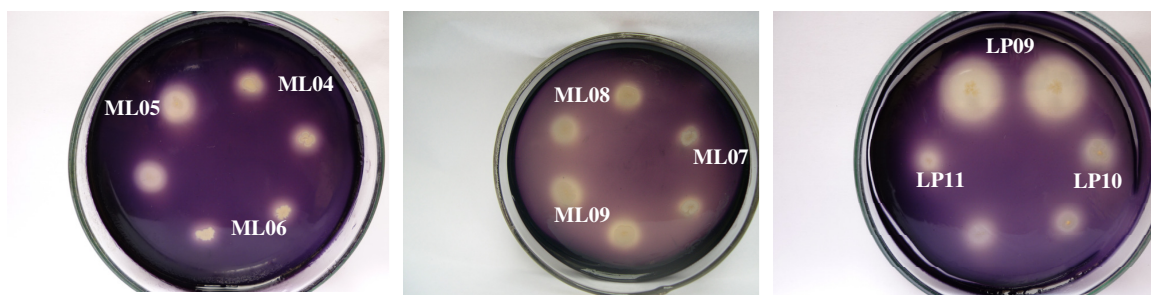
2.2. Phương pháp

Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng tuyển chọn theo các tác giả trong [6] và Kit chuẩn sinh hóa API 50 CHB theo tác giả trong [6]. Lên men sinh tổng hợp α -amylaza từ chủng tuyển chọn theo phương pháp lên men chìm, khả năng sinh trưởng của chủng nghiên cứu được xác định bằng OD 620 nm theo tác giả trong [5]. Xác định hoạt tính enzym α -amylaza bằng phương pháp đường khử sử dụng DNSA. Một đơn vị α -amylaza là lượng enzym cần thiết để thủy phân tinh bột thành $1\mu\text{M}$ đường tính theo glucoza ở nhiệt độ và pH tối ưu trong 1 phút theo các tác giả trong [1, 7, 8]. Xác định ảnh hưởng của nguồn cơ chất, nồng độ tinh bột, nhiệt độ và pH môi trường lên men lên khả năng sinh tổng hợp α -amylaza theo tác giả trong [5]. Xác định ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, ion kim loại và hóa chất lên hoạt tính α -amylaza của dịch lên men theo Heinen và Lauwers: dịch lên men được ly tâm sạch, bổ sung các ion kim loại và hóa chất (nồng độ 5 mM), giữ ở nhiệt độ 70 °C; thời gian 2 giờ, sau đó ly tâm bỏ cặn, xác định hoạt tính enzym theo tác giả trong [9].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng vi khuẩn ưa nhiệt sinh tổng hợp α -amylaza cao

Các chủng ML04, ML05, ML06, ML07, ML08, ML09, LP09, LP10 và LP11 nuôi trong môi trường tinh bột - khoáng trên đĩa Petri ở tủ ẩm 65 °C, 48 h. Hoạt tính α -amylaza được xác định bằng cách đo đường kính vòng phân giải tinh bột khi nhỏ thuốc thử Lugol lên mặt đĩa. Kết quả được trình bày ở hình 1 và bảng 1. Kết quả ở hình 1 và bảng 1 cho thấy cả 9 chủng đều có hoạt tính α -amylaza, trong đó 2 chủng có đường kính vòng phân giải > 10 mm là chủng ML09 và LP09. Chủng LP09 cho vòng phân giải cao nhất được chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.



