Journal of Applied Microbiology in Food Industry (Volume 11 – Issue 4) … Pages 121 to 138

Kinetic evaluation and optimization of amylase enzyme production time by *Bacillus licheniformis* in submerged fermentation process in medium containing corn starch, glucose and maltose substrates

Fatemeh Sadeghi[*1], Zahra Mehri Khansari[1], MojtabaYazdani[1]

[1] Department of Biology, Ar.C., Islamic Azad University, Arak, Iran

Received Date:2025.09.08 Accepted Date:2025.10.22

Abstract

Enzymes are essential in food, pharmaceutical, and bioenergy industries, with amylase playing a crucial role by hydrolysing starch into simpler sugars. Bacillus licheniformis is a notable source for producing thermostable and pH-tolerant amylase. This study evaluated the effect of three substrates corn starch, maltose, and glucose on amylase production by *B. licheniformis* under submerged fermentation. Enzyme activity was measured using the DNS method with absorbance at 540 nm. Results revealed that corn starch led to the highest amylase activity (150 U/mL) at 36 hours, while maltose and glucose yielded significantly lower activities. Statistical analysis using ANOVA and Tukey tests confirmed significant differences ($p < 0.05$) among substrates. Additionally, the strain's biochemical traits, such as motility and endospore formation, indicated strong environmental resistance. These findings highlight the importance of substrate selection for optimizing enzyme yield. Furthermore, submerged fermentation proved to be an effective and economical production method. This study contributes valuable insights into industrial enzyme production using *B. licheniformis* and supports further development of fermentation processes for enhanced amylase output.

Keywords: amylase, *Bacillus licheniformis*, submerged fermentation, corn starch, industrial enzyme

.

* fatemesadeghi0828@gmail.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

Kinetic evaluation and optimization of amylase enzyme production time by *Bacillus licheniformis* in submerged fermentation process in medium containing corn starch, glucose and maltose substrates

EXTENDED ABSTRACT

Enzymes, biological catalytic proteins, play an important role in metabolic reactions and are widely used in various industries due to their high speed, reaction specificity, biodegradability, and stability. Amylase, one of the most important industrial enzymes, converts starch polysaccharides into simpler sugars such as maltose and glucose. Alpha, beta, and gamma amylase types are used in various applications. Due to their activity under different temperature and pH conditions, amylase is applied in the food, textile, pharmaceutical, biosensors, and bioethanol production industries. Industrial production of amylase is mainly carried out through microbial fermentation, which is an efficient and economical method.

Submerged fermentation (SmF) is one of the two main methods of enzyme production, in which microorganisms grow in a liquid medium. This method allows precise control of culture parameters such as temperature, pH, and oxygen, and is of great importance in industrial enzyme production due to its scalability and automation.

Bacillus licheniformis is a thermophilic species and an important enzyme producer of the genus Bacillus. It is found in various environments such as soil, hot springs, and industrial waste. This gram-positive, rod-shaped, facultative aerobic, and endosporogenic bacterium is widely used in the detergent, food, pharmaceutical, and textile industries due to its tolerance to high temperature and pH and production of resistant enzymes. Native strains of Bacillus licheniformis in Iran also have a high ability to produce resistant enzymes under harsh conditions, making them suitable for industrial applications.

Despite the importance of industrial amylase production, optimizing culture conditions and selecting appropriate substrates remain challenging. Understanding the effect of carbon sources and controlling fermentation conditions on an industrial scale is limited, and production costs are high; therefore, further research is needed. Native strains of Bacillus licheniformis have high potential for amylase production by tolerating harsh conditions. This study aims to investigate the effect of different substrates in submerged fermentation to improve production efficiency and develop industrial processes.

The aim of this study is to investigate the effect of three substrates—corn starch, maltose, and glucose—on amylase production by Bacillus licheniformis PTCC 1721 under submerged fermentation conditions. This research was conducted to determine the best carbon source to increase enzyme production efficiency and optimize harvest time so that its results can be utilized in the development of industrial processes.

The Bacillus licheniformis PTCC 1721 strain was obtained from the Iranian Microorganism Bank and cultured in nutrient agar and broth media. Each of the three substrates—corn starch, maltose, and glucose—was added to the sterile culture medium at a rate of 1%. Fermentation was carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of culture medium and 5% bacterial inoculum volume, at a temperature of 37 °C for 48 hours with gentle shaking. Sampling was performed at 12, 24, 36, and 48 hours to determine amylase activity.

Amylase activity was measured by the DNS colorimetric method according to Miller's method. After centrifugation, the supernatant was used as the enzyme source, and the amount of starch hydrolysis was determined by measuring the color change at 540 nm.

The results showed that the type of substrate has a significant effect on amylase production. The highest activity was observed with corn starch (150 U/mL), while maltose and glucose showed 110 and 75 U/mL, respectively. Analysis of variance (ANOVA) test showed significant differences between substrates ($p < 0.05$). Increased amylase activity is related to the molecular complexity of the substrate, and more complex polysaccharides such as starch stimulate enzyme production to a greater extent.

Time-dependent amylase production in corn starch medium showed that the activity increased from 50 U/mL at 12 hours to 150 U/mL at 36 hours, which was statistically significant ($p < 0.05$). After 36 hours, the activity stabilized and remained steady until 48 hours, possibly due to resource saturation or accumulation of inhibitory metabolites.

Microscopic and biochemical studies of the Bacillus licheniformis strain showed that this bacterium is a Gram-positive, motile, and endosporogenic bacillus. Catalase positive, oxidase negative, and starch and gelatin hydrolysis tests confirmed the metabolic capacities of the strain. Its ability to grow at temperatures above 50 to 55 °C indicates its adaptability and resistance to harsh environmental conditions.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

According to the findings, optimizing fermentation conditions—including temperature, pH, oxygen concentration, and inoculation rate—can improve amylase production and determine the optimal harvest time. Using genetic engineering techniques to modify the Bacillus licheniformis strain and increase the expression of genes related to amylase production and stress resistance can also significantly enhance production efficiency.

The use of cheap and accessible substrates, such as agricultural and industrial wastes as carbon sources, is effective in reducing production costs and increasing the environmental sustainability of the process. Moreover, the development of large-scale fermentation systems with advanced bioreactor designs and precise control of process parameters allows for sustainable and economical industrial production of amylase. Additionally, combined studies of amylase production with related enzymes such as glucose oxidase or cellulase can lead to new industrial applications.

