

**NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU CHO VIỆC THU NHẬN  $\alpha$ - AMYLASE  
CHỊU NHIỆT TỪ VI KHUẨN *Bacillus licheniformis***  
**A study on the optimal conditions for recovery of thermostable  $\alpha$ - amylase from *Bacillus  
licheniformis***

*Ngô Xuân Mạnh<sup>1</sup>, Võ Nhân Hậu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Tú<sup>2</sup>*

**SUMMARY**

The present study was aimed to select and recover thermostable  $\alpha$ - amylase from *Bacillus licheniformis*. *Bacillus licheniformis* B56 were selected as the best strain for producing of thermostable  $\alpha$ - amylase. This strain grew well at 37°C on a rice starch medium with a pH of 6.5. The optimal conditions for activity of thermostable  $\alpha$ - amylase from *Bacillus licheniformis* B56 included a temperature of 91.11°C, pH of 6.20, concentration of Ca<sup>++</sup> of 5.02mM.

**Keywords:** enzyme,  $\alpha$  - amylase, thermostable, *Bacillus licheniformis*

**1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Enzyme đóng vai trò rất quan trọng trong ngành công nghệ sinh học hiện đại. Trong số các enzyme được biết,  $\alpha$ - amylase là một trong các enzyme đầu tiên được đưa vào sản xuất công nghiệp và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp dệt, giấy, nông nghiệp... đặc biệt là trong công nghiệp thực phẩm (Robert và Barry; 2002). Nhu cầu sử dụng chế phẩm enzyme này ở nước ta ngày càng cao, đặc biệt là các enzyme  $\alpha$ - amylase chịu nhiệt, trong khi đó sản xuất trong nước vẫn còn nhỏ lẻ, đa số phải nhập của nước ngoài với giá thành cao (Trần Đình Mẫn, 2001). Với phạm vi ứng dụng rộng rãi cũng như lợi ích mà enzyme  $\alpha$ - amylase mang lại, yêu cầu đặt ra cho các nhà nghiên cứu cần làm thế nào sản xuất chế phẩm enzyme này ở qui mô công nghiệp có chất lượng cao, giá thành thấp là vô cùng cấp thiết. Trong số các nguồn thu nhận enzyme như động vật, thực vật, vi sinh vật thì việc thu hồi chế phẩm enzyme từ vi sinh vật tỏ ra là phương pháp ưu việt hơn cả vì vi sinh vật sinh sản nhanh, sinh khối nhỏ nhưng tỷ lệ enzyme trong tế bào lớn. Mặt khác, môi trường dinh dưỡng lại rẻ tiền, dễ kiếm nên quy trình sản xuất chế phẩm enzyme khá dễ dàng, hiệu suất thu hồi cao và ít tốn kém. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu thu được về các điều kiện nuôi cấy, thu nhận enzyme  $\alpha$ - amylase chịu nhiệt từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* và các điều kiện tối ưu cho sự hoạt động của enzyme này.

**2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

Vật liệu nghiên cứu gồm 2 chủng *Bacillus licheniformis* (B56 và ATTC 27811) trong bộ sưu tập giống của Viện công nghệ thực phẩm Hà Nội và Enzyme  $\alpha$ - amylase chịu nhiệt thu hồi được từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*

Các phương pháp phân tích vi sinh được làm theo mô tả của Nguyễn Lâm Dũng (1983) và Vũ Hồng Thắng (1998). Sử dụng phương pháp thử nhanh trên iod (Tống Kim Thuận và cs., 2003) để tuyển chọn chủng *Bacillus licheniformis* có khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ - amylase chịu nhiệt có hoạt lực cao. Để thu nhận enzyme ngoại bào, canh trường được ly tâm với tốc độ 500 vòng/phút, bỏ cặn thu hồi dịch trong, dịch enzyme được bảo quản ở 4°C (Carlos và Meire, 2000). Xác định hoạt tính của enzyme theo phương pháp dùng bằng HCl (Tống Kim Thuận và cs., 2003). Sử dụng phương pháp quy hoạch hoá thực nghiệm (Lê Đức Ngọc, 1998).

