

## ẢNH HƯỞNG CỦA NHIỆT ĐỘ VÀ pH ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP, HOẠT TÍNH VÀ ĐỘ BỀN CỦA $\alpha$ -AMYLASE TỪ CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus subtilis* V37

Đoàn Văn Thược và Nguyễn Phúc Hưng  
*Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

**Tóm tắt.** Ảnh hưởng của 2 tác nhân vật lí quan trọng là nhiệt độ và pH đến khả năng sinh tổng hợp, hoạt tính và độ bền của  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* V37 đã được nghiên cứu trong bài báo này. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoạt tính enzyme thu được đạt giá trị lớn nhất khi nuôi chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 ở nhiệt độ 35 °C và pH 7,0. Hoạt tính enzyme đạt giá trị cực đại khi thực hiện phản ứng ở pH 6,0 và nhiệt độ 70 °C. Dịch enzyme thô sẽ giữ được hoạt tính tốt nhất khi bảo quản trong dung dịch đệm có pH từ 5,0 đến 7,0. Alpha-amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 tương đối bền nhiệt: enzyme giữ được khoảng 100% hoạt tính sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ 30 và 40 °C, giữ lại được khoảng 34% hoạt tính sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ 80 °C. Với những đặc tính này,  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 có tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực của cuộc sống ví dụ như sản xuất thực phẩm, công nghệ lên men, thức ăn chăn nuôi.

**Từ khóa:**  $\alpha$ -amylase, *Bacillus subtilis*, nhiệt độ, pH.

### 1. Mở đầu

Tinh bột là polymer của các đơn phân glucose, tinh bột được tổng hợp và dự trữ bởi rất nhiều loài thực vật đặc biệt những cây thuộc họ ngũ cốc. Tinh bột được cấu tạo từ 2 thành phần là amylose và amylopectin, hàm lượng 2 thành phần này khác nhau tùy nguồn tinh bột; tinh bột từ gạo, khoai tây, ngô thường có khoảng 20 - 30% amylose và amylopectin chiếm khoảng 70 - 80% [1]. Amylose là dạng polymer mạch thẳng, không tan trong nước và được cấu tạo từ các đơn phân glucose thông qua liên kết  $\alpha$ -1,4 glucoside. Trong khi đó amylopectin là dạng polymer tan trong nước, trong cấu trúc của nó ngoài các liên kết  $\alpha$ -1,4 glucoside thì còn có các liên kết  $\alpha$ -1,6 glucoside để hình thành cấu trúc mạch nhánh [1, 2].

Các enzyme thủy phân tinh bột thuộc nhóm hydrolase và thường có tên gọi chung là amylase. Hệ enzyme amylase được chia thành 3 loại chính là  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase và  $\gamma$ -amylase. Alpha-amylase (EC 3.2.1.1) là enzyme có khả năng phân cắt ngẫu nhiên các liên kết  $\alpha$ -1,4 glucoside ở trong mạch để tạo ra sản phẩm là các glucose, maltose hoặc dextrin. Beta-amylase (EC 3.2.1.2) là enzyme có khả năng phân cắt các liên kết  $\alpha$ -1,4 glucoside thứ 2 từ đầu tận cùng không khử nên sản phẩm tạo ra chủ yếu là maltose. Gamma-amylase (EC 3.2.1.3) có khả năng phân cắt liên kết  $\alpha$ -1,6 glucoside và  $\alpha$ -1,4 glucoside từ đầu tận cùng không khử trên mạch amylose và amylopectin để tạo ra sản phẩm cuối cùng là các phân tử glucose [3]. Amylase là enzyme có thị phần rất lớn trên thị trường thương mại, amylase chiếm khoảng 17% tổng lượng enzyme được sản xuất trên thế giới [4]. Trong đó  $\alpha$ -amylase là enzyme được ứng dụng nhiều trong công nghiệp hiện nay, ví dụ như công nghiệp sản xuất ethanol, công nghệ thực phẩm, chăn nuôi, giặt tẩy, công nghiệp giấy và dệt may [5].