Overall, the results of this research showed that Bacillus licheniformis has a high ability to produce amylase and that corn starch is the best substrate to increase production efficiency. Optimization of harvest time also helps increase process efficiency. These findings can be effective in developing industrial amylase production processes using environmentally and economically sustainable resources, especially in the food, textile, pharmaceutical, and biotechnology industries. Furthermore, the importance of substrate selection and optimization of submerged fermentation conditions has been highlighted and can serve as a basis for future research to improve enzyme performance and reduce production costs in the industry.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

ارزیابی سینتیکی و بهینه‌سازی زمان تولید آنزیم آمیلاز توسط *Bacillus licheniformis* در فرآیند تخمیر غوطه‌ور در محیط حاوی سوبستراهای نشاسته ذرت، گلوکز و مالتوز

فاطمه صادقی[*۱]، زهرا مهری خوانساری[۱]، مجتبی یزدانی[۱]

[*۱] گروه علوم و فناوری های زیستی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۴/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش:۱۴۰۴/۰۷/۳۰

چکیده

آنزیم‌ها نقش کلیدی در صنایع غذایی، داروسازی و بیوانرژی دارند. آمیلاز به عنوان آنزیم هیدرولیتیکی، توانایی تجزیه پلی‌ساکاریدهای نشاسته به قندهای ساده‌تر را دارد و کاربردهای صنعتی زیادی دارد. سویه بومی *Bacillus licheniformis* منبع مهمی برای تولید آمیلاز با پایداری بالا در دما و pH مختلف محسوب می‌شود. در این مطالعه، تأثیر سه سوبسترای نشاسته ذرت، مالتوز و گلوکز بر تولید آمیلاز توسط این سویه در شرایط تخمیر غوطه‌ور بررسی شد. فعالیت آنزیم با روش رنگ‌سنجی DNS و اندازه‌گیری جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید. نتایج نشان داد استفاده از نشاسته ذرت به عنوان سوبسترا، بیشترین میزان فعالیت آمیلاز (۱۵۰ U/mL) را در ۳۶ h تولید کرد، در حالی که مالتوز و گلوکز فعالیت‌های کمتری داشتند. آزمون‌های آماری ANOVA و توکی تفاوت معنادار ($p < 0.05$) بین سطوح فعالیت آمیلاز در حضور سوبستراهای مختلف را تأیید کردند. ویژگی‌های بیوشیمیایی سویه شامل حرکت‌پذیری و تولید اندوسپور، مقاومت و توانایی بالای آن را در شرایط محیطی مختلف نشان داد. این مطالعه اهمیت انتخاب سوبسترای مناسب برای بهینه‌سازی تولید آنزیم و تخمیر غوطه‌ور را به عنوان روشی اقتصادی و مؤثر تأیید می‌کند.

کلمات کلیدی: آمیلاز، *Bacillus licheniformis*، تخمیر غوطه‌ور، نشاسته ذرت، آنزیم صنعتی

* fatemesadeghi0828@gmail.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

مقدمه

آنزیم‌ها پروتئین‌های کاتالیزوری زیستی با سرعت بالا، پایدار، اختصاصیت واکنشی و زیست‌تخریب‌پذیر در فرایندهای متابولیکی هستند (۳-۱). در صنایع مختلف به منظور بهبود کیفیت و افزایش بازده تولید به کار می‌روند. به‌عنوان مثال آمیلازها برای تجزیه نشاسته، پروتئازها در فرآوری گوشت و پنیر، و لاکتاز در محصولات لبنی، سلولاز در صنعت نساجی و در صنایع دارویی، تشخیص‌های پزشکی، همچنین در زیست‌فناوری، تصفیه زیستی و بازیافت مواد آلی اهمیت دارند (۶-۴).

آمیلاز[1] به عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی و صنعتی شناخته می‌شود که پلی‌ساکارید نشاسته را به قندهای ساده‌تر مانند مالتوز و گلوکز هیدرولیز می‌کند (۸). این آنزیم شامل سه نوع اصلی آلفا-آمیلاز، بتا-آمیلاز و گاما-آمیلاز (گلوکوآمیلاز) [2]می شود (۴، ۸-۹). آنزیم آمیلاز توانایی فعالیت در گستره وسیعی از دما وpH را دارد بنابراین در صنایع متنوعی مانند صنایع غذایی، نساجی و همچنین در صنایع دارویی-پزشکی و حسگرهای زیستی[3] و تجزیه زیست‌توده‌های گیاهی به قندهای قابل تخمیر برای تولید بیواتانول[4] کاربرد دارد (۱۰ و ۱۱).

آنزیم آمیلاز در صنایع تخمیری نقش کلیدی دارد و موجب افزایش بازده تولید محصولات مختلفی می‌شود. صنایع تخمیری، فرآیندهای بیوتکنولوژیکی هستند که با استفاده از میکروارگانیسم‌ها تحت شرایط کنترل شده، محصولات متنوعی شامل مواد غذایی، دارویی، زیستی و انرژی‌های تجدیدپذیر تولید می‌کنند (۱۲ و ۱۳). این فرآیندها باعث کاهش هزینه‌ها، افزایش بازده تولید و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی شده و به عنوان روشی پایدار در بیوتکنولوژی شناخته می‌شوند (۱۳ و ۱۴).

به طور کلی دو نوع روش اصلی تخمیر وجود دارد: تخمیر غوطه‌ور (SmF[5]) که در این روش، میکروارگانیسم‌ها در یک محیط مایع مغذی رشد می‌کنند و محصولات خود را تولید می‌کنند. تخمیر در بستر جامد (SSF[6])که در این روش، میکروارگانیسم‌ها روی مواد جامد یا نیمه‌جامد (مانند ضایعات کشاورزی) رشد می‌کنند که رطوبت بسیار کمی دارد. تخمیر غوطه‌ور به دلیل وجود محیط مایع، امکان کنترل دقیق‌تر پارامترهای کشت مانند دما، pH و اکسیژن سبب افزایش بازده تولید می‌شود (۹) و از طرفی محیط مایع امکان دسترسی بهتر به مواد مغذی و دفع متابولیت‌های سمی در نتیجه افزایش سرعت رشد میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کند و به همین دلیل در تولید صنعتی آنزیم‌ها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین این روش مقیاس‌پذیری مناسبی دارد و قابلیت اتوماسیون در راکتورهای زیستی[7] را داراست (۱۰). از همه مهم تر اینکه این روش سازگاری با میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی را دارد به این ترتیب انعطاف‌پذیری زیادی در نوع میکروارگانیسم مصرفی نشان می دهد.

