

NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC THU MỘT SỐ CHỦNG THUỘC CHI *BACILLUS* CÓ HOẠT TÍNH AMYLASE TỪ CÁC MẪU ĐẤT KHÁC NHAU

Nguyễn Thị Đà, Nguyễn Kim Thoa, Trần Đình Mẫn

*Viện Công nghệ sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

α -Amylase (Endo-1,4- α -D-glucan glucohydrolase - EC3.2.1.1) xúc tác thủy phân ngẫu nhiên các liên kết α -1,4 glycoside trong phân tử tinh bột thu sản phẩm cuối cùng là các đoạn oligosacharide với liên kết α -glucoside như: glucose, maltose, maltotriose và dextrin (KiroMojsov 2012; Zhang et al. 2017). Amylase là enzyme có trong: thực vật, động vật và vi sinh vật. Ngày nay, số lượng lớn các enzym amylase từ vi sinh vật đã được ứng dụng trong các quá trình công nghiệp và các enzym này đã thay thế hoàn toàn cho việc sử dụng hóa chất để thủy phân tinh bột trong công nghiệp chế biến tinh bột trước đây (KiroMojsov 2012; Mobini-dehkordi and Javan 2012; Naidu 2013; Sundarram and Murthy 2014). Trong số các vi sinh vật sinh α -amylase, *Bacillus* dường như có số loài lớn nhất và đa dạng nhất. Hầu như các loài thuộc chi này đều có thể tìm thấy các chủng sinh α -amylase. PN người ta phát hiện thấy α -amylase được tổng hợp bởi các loài *B.subtilis*, *B.stearothermophilus*, *B.licheniformis*, *B.amyloliquefaciens*, *B.circulans*, *B.coagulan*, *B.caldoliticus*, *B.acidocodaricus*, *B.megaterium*..., trong đó *B.subtilis*, *B.stearothermophilus*, *B.licheniformis* và *B.amyloliquefaciens*, được biết đến là những loài sản xuất amylase tốt và được sử dụng rộng rãi trong sản xuất thương mại cho các ứng dụng khác nhau (Souza and Magalhães 2010; Mobini-dehkordi and Javan 2012; Naidu 2013; Sundarram and Murthy 2014; Ray 2015).

Các protein được tổng hợp trong tế bào và tiết ra ngoài môi trường nhờ vào các peptide tín hiệu và khái niệm này rõ ràng hơn kể từ năm 1972 khi C. Milstein và cộng sự phát hiện ra các tiền protein được tổng hợp trong tế bào nhờ sự kéo dài của các peptide tín hiệu (Milstein et al. 1972). Peptide tín hiệu của *Bacillus* được biết thông qua các công bố của Tjalsma và cộng sự (Tjalsma et al. 2000). Hoạt tính của enzyme tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy được đánh giá dựa vào thời gian cảm ứng, loại peptide tín hiệu và khối lượng phân tử của enzyme (Yamabhai et al. 2008). Chính vì vậy, sàng lọc đánh giá quá trình tiết amylase kết hợp với xác định hoạt tính của chúng trong bộ sưu tập các chủng thuộc chi *Bacillus* phân lập được là tiền đề quan trọng nhằm nâng cao khả năng tiết của enzyme quan tâm. Bài báo này trình bày về kết quả phân lập các chủng thuộc chi *Bacillus* từ các mẫu đất ở nhiều nơi và sàng lọc thu các chủng có hoạt tính enzyme cũng như lượng protein tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy cao. Từ đó, dựa trên kết quả phân tích bằng Kit API 50 CHB cũng như trình tự gen 16S rRNA để phân loại được một số chủng chọn lọc.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguồn gốc chủng

Các chủng nghiên cứu thuộc chi *Bacillus* được phân lập từ các mẫu đất khác nhau bằng phương pháp pha loãng liên tục và được nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung tinh bột 1%.

