

## NGHIÊN CỨU TÍNH CHẤT $\alpha$ -AMYLASE CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN THUỘC CHI *GEOBACILLUS* PHÂN LẬP Ở SUỐI NƯỚC NÓNG BÌNH CHÂU

Nguyễn Kim Thoà<sup>1</sup> ✉, Trần Thị Hoa<sup>1</sup>, Trần Đình Mẫn<sup>1</sup>, Tạ Thị Thu Thủy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Đại học Mở Hà Nội, Bộ Giáo dục và Đào tạo

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nkthoa@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 31.3.2016

Ngày nhận đăng: 28.3.2017

### TÓM TẮT

Suối nước nóng Bình Châu là một trong những suối có nhiệt độ miệng giếng phun cao nhất ở Việt Nam. Từ các mẫu bùn, nước thu thập được chúng tôi đã phân lập được 64 chủng vi khuẩn hiếu khí, trong đó 22 chủng vi khuẩn thuộc chi *Geobacillus* đã được tuyển chọn dựa trên các đặc điểm phân loại của chi *Bacillus*, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu, cũng như khả năng thủy phân tinh bột của chúng. Nghiên cứu các đặc điểm của  $\alpha$ -amylase từ các chủng này cho thấy 11 chủng sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase với  $\text{pH}_{\text{opt}}$  ở điều kiện kiềm ( $\text{pH} \geq 7$ ), 3 chủng có nhiệt độ tối ưu ( $T_{\text{opt}}$ ) ở 50°C, 9 chủng có  $T_{\text{opt}}$  từ 60-65°C, 3 chủng có  $T_{\text{opt}}$  từ 70-80°C và đặc biệt có 7 chủng có  $\alpha$ -amylase tối ưu ở nhiệt độ 90°C. Đánh giá độ bền nhiệt của  $\alpha$ -amylase từ 7 chủng này ở nhiệt độ 90°C cho thấy enzyme của 3 chủng TĐ3.2, TG2.2, TG3.7 có độ bền nhiệt ở 90°C với nửa chu kỳ sống tương ứng là 5,5 giờ, 3,25 giờ và 6,5 giờ. Hơn nữa, bổ sung  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mM) đã làm tăng hoạt tính  $\alpha$ -amylase của 4 chủng TĐ3.2, TG2.2, TG3.1 và TG3.7 lên 1,15 - 1,55 lần, đồng thời làm tăng độ bền nhiệt của tất cả các mẫu enzyme ở cả 7 chủng với giá trị nửa chu kỳ sống dao động từ 2-7 giờ. Kết quả phân loại dựa trên trình tự gen 16S rRNA của 3 chủng TĐ3.2, TG2.2, TG3.7 cho thấy chúng có độ tương đồng tương ứng là 99%, 98% và 99% với các loài *G. caldophilus*, *G. thermoglucosidasius*, *G. stearothermophilus*. Những kết quả này cho thấy tiềm năng và triển vọng khai thác các vật liệu di truyền từ các chủng thuộc chi *Geobacillus* phân lập ở suối nước nóng Bình Châu là rất lớn.

**Từ khóa:** Alpha amylase, enzyme bền nhiệt, *Geobacillus*, suối nước nóng Bình Châu, vi khuẩn ưa nhiệt

### MỞ ĐẦU

Ngày nay, enzyme bền nhiệt được sử dụng rộng rãi trong các quy trình sản xuất ở quy mô công nghiệp do đáp ứng được những điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ cao, áp suất lớn, chịu được dung môi... Hơn nữa, lợi thế của việc sử dụng enzyme bền nhiệt trong các quá trình sản xuất công nghiệp là làm giảm khả năng bị nhiễm các tạp chất không mong muốn như khi sử dụng các enzyme ưa ấm. Các enzyme hoạt động ở nhiệt độ cao cũng làm tăng đáng kể khả năng hòa tan cũng như tăng hoạt tính sinh học của các hợp chất hữu cơ (Sanchez, Demain, 2011). Nhiệt độ càng cao càng đẩy nhanh tốc độ phản ứng enzyme-cơ chất, do đó lượng sản phẩm được tổng hợp ra cũng nhiều hơn so với việc sử dụng các enzyme ưa ấm (Leuschner, Antranikan, 1995). Các enzyme bền nhiệt chủ yếu được tìm thấy ở các vi sinh vật ưa nhiệt có mặt trong vùng địa nhiệt như

suối nước nóng, dần khoan khai thác dầu khí, miệng giếng phun núi lửa, các dòng hải lưu nước nóng ở đáy đại dương... (Fredrich, Antrakian, 1996).