باسیلوس لیکنی فورمیس[8] یکی از مهم‌ترین گونه‌های ترموفیل و آنزیم‌ساز از جنس *باسیلوس*[9] ها است که در خاک، چشمه‌های آبگرم، ضایعات صنعتی و منابع زیستی یافت می‌شود. این باکتری، گرم‌مثبت، میله‌ای شکل، دارای توانایی اسپورسازی و به‌طور معمول هوازی اختیاری است و

[1] amylase
[2] Alpha-amylase, beta-amylase and gamma-amylase (glucoamylase)
[3] Biosensor
[45] Bio ethanol
[5] Submerged Fermentation
[6] Solid State Fermentation
[7] Bioreactors
[8] *Bacillus licheniformis*
[9] *Bacillus*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

قابلیت پایداری در دماهای بالا، شرایط pH قلیایی، تولید پروتئین‌های مقاوم به حرارت و متابولیت‌های ثانویه دارد (۸) به علاوه با خواص ضد میکروبی می‌توانند به عنوان عوامل بیولوژیک در کشاورزی استفاده شوند. همچنین توانایی استفاده از منابع کربن متنوع، آن را برای تخمیر با سوبستراهای متنوع مناسب می‌سازد (۴). به دلیل توانایی آن در تولید آنزیم‌هایی نظیر آلفا-آمیلاز، پروتئاز و لیپاز، به‌ویژه در شرایط سخت محیطی، در صنایع مختلف از جمله صنایع شوینده، غذایی، دارویی و نساجی کاربرد گسترده‌ای دارد(۹). مطالعات پیشین برخی از سویه‌های بومی *باسیلوس لیکنی فورمیس* ایران را از چشمه‌های آبگرم استان اردبیل، خاک‌های شور در سمنان و کمپوست‌های صنعتی جداسازی کرده اند که پتانسیل بالایی برای تولید آنزیم‌های مقاوم در برابر دمای بالا و pH قلیایی دارند (۱۵). توانایی تولید آمیلاز با بازدهی بالا دارند که می‌توان از آنها در فرایندهای صنعتی استفاده کرد (۱۶). به عنوان مثال در صنعت غذایی برای تجزیه نشاسته به قندهای ساده در تولید شربت‌های شیرین‌کننده، نان‌پزی، و صنایع نوشیدنی کاربرد دارد (۱۷). همچنین با توجه به فعالیت آنزیم در دما و pH بالا در صنایع شوینده به منظور حذف لکه‌ها از لباس و اصلاح الیاف در صنعت نساجی به کار می‌رود (۹).

به این ترتیب با عنایت به اهمیت آنزیم آمیلاز در صنایع مختلف و تأثیر تعیین‌کننده نوع سوبسترا بر کمیت و کیفیت تولید این آنزیم، بررسی این پارامترها در باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* از اهمیت بالایی برخوردار است و روش تخمیر غوطه‌ور به عنوان یک فرایند کارآمد در تولید صنعتی آنزیم‌ها، بهینه‌سازی شرایط کشت و افزایش بهره‌وری تولید فراهم می‌نماید. با وجود کاربرد گسترده آنزیم آمیلاز در صنایع مختلف و نقش کلیدی *باسیلوس لیکنی فورمیس* در تولید این آنزیم، اطلاعات جامعی درباره تأثیر انواع سوبستراها بر میزان و کیفیت تولید آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* در شرایط تخمیر غوطه‌ور در دسترس نیست، که این موضوع مانع بهینه‌سازی کامل فرآیندهای صنعتی و استفاده بهینه از این آنزیم می‌شود. تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که این باکتری با توانایی تولید آمیلاز پایدار در دما و شرایط pH مختلف برای کاربردهای صنعتی بسیار مناسب است (۴، ۸-۹). تکنیک تخمیر غوطه‌ور به دلیل امکان کنترل بهتر پارامترهای محیطی به عنوان روشی کارآمد برای تولید صنعتی آنزیم‌ها شناخته شده است (۱۰ و ۱۸). با این حال، نیاز به بررسی دقیق‌تر تأثیر انواع سوبستراها، بهینه‌سازی شرایط کشت و انتخاب سوبستراهای برای افزایش تولید آمیلاز احساس می‌شود تا با افزایش بهره‌وری وکاهش هزینه‌ها به پیشرفت فناوری‌های بیوتکنولوژیکی صنعتی کمک کند. این مطالعه به پرسش اصلی پژوهش پاسخ می‌دهد: آیا نوع سوبسترا می‌تواند بر کمیت و کیفیت تولید آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* در شرایط تخمیر غوطه‌ور تأثیر معناداری داشته باشد؟ هدف اصلی پژوهش حاضر، ارزیابی اثر انواع مختلف سوبسترا بر تولید آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* در شرایط تخمیر غوطه‌ور می‌باشد، که نتایج آن می‌تواند گامی مؤثر در توسعه فرآیندهای تولید آنزیمی با استفاده از منابع اقتصادی و زیست‌محیطی قابل دسترس باشد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس*[1] با کد PTCC 1721 از مجموعه بانک میکروارگانیسم‌های ایران (PTCC) تهیه شد. این سویه به عنوان نمونه‌ای استاندارد و تجاری در آزمایشگاه احیا و به صورت فعال نگهداری گردید. با توجه به اینکه این مطالعه صرفاً بر روی میکروارگانیسم‌ها و نمونه‌های آزمایشگاهی انجام شده و هیچ‌گونه نمونه انسانی یا حیوانی

[1] *Bacillus licheniformis*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

در فرآیند آزمایش به کار نرفته است، لذا کد اخلاق اخذ نگردید. سوبستراهای مورد استفاده شامل نشاسته ذرت، گلوکز و مالتوز بودند که از منابع تجاری و کشاورزی محلی تأمین گردیدند. مواد شیمیایی آزمایشگاهی شامل معرف DNS، محلول ید و سایر مواد با خلوص بالا تهیه شدند. محیط‌های کشت نوترینت آگار و نوترینت براث به کار رفتند.