---

Ngày nhận bài: 19/1/2021. Ngày sửa bài: 12/3/2021. Ngày nhận đăng: 19/3/2021.

Tác giả liên hệ: Đoàn Văn Thược. Địa chỉ e-mail: [thuocdv@hnue.edu.vn](mailto:thuocdv@hnue.edu.vn)

Rất nhiều sinh vật có khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase như động vật, thực vật, nấm, vi khuẩn. Tuy nhiên nguồn  $\alpha$ -amylase dùng trong công nghiệp hiện nay chủ yếu là từ vi sinh vật (vi khuẩn hoặc nấm). Các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase công nghiệp chủ yếu thuộc chi *Bacillus*, điển hình là các loài *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* hay *B. stearothermophilus* [3, 5]. Alpha-amylase từ các chủng vi khuẩn thuộc loài *B. subtilis* thường hoạt động tối ưu trong dải pH từ 6 - 8 và khoảng nhiệt độ từ 55 đến 60 °C [6-8].

Hiện nay chúng tôi đang lưu giữ chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* V37 có khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase mạnh. Để có thể ứng dụng  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 vào thực tiễn thì cần có những nghiên cứu sơ bộ đánh giá hoạt tính và độ bền của enzyme. Trong bài báo này chúng tôi tập trung nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase của chủng *B. subtilis* V37, đồng thời nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính và độ bền của  $\alpha$ -amylase thu được.

## **2. Nội dung nghiên cứu**

### **2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu**

#### **2.1.1. Vật liệu nghiên cứu**

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: cao thịt, peptone, NaCl,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Các hóa chất được cung cấp bởi hãng Merck (Đức).

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 sử dụng cho nghiên cứu được lưu giữ trong dung dịch 15% glycerol và bảo quản ở -80°C.

#### **2.1.2. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp $\alpha$ -amylase của chủng *B. subtilis* V37**

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 được nuôi cấy giữ giống trên môi trường MPA đặc có thành phần các chất dinh dưỡng tính theo 1 lít: 5 g cao thịt, 5 g peptone; 5 g NaCl, 20 g thạch, pH 7,0. Để nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase thì sử dụng môi trường MPA lỏng có các giá trị pH khác nhau từ 4,0 đến 8,0 (bước nhảy 0,5). Chủng *B. subtilis* V37 được nuôi trong môi trường có pH khác nhau ở 30°C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy sẽ được thu lại và tiến hành li tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút, dịch lỏng thu được được sử dụng để đánh giá hoạt tính  $\alpha$ -amylase.

Môi trường MPA lỏng có pH bằng 7,0 được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase. Chủng *B. subtilis* V37 được nuôi ở các nhiệt độ khác nhau (30, 35, 40 và 45 °C) với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy sẽ được thu lại và tiến hành li tâm với tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút, dịch lỏng thu được được sử dụng để đánh giá hoạt tính  $\alpha$ -amylase.

Hoạt tính enzyme trong thí nghiệm này được xác định trong điều kiện pH 7,0 và nhiệt độ 50 °C, lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp Nelson-Somogyi.

#### **2.1.3. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính và độ bền của $\alpha$ -amylase**

*Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính enzyme:* Trộn 50  $\mu\text{L}$  dịch enzyme đã được pha loãng với 450  $\mu\text{L}$  dung dịch 1% tinh bột tan được pha trong dung dịch đệm có pH khác nhau từ 3,5 - 8,0 (bước nhảy 0,5). Các dung dịch đệm sử dụng là: dung dịch đệm acetate có pH từ 3,5 - 5,5 và dung dịch đệm phosphate có pH từ 5,5 - 8,0. Ủ dung dịch phản ứng ở 50 °C trong 5 phút sau đó xác định lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp Nelson-Somogyi. Dựa vào lượng đường tạo ra để xác định hoạt tính của enzyme.