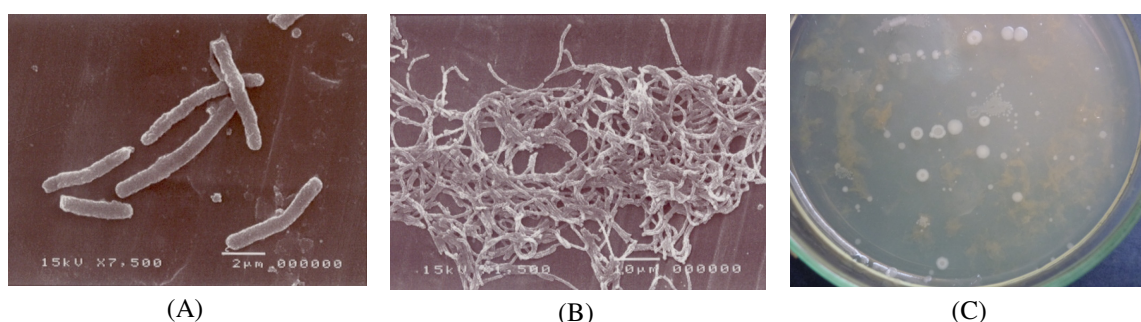
Hình 1. Vòng phân giải tinh bột của 9 chủng nghiên cứu

Bảng 1. Vòng phân giải tinh bột của 9 chủng nghiên cứu

STT	Kí hiệu chủng	Đường kính khuẩn lạc, mm (d)	Đường kính vòng phân giải, mm (D)
1	ML04	6	5,20
2	ML05	6	8,20
3	ML06	5	2,30
4	ML07	5	5,40
5	ML08	6	8,00
6	ML09	4	10,0
7	LP09	5	13,0
8	LP10	3	5,10
9	LP11	4	5,60

3.2. Đặc điểm sinh học chủng vi khuẩn LP09

- Chủng vi khuẩn LP09 được nuôi trên môi trường khoáng tinh bột ở 65°C, 48 h. Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại $\times 7.500$ và $\times 1.500$ và khuẩn lạc trình bày ở hình 2.



Hình 2. Hình thái tế bào và khuẩn lạc chủng LP09

(A) Chủng LP09 $\times 7.500$; (B) Chủng LP09 $\times 1.500$; (C) Hình thái khuẩn lạc

Từ hình 2 cho thấy, tế bào chủng LP09 có dạng hình que dài kích thước $0,5 \div 0,8 \times 6,0 \div 8,0 \mu\text{m}$. Khuẩn lạc có màu trắng sữa, dạng tròn, bề mặt nhẵn.

- Chủng LP09 được phân loại theo một số đặc điểm sinh học, kết quả phân loại chủng được thể hiện trên bảng 2. Từ bảng 2 cho thấy, chủng LP09 là vi khuẩn Gram (+), không sinh bào tử, không di động, ưa nhiệt ($t_{\text{opt}} = 65^\circ\text{C}$). Quan sát tế bào và chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử cho thấy chủng LP09 là trực khuẩn, hình que dài. Với các đặc điểm trên so sánh với khóa phân loại của Nazina và cộng sự, chủng vi khuẩn LP09 có thể được xếp vào chi *Geobacillus* theo tác giả trong [6]. Dưới đây là một số đặc điểm sinh học và sinh hóa của chủng LP09 (bảng 2 và 3).

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh học của chủng LP09

Đặc điểm	Chủng LP09
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng sữa
Bề mặt khuẩn lạc	Tròn, mép và bề mặt nhẵn
Hình dạng tế bào	Que dài, tạo búi
Kích thước tế bào	0,5 ÷ 0,8 x 6,0 ÷ 8,0 µm
Nhuộm Gram	(+)
Khả năng di động	Không
Tạo bào tử	Không
Chịu nhiệt độ (°C):	
35	±
45	+
55	++
65	+++
75	++
Sinh trưởng ở pH:	
6,0	++
6,5	+++
7,0	+++
7,5	+++
8,0	+++
8,5	++
9,0	±

Chú thích: ±: sinh trưởng kém; +: sinh trưởng bình thường; ++: sinh trưởng tốt; +++: sinh trưởng rất tốt

Bảng 3. Khả năng sử dụng cơ chất theo Kit API 50 CHB của chủng LP09

TT	Cơ chất	Chủng LP09	
		24h	48h
0	Control	-	-
1	Glycerol	+	+
2	Erythritol	-	-
3	D-Arabinoza	-	-
4	L- Arabinoza	+	+
5	Riboza	+	+
6	D-Xyloza	+	+