۱. آماده‌سازی کشت باکتری

برای راه‌اندازی کشت اولیه، سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* روی محیط نوترینت آگار[1] کشت داده شد و مطابق با استاندارد ISO 7218 (روش کشت میکروبیولوژیکی) و استاندارد ملی ایران ISIRI 6610 (روش‌های کشت و شمارش باکتری‌ها) پس از ۲۴ h انکوباسیون در دمای ۳۷ ^{o}C ، کلنی‌های تازه انتخاب شدند. سپس کلنی‌ها در محیط نوترینت براث به مدت ۱۸ h و در دمای ۳۷ ^{o}C و ۱۵۰ rpm در شیکر کشت داده شدند تا سلول‌ها به فاز رشد برسند (۵ و ۱۰).

۲. آماده‌سازی سوبسترا

هر یک از سوبستراها در غلظت ۱ درصد (وزنی/حجمی) در محیط نوترینت براث حل و به‌صورت جداگانه استریل شدند. بدین منظور محلول‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ ^{o}C و فشار ۱atm به مدت ۱۵ min استریل گردیدند.

۳. شرایط تخمیر غوطه‌ور

فرآیند تخمیر غوطه‌ور در ارلن‌های ۲۵۰ ml انجام شد. هر ارلن حاوی ۱۰۰ ml محیط کشت حاوی یکی از سوبستراهای مورد مطالعه بود. پس از افزودن ۵ درصد حجم کشت اولیه باکتری به هر ارلن، براساس ISIRI 13982 نمونه‌ها در انکوباتور شیکر با دمای ۳۷ ^{o}C و سرعت ۱۵۰ rpm به مدت ۴۸ h قرار گرفتند. نمونه‌برداری‌ها در فواصل زمانی ۱۲ h، ۲۴ h، ۳۶ h و ۴۸ h انجام شد تا فعالیت آمیلاز اندازه‌گیری شود (۵ و ۱۳).

۴. تعیین فعالیت آنزیمی آمیلاز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آمیلاز تولید شده توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* ، از روش رنگ‌سنجی با استفاده از DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) مطابق با روش Miller (۱۹۵۹) و براساس ISO 3093 تعیین شد. بدین ترتیب که نمونه‌های برداشت شده ابتدا سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت به‌عنوان منبع آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. در هر واکنش، ۱ml سوپرناتانت با ۱ml محلول نشاسته ذرت ۱٪ (وزن/حجم) در بافر فسفات ۰.۰۵ مولار (PH=۷) به نسبت ۱:۱ (حجم به حجم) مخلوط شد و به مدت ۱۰ min در دمای ۵۰ ^{o}C انکوبه گردید. سپس واکنش با افزودن ۱ ml معرف DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) متوقف شد و نمونه‌ها به مدت ۵ min در حمام جوش قرار گرفتند تا رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای ایجاد شود. پس از خنک شدن، شدت رنگ نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آمیلاز با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز تعیین و بر حسب واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر (U/mL) گزارش گردید. یک واحد آمیلاز به عنوان مقدار آنزیمی تعریف می‌شود که در شرایط آزمایش قادر به هیدرولیز ۱ mM نشاسته در یک دقیقه است(۵ و ۹).

۵. تحلیل داده‌ها

تمام آزمایش‌ها به صورت سه تکرار مستقل انجام شدند و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. برای بررسی تفاوت‌های آماری بین گروه‌ها، آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی با سطح معنی‌داری ۰/۰۵استفاده شد. تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام گردید.

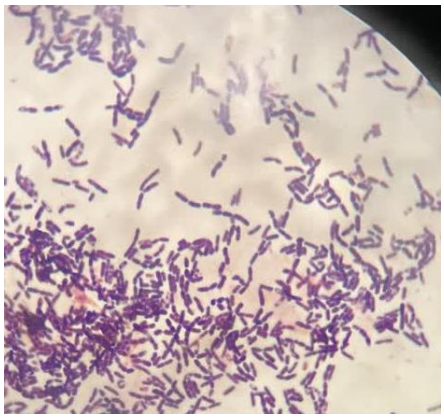
[1] Nutrient Agar

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

نتایج

رشد و کشت باکتری

سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس*[1] پس از کشت در محیط نوترینت آگار طی ۲۴ h در دمای ۳۷ °C کلنی‌های یکنواخت با رنگ سفید تا کرم روشن و سطح صاف و براق ایجاد کرد. کشت به محیط نوترینت براث انتقال داده شد و طی ۱۸ h رشد در شیکر (۱۵۰ rpm)، به فاز لگاریتمی رسید و به عنوان تلقیح اولیه برای تخمیر مورد استفاده قرار گرفت. بررسی



شکل ۱_باسیل گرم مثبت

از نظر ویژگی‌های ماکروسکوپی، کشت این باکتری روی محیط نوترینت آگار در دمای ۳۷ °C پس از ۲۴ h ، کلنی‌هایی با رنگ سفید تا کرم و مرزهای مشخص ایجاد نمود. این کلنی‌ها سطحی صاف و بافتی ضخیم و نسبتا خشک داشتند. در محیط مایع نیز رشد این باکتری با ایجاد کدورت قابل توجه و رسوب خاکستری رنگ همراه بود. برخی از سویه‌ها نیز بوی مشخصی شبیه به بوی پنیر یا خاک را از خود نشان دادند که از نشانه‌های شناسایی آن می‌باشد.

نتایج بیوشیمیایی سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس*

سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس*[2] مورد استفاده در این مطالعه، در آزمون‌های بیوشیمیایی دارای پاسخ‌های مشخصی بود. این سویه در آزمون کاتالاز، واکنش مثبت نشان داد(شکل۳) که میکروسکوپی سویه *Bacillus licheniformis* مورد استفاده پس از رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که این باکتری به صورت باسیل‌های گرم مثبت (شکل شماره ۱)، معمولاً به صورت سلول‌های تکی یا زنجیره‌های کوتاه ظاهر می‌شود. همچنین تشکیل اندوسپور در موقعیت مرکزی یا کمی جانبی سلول‌ها به روشنی مشاهده شد که این ویژگی بیانگر مقاومت این باکتری در شرایط نامساعد محیطی است. بررسی‌های مربوط به حرکت نشان داد که سویه مذکور متحرک است(شکل شماره۲).

