

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN QUÁ TRÌNH THU NHẬN CHẾ PHẨM AMYLASE NGOẠI BÀO TỪ *BACILLUS SUBTILIS* DC5

Phạm Trần Thùy Hương, Đỗ Thị Bích Thủy
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Tóm tắt. Một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào bởi *Bacillus subtilis* DC5 như thành phần môi trường, pH ban đầu, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy đã được nghiên cứu. Trong các nguồn dinh dưỡng bổ sung vào môi trường cơ bản (có chứa 1% pepton, 0,3% cao thịt và 0,5% NaCl), nguồn nitơ và carbon có tác dụng kích thích chủng này sinh tổng hợp amylase mạnh nhất là cao nấm và lactose. Hoạt độ amylase của dịch môi trường sau khi nuôi cấy chủng này trong môi trường có chứa 0,5% lactose là 8,174 U/ml, cao gấp 1,64 lần so với mẫu đối chứng (4,992 U/ml). Hoạt độ amylase trong môi trường có bổ sung 0,5% cao nấm đạt được (6,687 U/ml) gấp 1,369 lần so với mẫu đối chứng (4,885 U/ml). Các môi trường có bổ sung kết hợp các nguồn carbon và nitơ cho hoạt độ không cao hơn so với trường hợp chỉ bổ sung lactose. Việc thay đổi hàm lượng lactose bổ sung vào môi trường vì vậy mà được nghiên cứu. Kết quả cho thấy hàm lượng lactose bổ sung vào môi trường cơ bản thích hợp nhất là 0,25%. Môi trường này được gọi là môi trường thích hợp. pH ban đầu và nhiệt độ thích hợp khi nuôi cấy chủng này trong MTTT là pH 5 và 35°C. Trong các điều kiện nuôi cấy trên, thời gian nuôi cấy thu nhận enzyme thích hợp nhất là 24 giờ.

Từ khóa: Amylase, *Bacillus subtilis*, Dinitrosalicylic, enzyme, môi trường nuôi cấy.

1. Đặt vấn đề

Enzyme amylase có khả năng xúc tác thủy phân tinh bột tạo ra các xi rô đường chứa các oligosaccharide, maltose và glucose. Vì vậy các chế phẩm của enzyme này được ứng dụng một cách rộng rãi trong thực phẩm, dược phẩm, công nghiệp lên men. Amylase có thể được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như vi khuẩn, nấm mốc, thực vật và động vật. Tuy nhiên, các chế phẩm amylase thương mại được ứng dụng nhiều trong công nghiệp chủ yếu được sản xuất từ *Bacillus* sp..

Đã có nhiều nhà khoa học trên thế giới tập trung nghiên cứu thu nhận chế phẩm amylase từ *Bacillus* sp.. Dharani Aiyer (2004) đã công bố việc sản xuất α -amylase bởi *Bacillus licheniform* thích hợp trong môi trường có tỷ lệ carbon:nitơ thích hợp là 1:1. Nhiều công trình nghiên cứu cũng cho thấy rằng quá trình sinh tổng hợp amylase ngoại bào của vi sinh vật phụ thuộc nhiều vào thành phần môi trường, đặc biệt là các nguồn

carbon, nitơ, muối khoáng cũng như các yếu tố vật lý như nhiệt độ, pH, tốc độ lắc, hàm lượng oxy hòa tan (Carlos Eduardo de Souza Teodoro & Meire Lelis Leal Martins, 2000; Sajedi *et al*, 2004; Konsoula & Liakopoulou-Kyriakides, 2005; Anto H *et al*, 2006; Cordeiro C A M *et al*, 2002; ...).

Trong công trình này chúng tôi nghiên cứu một số các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu nhận chế phẩm amylase ngoại bào từ *Bacillus subtilis* DC5 có khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào cao được phân lập từ dưa cải bao gồm thành phần môi trường, pH ban đầu, nhiệt độ nuôi cấy, thời gian nuôi cấy.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Chủng *B. subtilis* DC5 phân lập từ dưa cải muối chua được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Viện Tài nguyên môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp hóa sinh

Xác định hoạt độ amylase bằng phương pháp Bernfield

Hỗn hợp phản ứng gồm 0,1ml dung dịch tinh bột 1% (hòa tan 1g tinh bột và 0,035g NaCl trong 60ml dịch đệm phosphat 50mM pH 7,0, đun sôi cho đến tan, để nguội và dẫn đến 100 ml) và 0,1ml dung dịch enzyme. Ủ hỗn hợp này ở 30⁰C, 10 phút. Tiếp tục cho vào hỗn hợp trên 0,2ml dung dịch Dinitrosalicylic 1% (hòa tan 1g 3,5 – acid Dinitrosalicylic trong 20 ml NaOH 2N và 50ml nước cất, cho 30g Kali-Natri tartrat và dẫn đến 100ml) và ủ ở 100⁰C trong 10 phút. Sau đó ủ hỗn hợp này trong nước đá 10 phút. Bổ sung vào hỗn hợp 2 ml nước cất trước khi đưa đi so màu ở bước sóng 540 nm. Song song tiến hành làm mẫu đối chứng bằng cách vô hoạt enzyme bằng Dinitrosalicylic 1% trước khi tiến hành các bước tiếp theo như trên. Từ giá trị OD thu được, dựa vào đường chuẩn maltose để biết nồng độ maltose. Một đơn vị hoạt độ α -amylase được xác định là lượng μ mol maltose tạo thành bởi 1ml dịch enzyme trong thời gian một phút ở nhiệt độ 30⁰C.