Bảng 1

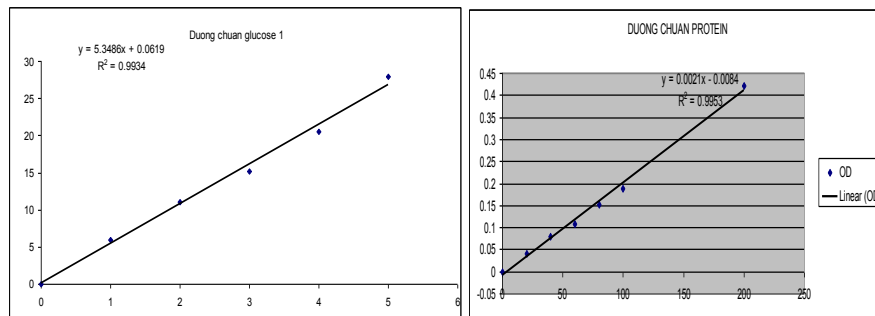
Các mẫu đất và ký hiệu sử dụng khi nghiên cứu

Số TT	Nơi thu thập mẫu đất	Địa chỉ	Ký hiệu nghiên cứu
1	Đất vườn	Xóm 10 - Cổ Nhuế - Từ Liêm - Hà Nội	CN1

2	Đất vườn	Xóm 10 - Cổ Nhuế - Từ Liêm - Hà Nội	CN2
3	Đất vườn	Tân Hội - Đan phượng - Hà Nội	TH
4	Đất vườn	Tây Tựu - Từ Liêm - Hà Nội	TT
5	Đất vườn	Gia lâm - Hà Nội	GL
6	Đất vườn	Phú Đô - Mễ Trì - Từ Liêm - Hà Nội	D
7	Đất ruộng rau muống	Hồng Hà - Đan Phượng - Hà Nội	RRM
8	Đất khu xả trấu xay xát	Hồng Hà - Đan Phượng - Hà Nội	TR
9	Đất nơi thải tinh bột làm bún	Hồng Hà - Đan Phượng - Hà Nội	DA

2. Xác định hoạt tính enzyme

Hoạt tính enzym được định tính theo phương pháp khuếch tán thạch và định lượng Hoạt tính enzym được phân tích bằng phương pháp Bernfeld có sử dụng 3,5-dinitrosalicylic acid. Một đơn vị enzyme là lượng enzyme cần thiết để thủy phân tinh bột thành 1 μmol đường tính theo glucose ở 40°C và pH 6.5 trong thời gian 1 phút (Miller 1959).



3. Xác định hàm lượng Protein trong dịch nuôi cấy

Nồng độ protein tiết tổng số được xác định theo phương pháp Lowry (Lowry et al. 1951) có cải tiến (Dulekgurgen 1994).

4. Tách DNA tổng số

DNA tổng số của chủng nghiên cứu được tách theo phương pháp của Ausubel (Ausubel et al. 2003).

5. Chu trình PCR thu đoạn gen 16S rRNA

Cặp mồi được sử dụng để cấu tạo đoạn gen 16S rRNA gồm:

- Mồi xuôi DAFpri: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

- Mồi ngược DARpri: TACGGTTACCTTGTTACCGACTT

Với chu kỳ PCR được thực hiện: 95°C, 5 phút; 95°C, 1 phút; 55°C, 1 phút 20''; 72°C, 2 phút; Lặp lại từ bước 2, 30 lần; 72°C, 7 phút; 4°C – ∞.

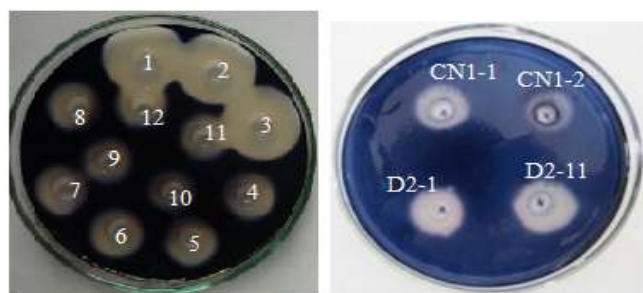
6. Xử lý số liệu

Các trình tự DNA được đọc bởi máy đọc trình tự của viện công nghệ sinh học. Kết quả xử lý các trình tự DNA, axit amin thu được bằng các chương trình Serial cloner, MEGA 5.0, BioEdit, Chromas, DNADynamo, SigmaPlot... Các trình tự bắt cặp, dữ liệu DNA, trình tự axit amin được phân tích trực tuyến trên các trang web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://web.expasy.org/>; [http://www.ebi.ac.uk/clustalw/...](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập và tuyển chọn sơ bộ các chủng thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính amylase