Môi trường sử dụng gồm môi trường giữ giống LBG: cao nấm men: 5g; natri clorua (NaCl): 10g; glucose: 10g; triptone: 10g; agar: 20g, chỉnh đến pH=7 – 7,2, thêm nước cất đến 1 lít, hấp ở 121°C trong 30 phút. Môi trường thử hoạt tính LB – Agar: 1% tinh bột tan; bacto- tripton:1%; cao men: 0,5%; agar: 2%; tinh bột tan: 1%. MT\*: môi trường LB agar bỏ agar. MT1: môi trường LB agar bỏ agar, cơ chất tinh bột tan được thay bằng bột gạo (3%). MT2: môi trường LB agar bỏ agar, cơ chất tinh bột tan

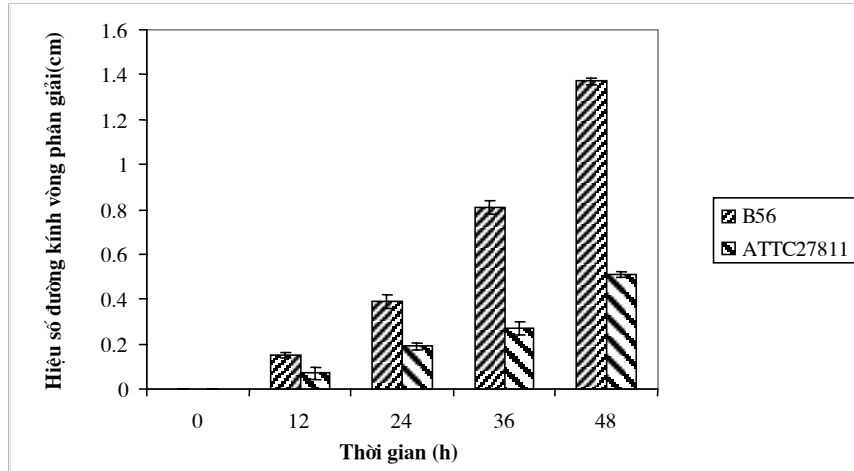
được thay bằng tinh bột sắn (3%). MT3: môi trường LB agar bỏ agar, cơ chất tinh bột tan được thay bằng tinh bột ngô (3%).

Số liệu được xử lý theo chương trình MICROSOFT EXCEL và IRRISTAT.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Khả năng sinh tổng hợp $\alpha$ - amylase của hai chủng *Bacillus licheniformis*

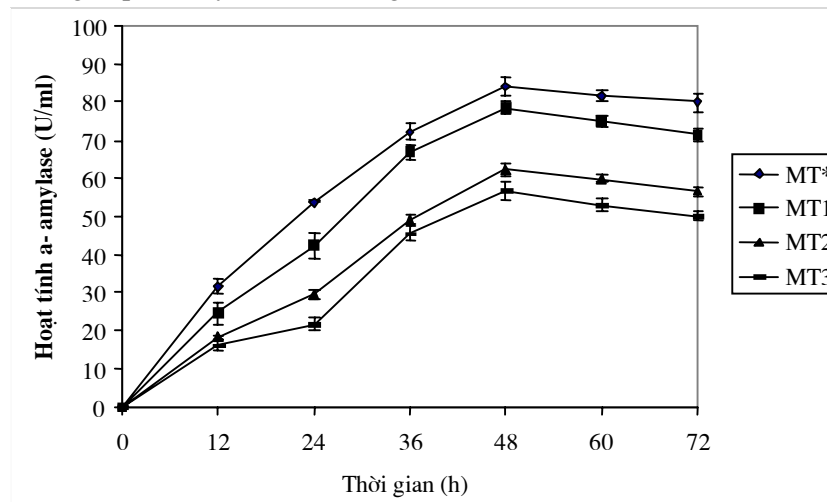
Sau 48h nuôi cấy, vi khuẩn có khả năng sinh enzyme nhiều nhất, hiệu số đường kính vòng phân giải tinh bột là 1,38 cm. B56 có khả năng sinh tổng hợp enzyme  $\alpha$ - amylase cao hơn hẳn so với chủng ATTC27811 (đồ thị 1). Vì vậy, B56 được tiếp tục sử dụng để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



Đồ thị 1. Hiệu số đường kính vòng phân giải tinh bột của hai chủng *Bacillus licheniformis*

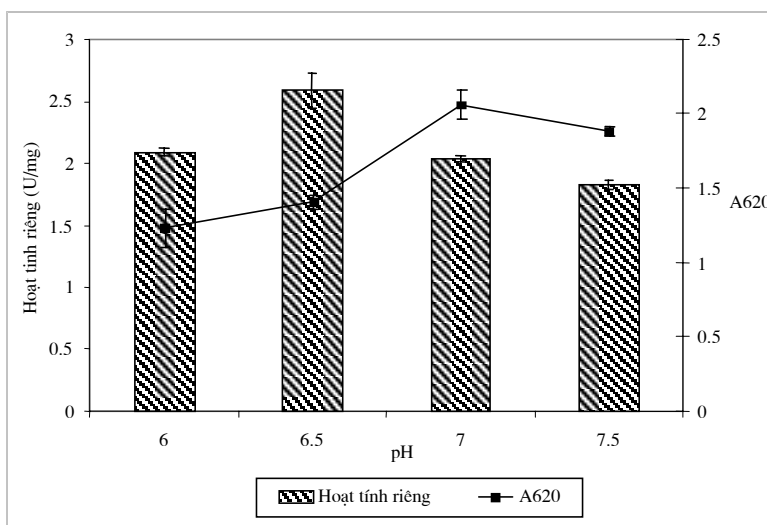
#### 3.2. Chọn lựa các yếu tố của môi trường lên men