2.2.2. Phương pháp vi sinh

- *Phương pháp cấy tăng sinh*: Lấy một khuẩn lạc sau 24 giờ nuôi cấy của chủng vi khuẩn cấy vào 1ml môi trường lỏng có chứa cao thịt và pepton trong ống nghiệm, thực hiện nuôi cấy trên máy lắc 220 vòng/phút ở 35⁰C, thời gian nuôi 24 giờ.

- *Phương pháp nuôi cấy thu nhận enzyme*: Phân phối 500 μ l dịch nuôi cấy tăng sinh vào bình tam giác 100ml có chứa 20ml môi trường dinh dưỡng. Thực hiện nuôi cấy trên máy lắc theo chế độ trên.

2.2.3. Một số phương pháp bố trí thí nghiệm trong nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào bởi B.subtilis DC5

B. subtilis DC5 được nuôi cấy để thu nhận chế phẩm enzyme ngoại bào trong 4 môi trường có bổ sung 0,5% các nguồn carbon khác nhau (tinh bột hòa tan, latose, saccharose và glucose) vào môi trường cơ bản (MTCB) có thành phần pepton 1%, cao thịt 0,3%, NaCl 0,5%. Mẫu đối chứng là MTCB. Hoạt độ dịch môi trường nuôi cấy (MTNC) sau khi ly tâm ở 14000 vòng/phút, nhiệt độ 4⁰C trong 10 phút để tách sinh khối tế bào được xác định bằng phương pháp Bernfield.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào bởi B.subtilis DC5

B. subtilis DC5 được nuôi cấy để thu nhận chế phẩm enzyme ngoại bào trong 4 môi trường có bổ sung 0,5% các nguồn nitơ khác nhau (cao nấm, casein, urê, NH₄Cl) vào môi trường cơ bản (MTCB) có thành phần pepton 1%, cao thịt 0,3%, NaCl 0,5%. Mẫu đối chứng là MTCB. Hoạt độ dịch môi trường nuôi cấy (MTNC) sau khi ly tâm ở 14000 vòng/phút, nhiệt độ 4⁰C trong 10 phút để tách sinh khối tế bào được xác định bằng phương pháp Bernfield.

Nghiên cứu ảnh hưởng của việc phối hợp nguồn carbon và nitơ đến khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào bởi B.subtilis DC5

Các công thức thí nghiệm được bố trí bằng cách phối hợp nguồn carbon có khả năng sinh tổng hợp amylase cao nhất với các nguồn nitơ khác nhau, và nguồn nitơ bổ sung vào môi trường nuôi cấy có khả năng sinh amylase cao nhất phối hợp với các nguồn carbon khác nhau.

Nghiên cứu xác định hàm lượng dinh dưỡng thích hợp để chủng B. subtilis DC5 sinh tổng hợp amylase ngoại bào cao

Thí nghiệm được thực hiện bằng cách nuôi cấy *B. subtilis* DC5 trong các công thức môi trường được thay đổi hàm lượng nguồn dinh dưỡng (đã tìm được kết quả ở khảo sát ảnh hưởng của việc phối hợp nguồn carbon và nitơ đến khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào bởi *B.subtilis* DC5) trong môi trường nuôi cấy. Kết quả thí nghiệm này sẽ cho phép kết luận thành phần môi trường phù hợp để *B.subtilis* DC5 sinh tổng hợp amylase ngoại bào cao. Môi trường này gọi là môi trường thích hợp (MTTH).

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào bởi B.subtilis DC5

B. subtilis DC5 được nuôi cấy trong MTTH có pH ban đầu thay đổi từ 2 – 11. Xác định hoạt độ amylase của dịch MTNC đã ly tâm tách sinh khối tế bào bằng phương pháp Bernfield.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp

amylase ngoại bào bởi *B.subtilis* DC5

Nuôi cấy chủng *B.subtilis* DC5 trong MTTT có điều chỉnh pH ban đầu với nhiệt độ nuôi cấy thay đổi từ 30°C đến 60°C. Hoạt độ dịch MTNC sau khi ly tâm tách sinh khối tế bào được xác định bằng phương pháp Bernfield.

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào bởi B.subtilis DC5

Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp (thành phần môi trường dinh dưỡng, pH ban đầu, nhiệt độ) trong thời gian 72 giờ. Các mẫu được tiến hành lấy 8 giờ một lần để xác định hoạt độ amylase trong dịch MTNC sau khi ly tâm tách sinh khối tế bào được xác định bằng phương pháp Bernfield.