Chi *Bacillus* đóng vai trò quan trọng trong cả hai lĩnh vực nghiên cứu cơ bản cũng như ứng dụng công nghiệp với tỷ lệ khoảng 60% lượng protein thương mại trên toàn thế giới có nguồn gốc từ chi này. Các chủng thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính amylase đã được phân lập từ các mẫu đất thu tại nhiều nơi khác nhau trên môi trường LB có bổ sung tinh bột. Từ các mẫu đất, 526 chủng *Bacillus* đã được phân lập và đã sàng lọc được 130 chủng dựa trên đặc điểm hình thái và hoạt tính amylase đã tuyển chọn sơ bộ bằng phương pháp chấm điểm (hình 1). Hoạt tính amylase cũng như hoạt tính tiết protein tổng của 130 chủng được thể hiện trên bảng 1.



Hình 1: Vòng hoạt tính một số chủng tuyển chọn

Dựa vào đồ thị chuẩn và kết quả đo phổ hấp phụ tại bước sóng 540 nm của các chủng, có thể xác định được hàm lượng α -amylase trong dịch nuôi cấy. Kết quả xác định hoạt tính α -amylase trên bảng 1 cho thấy, 130 chủng thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính amylase đo được thấp nhất là CN1-6 cho hoạt tính đạt $1,52 \pm 0,47$ U/ml đến cao nhất đạt $14,23 \pm 0,92$ U/ml ở chủng DA23. Từ bộ sưu tập 130 chủng này cho thấy số lượng chủng đạt hoạt tính > 10 U/ml chiếm 22,31% (29 chủng) trong khi đó hoạt tính enzyme được xác định với hàm lượng < 5 U/ml là 34,62% (45 chủng) và chiếm ưu thế nhất vẫn là các chủng có hoạt tính từ $5 \div < 10$ U/ml chiếm 43,07% (56 chủng). Trong khi đó, cũng trên bảng này cho thấy, khả năng tiết protein tổng số của các chủng nghiên cứu rất đa dạng đối với các chủng đã phân lập được thấp nhất là chủng TT2-3 với hàm lượng protein tiết đạt $1016,60 \pm 4,35$ μ g/ml và cao nhất là chủng TT2-10 với hàm lượng protein tiết đạt $2129,44 \pm 9,96$ μ g/ml. Thông qua các bảng này cho thấy, tỷ lệ protein tiết tổng số của các chủng trên 2mg/ml chiếm 2,31% (3 chủng), 97,69 % số chủng còn lại có hoạt tính tiết protein tổng số đạt 1-2mg. Parmar và Ajit Pandya khi phân lập thu các chủng thuộc chi *Bacillus* từ đất (vùng Gujarat vidyapith, sadra, Ấn Độ) và xác định hoạt tính phân giải tinh bột bằng pháp DNSA thì sau 48 h nuôi cấy hoạt tính chủng đại thu được mới chỉ đạt trong khoảng 0,045-1,35 U/mL (Parmar & Pandya, 2012).