7	L-Xyloza	-	-
8	Adonitol	-	-
9	β Methyl-xylosit	-	-
10	Galactoza	$\pm$	+
11	D-Glucoza	+	+
12	D-Fructoza	+	+
13	D-Mannoza	+	+
14	L-Sorboza	-	-
15	Rhamnoza	$\pm$	$\pm$
16	Dulcitol	-	-
17	Inositol	-	-
18	Mannitol	+	+
19	Sorbitol	+	+
20	α Methyl-D-mannosit	-	-
21	α Methyl-D-glucosit	+	+
22	N Acetyl glucosamin	+	+
23	Amygdalin	$\pm$	$\pm$
24	Arbutin	$\pm$	$\pm$
25	Esculin	+	+
26	Salicin	$\pm$	+
27	Cellobioza	+	+
28	Maltoza	+	+
29	Lactoza	-	-
30	Melibioza	-	-
31	Saccaroza	+	+
32	Trehaloza	+	+
33	Inulin	-	-
34	Melezitoza	-	-
35	D-Raffinoza	-	-
36	Amidon	+	+
37	Glycogen	-	-
38	Xylitol	-	-
39	β -Gentiobioza	$\pm$	$\pm$

40	D-Turanoza	+	+
41	D-Lyxozơ	-	-
42	D-Tagatozơ	-	-
43	D-Fucozơ	-	-
44	L-Fucozơ	-	-
45	D-Arabitơ	-	-
46	L-Arabitơ	-	-
47	Gluconat	-	-
48	2 ceto-gluconat	-	-
49	5 ceto-gluconat	-	-

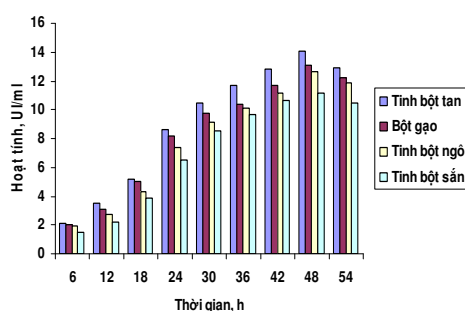
Chú thích: -: không có phản ứng; +: có phản ứng; ±: phản ứng yếu

Kết hợp với các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa trên bảng 2 và 3 cho thấy chủng vi khuẩn LP09 thuộc chi *Geobacillus* và được kí hiệu *Geobacillus* sp. LP09.

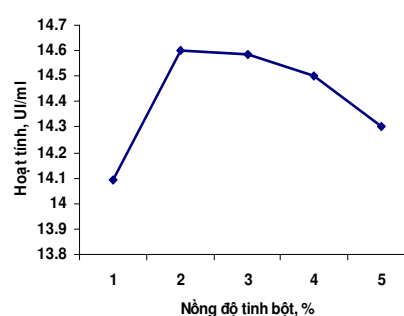
3.3. Sinh tổng hợp α -amylaza từ chủng *Geobacillus* sp. LP09

3.3.1. Chọn môi trường chứa cơ chất thay thế thích hợp

Để lựa chọn nguồn cơ chất thay thế thích hợp và đánh giá khả năng sinh tổng hợp α -amylaza từ các nguồn tinh bột (1 %) khác nhau như: tinh bột tan, bột gạo, tinh bột ngô và tinh bột sắn, chủng *Geobacillus* sp. LP09 được nuôi trên 4 môi trường riêng biệt ở 65 °C, pH 6.5, tốc độ lắc 200 v/p, trong 48 giờ. Kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất lên sinh tổng hợp α -amylaza



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ tinh bột tan lên sinh tổng hợp α -amylaza