2.2.4. Phương pháp vật lý

Xác định pH bằng máy đo pH điện tử

2.2.5. Phương pháp toán học

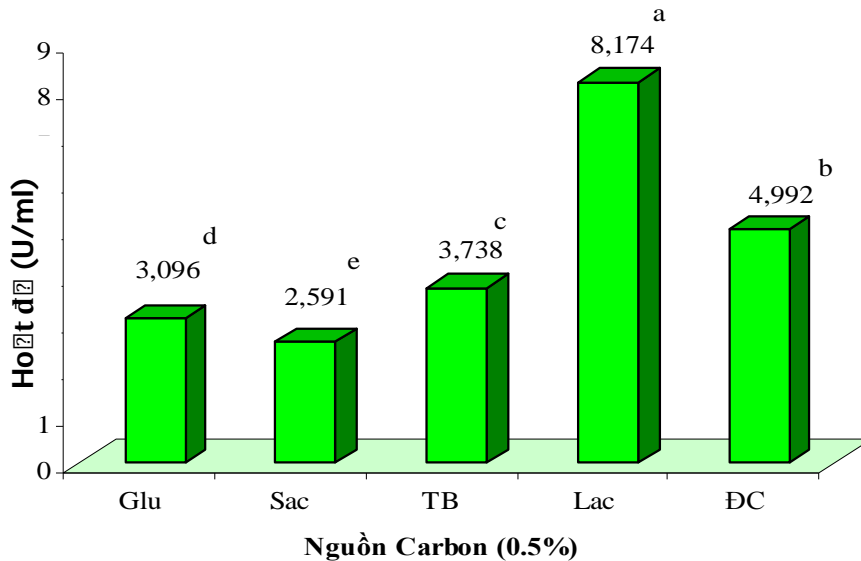
Sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) (Phan Hiếu Hiền, 2001) để xác định sự sai khác giữa các trung bình.

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của nguồn Carbon lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *Bacillus subtilis* DC5

Trong các nguồn carbon được bổ sung vào MTCB, hoạt độ amylase trong dịch MTNC cao hơn hẳn (8,174 U/ml) so với các nguồn carbon khác và lớn gấp 1,64 lần so với mẫu đối chứng (4,992 U/ml) (Hình 1). Suman và Ramesh (2010) đã công bố rằng khi nuôi cấy chủng *Bacillus* sp.KCPSS-12ss trong môi trường nuôi cấy có bổ sung nguồn lactose thì khả năng tổng hợp amylase là cao hơn so với các nguồn carbon khác. Việc bổ sung 2% lactose sẽ tăng làm khả năng sinh tổng hợp α -amylase của chủng *Bacillus circulans* ACB hơn là tinh bột cũng được công bố bởi Bandyopadhyay và đồng tác giả (1993). Trong khi đó, khi bổ sung các nguồn carbon khác vào môi trường nuôi cấy như: saccharose, glucose, tinh bột hòa tan thì hoạt độ amylase thu được đều thấp hơn so với mẫu đối chứng. Nhiều công trình cho kết quả khác nhau khi nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon lên quá trình sinh tổng hợp amylase ngoại bào của *Bacillus* sp.. Theo Kelly và đồng tác giả (1997), khi bổ sung tinh bột hoà tan, glucose, sucrose sẽ ức chế khả năng sinh amylase của chủng *B. flavothermus*. Ngược lại, Anto và đồng tác giả (2006) công bố rằng việc bổ sung nguồn carbon vào môi trường nuôi cấy sẽ kích thích khả năng tổng hợp α -amylase ngoại bào của chủng *B. cereus* MTCC 1305. Kinsoula và Liakopoulou-Kyriakides (2007), Đỗ Thị Bích Thủy và đồng tác giả (2008) kết luận rằng tinh bột hòa tan là thích hợp nhất cho quá trình sinh tổng hợp α -amylase của chủng *B. subtilis*.

Như vậy, đối với chủng *B. subtilis* DC5 chỉ có nguồn lactose mới có khả năng kích thích làm tăng hoạt độ amylase còn các nguồn carbon khác đều làm giảm hoạt độ amylase. Điều này có lẽ do chủng *B. subtilis* DC5 có khả năng tiết ra enzyme ngoại bào thủy phân được đường lactose, hoặc là amylase ngoại bào của chủng này thiếu tính đặc hiệu với liên kết α -D-1,4-glucosid nên có thể thủy phân mọi liên kết β -D-1,4-glucosid trong phân tử đường lactose. Vì thế lactose được xem là chất cảm ứng để chủng này tiết amylase.



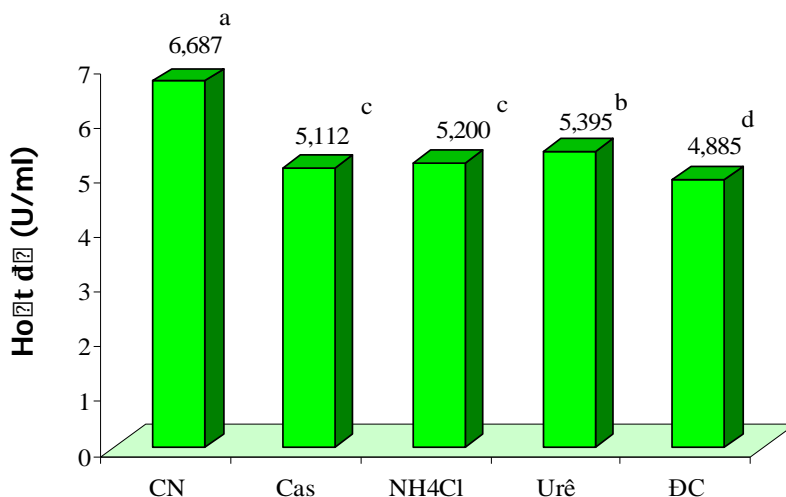
Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn Carbon đến hoạt độ amylase trong môi trường nuôi cấy *B. subtilis* DC5

(Glu: Glucose; Sac: Saccharose; TB: Tinh bột; Lac: Lactose; ĐC: mẫu đối chứng (nuôi cấy trong MTCB))