Bảng 2

Hàm lượng α -amylase trong dịch nuôi cấy

Ký hiệu chủng	Hoạt tính amylase (U/ml)	Hàm lượng protein tiết (μ g/ml)	Ký hiệu chủng	Hoạt tính amylase (U/ml)	Hàm lượng protein tiết (μ g/ml)
CN1-1	$5,70 \pm 0,40$	$1441,64 \pm 6,11$	D9-11	$6,28 \pm 0,67$	$1085,19 \pm 4,64$
CN1-2	$2,53 \pm 0,76$	$1553,18 \pm 6,14$	D9-12	$2,79 \pm 0,59$	$1293,53 \pm 5,53$
CN1-3	$3,51 \pm 0,52$	$1179,57 \pm 13,10$	D9-13	$7,33 \pm 0,57$	$1617,70 \pm 6,92$
CN1-5	$6,93 \pm 0,21$	$1368,06 \pm 15,38$	D9-14	$3,93 \pm 0,43$	$1690,31 \pm 7,23$
CN1-6	$1,52 \pm 0,47$	$1167,37 \pm 12,96$	DP1-1	$8,01 \pm 0,65$	$1412,87 \pm 4,76$

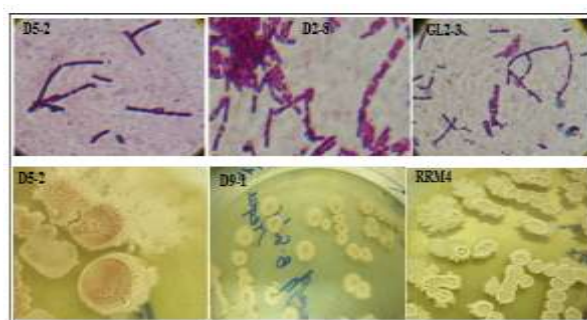
HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT LẦN THỨ 7

CN2-1	2,24±0,92	1631,07±18,11	DP1-2	7,81±0,65	1770,99±7,57
CN2-7	6,50±0,56	1269,36±14,09	DP2	3,82±0,54	1348,03±4,05
CN2-8	8,41±0,37	1750,91±19,44	DP3	7,58±0,98	1591,55±3,81
CN3-1	3,40±0,27	1171,43±13,01	DP4	3,90±0,65	1347,41±5,76
CN3-2	6,50±0,44	1540,13±17,10	DP5	4,01±0,27	1879,92±8,04
CN3-7	4,48±0,44	1285,33±14,27	DA23	14,23±0,92	1563,87±6,69
CN3-8	5,31±0,36	1548,03±16,08	DA24	11,23±0,52	1445,53±6,18
D1-1	5,64±0,15	1220,24±13,55	GL1-1	5,34±0,7	1069,05±4,57
D1-2	2,53±0,32	1232,45±13,68	GL1-2	6,89±0,5	1190,08±5,09
D1-17	6,97±0,33	1215,86±16,83	GL1-4	7,86±0,55	1274,79±5,45
D1-33	8,54±0,21	1532,45±13,68	GL1-5	11,24±0,79	1303,03±5,57
D1-35	3,14±0,31	1476,50±16,39	GL1-7	3,66±0,26	1625,76±6,95
D2-1	6,21±0,26	1675,81±18,61	GL1-8	4,9±0,92	1133,59±4,58
D2-2	8,61±0,1	1830,37±20,32	GL2-1	5,82±0,84	1420,02±6,07
D2-7	3,98±0,33	1460,23±16,21	GL2-2	10,61±1,2	1573,32±6,73
D2-8	10,21±0,25	1479,20±17,53	GL2-3	11,83±0,69	1504,74±6,44
D2-9	3,50±0,36	1374,51±9,71	GL2-4	3,17±0,57	1609,63±6,88
D2-10	4,39±0,27	1696,14±18,83	GL2-6	5,09±0,78	1940,43±8,30
D2-11	7,70±1,13	1754,09±17,25	GL2-7	4,48±0,89	1936,39±8,28
D2-12	3,90±0,26	1651,40±18,33	GL2-8	6,34±0,47	1435,31±5,71
D2-13	10,33±0,5	1618,87±17,97	ML1-3	8,55±0,74	1433,59±4,85
D2-15	5,35±0,56	1600,17±6,99	ML1-4	4,92±0,67	1641,90±7,02
D2-17	4,49±0,56	1517,19±6,62	ML1-5	5,18±0,59	1276,27±4,18
D2-20	8,65±0,61	1845,18±8,49	RRM1-1	3,65±0,47	1084,33±4,21
D2-22	2,48±0,56	1145,80±5,00	RRM1-2	7,97±0,51	1675,41±3,74
D3	4,65±0,65	1402,62±6,12	RRM1-3	5,34±1,31	1355,24±3,66
D4	2,07±0,96	1328,49±4,05	RRM2	10,52±1,21	1504,74±6,44
D5-2	14,12±0,99	1520,47±7,51	RRM3-1	10,38±1,01	1584,57±6,35
D6	10,09±0,67	1473,73±6,44	RRM3-2	11,33±0,59	1475,03±7,59
D6-1	7,62±0,62	1343,35±5,87	RRM4	12,84±0,74	1608,76±6,88
D6-3	2,25±1,03	1031,22±4,50	RRM5-2	8,59±0,45	1242,52±5,31
D6-6	5,28±0,17	1210,10±4,19	RRM5-3	7,59±0,68	1702,41±7,28
D6-8	3,14±0,77	1213,91±3,55	RRM5-4	11,00±0,71	1488,60±6,37
D6-9	3,07±0,45	1173,46±5,12	RRM8	10,76±0,79	1549,11±6,62
D6-10	7,53±0,31	1841,18±8,04	TB1-1	10,05±0,66	1380,96±6,76
D6-11	6,43±0,08	1248,53±5,45	TB1-2	7,94±0,42	1473,08±4,59
D6-12	8,53±0,23	1054,92±4,61	TB2-1	5,75±0,39	1511,34±7,75
D6-14	3,87±0,14	1036,39±4,09	TB2-2	5,70±0,92	1334,67±3,14
D6-19	10,61±0,46	1556,71±6,80	TH1-1	6,28±0,86	1054,21±4,51
D7	8,16±0,15	1536,68±5,4	TH1-2	11,03±0,78	1889,16±8,08
D7-1	6,48±0,13	1260,38±5,50	TH2	7,84±0,68	1379,23±3,76
D7-4	11,03±0,25	1529,35±6,68	TH5-1	6,22±0,33	2119,67±9,07
D7-5	11,49±0,36	1805,62±7,88	TH5-2	7,1±0,56	1932,36±8,26
D7-6	8,90±0,72	2086,15±9,11	TR1	3,63±0,65	1311,10±5,61
D7-10	5,22±0,62	1608,07±7,02	TR4-1	12,72±0,86	1658,04±7,09
D7-11	4,90±0,46	1149,75±5,02	TR4-2	8,50±0,3	1488,60±6,37