Qua những nghiên cứu trước đây (Hwang K. Y, 1997; Trần Đình Mấn, 2001), tinh bột tan là nguồn cơ chất cảm ứng thích hợp, tuy nhiên việc sử dụng nguồn cơ chất này không mang lại hiệu quả kinh tế vì giá thành cao. Vì vậy cần tìm một nguồn nguyên liệu thay thế tinh bột tan có thể thu hồi được  $\alpha$ - amylase có chất lượng không kém mà giá thành lại thấp hơn. Sau 48h nuôi cấy, hoạt tính của enzyme thu được lớn nhất. Môi trường chứa tinh bột tan (MT\*) vẫn là môi trường thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và sinh tổng hợp  $\alpha$ - amylase của chủng B56.



Đồ thị 2. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất đến hoạt tính của enzyme  $\alpha$ - amylase

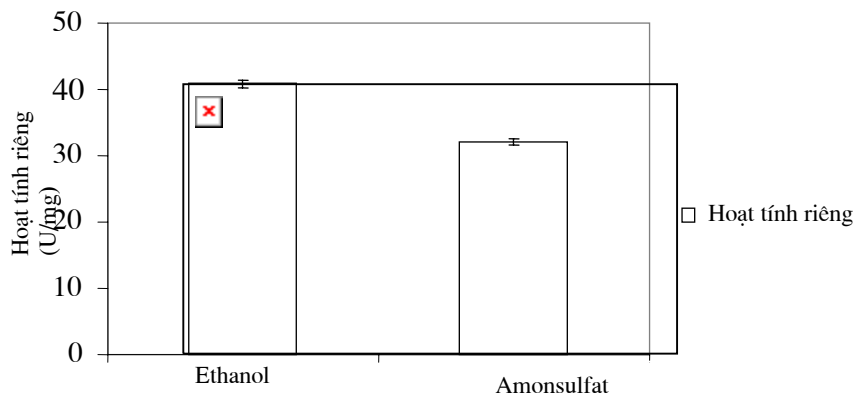
Khả năng phát triển và sinh tổng hợp enzyme tại môi trường MT1 chỉ kém hơn so với môi trường MT\* còn cao hơn hẳn so với môi trường MT2, MT3. Vì vậy, môi trường MT1 được chọn để thay thế cho môi trường MT\*. Thời gian lên men thích hợp nhất là 48h sau khi cấy vì sau 48h, hoạt tính amylase không tăng thậm chí còn giảm (đồ thị 2). Bên cạnh nhiệt độ, thành phần pH cũng là một yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến sự sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp enzyme của chủng B56. Trong quá trình lên men, các sản phẩm của quá trình trao đổi chất có thể làm thay đổi pH của môi trường, làm ảnh hưởng tới hoạt động của vi sinh vật. Chính vì vậy việc lựa chọn giá trị pH tối ưu và duy trì giá trị này trong suốt quá trình lên men là rất quan trọng đối với việc nuôi cấy để thu hồi enzyme  $\alpha$ - amylase. Ở pH = 7,0 sinh khối đạt cao nhất, tuy nhiên hoạt tính riêng của  $\alpha$ - amylase đạt cao nhất ở pH = 6,5 mặc dù ở pH = 7,0 vi khuẩn phát triển mạnh hơn, có nồng độ protein cao hơn. Vì vậy để thu hồi enzyme có hoạt tính cao, pH= 6,5 được chọn là pH thích hợp nhất cho môi trường nuôi cấy.