Alpha-amylase,  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) là enzyme thủy phân tinh bột tại các mối liên kết  $\alpha$ -1,4-glucoside nội mạch thành hỗn hợp dextrin và đường.  $\alpha$ -Amylase có nguồn gốc khác nhau thì tính chất cũng rất khác nhau, thường gặp là các loại  $\alpha$ -amylase có  $\text{pH}_{\text{opt}}$  nằm trong khoảng 4,6 – 6,9 và  $T_{\text{opt}}$  từ 40-50°C (Agüloğlu Fincan *et al.*, 2014). Tuy nhiên, có một số loại  $\alpha$ -amylase có tính chất đặc biệt như: bền acid ( $\text{pH}_{\text{opt}} < 4,5$ ); kiềm tính ( $\text{pH}_{\text{opt}} > 7,5$ ) và đặc biệt là  $\alpha$ -amylase bền nhiệt được quan tâm nghiên cứu nhiều trong những năm gần đây (Özdemir *et al.*, 2015). Giới hạn phân biệt giữa  $\alpha$ -amylase bền nhiệt với các loại enzyme khác chưa có tác giả nào xác định cụ thể. Tuy nhiên, hầu hết các công bố có liên quan đến  $\alpha$ -amylase bền nhiệt

đều cho thấy  $T_{opt} > 65^{\circ}\text{C}$  và bền ở nhiệt độ  $> 70^{\circ}\text{C}$  (Vaseekaran *et al.*, 2010).  $\alpha$ -Amylase bền nhiệt được tìm thấy chủ yếu ở các vi khuẩn ưa nhiệt như *Thermococcus hydrothermalis*, *Pyrococcus furiosus*, *Staphylothermus marinus*, *Bacillus stearothermophilus*... (Hartman *et al.*, 1954; Ogasahara *et al.*, 1970). Từ những năm 1970, các nhà nghiên cứu đã tìm thấy các chủng thuộc chi *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp các  $\alpha$ -amylase bền nhiệt. Các chủng vi khuẩn này đều có  $T_{opt} > 65^{\circ}\text{C}$  và bền ở nhiệt độ  $> 70^{\circ}\text{C}$  (Underkofler, 1976). Đại diện quan trọng nhất trong chi *Bacillus* được sử dụng sản xuất  $\alpha$ -amylase bền nhiệt là các chủng thuộc loài *B. licheniformis*. Chính  $\alpha$ -amylase bền nhiệt mang thương hiệu nổi tiếng “Termamyl” của hãng Novo cũng được sản xuất từ loài này. Các chủng vi khuẩn hiếu khí có tế bào hình que, sinh nội bào tử, Gram dương và có phản ứng catalase dương tính được Gordon và cộng sự xếp vào chi *Bacillus* từ những năm 1940 (Gordon, Smith, 1949), tuy nhiên do mức độ đa dạng của các môi trường sống khác nhau cộng với mức độ đa dạng gen 16S rRNA nên từ năm 2003, Xu và Côté đã phân chia chi *Bacillus* thành 10 chi khác nhau, trong đó *Geobacillus* gồm những loài *Bacillus* ưa nhiệt, hầu hết có mặt ở các vùng địa nhiệt (Xu, Côté, 2003). Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu đa dạng tính chất của  $\alpha$ -amylase sinh tổng hợp từ các chủng thuộc chi *Geobacillus* phân lập từ suối nước nóng Bình Châu, một trong những suối có nhiệt độ cao nhất tại Việt Nam.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Vật liệu

Tập hợp 64 chủng vi khuẩn hiếu khí phân lập từ các mẫu bùn, nước của suối nước nóng Bình Châu, thuộc bộ sưu tập chủng giống của Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học.

### Phương pháp nghiên cứu

Phân loại sơ bộ các chủng vi khuẩn hiếu khí ưa nhiệt vào chi *Geobacillus* theo phương pháp của Nazida và cộng sự (2001) dựa vào nhiệt độ sinh trưởng tối ưu ( $55-60^{\circ}\text{C}$ ), Gram dương, sinh bào tử và catalase dương tính.

Đánh giá sơ bộ khả năng thủy phân tinh bột của các chủng thuộc chi *Geobacillus* trên đĩa thạch môi trường khoáng-agar có bổ sung 1% tinh bột tan.

Những chủng sinh tổng hợp enzyme thủy phân tinh bột sẽ có vòng trong suốt sau khi hiện màu với dung dịch Lugol ở nhiệt độ  $55-60^{\circ}\text{C}$ .

Hoạt độ  $\alpha$ -amylase được xác định bằng phương pháp đường khử DNS theo Bernfeld (1955), theo đó một đơn vị  $\alpha$ -amylase là lượng enzyme cần thiết để thủy phân thành 1  $\mu\text{M}$  đường tính theo glucose ở nhiệt độ  $65^{\circ}\text{C}$  và pH 7 trong 1 phút.

Xác định nhiệt độ tối ưu ( $T_{opt}$ ), pH tối ưu ( $\text{pH}_{opt}$ ), độ bền nhiệt, ảnh hưởng của ion  $\text{Ca}^{2+}$  lên hoạt tính và độ bền nhiệt của các  $\alpha$ -amylase sinh tổng hợp từ tập hợp chủng thuộc chi *Geobacillus*. Dải nhiệt độ được khảo sát từ  $50 - 100^{\circ}\text{C}$ , pH từ 3-9. Độ bền nhiệt của enzyme được đánh giá thông qua chỉ số  $T_{50}$  là giá trị biểu hiện 50% hoạt tính enzyme sau khi ủ ở điều kiện nhiệt độ thích hợp trong khoảng thời gian nhất định.