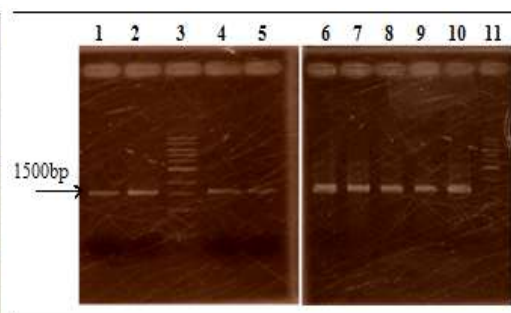
D8-1	4,09±0,77	1683,53±2,98	TR4-3	10,74±0,71	1590,93±5,52
D8-2	4,61±0,44	1879,45±3,76	TR5-1	8,60±0,4	1698,38±7,26
D8-4	9,55±0,58	1658,04±7,09	TR5-2	11,79±0,61	1562,93±7,54
D8-5	12,82±1,03	1441,92±6,17	TR5-3	10,27±0,69	1460,36±6,25
D8-6	4,25±0,85	1508,77±6,45	TT2-1	4,04±0,37	1137,63±4,87
D8-11	5,94±0,74	1078,59±3,33	TT2-2	12,23±0,48	1764,86±5,41
D8-12	2,95±0,62	1024,68±4,38	TT2-3	2,71±0,71	1016,60±4,35
D9	3,61±0,56	1097,29±4,69	TT2-4	3,54±0,63	1101,33±4,71
D9-1	11,18±1,05	1469,30±6,28	TT2-5	4,18±0,71	1637,86±7,00
D9-2	3,83±0,59	1444,22±6,18	TT2-6	8,98±0,63	1415,99±6,06
D9-3	3,99±0,32	1149,73±4,92	TT2-7	5,90±0,78	1391,78±5,95
D9-4	11,15±0,99	1615,99±6,06	TT2-8	9,66±0,63	1658,34±7,09
D9-5	9,46±0,57	1359,51±5,81	TT2-9	5,60±0,68	1407,69±3,88
D9-7	10,17±0,79	1767,16±5,42	TT2-10	4,71±0,44	2129,44±9,96