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

3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *Bacillus subtilis* DC5

Khi bổ sung các nguồn nitơ vào MTCB thì cao nấm có khả năng làm tăng hoạt độ amylase nhiều nhất (6,687 U/ml) gấp 1,369 lần so với mẫu đối chứng (4,885 U/ml). Các nguồn Casein, NH_4Cl , Urê cũng làm tăng hoạt độ amylase trong dịch môi trường nuôi cấy (MTNC) nhưng không nhiều so với mẫu đối chứng (Hình 2). Một số công trình đã công bố cho kết quả tương tự. Hamilton và đồng tác giả (1999) đã kết luận rằng bổ sung 2% cao nấm vào môi trường nuôi cấy chủng *Bacillus* sp. IMD 435 thì khả năng sinh tổng hợp amylase cao nhất; Đỗ Thị Bích Thủy và đồng tác giả (2008) cũng cho thấy rằng cao nấm là nguồn dinh dưỡng có tác dụng kích thích làm tăng hoạt độ amylase nhiều nhất đối với chủng *B. subtilis* C10.



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn Nitơ lên hoạt độ amylase trong môi trường nuôi cấy *B. subtilis* DC5

(CN: Cao nấm; Cas: Casein; ĐC: môi trường chẵn (nuôi cấy trong MTCB))

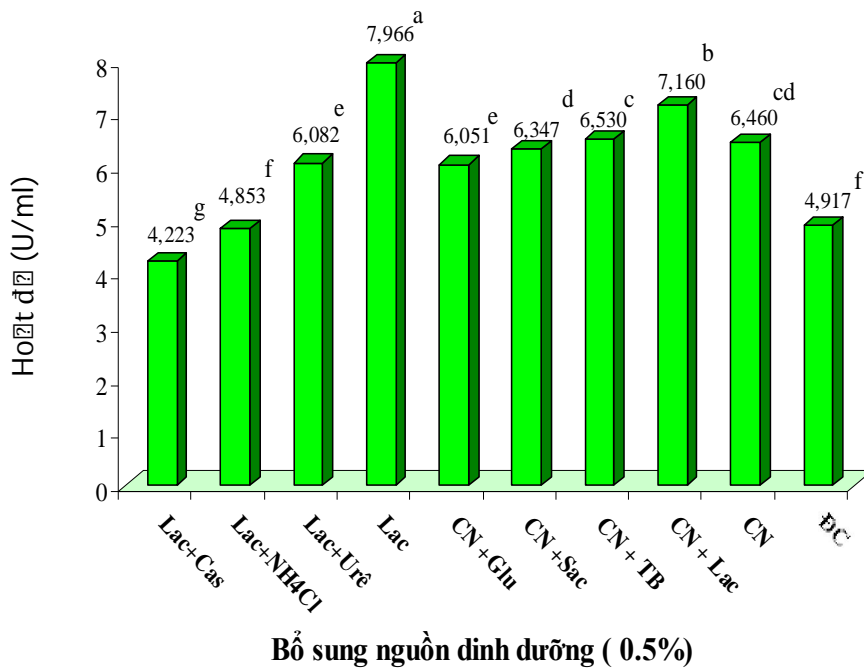
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa, Duncan's test ($P < 0,05$))

Trong khi đó, nghiên cứu sản xuất amylase từ *B. ceureus*, Anto và đồng tác giả (2006) đã kết luận tất cả nguồn nitơ đều tìm thấy hàm lượng amylase; Kinsoula và Liakopoulou-Kyriakides (2007) cho rằng tryptone là nguồn nitơ kích thích sinh tổng hợp amylase của chủng *Bacillus*. sp.

Như vậy, đối với *B. subtilis* DC5 tất cả các nguồn nitơ đều kích thích làm tăng hoạt độ amylase, trong đó cao nấm có tác dụng kích thích mạnh nhất. Có lẽ là tế bào chủng này đang cần nitơ để tổng hợp protein.

3.3. Ảnh hưởng của sự kết hợp đồng thời nguồn carbon và nitơ lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *Bacillus subtilis* DC5

Kết quả của các thí nghiệm bổ sung kết hợp các nguồn dinh dưỡng carbon và nitơ đều cho kết quả thấp hơn mẫu thí nghiệm chỉ có bổ sung lactose (Hình 3). Trong các thí nghiệm kết hợp giữa cao nấm với các nguồn carbon cho hoạt độ amylase trong môi trường khá cao và tất cả đều cao hơn mẫu đối chứng. Điều này có thể giải thích là do cao nấm giàu amino acid tự do và vitamin nên kích thích quá trình trao đổi chất.