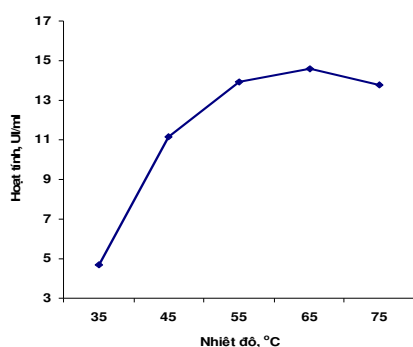
Kết quả hình 3 cho thấy chủng *Geobacillus* sp. LP09 cho hoạt tính α -amylaza cao (14,1 UI/ml) ở 48 h trên nền cơ chất là tinh bột tan, tiếp theo là cơ chất bột gạo. Ở cơ chất khác, *Geobacillus* sp. LP09 vẫn cho hoạt tính α -amylaza nhưng thấp hơn. Đối với cơ chất tinh bột sắn, chủng *Geobacillus* sp. LP09 cho hoạt tính α -amylaza thấp (11,2 UI/ml).

3.3.2. Chọn nồng độ cơ chất thích hợp

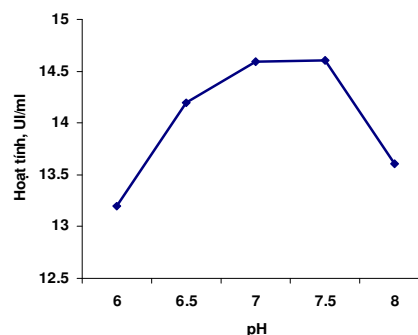
Nồng độ cơ chất cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp α -amylaza, là chất cảm ứng cho vi sinh vật tiết ra enzym. Tiến hành chọn nồng độ cơ chất tinh bột tan với hàm lượng 1 %; 2%; 3%; 4 % và 5 %, bổ sung 1% giống vào môi trường, nuôi lắc 200 v/p, nhiệt độ 65 °C trong 48 h. Kết quả được trình bày ở hình 4 cho thấy, ở nồng độ tinh bột tan 2 % hoạt tính α -amylaza là cao nhất (14,6 UI/ml). Nồng độ tinh bột tan từ 3 ÷ 5 %, hoạt tính α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09 giảm dần. Còn nồng độ 1 % tinh bột tan khả năng sinh tổng hợp α -amylaza thấp nhất (13,1 UI/ml).

3.3.3. Chọn nhiệt độ nuôi cấy thích hợp

Từ các kết quả ở trên cho thấy, ở nồng độ tinh bột tan 2 %, hoạt tính α -amylaza của chủng LP09 là cao nhất. Chủng *Geobacillus* sp. LP09 được nuôi cấy ở các nhiệt độ 35 ÷ 75 °C, bổ sung 1 % giống, nuôi lắc, nhiệt độ 65 °C trong 48 giờ. Hoạt tính α -amylaza tại các nhiệt độ khác nhau được xác định bằng phương pháp đường khử theo tác giả trong [10].



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh tổng hợp α -amylaza



Hình 6. Ảnh hưởng của pH môi trường lên men đến sinh tổng hợp α -amylaza

Kết quả ở hình 5 cho thấy nhiệt độ nuôi cấy thích hợp của chủng *Geobacillus* sp. LP09 là 65 °C cho hoạt tính α -amylaza cao (14,6 UI/ml), trong khi đó ở 35 °C chỉ cho hoạt tính (4,69 UI/ml). Ở nhiệt độ 75 °C hoạt tính của α -amylaza giảm (14,14 UI/ml). Như vậy có thể thấy nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh tổng hợp enzym α -amylaza, chủng *Geobacillus* sp. LP09 phân lập từ nguồn suối nước nóng. Vì vậy, nhiệt độ 65 ÷ 75 °C là nhiệt độ cho chủng *Geobacillus* sp. LP09 sinh tổng hợp α -amylaza, và đây cũng là nhiệt độ chung của suối nước nóng La Phù (Phú Thọ).