2. Nghiên cứu đặc điểm phân loại của các chủng

Các chủng được tuyển chọn đều thuộc chi *Bacillus* do có tế bào hình que và bắt màu tím đặc trưng cho vi khuẩn Gram dương. Quan sát dưới kính hiển vi còn cho thấy tất cả các chủng này đều có khả năng sinh bào tử. Trong khi đó thí nghiệm thử hoạt tính enzyme catalase đều cho kết quả dương tính với thuốc thử, chứng tỏ tất cả chủng này đều có khả năng sinh catalase. Dựa trên hoạt tính amylase, khả năng tiết protein ngoại bào và đặc điểm hình thái các chủng tuyển chọn cho mục đích phân loại để sử dụng cho các nghiên cứu phân loại tiếp theo bao gồm: CN1-5, D1-17, D2-8, D5-2, D7-4, D8-5, DA23, DA24, GL1-5, RRM3-2, RRM4, RRM5-4, TB1-1, TB2-1, TR4-1, TR5-2, GL2-3. Để có thể so sánh được khả năng tiết amylase ra ngoài môi trường và nghiên cứu sâu hơn về khả năng tiết enzyme này ở mức độ gen và tiến tới mục đích so sánh sự khác nhau trong trình tự peptide tín hiệu của các chủng và để nâng cao hoạt tính tiết enzyme, các chủng chọn lọc được nghiên cứu phân loại đến loài bằng kit API 50 CHB và trình tự gen 16S rRNA.