Hình 3. Ảnh hưởng của sự kết hợp một số nguồn dinh dưỡng lên hoạt độ amylase trong môi trường nuôi cấy *B. subtilis* DC5

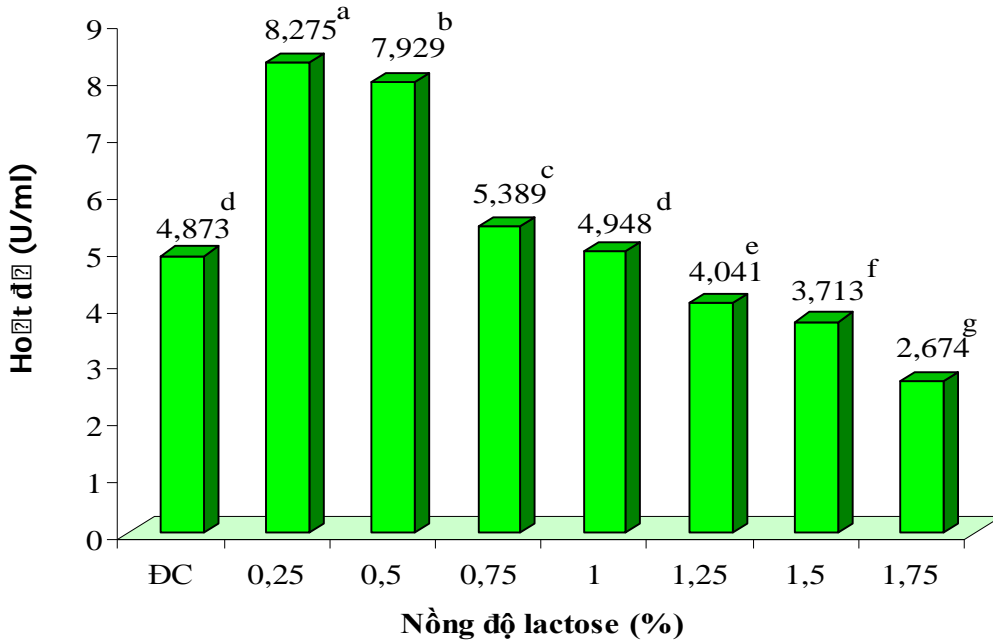
(Glu: Glucose; Sac: Saccharose; TB: Tinh bột; Lac: Lactose; CN: Cao nấm; Cas: Casein; ĐC: mẫu đối chứng (nuôi cấy trong MTCB))

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

3.4. Ảnh hưởng của hàm lượng lactose trong môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *Bacillus subtilis* DC5

Kết quả các thí nghiệm bổ sung vào MTCB nguồn lactose với hàm lượng khác nhau (Hình 4) cho thấy với sự có mặt của 0,25% lactose, hoạt độ amylase trong môi trường nuôi cấy đạt giá trị cực đại (8,275 U/ml) gấp 1,698 lần so với mẫu đối chứng (4,873 U/ml). Có lẽ ban đầu khi chưa bổ sung lactose vào MTNC, chủng *B. subtilis* DC5 thiếu đường để sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp amylase. Và khi bổ sung đường lactose vào MTNC thì ngưỡng 0,25% đủ để chủng này sinh trưởng và tổng hợp amylase. Nếu tiếp tục tăng hàm lượng lactose cao hơn ngưỡng này thì sẽ ức chế khả năng sinh tổng hợp amylase bởi chủng *B. subtilis* DC5.

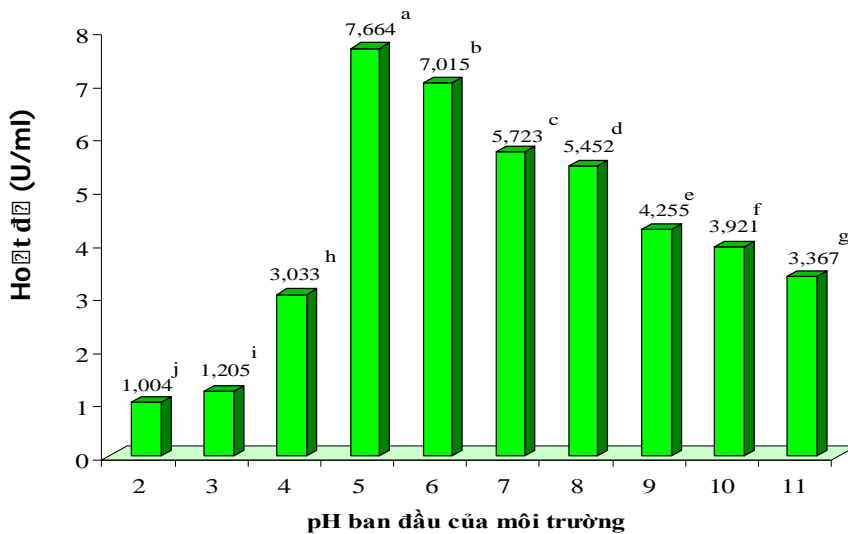
Như vậy từ các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng thành phần môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào của chủng *B. subtilis* DC5 chúng tôi nhận thấy rằng trong môi trường có bổ sung 0,25% lactose vào MTCB là môi trường thích hợp (MTTH) cho chủng *B. subtilis* DC5 sinh amylase ngoại bào cao nhất.



Hình 4. Ảnh hưởng của hàm lượng lactose lên hoạt độ amylase trong môi trường nuôi cấy *B. subtilis* DC5

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

3.5. Ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *Bacillus subtilis* DC5



Hình 5. Ảnh hưởng pH ban đầu của môi trường nuôi cấy lên hoạt độ của amylase trong môi trường nuôi cấy *B. subtilis* DC5