**Đồ thị 3.** Ảnh hưởng của pH môi trường tới sự phát triển sinh khối và hoạt tính riêng của  $\alpha$ - amylase

### 3.3. Thu hồi $\alpha$ -amylase chịu

nhệt từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis*

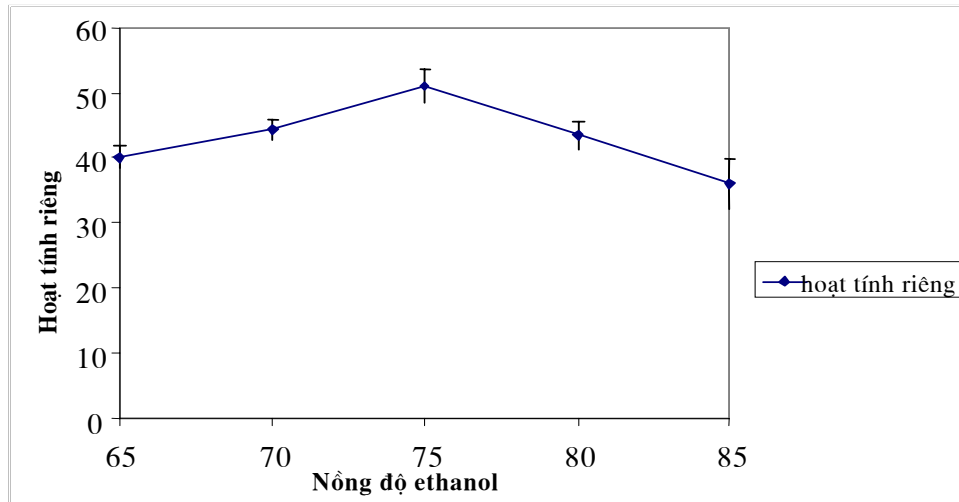


**Đồ thị 4.** Ảnh hưởng của loại dung môi tới hoạt tính riêng của  $\alpha$ - amylase

### Loại dung môi

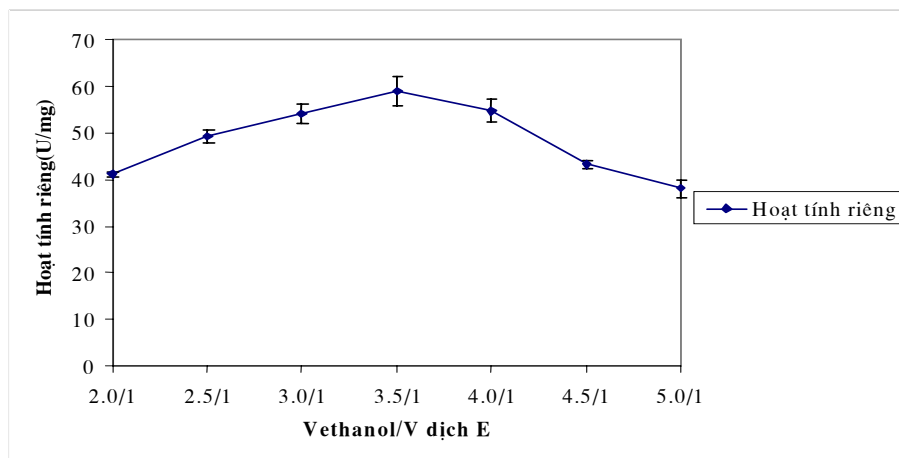
Sử dụng chất kết tủa bằng ethanol, enzyme có hoạt tính cao hơn khi kết tủa bằng amonsulfat (40,48 U/mg so với 32,47 U/mg). Kết luận này khác với kết quả của Giang Thế Bính (2000), sử dụng amonsulfat để kết tủa enzyme  $\beta$  – glucosidase. Điều này cho thấy, các enzyme khác nhau thích hợp với các chất kết tủa khác nhau.

Muốn thu được chế phẩm enzyme khô có chất lượng cao, sau khi đã chọn lựa được dung môi thích hợp, việc xác định nồng độ của dung môi thu hồi cũng rất quan trọng, nó quyết định hiệu suất thu hồi, chất lượng của enzyme và giá thành sản phẩm.



Đồ thị 5. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hoạt tính riêng của  $\alpha$  - amylase