Hình 2: Hình thái tế bào và hình ảnh một số khuẩn lạc *Bacillus* phân lập được

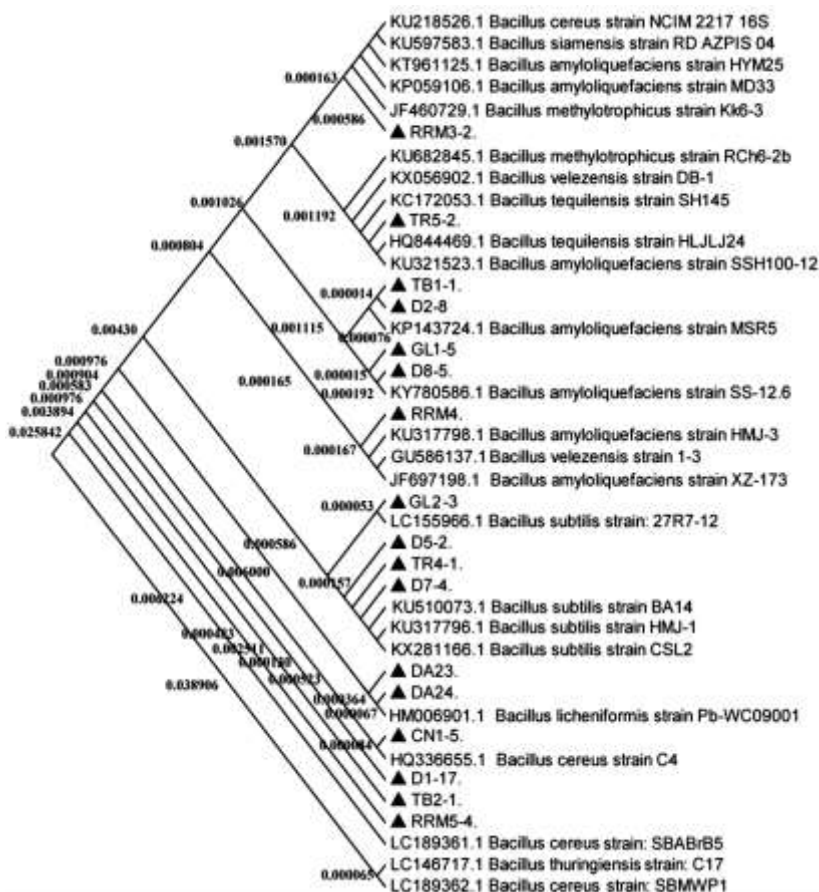


Hình 3: Điện di đồ sản phẩm PCR gen 16S rRNA của một số chủng nghiên cứu

Sản phẩm khuếch đại lần lượt theo thứ tự các chủng: CN1-5 (1), D7-4 (2), thang DNA 1kb (3, 11), TB2-1 (4), D1-17 (5), DA23 (6), RRM4 (7), TR4-1 (8), D5-2 (9), GL2-3(11)

Sản phẩm PCR thu được, được tinh sạch và được gửi đi đọc trình tự. Kết quả đọc trình tự gen 16S rRNA của các chủng đã được xử lý bằng phần mềm xử lý trình tự MEGA6.0, DNADynamo... và một số trang web trực tuyến chúng tôi đã ghép nối được các đoạn gen 16S và so sánh với dữ liệu về gen này đã được cung cấp trên GenBank. Khi đã phân loại được đến

loài có thể thiết kế được bộ môi nhằm khuếch đại được gen mã hóa cho peptide tín hiệu nhằm tạo được bộ sưu tập của các peptide tín hiệu của gen α -amylase khác nhau thông qua các dữ liệu về gen quan tâm đã được công bố trên các ngân hàng gen. Kết quả cho thấy, trong tổng số 17 chủng được phân loại thì có 1 chủng RRM3-2 có độ tương đồng cao 99% về trình tự gen phân tích với chủng *B. methylotrophicus* Kk6-3 (JF460729), 1 chủng TR5-2 có độ tương đồng gen 16S là 99% với chủng *B. tequilensis* SH145. Năm chủng TB1-1, D2-8, GL1-5, D8-5, RRM4 thuộc loài *B. amyloliquefaciens* với độ tương đồng về trình tự với loài này đã công bố trên ngân hàng gen từ 99-99,7%. Bốn chủng GL 2-3, D5-2, TR4-1, D7-4 được phân loại thuộc chi *B. subtilis* cũng với tỷ lệ tương đồng về trình tự gen 16S đạt từ 99 – 99,8%. Chủng DA23 và DA 24 được phân loại thuộc vào loài *B. licheniformis* với sự tương đồng 99 và 99,7%. Các chủng CN1-5, D1-17, TB2-1 và RRM5-4 thuộc vào loài *B. cereus* độ tương đồng đạt 98 – 99,5%. Dựa trên trình tự gen 16S rRNA của các chủng chọn lọc, cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA6.



Hình 4: Cây phát sinh loài của các chủng chọn lọc

III. KẾT LUẬN

Với các mẫu đất thu thập ở nhiều địa phương khác nhau, 130 chủng đã được chọn lọc và nghiên cứu đánh giá khả năng tiết protein tổng số cũng như hoạt tính amylase. Sự đa dạng trong hoạt tính tiết đo được cho giúp khẳng định sự khác nhau về khả năng tiết protein của cùng một loài. Có 29 chủng sinh hoạt tính amylase lớn hơn 10 U/ml chiếm 22,31% và hàm lượng protein tiết tổng số đo được bằng phương pháp Lowry ở mức 1-2 mg/ml chiếm đa số với 97,69%. Chỉ