Phân loại các chủng tiềm năng đến loài bằng Kit API 50CHB và so sánh trình tự gần đủ của gen 16S rRNA, phân tích hệ để xác định mối quan hệ di truyền với các chủng vi khuẩn khác theo Sambrook & Russell (2000). Sử dụng chương trình BLAST để tìm kiếm các trình tự tương đồng đã được công bố và đối chiếu với trình tự thu được. Phần mềm Clustalw đã được sử dụng để so sánh trình tự cần nghiên cứu với trình tự của các loài có quan hệ gần (Thompson *et al.*, 1997). Cây phát sinh chủng loại được thiết lập trên cơ sở khoảng cách di truyền của Kimura (1980) bằng việc sử dụng phương pháp Neighbor-joining (Saitou, Nei, 1987). Phân tích Bootstrap (Felsenstein, 1985) của cây phát sinh chủng loại được tính với 1000 lần lấy mẫu thử (resampling).

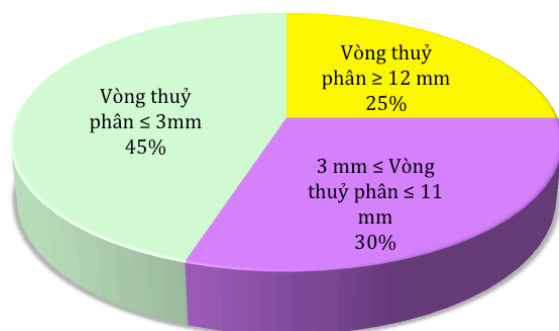
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Suối nước nóng Bình Châu thuộc xã Bung Riềng, huyện Xuyên Mộc, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu là một trong những suối nước nóng lộ thiên có nhiệt độ tại điểm phun nóng nhất ở nước ta ( $\sim 82^{\circ}\text{C}$ ). Với hơn 70 điểm phun lộ thiên và nằm giữa vùng rừng tràm nguyên sinh, hệ sinh thái của suối nước nóng này chứa đựng tiềm năng to lớn, là nguồn gen để khai thác các enzyme và hoạt chất sinh học bền nhiệt. Lượng xác thực vật lớn tạo thành lớp bùn thạch cho thấy vai trò quan trọng của các vi sinh vật bản địa trong quá trình chuyển hóa vật chất tại đây.

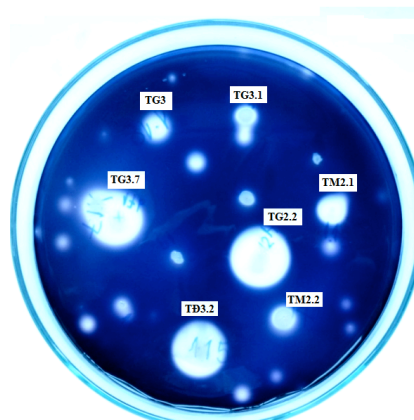
Từ các mẫu bùn và nước thu thập tại suối nước nóng này chúng tôi đã phân lập được 64 chủng vi khuẩn hiếu khí ưa nhiệt, sinh trưởng tốt ở nhiệt độ  $55-60^{\circ}\text{C}$ . Trong số các chủng này khi quan sát trên

kính hiển vi quang học Olympus có độ phóng đại 1000 lần cho thấy có 22 chủng Gram dương, sinh nội bào từ (chiếm 34,4%) và có phản ứng dương tính

trong phép thử hoạt tính catalase với dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Những đặc điểm trên cho phép xếp 22 chủng này vào chi *Geobacillus* (Coorevits *et al.*, 2012).



**Hình 1.** Đa dạng hoạt tính  $\alpha$ -amylase của 22 chủng vi khuẩn thuộc chi *Geobacillus* phân lập tại suối nước nóng Bình Châu.



**Hình 2.** Khả năng thủy phân tinh bột của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Geobacillus* phân lập tại suối nước nóng Bình Châu.

**Bảng 1.** Đặc điểm pH<sub>opt</sub> và T<sub>opt</sub> của  $\alpha$ -amylase từ 22 chủng thuộc chi *Geobacillus* phân lập ở suối nước nóng Bình Châu.