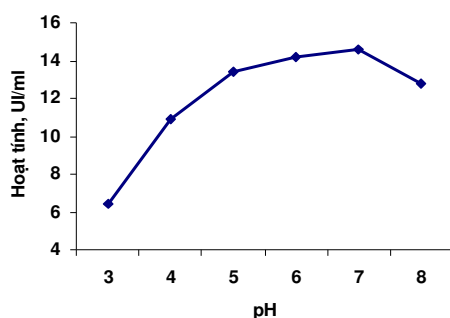
3.3.4. Chọn pH môi trường lên men thích hợp

Từ các kết quả ở trên cho thấy ở cơ chất tinh bột tan 2 %, nhiệt độ nuôi 65 °C chủng *Geobacillus* sp. LP09 sinh tổng hợp α -amylaza là cao nhất, ta tiến hành chọn pH thích hợp ở dải: 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 và 9, bổ sung 1 % giống vào môi trường nuôi cấy, nuôi lắc 200 v/p, nhiệt độ 65 °C trong 48 h. Hoạt tính α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09 ở các pH khác nhau được xác định bằng phương pháp đường khử theo tác giả trong [10]. Kết quả ở hình 6 cho thấy chủng *Geobacillus* sp. LP09 có hoạt tính α -amylaza tốt nhất trong khoảng pH từ 6,5 ÷ 7,5. Ở pH 7 hoạt tính α -amylaza cao nhất đạt 14,6 UI/ml. Ở pH 6 hoạt tính α -amylaza thấp nhất chỉ đạt 13,2 UI/ml, trong khi đó ở pH 8 hoạt tính chỉ đạt 13,6 UI/ml. Từ kết quả trên cho thấy điều kiện để chủng *Geobacillus* sp. LP09 sinh tổng hợp α -amylaza cao nhất là ở cơ chất tinh bột tan 2 %, nhiệt độ 65 °C, pH 7 ÷ 7,5.

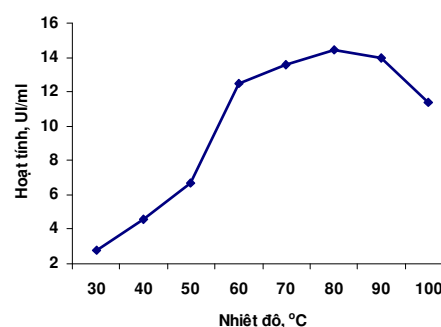
3.4. Tính chất của α -amylaza từ chủng *Geobacillus* sp. LP09

3.4.1. Ảnh hưởng pH và nhiệt độ lên hoạt tính α -amylaza

Ảnh hưởng pH lên hoạt tính α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09 được xác định ở dải pH từ 3 ÷ 8 (hình 7). Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09 được xác định ở dải nhiệt độ từ 30 ÷ 100 °C ở pH 7 (hình 8).



Hình 7. Ảnh hưởng pH lên hoạt tính α -amylaza



Hình 8. Ảnh hưởng nhiệt độ lên hoạt tính α -amylaza

Từ hình 7 cho thấy, α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09 có dải pH tác động rộng từ 5 ÷ 8 và tối ưu tại pH 7 hoạt tính enzyme đạt 14,6 UI/ml. Giá trị này phù hợp với giá trị pH tối ưu của α -amylaza từ một số chủng thuộc chi *Bacillus* ưa nhiệt theo công bố của các tác giả trong [10]. Tại pH 3 hoạt tính α -amylaza của chủng LP09 là thấp nhất, chỉ đạt 6,4 UI/ml.

Từ hình 8 cho thấy chủng *Geobacillus* sp. LP09 có hoạt tính α -amylaza tốt từ 60 °C ÷ 90 °C và đạt hoạt tính tối đa ở 80 °C là 14,6 UI/ml. Trong khi đó ở 70 °C chỉ đạt 13,6 UI/ml và ở 90 °C đạt 14 UI/ml. Khi nhiệt độ 90 °C, hoạt tính α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09 giảm.

3.4.2. Ảnh hưởng của ion kim loại và hóa chất lên hoạt tính α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09

Bảng 4. Ảnh hưởng của một số ion kim loại và hóa chất lên hoạt tính α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09

STT	Hóa chất	Hoạt tính (UI/ml)	%
1	Mẫu đối chứng	14,6	100
2	CaCl ₂	14,7	100,68
3	ZnSO ₄	3,0	20,55
4	NaCl	14,9	102,05
5	EDTA	7,2	49,32
6	MnCl ₂	11,6	79,45
7	Glyxerin	14,6	100
8	CuSO ₄	2,9	19,86
9	MgSO ₄	12,6	86,30

Để đánh giá sự ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính enzym, dịch α -amylaza của chủng *Geobacillus* sp. LP09 được tiến hành xác định hoạt tính khi được bổ sung các ion kim loại có nồng độ 5 mM. Kết quả được thể hiện trên bảng 4.