شکل۲-تست حرکت باکتری بر روی محیط sim

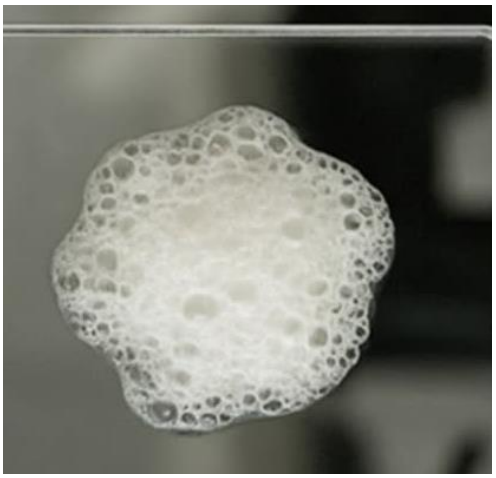
بیانگر تولید آنزیم کاتالاز است در حالی که در آزمون اکسیداز نتیجه منفی به دست آمد. همچنین توانایی هیدرولیز نشاسته و ژلاتین به روشنی مشاهده شد که نشان‌دهنده قابلیت تجزیه پلی‌مرهای پیچیده توسط این باکتری است. بررسی قابلیت رشد در دماهای بالا نیز تایید کرد که سویه قادر به رشد در دمای حدود °C ۵۰ تا ۵۵ می‌باشد. تولید اندوسپور به صورت مثبت گزارش شد که بیانگر مقاومت باکتری در شرایط نامساعد محیطی است. سایر تست‌های بیوشیمیایی مانند تجزیه اوره معمولاً منفی بوده و تخمیر قندها مانند گلوکز به صورت اسیدی بدون تولید گاز انجام شد. این نتایج به تأیید هویت سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* و تایید

[1] *Bacillus licheniformis*

[2] *Bacillus licheniformis*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

قابلیت‌های متابولیکی آن برای تولید آنزیم آمیلاز کمک نمود.



شکل۳-تست کاتالاز مثبت

تاثیر نوع سوبسترا بر تولید آنزیم آمیلاز

تولید آنزیم آمیلاز در محیط نوترینت براث حاوی سه سوبسترا شامل نشاسته ذرت، مالتوز و گلوکز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نوع سوبسترا اثر قابل‌توجهی بر میزان فعالیت آمیلاز دارد. بیشترین فعالیت آنزیمی در حضور نشاسته ذرت مشاهده شد.

جدول ۱ – مقایسه فعالیت آمیلاز تولید شده توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* در حضور سوبستراهای مختلف

سوبسترا	آمیلاز (U/mL)	انحراف معیار(±)
نشاسته ذرت	۱۵۰	۱۰
مالتوز	۱۱۰	۸
گلوکز	۷۵	۵

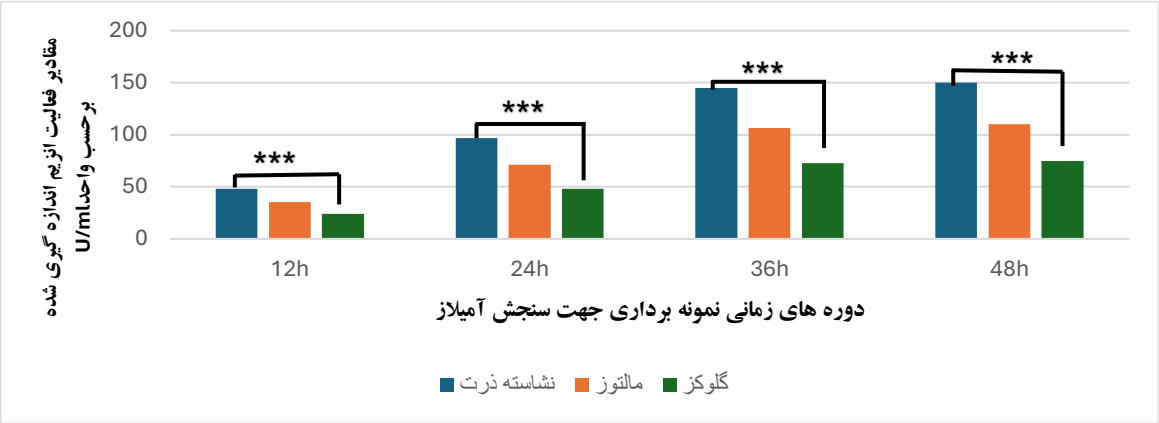
جدول ۱ نتایج فعالیت آنزیم آمیلاز تولید شده توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس*[1] در حضور سه نوع سوبسترا مختلف را نشان می‌دهد که نتایج حاکی از تفاوت قابل توجه در میزان تولید آنزیم بسته به نوع سوبسترا است. بیشترین فعالیت آمیلاز در حضور نشاسته ذرت ثبت شده است که با مقدار میانگین ۱۵۰U/ml و انحراف معیار ۱۰، نشان‌دهنده کارایی بالای این پلی‌ساکارید پیچیده به عنوان منبع کربن برای تحریک تولید آنزیم می‌باشد. این امر می‌تواند ناشی از این باشد که نشاسته ذرت به عنوان سوبسترای پیچیده، باعث القای بیشتر ژن‌های مرتبط با سنتز آمیلاز در باکتری می‌شود.

فعالیت آمیلاز در محیط حاوی مالتوز (یک دی‌ساکارید) به ۱۱۰ U/ml رسید که کمتر از نشاسته ذرت است اما به طور قابل توجهی بیشتر از فعالیت اندازه‌گیری شده در حضور گلوکز (یک مونوساکارید) با ۷۵ U/ml می‌باشد. این روند کاهش فعالیت از نشاسته ذرت به مالتوز و سپس گلوکز، احتمالاً به دلیل پیچیدگی مولکولی و نحوه متابولیسم این قندها در باکتری است، پلی‌ساکاریدهای پیچیده‌تر مانند

[1] *Bacillus licheniformis*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

نشاسته ذرت ممکن است محرک قوی‌تری برای تولید آنزیم آمیلاز باشند.



نمودار ۱- مقایسه فعالیت آمیلاز تولید شده در واحد U/ml توسط *Bacillus licheniformis* در حضور سوبسترا‌های مختلف

در مجموع نتایج جدول و نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که انتخاب سوبسترا نقش کلیدی در بهینه‌سازی تولید آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس*[1] دارد و نشاسته ذرت به عنوان بهترین گزینه در این مطالعه معرفی می‌شود.