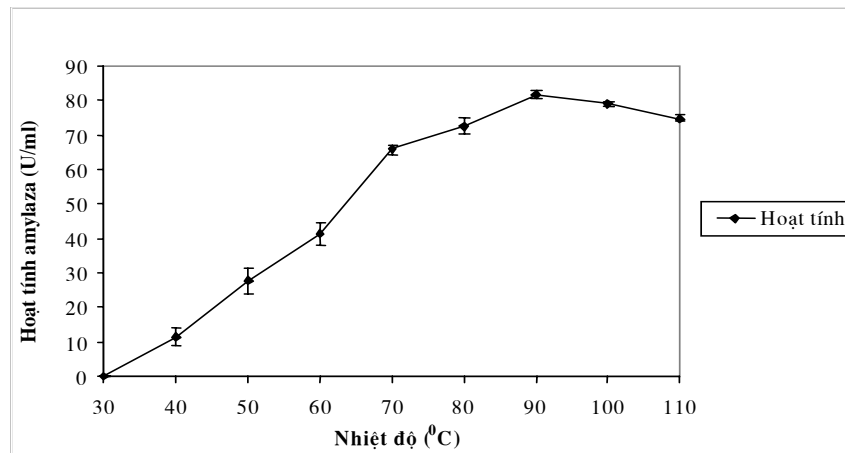
Khi kết tủa bởi ethanol ở nồng độ 75%, hoạt tính riêng của enzyme thu được là lớn nhất (51,06 U/mg). Ở nồng độ ethanol 85%, hoạt tính riêng của enzyme thu được thấp nhất (36,09 U/mg). Kết quả cho thấy khi tăng đến một giới hạn, nồng độ cồn sẽ có tác động và làm giảm hoạt tính của enzyme (đồ thị 5). Tỷ lệ giữa dung môi và dịch enzyme là một chỉ tiêu cũng rất quan trọng. Nếu thiếu dung môi sẽ không thu hồi được hết enzyme có trong dung dịch. Ở các tỷ lệ ethanol/dịch enzyme 3/1; 3.5/1 và 4/1, hoạt tính riêng của enzyme thu hồi được là tương đương nhau và cao hơn các tỷ lệ khác (sai số được tính theo chương trình Microsoft Excel). Tuy nhiên, để giảm sự tổn thất ethanol, tỷ lệ ethanol/dịch enzyme thích hợp nhất là 3/1 (đồ thị 6).



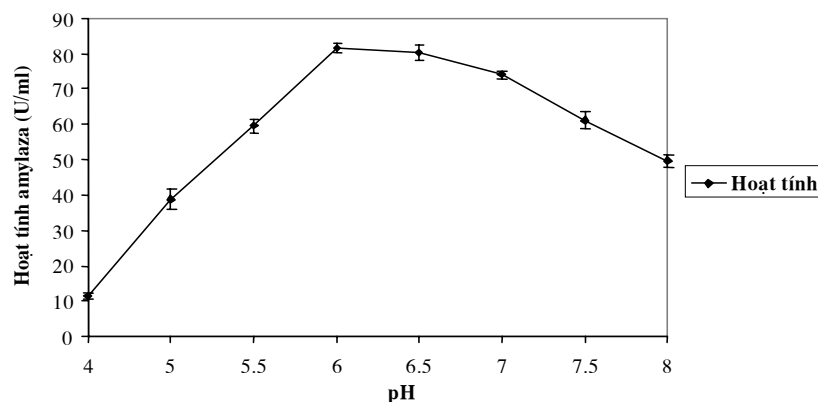
Đồ thị 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol/dịch enzyme tới hoạt tính riêng của enzyme

### 3.4. Tối ưu hoá điều kiện hoạt động của enzyme $\alpha$ - amylase

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng tới hoạt tính của enzyme, đặc biệt là với  $\alpha$ -amylase bền nhiệt thì việc nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lại càng quan trọng (Heinen và Lauwers, 1976; Hwang và cs, 1997). Nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của  $\alpha$ - amylase thu được từ chủng *Bacillus licheniformis* B56 là 90°C. Khi nhiệt độ tăng từ 30 - 90°C, hoạt tính của enzyme tăng theo, nhưng khi nhiệt độ tăng đến trên 90°C, hoạt tính của enzyme không tăng mà còn có chiều hướng giảm (đồ thị 7). Cùng với nhiệt độ, pH là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới phản ứng của enzyme vì nó ảnh hưởng tới mức độ ion hóa cơ chất - enzyme và ảnh hưởng đến độ bền protein của enzyme (Trần Đình Mẫn, 2001). pH tối ưu cho phản ứng của enzyme  $\alpha$ - amylase là 6,0- 6,5 (ở hai giá trị pH này hoạt tính của enzyme là không khác nhau). Khi giá trị pH tăng từ 7- 8 và giảm từ 5,5 xuống 4,0 hoạt tính của enzyme giảm. Nhưng khi pH giảm từ 5.5 xuống 4.0, hoạt tính của enzyme giảm mạnh hơn rất nhiều. Điều này có thể giải thích do enzyme  $\alpha$ - amylase có thể chịu được môi trường phản ứng kiềm tốt hơn so với môi trường acid (Hwang K. Y., và cs., 1997).