Kết quả bảng 4 cho thấy, Ca^{2+} , Na^{+} và glycerin đều làm tăng hoạt tính α -amylaza. Glycerin và NaCl làm giảm hoạt độ của nước, nên có thể sử dụng làm chất bảo quản enzym. EDTA được biết đến có khả năng khử Ca^{2+} trong cấu trúc của enzym nên làm giảm hoạt tính α -amylaza, Cu^{2+} cũng là nhân tố làm giảm hoạt tính phân giải tinh bột của enzym này. Kết quả trên cũng phù hợp theo các tác giả trong [6].

3.4.3. Khả năng dịch hóa tinh bột của α -amylaza bền nhiệt

Dịch hóa tinh bột là tính chất quan trọng của α -amylaza. Xác định khả năng dịch hóa tinh bột của α -amylaza từ chủng *Geobacillus* sp. LP09, Kết quả trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Khả năng dịch hóa tinh bột của α -amylaza từ *Geobacillus* sp. LP09

STT	Chỉ tiêu	Alpha-amylaza từ chủng <i>Geobacillus</i> sp. LP09
1	Nồng độ cơ chất, %	30
2	Lượng enzym thô, %	1,5
3	Nhiệt độ dịch hóa, °C	80 ÷ 85
4	Thời gian dịch hóa, phút	45
5	Nồng độ CaCl_2 , mM	5
6	DE dịch hóa	8,1

Kết quả bảng 5 cho thấy nhiệt độ 80 ÷ 85 °C, nồng độ tinh bột 30 %, với lượng dịch enzym thô (14,5 UI/ml) sử dụng là 1,5 % so với cơ chất, sau 45 phút chỉ số DE (dextrose equivalent) của dịch đạt 8,1.

4. KẾT LUẬN

Trong số 9 chủng vi khuẩn ưa nhiệt sinh α -amylaza được kí hiệu ML04, ML05, ML06, ML07, ML08, ML09, LP09, LP10 và LP11 đã chọn được chủng kí hiệu LP09 có vòng phân giải tinh bột cao nhất. Chủng vi khuẩn LP09 có đặc điểm sinh học gần với chi *Geobacillus* và được kí hiệu *Geobacillus* sp. LP09. Chủng *Geobacillus* sp. LP09 có thể sinh tổng hợp α -amylaza tốt nhất trên môi trường có: nhiệt độ 65 °C, pH 7, thời gian nuôi cấy 48 giờ. Nồng độ tinh bột tan 2 % cho hoạt tính α -amylaza cao nhất (14,6 UI/ml). Alpha-amylaza bền nhiệt của LP09 có những đặc tính: pH hoạt động ở 7 ÷ 8, nhiệt độ 80 ÷ 90 °C, ảnh hưởng của ion kim loại rõ rệt đến α -amylaza và khả năng thủy phân tinh bột cao của α -amylaza, đặc biệt là CaCl_2 .