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

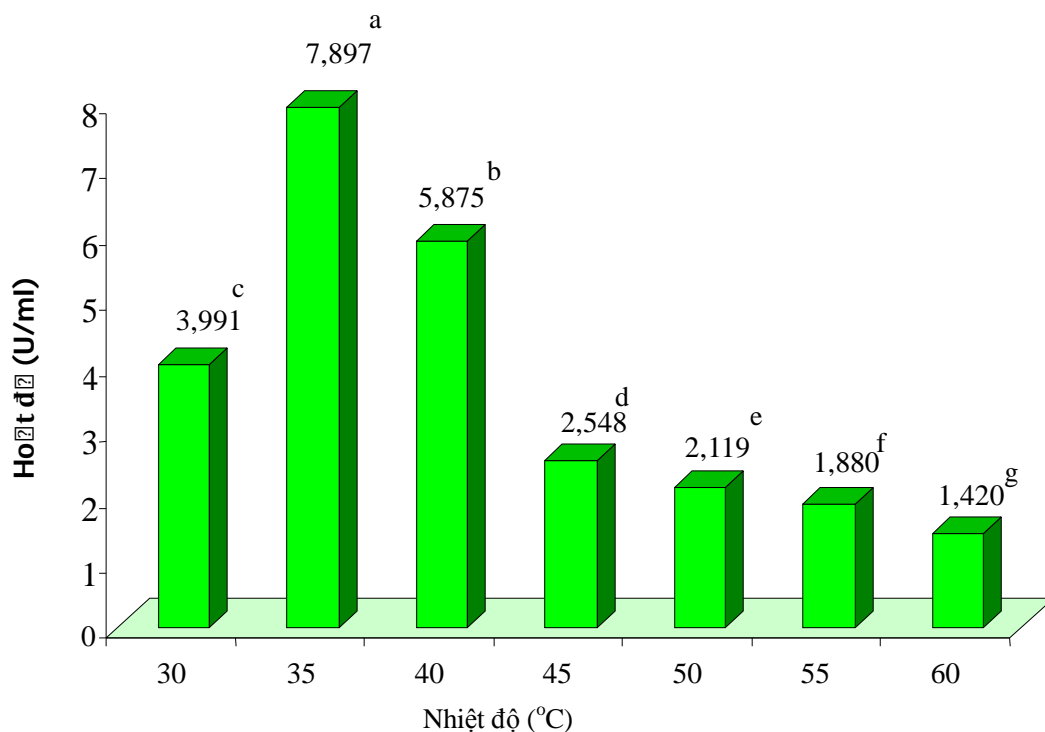
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường nuôi cấy (Hình 5) cho thấy hoạt độ amylase cao trong vùng pH từ 5,0 đến 6,0 và hoạt độ amylase đạt cực đại khi pH ban đầu bằng 5 (7,664 U/ml). Nhiều tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp amylase của vi sinh vật và có những công bố rất khác nhau. Anto và đồng tác giả (2006) đã công bố pH tối ưu để *Bacillus cereus* MTCC 1305 sinh tổng hợp amylase cao là 5,0; khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào của chủng *B. subtilis* KIBGE-HAR được Riaz và đồng tác giả (2009) kết luận là đạt cực đại tại pH 7,0; kết quả nghiên cứu của Đỗ Thị Bích Thủy và đồng tác giả (2008) cho thấy khoảng pH thích hợp để *B. subtilis* C10 sinh tổng hợp amylase cao là 5,0 – 8,0 và hoạt độ amylase đạt cực đại tại pH 7,0.

Như vậy pH 5,0 là giá trị pH tối ưu cho khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào của chủng *B.subtilis* DC5 khi nuôi cấy trên MTTH.

3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *Bacillus subtilis* DC5

Kết quả xác định hoạt độ amylase trong dịch môi trường thu được sau khi nuôi cấy *B. subtilis* DC5 trong MTTH có điều chỉnh pH 5 ở các mức nhiệt độ từ 30°C đến 60°C (Hình 6) cho thấy khả năng sinh tổng hợp amylase của chủng *B. subtilis* DC5 đạt cực đại (7,897 U/ml) ở 35°C. Ở vùng nhiệt độ từ 40 - 60°C theo chiều tăng nhiệt độ hoạt độ amylase giảm mạnh và tại mốc 60°C hoạt độ enzyme chỉ còn 1,420 U/ml đạt 18% so với hoạt độ cực đại. Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme khi nhiệt độ thay đổi trong đó tốc độ phát triển của vi sinh vật ảnh hưởng rất lớn. Có lẽ ở 30°C tốc độ phát triển của vi khuẩn chưa đạt cực đại, còn ở 40°C thì sự phát triển của vi khuẩn giảm xuống, vì vậy kéo theo sự giảm hoạt độ amylase. Nhiệt độ cao cũng làm bất hoạt enzyme từng phần nên hoạt độ cũng giảm theo. Suman and Ramesh (2010) nghiên cứu trên *B. Subtilis* KCPSS-12ss cho thấy rằng 35°C là nhiệt độ tối ưu để chủng này sinh tổng hợp α -amylase cực đại. Kết quả này tương tự với khảo sát của Kokab và đồng tác giả (2003) khi nuôi cấy rắn chủng *B.subtilis* trên môi trường vỏ chuối được băm nhỏ. Đỗ Thị Bích Thủy và đồng tác giả (2008) đã công bố 40°C là nhiệt độ tối ưu cho chủng *B.subtilis* C10 sinh enzyme α -amylase cao; Công bố này trùng với kết quả của Nadia và đồng tác giả (2003) đối với chủng *B.subtilis* GCBUCM-25. Trong khi đó, Asgher và đồng tác giả (2007) tiến hành nghiên cứu nhiệt độ tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp α -amylase chịu nhiệt của chủng vi khuẩn *B.subtilis* JS- 2004 và công bố ở mức nhiệt độ 50°C mới là nhiệt độ tối ưu; Riaz và đồng tác giả (2009) đưa ra kết luận ở mức nhiệt độ 60°C thì khả năng sinh enzym α -amylase ngoại bào là cực đại.