*Ảnh hưởng của pH đến độ bền enzyme:* Trộn dịch enzyme với dung dịch đệm 0,2 M có pH khác nhau từ 3,5 - 8,0 theo tỉ lệ 1:1 và ủ ở 30 °C trong 1 giờ, mẫu đối chứng là dịch enzyme được giữ ở 4 °C. Sau khi ủ, pha loãng dịch enzyme trong dung dịch đệm photphat pH 6,0, trộn 50  $\mu\text{L}$

dịch enzyme pha loãng với 450  $\mu\text{L}$  dung dịch 1% tinh bột tan được pha trong dung dịch đệm photphat pH 6,0. Ủ dung dịch phản ứng ở 50  $^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút sau đó xác định lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp Nelson-Somogyi. Dựa vào lượng đường tạo ra để xác định hoạt tính còn lại của enzyme.

#### 2.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính và độ bền của $\alpha$ -amylase

*Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme:* Trộn 50  $\mu\text{L}$  dịch enzyme đã được pha loãng với 450  $\mu\text{L}$  dung dịch 1% tinh bột tan được pha trong dung dịch đệm photphat pH 6,0. Ủ dung dịch phản ứng ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 đến 100  $^{\circ}\text{C}$  (bước nhảy 10  $^{\circ}\text{C}$ ) trong 5 phút sau đó xác định lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp Nelson-Somogyi. Dựa vào lượng đường tạo ra để xác định hoạt tính của enzyme.

*Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ bền enzyme:* Trộn dịch enzyme với dung dịch đệm photphat 0,2M có pH = 6,0 theo tỉ lệ 1:1 và ủ ở các nhiệt độ khác nhau từ 30 đến 100  $^{\circ}\text{C}$  (bước nhảy 10  $^{\circ}\text{C}$ ) trong 1 giờ, mẫu đối chứng được giữ ở 4  $^{\circ}\text{C}$ . Sau khi ủ, pha loãng dịch enzyme trong dung dịch đệm photphat pH 6,0, trộn 50  $\mu\text{L}$  dịch enzyme pha loãng với 450  $\mu\text{L}$  dung dịch 1% tinh bột tan được pha trong dung dịch đệm photphat pH 6,0. Ủ dung dịch phản ứng ở 70  $^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút sau đó xác định lượng đường khử tạo ra bằng phương pháp Nelson-Somogyi. Dựa vào lượng đường tạo ra để xác định hoạt tính còn lại của enzyme.

#### 2.1.5. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme

Hoạt tính enzyme được xác định theo phương pháp Nelson-Somogyi, phương pháp này do Nelson đề xuất năm 1944 [9] và được Somogyi cải tiến vào năm 1952 [10]. Dung dịch hóa chất dùng cho phản ứng gồm có 2 phần là dung dịch Nelson và dung dịch Somogyi, các dung dịch được chuẩn bị theo hướng dẫn [9, 10].

Bổ sung 500  $\mu\text{L}$  dung dịch Somogyi vào hỗn hợp 500  $\mu\text{L}$  dung dịch enzyme-cơ chất (sau 5 phút phản ứng ở nhiệt độ và pH thích hợp), giữ trong nồi nước sôi 10 phút, sau đó cho vào nước lạnh trong 5 phút. Bổ sung dung dịch 500  $\mu\text{L}$  Nelson và giữ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Bổ sung 2,5 ml nước cất 2 lần, lắc đều và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 500 nm.

Glucose (Merck, Đức) được sử dụng để xây dựng đồ thị chuẩn.

Một đơn vị hoạt độ của amylase (1 IU) được quy định là hàm lượng amylase cần thiết để giải phóng ra 1  $\mu\text{mol}$  đường khử trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm.

Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại ít nhất 3 lần, các số liệu trình bày trong bài báo là giá trị trung bình của những lần thí nghiệm.