انحراف معیارهای پایین در هر سه حالت نشان‌دهنده تکرارپذیری و دقت آزمایش است. تحلیل آماری (ANOVA) تأیید کرد که تفاوت‌ها بین گروه‌ها معنادار است ($p<۰.۰۵$)، بنابراین نوع سوبسترا به طور مستقیم بر میزان تولید آنزیم آمیلاز تأثیرگذار است.

تأثیر زمان بر تولید آمیلاز در حضور نشاسته ذرت

فعالیت آمیلاز در محیط حاوی نشاسته ذرت طی زمان تخمیر افزایش یافت و در ۳۶ h به حداکثر مقدار خود رسید (۱۵۰ U/ml). پس از این مدت میزان فعالیت، تثبیت شده و تغییر قابل‌توجهی در ۴۸ h مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲: تغییرات فعالیت آمیلاز (U/mL) در حضور نشاسته ذرت طی زمان

زمان (h)	میانگین فعالیت آمیلاز (U/mL)	انحراف معیار (±)
۱۲	۵۰	۶
۲۴	۱۰۰	۸
۳۶	۱۵۰	۱۰
۴۸	۱۵۵	۹

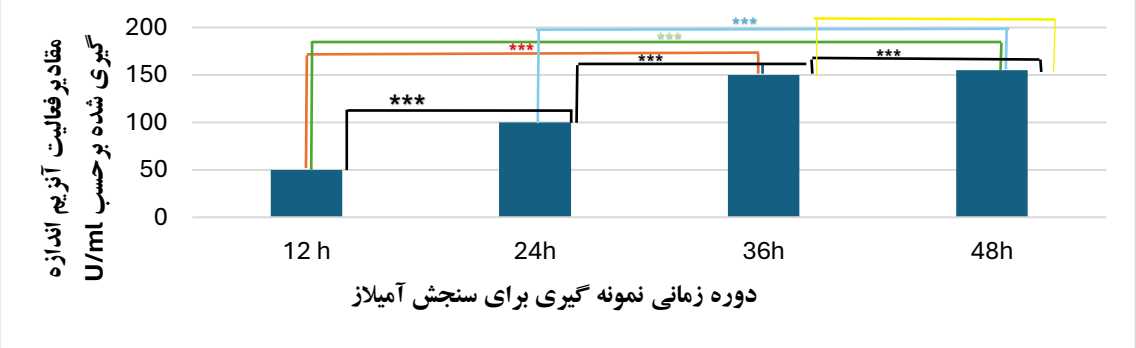
بررسی روند زمانی تولید آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس*[2] در محیط حاوی نشاسته ذرت نشان داد که فعالیت آنزیمی به‌طور قابل توجهی با گذشت زمان افزایش می‌یابد (جدول و نمودار ۲). در ۱۲ h، میانگین فعالیت آمیلاز برابر با ۵۰ U/mL با انحراف معیار ۶ گزارش شد که نشان‌دهنده آغاز فاز تولید آنزیم و رشد اولیه باکتری است. در ادامه، با ورود باکتری به فاز لگاریتمی رشد، فعالیت آمیلاز به ۱۰۰ U/mL در

[1] *Bacillus licheniformis*

[2] *Bacillus licheniformis*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

۲۴ h افزایش یافت (±۸)، که حاکی از افزایش بیان ژن‌های کدکننده آمیلاز تحت تأثیر دسترسی به نشاسته به عنوان سوبسترا می‌باشد.



نمودار۲-تغییرات فعالیت آمیلاز (U/mL) در حضور نشاسته ذرت طی زمان

در ۳۶ h، حداکثر فعالیت آنزیمی با مقدار میانگین ۱۵۰ U/mL و انحراف معیار ۱۰ ثبت شد. این نقطه احتمالاً هم‌زمان با اوج رشد باکتری و بیشترین فعالیت متابولیکی آن است. در ۴۸ h، فعالیت آنزیم با مقدار ۱۵۵U/mL (±۹) اندکی افزایش یافت اما این تغییر از نظر آماری معنادار نبوده و نشان‌دهنده رسیدن به مرحله اشباع یا تعادل تولید آنزیم می‌باشد. این پدیده ممکن است ناشی از محدود شدن منابع غذایی، تغییر pH محیط یا تجمع محصولات جانبی بازدارنده باشد که در نهایت تولید بیشتر آنزیم را محدود می‌کنند.

در تحلیل داده‌های زمانی، تفاوت معناداری ($p < ۰.۰۵$) بین سطوح مختلف زمانی نشان داد. درحالی که آزمون تعقیبی توکی نشان داد که اختلاف فعالیت آنزیم بین ساعت‌های ۱۲، ۲۴ و ۳۶ معنادار است ($p < ۰.۰۵$)، اما تفاوت بین ساعت‌های ۳۶ و ۴۸ معنادار نبوده و به عنوان فاز تثبیت در نظر گرفته می‌شود.

به‌طور کلی این نتایج نشان می‌دهد که زمان نقش مهمی در افزایش تولید آنزیم آمیلاز دارد و بهترین بازده تولید در حدود ۳۶ h پس از تلقیح حاصل می‌شود. بنابراین برای بهینه‌سازی فرایند تولید صنعتی آمیلاز با استفاده از *باسیلوس لیکنی فورمیس*، پیشنهاد می‌شود برداشت آنزیم در این بازه زمانی صورت گیرد تا از مصرف بیهوده منابع جلوگیری شود و کارایی فرایند افزایش یابد. به طور کلی این روند افزایشی نشان می‌دهد که نشاسته ذرت به عنوان سوبسترا تأثیر مثبت و مؤثری بر تولید آمیلاز دارد و زمان بهینه برای برداشت آنزیم در حدود ۳۶ h تا ۴۸ h است.

سنجش فعالیت آنزیمی

نتایج آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد که تفاوت معناداری ($p < ۰.۰۵$) بین میانگین فعالیت آمیلاز تولید شده در محیط‌های حاوی سوبستراهای مختلف وجود دارد. آزمون تعقیبی توکی نشان داد که فعالیت آمیلاز در حضور نشاسته ذرت به طور معنی‌داری بیشتر از مالتوز و گلوکز است. همچنین، تفاوت معنی‌داری بین تولید آمیلاز در محیط‌های حاوی مالتوز و گلوکز مشاهده شد ($p < ۰.۰۵$).