Như vậy trong MTTH và điều chỉnh pH ban đầu bằng 5 chúng tôi thấy rằng nhiệt độ mà chủng *B.subtilis* có khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào cao nhất là 35°C. Nhiệt độ này được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt độ amylase bởi chủng *B. subtilis* DC5

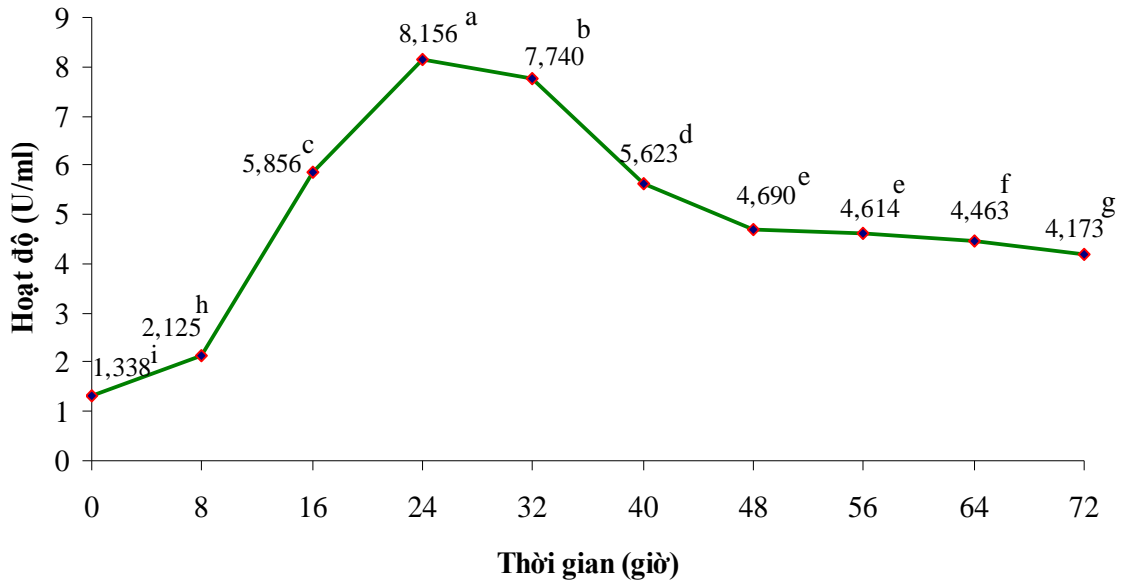
(Các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa, Duncan's test ($P < 0,05$)).

3.7. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp amylase bởi *Bacillus subtilis* DC5

Theo dõi sự biến đổi hoạt độ amylase trong môi trường nuôi cấy cho thấy hoạt độ này tăng nhanh từ 8 giờ đến 24 giờ nuôi cấy và khá cao sau khi nuôi cấy từ 24 đến 32 giờ và đạt cực đại thời điểm 24 giờ (8,156 U/ml) (Hình 7). Sau 32 giờ hoạt độ amylase trong môi trường bắt đầu giảm. Khoảng thời gian từ 48 giờ đến 72 giờ hoạt độ enzyme hầu như ít thay đổi. Sau 72 giờ nuôi cấy, hoạt độ enzyme đạt 51,2% so với mức cực đại. Đã có nhiều công bố khác nhau về ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp α -amylase bởi vi khuẩn. Khi nghiên cứu tìm điều kiện nuôi cấy để sinh amylase ngoại bào cao từ *Bacillus* sp. Suman và Ramesh (2010) đã công bố thời gian nuôi cấy để sinh tổng hợp enzym amylase cực đại là 24 giờ. Các nhà nghiên cứu Teodoro và Martins (2000), Dharani (2004) và Riaz (2009) cũng có công bố tương tự như kết quả khảo sát.

Khác với kết quả nghiên cứu trên Asgher (2007) và đồng tác giả, Nadia và đồng tác giả (2003) đã kết luận rằng chủng *Bacillus* sp đạt hoạt độ amylase cực đại sau 48 giờ nuôi cấy. Ikram và đồng tác giả (2009) khi chọn lựa điều kiện nuôi cấy tối ưu vi khuẩn *B.licheniformis* GCB-30^{UCM} để sinh tổng hợp α -amylase chịu nhiệt đã kết luận rằng hoạt độ enzyme đạt cực đại sau 72 giờ nuôi cấy.

Như vậy, đối với chủng *Bacillus subtilis* DC5 nuôi cấy trong MTTUCB có pH ban đầu là 5,0 sau 24 giờ nuôi cấy thì hoạt độ amylase đạt cực đại.



Hình 7. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ amylase của chủng *Bacillus subtilis* DC5

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

4. Kết luận

- Đã xác định được thành phần môi trường thích hợp (MTTH) để nuôi cấy thích hợp chủng *Bacillus subtilis* DC5 có khả năng sinh tổng hợp amylase ngoại bào cao bao gồm: pepton 1%; cao thịt 0,3%; NaCl 0,5%; lactose 0,25% .