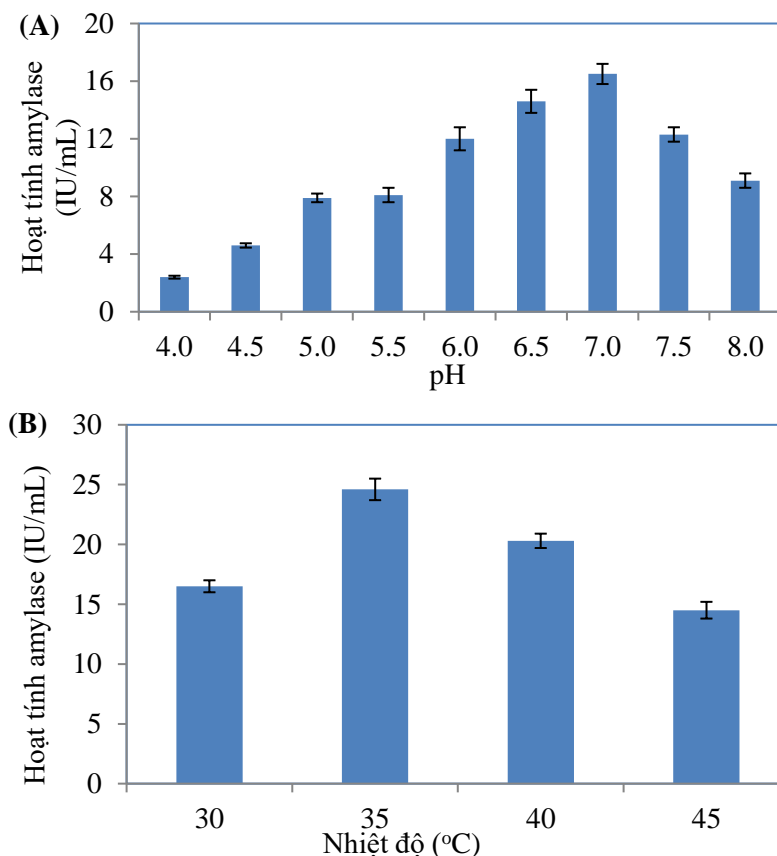
## 2.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

### 2.2.1. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp amylase

Nhiệt độ và pH là những yếu tố môi trường có tác động mạnh mẽ đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme của vi sinh vật [11, 12]. Giá trị pH của môi trường nuôi cấy không chỉ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi sinh vật, pH môi trường còn có ảnh hưởng đến độ bền của enzyme [11]. Do vậy sự ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase của chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 đã được nghiên cứu. Kết quả trong Hình 1A cho thấy, hoạt tính amylase đạt giá trị cực đại là 16,5 IU/mL ở pH = 7,0. Hoạt tính amylase thu được ở giá trị pH acid yếu (6,5 và 6) cao hơn so với hoạt tính thu được ở pH kiềm yếu (7,5 và 8). Kết quả nghiên cứu thu được trong nghiên cứu này cũng tương tự như các nghiên cứu gần đây, các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* thường sinh tổng hợp amylase tốt nhất trên môi trường có pH trung tính hoặc acid yếu [12, 13].

Hình 1B thể hiện hoạt tính enzyme của chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 khi nuôi cấy trên môi trường có nhiệt độ khác nhau. Hoạt tính  $\alpha$ -amylase tăng từ 16,5 IU/mL ở nhiệt độ 30  $^{\circ}\text{C}$  lên giá trị cực đại là 24,6 IU/mL khi tăng nhiệt độ lên 35  $^{\circ}\text{C}$ , hoạt tính enzyme giảm dần khi tăng nhiệt độ lên 40 và 45  $^{\circ}\text{C}$ . Như vậy, có thể thấy nhiệt độ khoảng 35  $^{\circ}\text{C}$  là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp amylase của chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37. Trong một số trường hợp đặc biệt, một số chủng vi khuẩn *B. subtilis* có thể sinh trưởng và sinh tổng hợp amylase ở điều