Chủng	pH tối ưu	Nhiệt độ tối ưu [°C]
TĐ3.1	6,0	60
<b>TĐ3.2</b>	<b>6,0</b>	<b>90</b>
TĐ3.3	8,0	50
TĐ3.5	7,5	65
TG2.1	6,0	50
<b>TG2.2</b>	<b>6,0</b>	<b>90</b>
TG2.3	8,0	60
TG3	7,0	90
TG3.1	7,5	90
TG3.1.1	8,0	60
TG3.1.3	8,0	50
TG3.1.4	8,0	70
TG3.2	6,0	60
TG3.3	6,0	75
<b>TG3.7</b>	<b>6,0</b>	<b>90</b>
TM1.1	6,0	65
TM1.2	6,0	60
TM2.1	8,0	90
TM2.2	6,0	90
TM3.1	6,0	60
TM3.2	7,5	80
12H	7,0	60

Các chủng được cấy trên đĩa môi trường khoáng agar có bổ sung 1% tinh bột tan là nguồn cơ chất duy

nhất và cho hiện màu bằng dung dịch Lugol ở nhiệt độ từ 55-60 °C. Kết quả cho thấy tất cả các chủng đều có khả năng thủy phân tinh bột ở mức độ khác nhau, trong đó có 25% số chủng có hoạt tính tiết mạnh (đường kính vòng phân giải  $\geq 12$  mm), 30% số chủng có đường kính vòng phân giải  $\leq 10$  mm và 45% số chủng có hoạt tính phân giải tinh bột yếu (đường kính vòng phân giải  $\leq 3$  mm) (Hình 1 và 2).

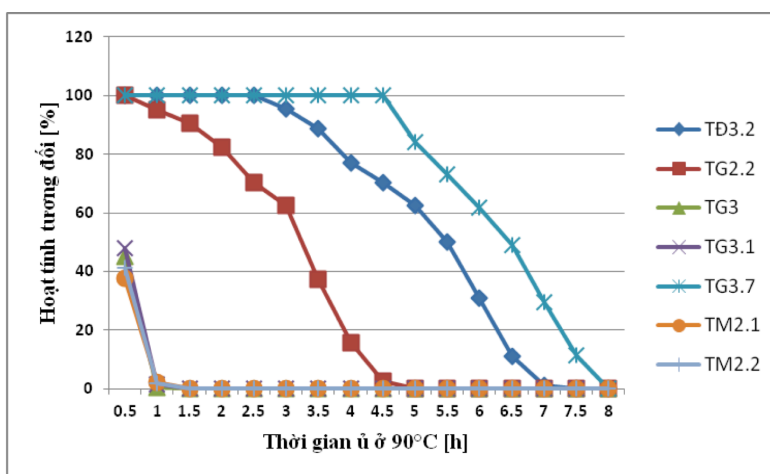
**Đặc điểm pH<sub>opt</sub> và T<sub>opt</sub> của  $\alpha$ -amylase từ 22 chủng thuộc chi *Geobacillus***

Đặc tính enzyme là thông số kỹ thuật quan trọng để định hướng ứng dụng trong các quy trình sản xuất phù hợp. Tất cả 22 chủng vi khuẩn thuộc chi *Geobacillus* được nuôi lắc trong môi trường khoáng có bổ sung 1% tinh bột tan trong 48 giờ ở 55°C để thu enzyme thô sử dụng để xác định hoạt tính thủy phân tinh bột ở các giá trị pH và nhiệt độ khác nhau. Kết quả cho thấy  $\alpha$ -amylase từ các chủng này có tính chất khác nhau (Bảng 1). Về pH, 11 trong số 22 chủng sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase với pH<sub>opt</sub> ở điều kiện kiềm (pH  $\geq 7$ ) chiếm 50%. Về nhiệt độ, 3 chủng có T<sub>opt</sub> ở 50°C, 9 chủng có T<sub>opt</sub> từ 60-65°C, 3 chủng có T<sub>opt</sub> từ 70-80°C và đặc biệt có 7 chủng có  $\alpha$ -amylase tối ưu ở nhiệt độ 90°C. Tính chất của  $\alpha$ -amylase từ các chủng nghiên cứu có độ tương thích lớn với điều kiện môi trường tại suối nước nóng Bình Châu. Mặc dù là suối lộ thiên và tạo thành dòng chảy xung quanh khu vực rừng tràm nhưng trên đường đi của dòng chảy cũng vẫn có các điểm sôi, do đó nhiệt độ

của dòng chảy luôn giữ được ở mức  $\geq 60^{\circ}\text{C}$ , nhiệt độ tại các điểm sôi dao động từ  $82-90^{\circ}\text{C}$ . Với đặc điểm của suối khoáng nóng nên pH của nước suối Bình Châu có tính chất kiềm nhẹ, từ 7,5-7,7. Điều kiện môi trường tuy không quyết định hoàn toàn lên tính chất của các hợp chất bậc 1 và bậc 2 của vi sinh vật nhưng cũng có ảnh hưởng lớn đến những đặc điểm này. Để tồn tại trong môi trường, vi sinh vật bắt buộc có những thay đổi để thích nghi với điều kiện của nơi sống. Với mục tiêu quan tâm đến những enzyme có tính có tính chất đặc biệt như bền nhiệt cao, chúng tôi đã chọn 7 chủng có  $T_{\text{opt}}$  ở  $90^{\circ}\text{C}$  để nghiên cứu tiếp.