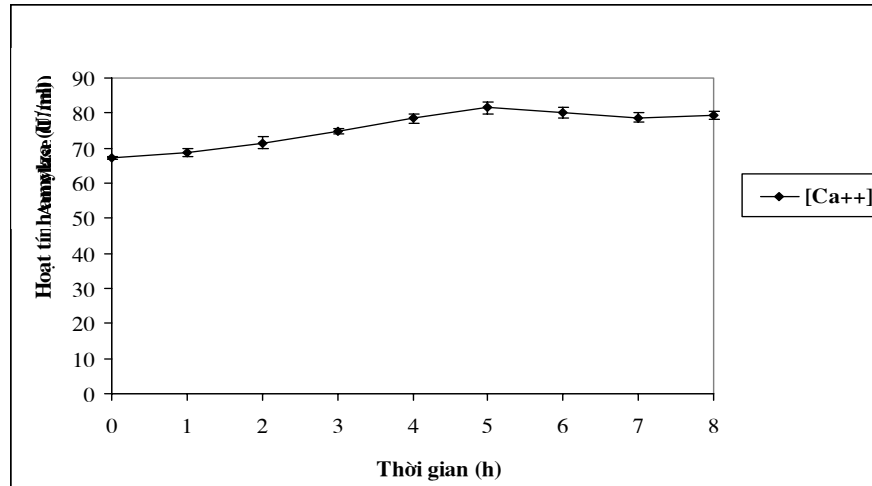


Đồ thị 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính của enzyme  $\alpha$  - amylase



Đồ thị 8. Ảnh hưởng của pH tới hoạt tính của enzyme  $\alpha$  - amylase

Theo những nghiên cứu của Hwang và cs., 1997; Heinen và Lauwers, 1976,  $\alpha$ - amylase là một metalloenzyme.  $\text{Ca}^{++}$  có tác dụng làm tăng độ bền nhiệt của enzyme này. Việc bổ sung  $\text{Ca}^{++}$  vào dịch enzyme sẽ làm tăng hoạt tính của enzyme khi hoạt động ở nhiệt độ cao. Khi nồng độ  $\text{Ca}^{++}$  bổ sung tăng đến 5mM, hoạt tính của enzyme  $\alpha$ - amylase cao nhất. Nồng độ  $\text{Ca}^{++}$  tiếp tục tăng thì hoạt tính của enzyme không tăng. Để tiết kiệm lượng  $\text{Ca}^{++}$ , nồng độ  $\text{Ca}^{++}$  5mM được lựa chọn bổ sung (đồ thị 9).



**Đồ thị 9. Ảnh hưởng của nồng độ  $Ca^{++}$  tới hoạt tính enzyme**

Các kết quả đã khảo sát được tiến hành tối ưu hoá bằng quy hoạch thực nghiệm nhằm tìm ra điểm tối ưu nhất cho hoạt động của enzyme  $\alpha$ - amylase khi các yếu tố nhiệt độ, pH, nồng độ  $Ca^{++}$  bổ sung tương tác lẫn nhau. Từ các kết quả thu được tại phần 4.1, các mức yếu tố của môi trường được thiết lập tại bảng 1

**Bảng 1. Các mức yếu tố của môi trường**

Mức yếu tố	Nhiệt độ ( $^{\circ}C$ )	PH	$[Ca^{++}]$ (mM)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$
Mức trên (+)	110	8	8
Mức dưới (-)	50	4	2
Mức gốc (0)	80	6	5
Điểm sao (+1,215)	116,5	8,4	8,6
Điểm sao (-1,215)	43,5	3,6	1,4

**Bảng 2. Ma trận thực nghiệm**

Thí nghiệm	Biến mã hoá			Thí nghiệm song song		Y	$S_y^2$
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$	$Y_2$		
1	+	+	+	65,11	66,24	65,68	0,64
2	-	+	+	43,16	43,36	43,15	0,02
3	+	-	+	65,31	64,13	64,72	0,69
4	-	-	+	36,12	34,51	35,32	1,29
5	+	+	-	64,13	63,24	63,69	0,39
6	-	+	-	41,73	41,31	41,52	0,09
7	+	-	-	67,47	67,21	67,34	0,03
8	-	-	-	34,51	35,71	35,11	0,72
9	+1,215	0	0	68,22	69,30	68,76	0,58
10	-1,215	0	0	36,13	34,79	35,46	0,90
11	0	+1,215	0	77,21	76,82	77,02	0,08
12	0	-1,215	0	71,29	72,48	71,89	0,71
13	0	0	+1,215	74,09	73,31	73,70	0,30
14	0	0	-1,215	72,22	73,49	72,86	0,81
15	0	0	0	81,23	82,31	81,77	0,58

Tính đồng nhất phương sai của thông số tối ưu được kiểm tra bằng cách áp dụng chuẩn Kohren

$$G_0 = \frac{S_{y \max}^2}{\sum S_y^2} = \frac{1,29}{7,85} = 0,165$$

Chuẩn Kohren được tra ở mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$  và bậc tự do  $f = 1$  (tra bảng 6 phân vị phân bố Kohren  $G_{p-1}$  với  $p = 0,05$ )

$$G_b = 0,471 \rightarrow G_0 < G_b$$

Như vậy là phương sai đồng nhất, tức là các thí nghiệm được tiến hành với cùng một sai số như nhau.