kiện nhiệt độ cao: ví dụ như chủng *B. subtilis* T41a sinh tổng hợp amylase tốt nhất ở nhiệt độ 58 °C [13], chủng *B. subtilis* Y25 sinh tổng hợp amylase cực đại ở 45 °C [6]. Tuy nhiên, trong đa số các trường hợp thì chủng vi khuẩn thuộc loài *B. subtilis* thường sinh enzyme tốt nhất ở khoảng nhiệt độ 35 - 37 °C [7, 12].

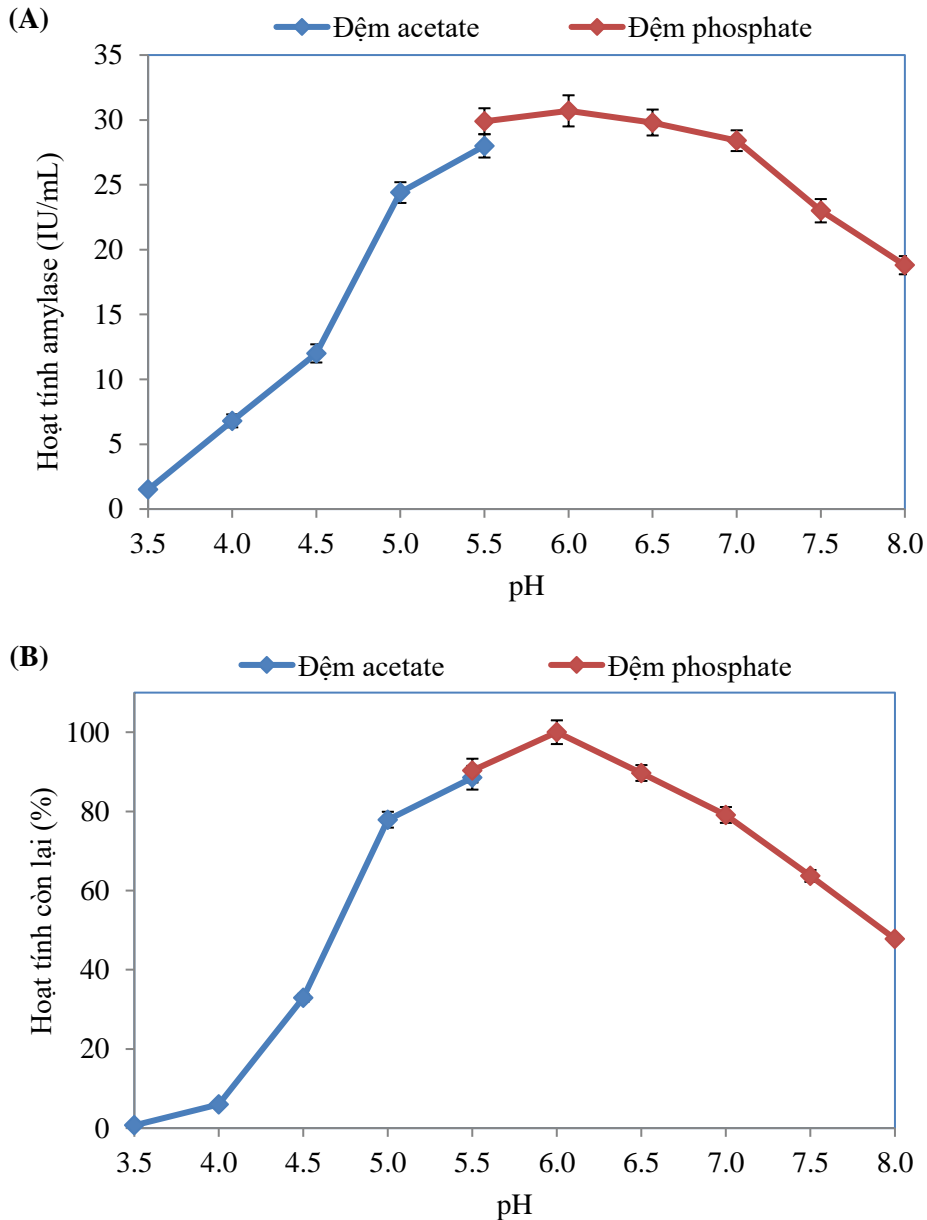


Hình 1. Ảnh hưởng của pH (A) và nhiệt độ (B) đến khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase của chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37

### 2.2.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính và độ bền của $\alpha$ -amylase thô

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến hoạt tính  $\alpha$ -amylase được thể hiện trong Hình 2A.  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 biểu hiện hoạt tính tốt nhất trong điều kiện pH từ 5,5 đến 6,5, hoạt tính enzyme đạt giá trị cực đại (30,7 IU/mL) ở pH 6. Enzyme giữ được 79,5% hoạt tính ở pH 5 và 22,1% hoạt tính ở pH 4, trong khi đó enzyme chỉ giữ được 61,2% hoạt tính ở pH 8 khi so với hoạt tính cực đại ở pH 6 (100%).