### Độ bền nhiệt của $\alpha$ -amylase từ 7 chủng *Geobacillus* tuyển chọn

$\alpha$ -Amylase của 7 chủng có  $T_{\text{opt}}$  ở  $90^{\circ}\text{C}$  được ủ ở  $90^{\circ}\text{C}$  với thời gian từ 30 phút đến 8 giờ để xác định mức độ bền với nhiệt độ của enzyme thông qua giá trị nửa chu kỳ sống của nó ( $T_{50}$ ). Kết quả cho thấy 4 chủng TG3, TG3.1, TM2.1 và TM2.2 nhanh chóng mất hoạt tính sau khi ủ 30 phút – 1 giờ mặc dù có  $T_{\text{opt}}$  ở  $90^{\circ}\text{C}$ , trong khi đó 3 chủng TĐ3.2, TG2.2, TG3.7 có độ bền nhiệt ở  $90^{\circ}\text{C}$  với nửa chu kỳ sống tương ứng là 5,5 giờ, 3,25 giờ và 6,5 giờ (Hình 3).



Hình 3. Độ bền nhiệt của  $\alpha$ -amylase từ 7 chủng thuộc chi *Geobacillus* phân lập tại suối nước nóng Bình Châu.

Độ bền nhiệt của các enzyme này có ý nghĩa ứng dụng trong các quy trình sản xuất công nghiệp.  $\alpha$ -Amylase của các chủng TG2.2, TĐ3.2, TG3.7 có độ bền nhiệt tương đương với chủng *B. thermooleovorans* NP54 có  $T_{50}$  ở  $95^{\circ}\text{C}$  trong 3 giờ (Malhotra *et al.*, 2000), cao hơn chủng *Geobacillus* sp. 4j phân lập ở vùng biển sâu có  $T_{50}$  ở  $80^{\circ}\text{C}$  trong 3,25 giờ (Jiang *et al.*, 2015). Độ bền nhiệt của enzyme càng lớn thì càng có ý nghĩa ứng dụng trong các quy trình sản xuất. Các chủng khác nhau sinh enzyme có độ bền nhiệt khác nhau. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng các enzyme càng bền nhiệt thì cấu trúc protein của chúng càng chặt chẽ hơn so với các enzyme tương ứng thuộc nhóm ưa ấm do cấu trúc protein đã bị thay đổi. Ở các vi sinh vật ưa nhiệt có tồn tại một dạng protein đặc biệt, các “chaperonin” có nhiệm vụ làm cuộn xoắn lại cấu trúc tự nhiên của protein cũng như hồi phục lại chức năng của chúng sau quá trình biến tính (Nguyễn Thị Mai Dung, 2006). Các protein vi khuẩn ưa nhiệt bền

vững do các tương tác giữa các cặp ion. Hơn nữa, vật liệu di truyền DNA của các vi sinh vật ưa nhiệt có chứa enzyme DNA gyrase ngược có khả năng tổng hợp nên lõi siêu xoắn của sợi DNA dương. Cấu trúc siêu xoắn của DNA này giúp làm tăng nhiệt độ duỗi xoắn của DNA ít nhất bằng nhiệt độ sinh trưởng tối đa của vi sinh vật. Ngoài ra, các vi sinh vật ưa nhiệt có khả năng chịu được nhiệt độ cao một phần cũng do sự gia tăng của các tương tác tĩnh điện, các cầu nối disulphide và tương tác kỵ nước.

### Ảnh hưởng của ion $\text{Ca}^{2+}$ lên độ bền nhiệt của $\alpha$ -amylase từ các chủng tuyển chọn

$\alpha$ -Amylase là enzyme kim loại, do đó trong cấu trúc của nó có các vị trí để gắn các ion kim loại, đặc biệt là các kim loại có hóa trị 2 như ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Một số  $\alpha$ -amylase đã tăng hoạt tính và độ bền nhiệt khi có mặt ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Ion  $\text{Ca}^{2+}$  có vai trò ổn định cấu trúc và là chất hoạt hóa dị lập thể (Buonocore *et al.*, 1976). Theo các công bố trước đây, nồng độ  $\text{Ca}^{2+}$  từ 4-5

mM có ảnh hưởng tốt nhất đến hoạt tính và độ bền nhiệt của enzyme (Chkraborty *et al.*, 2012).