این نتایج بیانگر اهمیت انتخاب نوع سوبسترا در افزایش بازده تولید آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس*[1] است. سوبستراهای پلی‌ساکاریدی پیچیده مانند نشاسته ذرت به عنوان منبع کربن مؤثرتر در تحریک بیان ژن‌های مرتبط با

[1] *Bacillus licheniformis*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

تولید آمیلاز عمل می‌کنند و منجر به افزایش تولید آنزیم می‌شوند.

بحث

باکتری‌های مختلفی به عنوان تولیدکنندگان مهم آنزیم آمیلاز شناخته شده‌اند که کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی، نساجی و دارویی دارند. مطالعات خارجی بسیاری به بررسی گونه‌هایی مانند *باسیلوس لیکنی‌فورمیس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس آمیلولیکوییفاشینس*[1] پرداخته‌اند و عملکرد بهینه این باکتری‌ها را در تولید آمیلاز تحت شرایط مختلف گزارش کرده‌اند (۱۹و۱۳).

کومار[2] و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که *باسیلوس لیکنی فورمیس* می‌تواند در دماهای بالا و شرایط متنوع محیطی به تولید آمیلاز با بازده بالا بپردازد که برای کاربردهای صنعتی بسیار مناسب است (۵). از سوی دیگر تحقیقات داخلی نیز بر روی سویه‌های بومی باکتری‌های تولیدکننده آمیلاز متمرکز شده است. رضایی و همکاران در سال ۱۳۹۸ به بررسی تأثیر عوامل محیطی مانند نوع سوبسترا و زمان تخمیر بر فعالیت آمیلاز تولیدشده توسط سویه‌های *باسیلوس* بومی پرداختند و نتایج آن‌ها نشان داد که شرایط بهینه تخمیر نقش بسزایی در افزایش بازده تولید آنزیم دارد(۲۰). همچنین محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۹ با بهره‌گیری از سوبستراهای کشاورزی محلی، تولید آمیلاز را به صورت اقتصادی و پایدار بهینه کردند (۱۷). مقایسه مطالعات داخلی و خارجی نشان می‌دهد که هر دو گروه با تمرکز بر بهینه‌سازی شرایط رشد و انتخاب سوبسترای مناسب به دنبال افزایش بهره‌وری تولید آنزیم آمیلاز هستند. با این حال مطالعات داخلی با توجه به شرایط اقلیمی و منابع محلی توانسته‌اند روش‌های کاربردی‌تر و مقرون‌به‌صرفه‌تری برای تولید این آنزیم ارائه دهند که می‌تواند در توسعه صنایع بومی نقش مؤثری ایفا کند.

گارگ[3] و همکاران در سال ۲۰۲۲ مطالعاتی بر روی سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* انجام دادند که به دلیل ویژگی‌های بیوشیمیایی منحصر به فرد خود به ویژه تولید آنزیم‌های مقاوم در برابر شرایط محیطی سخت، یکی از بهترین گزینه‌ها برای کاربردهای صنعتی محسوب می‌شود (۲۱). سینگ[4] و همکاران در سال ۲۰۲۳ نشان داد که این باکتری توانایی بالایی در تولید آنزیم آمیلاز در دماهای بالا و pH متغیر دارد که برای فرایندهای صنعتی از جمله صنایع غذایی، دارویی و نساجی بسیار اهمیت دارد (۱۳ و ۳۲).

علاوه بر این، محمود و همکاران در سال ۲۰۲۱ بیان کردند که *باسیلوس لیکنی فورمیس*[5] توانایی رشد سریع و تولید اندوسپور برای بقا در شرایط نامطلوب و قابلیت استفاده از منابع کربنی متنوع را دارا است که باعث افزایش بازده تولید آنزیم می‌شود(۲۲). مطالعاتی در سال ۲۰۲۲ توسط شارما و یاداو[6] انجام شد که به بررسی ویژگی‌های ژنتیکی و متابولیکی این باکتری که امکان بهینه‌سازی فرایندهای تخمیری می پردازد و این امر باعث محبوبیت آن در مطالعات بیوتکنولوژیکی و صنعتی شده است. سینگ وهمکاران در سال ۲۰۱۷ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* را بررسی کردند. تشکیل کلنی‌های سفید تا کرم و ساختار باسیل‌های گرم مثبت با اندوسپور مرکزی یا جانبی مشابه نتایج ارائه شده توسط سینگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ است. این ویژگی‌ها نشان‌دهنده تطابق این سویه با شرایط صنعتی و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی می‌باشد(۱۹). همچنین نتایج آزمون‌های کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی نیز با یافته‌های مشابه در مطالعات اخیر که

[1] *Bacillus licheniformis*، *Bacillus subtilis* و *Bacillus amyloliquefaciens*
[2] Kumar
[3] Garg
[4] Singh
[5] *Bacillus licheniformis*
[6] Sharma و Yadav

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

توسط شیولا[1] و همکاران درسال ۲۰۲۳ انجام شد مطابق دارد(۲۴). توانایی این سویه در هیدرولیز نشاسته و ژلاتین نشان از ظرفیت بالای متابولیکی برای تجزیه پلی‌مرهای پیچیده و تولید آنزیم آمیلاز دارد که در مطالعات کومار[2] و همکاران در سال ۲۰۲۱ نیز گزارش شده است(۵). این سویه توانایی رشد در دماهای بالا (۵۰–۵۵ درجه سانتی‌گراد) را داراست که این ویژگی در پژوهش‌های اخیر به عنوان مزیتی مهم برای کاربردهای صنعتی معرفی شده است همان طور که پاتل[3] و همکارانش در سال ۲۰۲۰ از این توانایی به عنوان عاملی که سبب افزایش پایداری آنزیم‌ها در شرایط عملیاتی شدید را ممکن می‌سازد و برای تولید صنعتی آمیلاز بسیار ارزشمند است(۲۵).