có 3 chủng (2,31%) có hàm lượng protein trên 2 mg/ml. Dựa trên kết quả nghiên cứu này, 17 chủng có khả năng tiết protein tổng số và hoạt tính amylase cao được lựa chọn và phân loại bằng phương pháp sử dụng Kit API 50 CHB và phân tích trình tự gen 16S rRNA. *B. cereus* (4 chủng), 1 chủng thuộc loài *B. tequilensis*, *B. amyloliquefacien* (5 chủng), *B. subtilis* (4 chủng), *B. licheniformis* (2 chủng), *B. methylotrophicus* (1 chủng). Sàng lọc từ bộ chủng phân lập tự nhiên nhằm thu các chủng vừa có hoạt tính amylase cao, lại vừa có hàm lượng protein tiết lớn, hơn nữa lại cần phải có sự đa dạng về hình thái, đa dạng về chủng loại nhằm đánh giá tốt hơn về ảnh hưởng của các peptide đến quá trình tiết của một enzym gốc sau này.

Lời cảm ơn: Đây là công trình được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của đề tài Bộ Công Thương của PGS.TS Trần Đình Mẫn với đề tài được cấp: “Nghiên cứu sản xuất enzyme α -amylase bền nhiệt tái tổ hợp ứng dụng trong công nghiệp dệt” mang mã số: CNSHCB/2010-5

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Brent R., Kingston RE., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K., Wiley C. J., Allison R. D., Bittner M., Blackshaw S.,** 2003: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons.
2. **Dulekgurgen E.,** 1994. Proteins (Lowry) protocol. . *Protein Protocol* 5:1–5.
3. **KiroMojsov.,** 2012. Microbial α -amylase and their industrial applications: A review. *Int J Manag IT Eng* 2:583–609.
4. **Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.,** 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
5. **Miller G. L.,** 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428.
6. **Milstein C., Brownlee G., Harrison T., Mathews M.,** 1972. A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nat New Biol* 239:117–120.
7. **Mobini-dehkordi M., Javan F. A.,** 2012. Review Article: Application of alpha-amylase in biotechnology. *J Biol today's world* 1:39–50.
8. **Naidu M. A.,** 2013. Bacterial Amylase A Review. *Int J Pharm Biol Arch* 4:274–287.
9. **Souza P. M., Magalhães P. O.,** 2010. Application of microbial α -amylase in industry - a review. *Brazilian J Microbiol* 41:850–861.
10. **Sundarram A., Murthy T. P. K.,** 2014. α - Amylase Production and Applications: A Review. *J Appl Environ Microbiol* 2:166–175.
11. **Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J. D., Bron S., van Dijk J. M.,** 2000: Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 515–547.
12. **Yamabhai M., Emrat S., Sukasem S., Pesatcha P., Jaruseranee N., Buranabanyat B.,** 2008. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *E. coli* expression systems. *Jof biotechnol* 133: 50–57.
13. **Zhang Q., Han Y., Xiao H.,** 2017. Microbial α -amylase: A biomolecular overview. *Process Biochem* 53:88–101.

**ISOLATION AND SREENING OF *BACILLUS* SPECIES WITH AMYLASE
ACTIVITY FROM DIFFERENT SOIL SAMPLES**

Nguyen Thi Da, Nguyen Kim Thoa, Tran Dinh Man

SUMMARY

From many soil samples in different places, 526 strains had found with amylase activity and 130 strains of which were selected as of high amylase activity. The collection of them was identified based on either enzyme's activity by DNSA or the secretion of total protein by Lowry's method. Therefore, 130 strains had been collected and preserved in a refrigerator for use. Amylase activities of these strains were measured using DNS method which showed very diverse with a range of different results reached about 5-10U/ml (56 strains), 29 strains reached more than 10U/ml and 45 strains were found the content of level less than 5U/ml. The secretions of extracellular proteins of them were determined. The obtained results showed that three strains had high level secretion of total protein with 2mg/ml. The largest number as 127 strains secreted total proteins about 1-2 mg. Based on morphological, biochemical characterization using API 50 CHB Kit and 16S rRNA gene, 17 isolated strains were identified belong to 6 species as *B. cereus*, *B. amyloliquefacien*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus*, *B. tequilensis*.