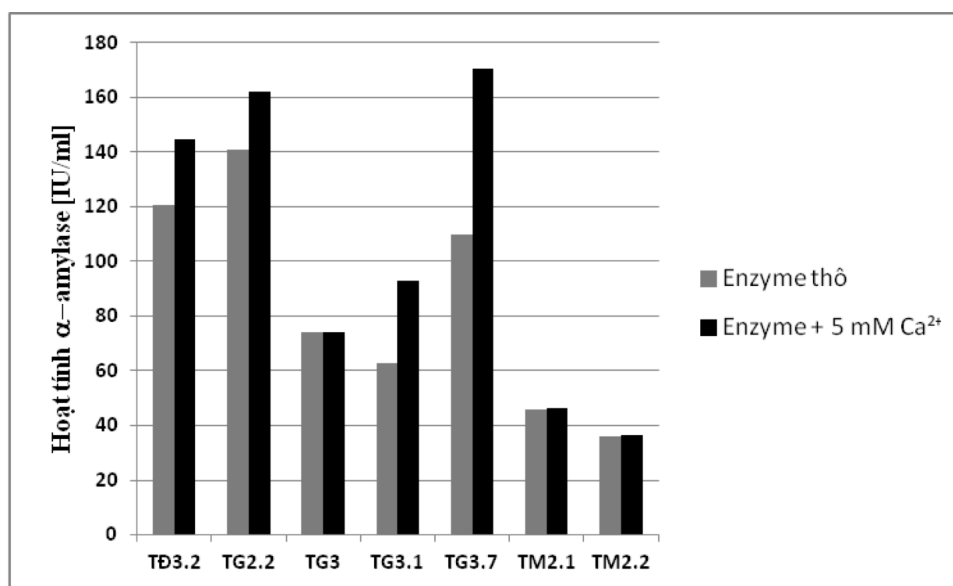
Chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của ion  $\text{Ca}^{2+}$  lên hoạt tính và độ bền nhiệt của  $\alpha$ -amylase từ 7 chủng thuộc chi *Geobacillus* tuyển chọn. Kết quả cho thấy ion  $\text{Ca}^{2+}$  vừa đóng vai trò làm tăng hoạt tính của  $\alpha$ -amylase từ 4 chủng TĐ3.2, TG2.2, TG3.1 và TG3.7 lên lần lượt là 1,2; 1,15; 1,48 và 1,55 lần so với các mẫu không có ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Hình 4), vừa làm tăng độ bền nhiệt của tất cả các mẫu enzyme của 7 chủng này. Giá trị  $T_{50}$  của  $\alpha$ -amylase từ 7 chủng nghiên cứu được xác định sau khi bổ sung 5 mM  $\text{CaCl}_2$  được trình bày ở bảng 2.

Theo Heinen và Lauwers (1976)  $\text{Ca}^{2+}$  chỉ có tác dụng làm tăng độ bền nhiệt và hoạt tính của  $\alpha$ -amylase ở nhiệt độ cao. Ở nhiệt độ thấp,  $\text{Ca}^{2+}$  hoàn toàn có thể được thay thế bằng các ion kim loại hóa trị 2 thuộc nhóm kiềm thổ, trong khi đó ở

nhiệt độ cao  $\text{Ca}^{2+}$  không thể thay thế được bằng các ion kim loại khác. Tuy nhiên ở một số ít  $\alpha$ -amylase của cổ khuẩn,  $\text{Ca}^{2+}$  không ảnh hưởng tới hoạt tính cũng như độ bền nhiệt của enzyme (Dong *et al.*, 1997).

**Bảng 2.** Nửa chu kỳ sống của  $\alpha$ -amylase từ 7 chủng thuộc chi *Geobacillus* trước và sau khi bổ sung  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mM) ở 90°C.

Chủng	Không bổ sung $\text{Ca}^{2+}$	Bổ sung $\text{Ca}^{2+}$
TĐ3.2	5,5 giờ	7 giờ
TG2.2	3,25 giờ	5,5 giờ
TG3	-	2,5 giờ
TG3.1	-	1,25 giờ
TG3.7	6,5 giờ	7 giờ
TM2.1	-	2 giờ
TM2.2	-	2,5 giờ



**Hình 4.** Ảnh hưởng của ion  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mM) lên hoạt tính  $\alpha$ -amylase của 7 chủng thuộc chi *Geobacillus* tuyển chọn.