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài mã số 07/HĐ-ĐT.07.10/CNSHCB – thuộc “Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ajayi Adedayo Olajide¹ and Fagade Obasola Ezekiel - Heat activation and stability of amylases from *Bacillus* species, Full length research paper, African Journal of Biotechnology **6** (10) (2007) 1181-1184.
2. Ikram Haq, Hanad Ashaji, Javel iqbal, M. A. Audeer - Production of α -amylase by *Bacillus licheniformis* using economical medium, Bioresource technology **87** (2003) 57-61.
3. Whitaker J., Voragen A. G. J., and Wong D.W. S. - Handbook of Enzymology, Marcel Dekker Inc. 2003, p. 1108.
4. Bertoldo C., and G. Antranikian - Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria, Curr. Opin. J. Chem. Biol. **6** (2002) 151-160.
5. Trần Đình Mẫn - Nghiên cứu thu nhận α -amylaza bền nhiệt bằng chủng *Bacillus subtilis* tái tổ hợp mang gen α -amylaza của vi khuẩn phân lập ở Việt Nam, Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, 2001.
6. Nazina T. N., Tourova T. P., Poltarau A. B., Novikova E. V., Grigoryan A. A., Ivanova A. E., Lysenko A. M., Petrunka V. V., Osipov G. A., Belyaev S. S., and Ivanov M. V. - Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus* ... Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51** (2001) 433-446.
7. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đăng Đức, Đặng Hồng Miên, Nguyễn Vĩnh Phước, Nguyễn Đình Quyên, Nguyễn Phùng Tiên, Phạm Văn Ty - Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật, tập 2, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1976, pp. 36-54.
8. Miller G. L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. **31** (1959) 426-428.
9. Heinen W., Lauwers A. M. - Amylase activity and stability at high and low temperature depending on calcium and other divalent cations, Experientia Suppl. **26** (1976) 77-89.
10. Frillingos S., Linden A., Niehaus F., Vargas C., Nieto J. J., Ventosa A., Antranikian G., Drinas - Cloning and expression of alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*, J. Applied microbiology **88** (3) (2000) 495-503
11. Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Xuân Sâm - Công nghệ enzym, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2004. 45-63.
12. John G., Holt., Noel R., Krieg., Peter H.A., Sneath, James T., Staley and Stanley T., Williams - Bergey's manual of Systematic Bacteriology, 9th Edition, **2** (1986).
13. Nielsen J. E., Borchert T. V. - Protein engineering of bacterial α -amylases, Biochem. Biophys. Acta. **1543** (2000) 253-274.
14. Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R. - Advances in microbial amylases, Biotechnol. Appl. Biochem. **31** (2000) 135-152.
15. Ryan S. M., Fitzgerald G. F., van Sinderen D. - Screening and Identification of starch-, amylopectin-, and pullulan - degrading activities in bifidobacterial strains, Appl. Environ. Microbiol. **72** (2006) 5289-5296.
16. Lee S., Oneda H., Minoda M., Tanaka A., and Inouye K. - Comparison of Starch Hydrolysis Activity and Thermal Stability of Two *Bacillus licheniformis* { α }-

Amylases and Insights into Engineering {alpha}-Amylase Variants Active under Acidic Conditions, J. Biochem. **139** (6) (2006) 997-1005.

ABSTRACT

SCREENING THERMOPHILIC BACTERIA PRODUCING THERMOSTABLE α -AMYLASE ISOLATED IN VIETNAM

Nguyen The Trang*, Nguyen Thi Da, Tran Dinh Man

*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

*Email: *thetrang67@yahoo.com*

Strains ML04, ML05, ML06, ML07, ML08, ML09, LP09, LP10 and LP11 were isolated from My Lam hot spring in Tuyen Quang province and La Phu hot spring in Phu Tho. All these strains were cultured in mineral - starch medium. LP09 strain has showed the largest α -amylase activity in this medium. LP09 is a Gram positive, non - motile bacterium and could grow in high temperature (75 °C). API 50 CHB Kit was used for classification LP09 strain. According to Nazina's morphology and API Kit, LP09 belongs to *Geobacillus* genus and has called *Geobacillus* sp. LP09. The strain was cultured in liquid mineral media with 1 % soluble starch to produce α -amylase. The influence of the carbon source on α -amylase production by *Geobacillus* sp. LP09 was investigated using different carbon sources: soluble starch, rice flour, corn meal and tapioca. It showed maximum activity with 2 % soluble starch (14,6 UI/ml). Studies the enzyme production conditions of the newly isolated *Geobacillus* revealed that the maximum enzyme production after 48 h of cultivation at pH 7, 65 °C.

Keywords: Thermostable enzyme; α -amylase; Starch hydrolysis; *Geobacillus* sp. LP09