- Khi nuôi cấy trong MTTH, pH ban đầu thích hợp là 5, nhiệt độ nuôi cấy là 35°C.

- Thời gian nuôi cấy để thu nhận enzyme cao nhất trong các điều kiện thích hợp ở trên là sau 24 giờ nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Thị Bích Thủy, Nguyễn Trần Phương Thảo, Đinh Thị Thu Thanh, *Ảnh hưởng của một số yếu tố lên khả năng tổng hợp α -amylase ngoại bào từ *Bacillus subtilis**, Kỷ yếu Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ IV, Hoá sinh và sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghệ thực phẩm, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2008.
2. Anto H., Trivedi U. and Patel K., *Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation*, Food Technol. Biotechnol. 44(2), (2006), 241-245.

3. Asgher M., Javaid A. M., Rahman S. U., Legge R. L., *A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic Bacillus subtilis strain for starch processing*, Journal of Engineering 79, (2007), 950-955.
4. Bandyopadhyay A., Pal S. C. and Sen S. K., *α -amylase production in lactose medium by Bacillus circulans ACB*, Microbiologia Sem 9, (1993), 142-148.
5. Cordeiro C. A. M., Meire Lelis Leal Martins, Luciano A. B., *Production and Properties of α -amylase from Thermophilic Bacillus sp.*, Brazilian Journal of Microbiology 33, (2002), 57-61.
6. Dharani A. P. V., *Effect of C:N on alpha amylase production by Bacillus licheniformis SPT 27*, African Journal of Biotechnology Vol. 3 (10), (2004), 519-522.
7. Hamilton L. M., Kelly C. T. , Fogarty W. M., *Production and properties of the raw starch-digesting alpha-amylase of Bacillus. sp IMD 435*, Process Biochemistry, (1999), 27-31.
8. Ikram U. L. H., Ali S., Saleem A. and Javed M. M., *Mutagenesis of Bacillus licheniformis through ethyl methanesulfonate for alpha amylase production*, The Pakistan Journal of Botany, 41(3), (2009), 1489-1498.
9. Kelly C. T. , Bolton D. J. and Fogarty W. M., *Bi-phasic production of α -amylase of Bacillus flavothermus in batch fermentation*, Journal Biotechnology Letters, Vol 19, No7, (1997), 675-677.
10. Kinsoula Z., Liakopoulou-Kyriakides M., *Co-production of α -amylase and β -galactosidase by Bacillus subtilis in complex organic substrates*, Bioresource Technology 98, (2007), 150-157.
11. Kokab S., Asghar M., Rehman K., Asad M. J. and Adedyo O., *Bio-Processing of Banana Peel for α -amylase production by Bacillus subtilis*, International journal of Agriculture and Biology, (2003), 36-39
12. Nadia riaz, Ikram U. L. H. and Qadeer M. A., *Characterization of α -amylase by Bacillus subtilis*, International journal of Agriculture and Biology, (2003), 249-252.
13. Riaz.A, Qadar.S, Anwar.A, Iqbal.S & Bano.S., *Production and characterization of thermostable α -amylase from a newly isolated strain of Bacillus subtilis KIBGE-HAR*, The Internet Journal of Microbiology, Vol 6, No 1, (2009).
14. Sajedi R. H., Naderi-Manesh H., Ahmadvand K. K. R., Ranjbar B., Asoodeh A., Moradian F., *A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the Bacillus sp. KR-8104*, Enzyme and Microbial Technology 36, (2005), 666-671.
15. Suman S. and Ramesh K., *Production of a thermostable extracellular amylase from thermophilic Bacillus species*, Journal of Pharmaceutical, Vol.2(2), (2010), 149-154.
16. Teodoro C E D S, Martins M L, *Culture conditions for the production of thermostable amylase by Bacillus sp.* Brazillian Journal of Microbiology 31, (2000), 298-302.

EFFECT OF SOME FACTORS ON THE EXTRACELLULAR AMYLASE PRODUCTION BY *Bacillus subtilis* DC5

Pham Tran Thuy Huong, Do Thi Bich Thuy

College of Agriculture and Forestry, Hue University

Abstract. Studies on some factors affecting the extracellular amylase production by *Bacillus subtilis* DC5 such as medium composition, initial pH, temperature and culture time were carried out. Among nutrition sources added into base medium (BM) that contains 1% of peptone, 0,3% of meat extract and 0,5% of NaCl, the best carbon source and nitrogen source were lactose and yeast extract. Amylase activity in medium after the culture of *B.subtilis* DC5 with an addition of 0,5% of lactose obtained 8.174 U/ml, which was 1,64 times as much as that in the control sample (4.992 U/ml). In the case of adding 0.5% of yeast extract, the amylase activity in medium was 6.687 U/ml and 1.369 times as much as that in the control sample. All experiments of the combination of nutrient sources had the amylase activities in culture medium less than the case of supplement lactose. Effect from the content of lactose in medium on the amylase activities was therefore researched. Results showed that the optimal content of lactose was 0,25%. The new optimum medium (NOM) contained 1% of peptone, 0,3% of meat extract, 0,25% of lactose and 0,5% of NaCl. Studies on the effect of initial pH of NOM, culture temperature and time revealed that the maximum enzyme level was obtained after growing *Bacillus subtilis* in NOM for 24 hours at initial pH 5 and at 35⁰C.

Keywords: Amylase, *Bacillus subtilis*, Dinitrosalicylic, enzyme, culture medium.