#### Phân loại các chủng tuyển chọn thuộc chi *Geobacillus*

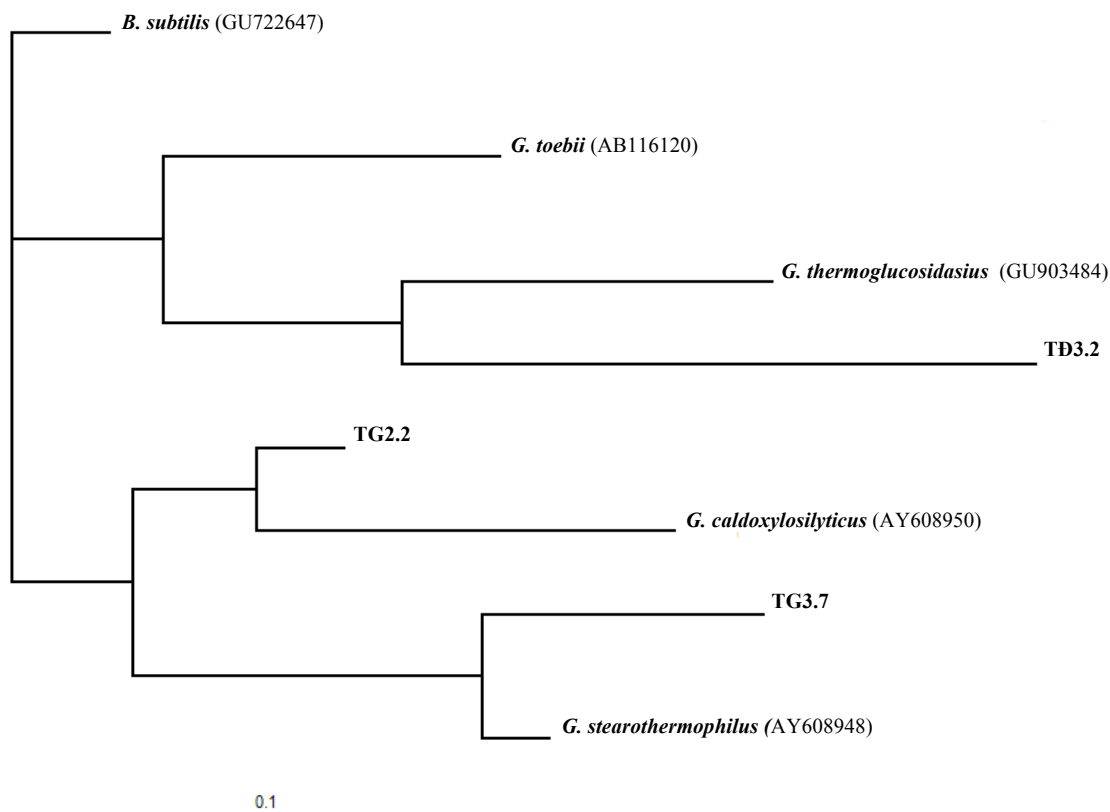
Trong số các chủng thuộc chi *Geobacillus* phân lập ở suối nước nóng Bình Châu, 3 chủng TG2.2, TĐ3.2, TG3.7 sinh trưởng tối ưu và có  $\alpha$ -amylase bền nhiệt ở 90°C, hứa hẹn có tiềm năng ứng dụng trong các ngành công nghiệp dệt, sản xuất tinh bột. Các chủng này được nghiên cứu phân loại đến loài

dựa trên so sánh trình tự gen 16S rRNA (Hình 5).

Kết quả phân tích cho thấy các chủng TG2.2, TĐ3.2, TG3.7 có độ tương đồng lần lượt là 98%, 99%, và 99% với các loài *G. caldophililyticus*, *G. thermoglucosidasius*, *G. Stearothermophilus* (Hình 5). Đây là những loài ưa nhiệt đã được sử dụng làm chủng sản các enzyme bền nhiệt ở quy mô công nghiệp (Obeidat *et al.*, 2012). Kết quả

của nghiên cứu cho thấy tiềm năng khai thác các vật liệu di truyền từ các chủng thuộc chi

*Geobacillus* phân lập ở suối nước nóng Bình Châu.



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của các chủng TG2.2, TĐ3.2 và TG3.7.

## KẾT LUẬN

Trong số tập hợp chủng vi khuẩn hiếu khí phân lập tại suối nước nóng Bình Châu đã xác định được 24 chủng thuộc chi *Geobacillus* có khả năng thủy phân tinh bột

Đã xác định được đặc điểm  $\alpha$ -amylase của 22 chủng thuộc chi *Geobacillus*, trong đó có  $\alpha$ -amylase của 7 chủng có  $T_{opt}$  ở 90°C và 11 chủng có  $pH_{opt} \geq 7$

Hoạt tính  $\alpha$ -amylase của 3 chủng TG2.2, TĐ3.2, TG3.7 và độ bền nhiệt enzyme của tất cả 7 chủng có  $T_{opt}$  ở 90°C đều tăng khi có mặt  $Ca^{2+}$  (5mM)

Dựa vào trình tự gen16S rRNA của 3 chủng TG2.2, TĐ3.2, TG3.7 cho thấy các chủng này có độ tương đồng cao nhất 98%, 99% và 99% với đặc điểm

của các loài *G. caldxylosilyticus*, *G. thermoglucosidasius*, *G. stearothermophilus*

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện tại Phòng Công nghệ vật liệu sinh học và Phòng Thí nghiệm trọng điểm và Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agüloğlu Fincan S, Enez B, Özdemir S, Matpan Bekler F (2014) Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydr Polym* 102: 144-150.

Bernfeld P (1955) Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods Enzymol* 1: 149-158.