Dùng chuẩn t- students, được tra ở mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$  và bậc tự do  $f = 15 \times (2-1) = 15$

$$t = 2,131$$

Sau đó lập bảng kiểm tra tính có nghĩa của các hệ số hồi quy

**Bảng 3. Hệ số hồi quy**

Hệ số	$\sum X_{iu}^2$	$S_b^2$	$t_b, S_b$	So sánh	Kết luận
$b_0=81,131$	15	$0,523/(15 \times 2)=0,017$	0,281	$81,131 > 0,281$	Có nghĩa
$b_1=13,395$	10,952	$0,523/(10,952 \times 2)=0,051$	0,329	$13,395 > 0,329$	Có nghĩa
$b_2=1,634$	10,952	$0,523/(10,952 \times 2)=0,051$	0,329	$1,634 > 0,329$	Có nghĩa
$b_3=0,241$	10,952	$0,523/(10,952 \times 2)=0,051$	0,329	$0,214 < 0,329$	Không có nghĩa
$b_{12}=-2,132$	8	$0,523/(8 \times 2)=0,033$	0,358	$2,132 > 0,358$	Có nghĩa
$b_{23}=0,768$	8	$0,523/(8 \times 2)=0,033$	0,358	$0,768 > 0,358$	Có nghĩa
$b_{13}=-0,322$	8	$0,523/(8 \times 2)=0,033$	0,358	$0,322 < 0,358$	Không có nghĩa
$b_{11}=-19,527$	4,361	$0,523/(4,361 \times 2)=0,056$	0,522	$19,527 > 0,522$	Có nghĩa
$b_{22}=-4,401$	4,361	$0,523/(4,361 \times 2)=0,056$	0,522	$4,401 > 0,522$	Có nghĩa
$b_{33}=5,195$	4,361	$0,523/(4,361 \times 2)=0,056$	0,522	$5,195 > 0,522$	Có nghĩa

Bảng 3 cho thấy các hệ số  $b_3, b_{13}$  không có nghĩa và bị loại khỏi mô hình, do vậy hàm mục tiêu có dạng:

$$Y = 81,131 + 13,395 X_1 + 1,634 X_2 - 2,132 X_1 X_2 + 0,768 X_2 X_3 - 19,527 X_1^2 - 4,401 X_2^2 - 5,195 X_3^2$$

Tính thích ứng của mô hình được thể hiện ở bảng 4

**Bảng 4. Tính thích ứng của mô hình**

Thí nghiệm	Biến mã hoá			$\bar{Y}_n$	Y	$\Delta = Y_n - Y$	$\Delta^2$
	$X_1$	$X_2$	$X_3$				
1	+	+	+	65,675	65,673	0,002	0,00
2	-	+	+	43,260	43,147	0,113	0,013
3	+	-	+	64,720	65,133	-0,413	0,171
4	-	-	+	35,315	34,079	1,235	1,527
5	+	+	-	63,685	64,137	-0,451	0,204
6	-	+	-	41,520	41,610	-0,090	0,008
7	+	-	-	67,340	66,669	0,670	0,450
8	-	-	-	35,110	35,616	-0,506	0,256
9	+1,215	0	0	68,760	68,580	0,179	0,032
10	-1,215	0	0	35,460	36,030	-0,570	0,325
11	0	+1,215	0	77,015	76,619	0,396	0,157
12	0	-1,215	0	71,885	72,649	-0,764	0,584
13	0	0	+1,215	73,700	73,462	0,237	0,057
14	0	0	-1,215	72,855	72,462	-0,607	0,369
15	0	0	0	81,770	81,131	0,639	0,408

Phương sai thích ứng được tính

$$S_{tu}^2 = \frac{1}{N-K} \sum (\bar{y}_u - \hat{y}_u)^2 = \frac{1}{15-8} 4,559 = 0,651$$

Trong đó:

N: Số thí nghiệm

K: Số hệ số có nghĩa của phương trình hồi quy

Để kiểm tra tính thích ứng của mô hình ta dùng chuẩn Fisher

$$F_0 = \frac{n.S_{tu}^2}{S_y^2} = \frac{2.0,651}{0,523} = 2,489$$

Chuẩn Fisher được tra bảng ở mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$  với bậc tự do:

$$f_1 = N - K = 15 - 8 = 7$$

$$f_2 = N(n-1) = 15 \times (2-1) = 15$$

Ta có  $F_{7,15} = 2,9$

Như vậy  $F_0 < F_b$  có nghĩa là mô hình trên tương thích với thực nghiệm ở mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$