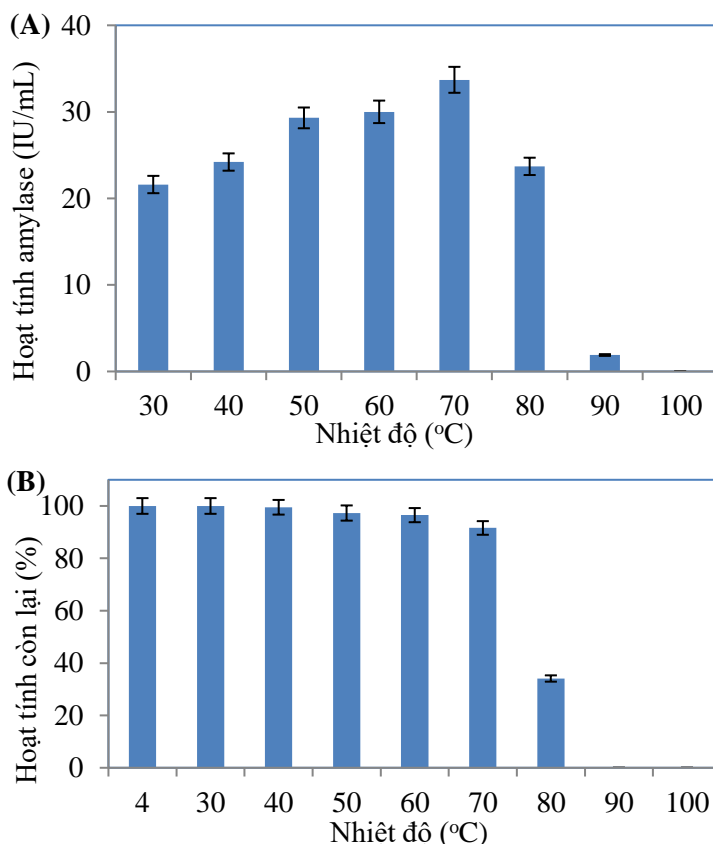
Không chỉ hoạt động tốt ở pH 6,  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 cũng bền nhất khi giữ ở pH 6. Enzyme này giữ được 100% hoạt tính sau 1 giờ ủ ở 30 °C trong đệm phosphate pH 6. Khoảng 78% hoạt tính được giữ lại ở pH 5 và giảm xuống còn khoảng 6% khi giữ ở pH 4; trong khi đó chỉ 79% và 47,8% hoạt tính được giữ lại khi ủ trong đệm phot phát pH 7 và pH 8 (Hình 2B). Các kết quả nghiên cứu cho thấy  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 bền và hoạt động tốt nhất trong khoảng pH từ 5,0 đến 6,5. Rất nhiều các nghiên cứu trước đây cũng nhận thấy rằng,  $\alpha$ -amylase sinh tổng hợp từ *B. subtilis* bền và hoạt động tốt ở pH từ 5,0 đến 6,5 [7, 14, 15]. Alpha-amylase hoạt động tốt trong khoảng pH này thường thích hợp trong các ứng dụng liên quan đến công nghệ sản xuất ethanol, công nghệ thực phẩm, chăn nuôi và dệt may [3, 15].



**Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính (A) và độ bền (B) của  $\alpha$ -amylase thô thu được từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37**

**2.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính và độ bền của  $\alpha$ -amylase thô**

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 cũng đã được nghiên cứu. Kết quả trong hình 3A cho thấy  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 thể hiện hoạt tính trong dải nhiệt độ rất rộng từ 30 đến 90 °C; tuy nhiên, enzyme mất hoàn toàn hoạt tính ở 100 °C. Ở 30 °C,  $\alpha$ -amylase thể hiện được 64% hoạt tính, hoạt tính tăng lên 90% ở 60 °C, 100% ở 70 °C, sau đó giảm xuống còn 70% ở 80 °C và chỉ còn khoảng 5,6% ở 90°C. Đa số  $\alpha$ -amylase từ vi khuẩn *B. subtilis* thể hiện hoạt tính mạnh nhất trong khoảng nhiệt độ từ 50 đến 60 °C [7, 8, 13, 15, 16], cá biệt có chủng *B. subtilis* thể hiện hoạt tính tốt nhất ở 37 °C [8].



**Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính (A) và độ bền (B) của  $\alpha$ -amylase thô thu được từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37**

Không chỉ thể hiện hoạt tính enzyme trong dải nhiệt độ rộng và cao,  $\alpha$ -amylase từ chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 cũng khá bền khi giữ ở nhiệt độ cao. Hoạt tính enzyme được giữ lại nguyên vẹn 100% sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ 30 °C và 40 °C khi so sánh với mẫu đối chứng giữ ở 4 °C, hoạt tính enzyme còn lại lần lượt là 91,6% và 34% sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ 70 và 80 °C, hoạt tính enzyme mất hoàn toàn khi giữ ở 90 và 100 °C (Hình 3B). Trong nghiên cứu gần đây, Trabelsi và cộng sự [15] đã giữ  $\alpha$ -amylase tinh sạch từ chủng *B. subtilis* US586 ở các nhiệt độ 50, 55 và 60 °C. Sau thời gian 1 giờ, hoạt tính enzyme giảm còn khoảng 96% ở 50°C, 82% ở 55 °C và chỉ còn khoảng 40% ở 60 °C. Trong khi đó ở nghiên cứu này  $\alpha$ -amylase giữ lại 96,5% hoạt tính sau 1 giờ ủ ở 60 °C. Bền ở nhiệt độ cao (60 - 80 °C) và có khả năng hoạt động trong dải nhiệt rộng là ưu điểm của  $\alpha$ -amylase sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37. Ưu điểm này đảm bảo để enzyme có thể ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau của đời sống.

### 3. Kết luận

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* V37 sinh tổng hợp  $\alpha$ -amylase tốt nhất khi nuôi cấy ở 35 °C, môi trường có pH ban đầu là 7,0. Enzyme sinh tổng hợp được thể hiện hoạt tính tốt nhất ở pH 6,0 và nhiệt độ 70 °C. Hoạt tính enzyme gần như không thay đổi khi giữ ở pH từ 5,5 đến 6,5, nhiệt độ dưới 70 °C trong 1 giờ.