- Buonocore V, Caporale C, De Rosa M, Gambacorta A (1976) Stable, inducible thermoacidophilic alpha-amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J Bacteriol* 128(2): 515-521.
- Chkraborty S, Ghanshyam R, Khopade A, Mahadik K, Kokare C (2012) Study on calcium ion independent  $\alpha$ -amylase from haloalkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3. *Indian J Biotechnol* 11: 427-437.
- Coorevits A, Dinsdale AE, Halket G, Lebbe L, De Vos P, Van Landschoot A, Logan NA (2012) Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidasius* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 1470-1485.
- Dong G, Vieille C, Savchenko A, Zeikus JG (1997) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding extracellular  $\alpha$ -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol* 63(9): 3569-3576.
- Felsenstein J (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fredrich A, Antrakian G (1996) Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermatogales*. *Appl Environ Microbiol* 62: 2875-2882.
- Gordon RE, Smith NR (1949) Aerobic spore-forming bacteria capable of growth at high temperatures. *J Bacteriol* 58: 327-341.
- Hartman PA and Tetrault PA (1954). *Bacillus stearothermophilus*. II. Certain Factors Affecting Amylase Production on Some Undefined Media. *Appl Microbiol* 3(1): 11-14.
- Heinen W, Lauwers AM (1976) Amylase activity and stability at high and low temperature depending on calcium and other divalent cations. *Experientia Suppl* 26: 77-89.
- Jiang T, Cai M, Huang M, He H, Lu J, Zhou X, Zhang Y (2015) Characterization of a thermostable raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylase from deep sea thermophile *Geobacillus* sp. *Protein Expr Purif* 114: 15-22.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- Leuschner C, Antranik G (1995) Heat stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* 11: 95-114.
- Malhotra R, Noorwer SM, Satvanaravana T (2000) Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett Appl Microbiol* 31(5): 378-384.
- Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS and Ivanov MV (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 433-446.
- Nguyễn Thị Mai Dung (2006) Giáo trình sinh học đại cương, NXB Đại học Huế.
- Obeidat M, Khyami-Horani H, Al-Zoubi A and Otri I (2012) Isolation, characterization, and hydrolytic activities of *Geobacillus* species from Jordanian hot springs. *Afr J Biotechnol* 11(25): 6763-6768.
- Ogasahara K, Imanishi A, Isemura T (1970) Studies on thermophilic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biochem* 67(1): 65-75.
- Özdemir S, Okumus V, Ulutas MS, Dundar A, Akarsubas AT and Dumonted S (2015) Isolation of a Novel Thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* SO-13, Production, Characterization and Industrial Applications of its Thermostable alpha-Amylase. *J Bioprocess Biotech* 5(7): 237.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. The 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sanchez S, Demain AL (2011) Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. *Org Process Res Dev* 15: 224-230.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Underkofler L (1976) *Microbial enzymes* In: Miller B, Litsky W (Eds.), *Industrial Microbiology*. McGraw-Hill, New York.

Vaseekaran S, Balakumar S and Arasaratnam V (2010) Isolation and Identification of a Bacterial Strain Producing Thermostable  $\alpha$ - Amylase. *Trop Agricult Res*2 (1): 1-11.

Xu D, Côté JC (2003). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(3): 695-704.

## CHARACTERIZATION OF $\alpha$ -AMYLASES OBTAINED FROM *GEOBACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM BINH CHAU HOT SPRING

Nguyen Kim Thoa<sup>1</sup>, Tran Thị Hoa<sup>1</sup>, Tran Dinh Man<sup>1</sup>, Ta Thi Thu Thuy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Hanoi Open University*

### SUMMARY

Binh Chau is famous for being a rare open-air hot spring with the highest mouth temperature in Vietnam. From water and sludge samples collected in Binh Chau hot spring, 64 aerobic thermophilic bacterial strains were isolated. Based on the identified characteristics of *Bacillus* genus, the optimum growth temperature as well as the ability to hydrolyze starch, 22 strains belonging to *Geobacillus* genus were selected for study on their  $\alpha$ -amylase properties. Alpha-amylase from 11 of 22 strains showed  $\text{pH}_{\text{opt}} \geq 7$ . The optimum temperature of  $\alpha$ -amylase ranged from 50°C to 90°C in different strains, of which seven strains showed the  $T_{\text{opt}}$  of  $\alpha$ -amylase at 90°C. Thermostability of these strains at 90°C was identified, showing the half life of the three most prominent strains TĐ3.2, TG2.2, TG3.7 strains at 5.5 hours, 3.25 hours and 6.5 hours, respectively. Moreover, the addition of 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  resulted in improving  $\alpha$ -amylase activity of 4 strains (TĐ3.2, TG2.2, TG3.1 and TG3.7) from 1,15 - 1,55 times, as well as in increasing thermostability of all enzymes produced by 7 strains with their new half life varied from 2-7 hours. Comparative analyses of sequences of 16S rRNA gene from the TĐ3.2, TG2.2, TG3.7 strains indicated that they were most closely related to *G. caldophilicus*, *G. thermoglucosidasius*, and *G. stearothermophilus* respectively (with the homology of 99%, 98% and 99%, respectively). Thus, it could be assumed that the genetic materials of microorganisms in Binh Chau hot spring are of great interest of exploitation in very near future.

**Keywords:** *Alpha amylase, thermophiles, thermostable enzyme, Geobacillus, Binh Chau hot spring*