Từ mô hình hoạt tính của enzyme  $\alpha$ - amylase, các điểm tối ưu được tìm bằng cách đạo hàm Y theo lần lượt các biến được một hệ 3 phương trình bậc một 3 biến số:

$$Y'(X) = 0 = 13,395 - 2,132 X_2 - 0,322 X_3 - 2 \times 19,527 X_1$$

$$Y'(X) = 0 = 1,634 - 2,132 X_1 + 0,768 X_3 - 2 \times 4,401 X_2$$

$$Y'(X) = 0 = 0,768 X_2 - 2 \times 5,195 X_3$$

Giải hệ phương trình, thay vào công thức tính toán được các điều kiện tối ưu cho hoạt động của  $\alpha$ - amylase: nhiệt độ 91,11°C, pH 6,20, nồng độ  $Ca^{++}$  5,02mM,

#### 4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* B56 có khả năng sinh tổng hợp  $\alpha$ - amylase chịu nhiệt có hoạt lực cao. Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển và sinh tổng hợp enzyme  $\alpha$ - amylase của chủng B56: môi trường cơ chất tinh bột gạo, nhiệt độ nuôi cấy 37°C, pH môi trường 6,5, thời gian lên men 48h. Dung môi thích hợp nhất để thu hồi enzyme: ethanol 75%, tỷ lệ ethanol/dịch enzyme: 3/1. Mô hình tác động của các yếu tố nhiệt độ, pH, nồng độ  $Ca^{++}$ :

$$Y = 81,131 + 13,395 X_1 + 1,634 X_2 - 2,132 X_1 X_2 + 0,768 X_2 X_3 - 19,527 X_1^2 - 4,401 X_2^2 - 5,195 X_3^2$$

Các điều kiện tối ưu cho sự hoạt động của enzyme  $\alpha$ - amylase thu được từ chủng *Bacillus licheniformis* B56: nhiệt độ 91,11°C, pH 6,20, nồng độ  $Ca^{++}$  5,02mM.

#### Tài liệu tham khảo

- Giang Thế Bình, Hoàng Thị Lệ Hằng, Đặng Kim Tuyền, Lê Năng Công (2000). Thu nhận và ứng dụng  $\beta$  – glucosidase để khử vị đắng của nước mơ. Các công trình nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học và công nghệ thực phẩm giai đoạn 1996-2000. Nxb Khoa học và kỹ thuật, tr. 136-144.
- Carlos E. T., Meire L. M., (2000), Culture condition for the production of thermostable amylase by *Bacillus*. sp., *Brazilian Journal of microbiology*.
- Nguyễn Lân Dũng (1983). *Thực tập vi sinh vật học*. Nxb Đại học và trung học chuyên nghiệp, tr. 15-62, 145-188.
- Heinen W., Lauwers A. M., (1976), Amylase activity and Stability at high and low temperature depending on calcium and other divalent cations, *Experientia Suppl.*, 26, tr. 77-89.
- Hwang K. Y., Song H. K., Change C., Lee J., Lee S. Y., Kim K. K., Choe S., Swee R. M., Sub. S.W., (1997). Crystal structure of thermostable  $\alpha$  – amylase from *Bacillus licheniformis*, *Mol. Cell.*, tr. 251-258.
- Trần Đình Mấn (2001). Nghiên cứu thu nhận  $\alpha$  – amylase bền nhiệt bằng chủng *Bacillus subtilis* tái tổ hợp mang gen  $\alpha$  – amylase của vi khuẩn phân lập ở Việt Nam. *Luận án tiến sĩ kỹ thuật*, trường ĐH Bách Khoa Hà nội, tr. 1 – 45.
- Lê Đức Ngọc (1998). *Xử lý số liệu và kế hoạch hoá thực nghiệm*, Đại học khoa học tự nhiên. Đại học Quốc gia Hà nội.
- Robert J. Whitehurst, Barry A. Law, (2002). *Enzyme in food technology*, Sheffield Academic Press, tr. 1-18.
- Vũ Hồng Thắng (1998). Vai trò của nhóm vi khuẩn lactic trong quá trình chế biến nem chua, *Luận văn tốt nghiệp thạc sỹ*, Trường ĐHBK Hà Nội tr. 32-49.
- Tống Kim Thuần, Trần Thị Thiều Hương, Trương Nam Hải (2003). Amylase phân giải tinh bột sống của một số chủng vi khuẩn phân lập được ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, tr. 14-22.