**Lời cảm ơn.** Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí từ Bộ Giáo dục và Đào tạo (đề tài mã số B2020-SPH-07).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. I. Cornejo-Ramírez, O. Martínez-Cruz, C. L. D. Toro-Sánchez, F. J. Wong-Corral, J. Borboa-Flores and F. J. Cinco-Moroyoqui, 2018. The structural characteristics of starches and their functional properties. *CYTA - J. Food*, 16, pp.1003-1017.
- [2] R. F. Tester, J. Karkalas and X. Qi, 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.*, 39, pp. 151-165.
- [3] D. Mehta and T. Satyanarayana, 2016. Bacterial and Archaeal  $\alpha$ -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. *Front. Microbiol.*, 7, 1129
- [4] M. A. Uygut and M. S. Tanyuldizi, 2018. Optimization of alpha-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* grown on orange peels. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. Sci.*, 42, pp. 443-449.
- [5] B. E. Far, Y. Ahmadi, A. Y. Khosroushahi and A. Dilmaghani, 2020. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Adv. Pharm. Bull.*, 10, pp. 350-358.
- [6] S. Tavallaie, M. Khomeiri, M. Mousivand, Y. Maghsoudlou and M. Hashemi, 2019. Starches from different sources hydrolysis using a new thermo-tolerant amylase complex produced by *Bacillus subtilis* T41a: characterization and efficiency evaluation. *LWT-Food Sci. Technol.*, 112, 108218.
- [7] O. M. Aladejana, O. Oyedeji, O. O. Omoboye and M. K. Bakare, 2020. Production, purification and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* Y25 isolated from decaying yam (*Dioscorea rotundata*) tuber. *Not. Sci. Biol.*, 12, pp. 154-171.
- [8] S. Bano, S. A. U. Qader, A. Aman, M. N. Syed and A. Azhar, 2011. Purification and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 12, pp. 255-261.
- [9] N. Nelson, 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, pp. 375-380.
- [10] M. Somogyi, 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, pp. 19-23.
- [11] P. Deb, S. A. Talukdar, K. Mohsina, P. K. Sarker and S. M. A. Sayem, 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus*, 2, 154.
- [12] D. A. Bukhari and A. Rehman, 2015. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* isolated from local environment. *Pakistan J. Zool.*, 47, pp. 905-911.
- [13] M. F. Najafi, D. Deobagkar and D. Deobagkar, 2005. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expr. Purif.*, 41, pp. 349-354.
- [14] J. L. Marco, L. A. Bataus, F. F. Valencia, C. J. Ulhora, S. Astolfi and C. R. Felix, 1996. Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase produced by *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, pp. 746-752.
- [15] S. Trabelsi, S. B. mabrouk, M. Kriaa, R. Ameri, M. Sahnoun, M. Mezghani and S. Bejar, 2019. The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. *J. Food Biochem.*, 43, e12826.
- [16] J. K. Roy, S. K. Rai and A. K. Mukherjee, 2012. Characterization and application of a detergent-stable alkaline alpha-amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. *Int. J. Biol. Macromol.*, 50, pp. 219-229.

**ABSTRACT**

**Effect of temperature and pH on the production, activity,  
and stability of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* V37**

Doan Van Thuoc and Nguyen Phuc Hung

*Faculty of Biology, Hanoi National University of Education*

The effect of physical parameters such as temperature and pH on the production, activity, and stability of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* V37 was investigated. The results indicated that the optimum culture conditions for enzyme activity were pH 7.0 and 35 °C. The optimum pH and temperature for enzyme activity were 6.0 and 70 °C. The crude enzyme was found to be stable in the pH range of 5.0 to 7.0. The enzyme was stable for 1 h at a temperature from 30 to 80 °C; nearly 100% of enzyme activity remained at temperatures of 30 - 40 °C, and about 34% of original activity remained at a temperature of 80 °C. These features demonstrated that  $\alpha$ -amylase from *B. subtilis* V37 can be applied in many areas such as the food, fermentation, and animal feed industries.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, *Bacillus subtilis*, pH, temperature.