استفاده از سبوس گندم به عنوان یک سوبسترا پایدار در تخمیر حالت جامد برای تولید آمیلاز توسط ژو[4] و همکاران در سال ۲۰۲۲ صورت گرفت و نتایج نشان داد که سبوس گندم با دارا بودن ترکیبات غنی کربوهیدراتی و فیبری، محیط مناسبی را برای رشد میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کند و منجر به افزایش چشمگیر تولید -αآمیلاز می‌شود. این روش تولید علاوه بر کاهش هزینه‌های مواد اولیه، به عنوان یک راهکار زیست‌محیطی و اقتصادی برای تولید صنعتی آنزیم‌های کاربردی معرفی شده است. بهینه‌سازی شرایط تخمیر بر اساس ویژگی‌های سبوس گندم می‌تواند عملکرد فرایند تولید آمیلاز را بهبود بخشد و استفاده از این منبع زیستی را در صنعت بیوتکنولوژی گسترش دهد(۲۶).

استفاده از نشاسته‌ی غلات و ضایعات کشاورزی به عنوان سوبستراهای اقتصادی و پایدار، نقش مهمی در افزایش تولید میکروبی آنزیم‌ها دارد. داس[5] و همکاران در سال ۲۰۲۳ بیان کردند که این منابع طبیعی حاوی ترکیبات کربوهیدراتی پیچیده و سایر مواد مغذی هستند که به تحریک رشد میکروارگانیسم‌ها و افزایش فعالیت آنزیمی کمک می‌کنند(۲۷). بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که بهینه‌سازی شرایط کشت و انتخاب سوبستراهای مناسب، می‌تواند بازده تولید آنزیم‌ها را به طور قابل توجهی افزایش دهد و جایگزین مناسبی برای منابع سنتتیک و گران‌قیمت فراهم آورد. این رویکرد نه تنها هزینه‌های تولید را کاهش می‌دهد، بلکه به حفظ محیط زیست و توسعه فناوری‌های سبز در صنعت بیوتکنولوژی کمک می‌کند. مطالعه حاضر به مرور کاربردهای مختلف نشاسته و ضایعات غلات در تولید آنزیم‌های صنعتی می‌پردازد و چشم‌اندازهای آینده در این حوزه را مورد بحث قرار می‌دهد.

محمدی و همکارانش در سال ۱۳۹۸به بررسی اثر انواع سوبستراهای کشاورزی شامل نشاسته ذرت، سبوس گندم و تفاله چغندرقند بر تولید آنزیم آمیلاز توسط باکتری باسیلوس سوبتیلیس[6]بود. کشت باکتری در محیط مایع حاوی هر یک از سوبستراها در شرایط کنترل شده انجام شد و میزان فعالیت آنزیم در فواصل زمانی مختلف اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که سبوس گندم به طور قابل توجهی بیشترین تولید آنزیم آمیلاز را به همراه داشت ($p < ۰.۰۵$) در حالی که نشاسته ذرت و ملاس چغندرقند نیز تولید قابل قبولی داشتند مشابه تحقیق فوق فعالیت آمیلاز در حضور نشاسته ذرت به میزان میانگین ۱۵۰ U/mL رسید که به طور قابل توجهی بیشتر از میزان تولید آنزیم در حضور مالتوز (۱۱۰ U/mL) و گلوکز (۷۵U/mL) بود(۲۸). این مطالعه نشان می‌دهد که انتخاب سوبستراهای مناسب می‌تواند نقش مهمی در بهینه‌سازی فرآیند تولید صنعتی آنزیم‌ها داشته باشد.

[1] Shyaula
[2] Kumar
[3] Patel
[4] Zhou
[5] Das
[6] *Bacillus subtilis*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

زمان تخمیر یکی از عوامل کلیدی در بهینه‌سازی تولید آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس*[1] است. مطالعات Kumar وهمکارانش در سال ۲۰۲۱ نشان داده‌اند که فعالیت آمیلاز در محیط‌های حاوی نشاسته ذرت به طور پیوسته با افزایش زمان کشت افزایش می‌یابد و به اوج خود در بازه h ۳۰ تا h ۴۰ پس از شروع تخمیر می‌رسد(۵).

مشابه بررسی پیش رو که مطالعه روند زمانی تولید آمیلاز از h ۱۲ تا h ۳۶، در h ۳۶ با میانگین فعالیت ۱۵۰U/mL به حداکثر رسید و پس از آن در h ۴۸ فعالیت آنزیمی تثبیت شد. این الگو نشان‌دهنده هم‌زمانی اوج تولید آنزیم با مرحله لگاریتمی و فاز اوج رشد باکتری است پس از این مدت، معمولاً سطح تولید آنزیم تثبیت شده یا کاهش می‌یابد که ممکن است ناشی از محدودیت منابع غذایی، تغییر pH محیط یا تجمع محصولات جانبی بازدارنده باشد. بنابراین تعیین زمان بهینه برداشت آنزیم برای دستیابی به بیشترین بازده تولید ضروری است.

زمان کشت تاثیر قابل توجهی بر میزان تولید آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* در محیط حاوی نشاسته ذرت دارد. تحقیقات پاتل[2] و همکارانش در سال ۲۰۲۲ نشان می‌دهد که فعالیت آمیلاز با افزایش زمان تخمیر افزایش می‌یابد و در حدود h ۳۶ تا h ۴۸ به اوج خود می‌رسد سپس به دلیل عوامل محیطی مانند کاهش منابع غذایی یا تجمع محصولات جانبی، میزان تولید تثبیت یا کاهش می‌یابد(۲۵). این روند بیانگر اهمیت کنترل دقیق زمان برداشت برای بهینه‌سازی فرآیند تولید آنزیم در مقیاس صنعتی است.

مطالعات داخلی متعددی به بررسی تأثیر زمان بر تولید آنزیم آمیلاز در محیط‌های حاوی سوبستراهای نشاسته‌ای پرداخته‌اند. پژوهش های رضایی و همکاران در سال ۱۳۹۷ مشابه تحقیق پیش رو نشان داد که فعالیت آمیلاز تولید شده توسط سویه‌های باسیلوس در محیط حاوی نشاسته ذرت با افزایش زمان کشت افزایش می‌یابد و بیشترین میزان تولید در بازه زمانی h ۳۶ تا h ۴۸ به دست می‌آید. پس از این مدت میزان تولید آنزیم به دلیل کاهش مواد مغذی و تجمع متابولیت‌های بازدارنده کاهش یا ثابت می‌ماند(۱۴). همچنین مطالعاتی مانند تحقیق محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۸ نشان داد که کنترل دقیق زمان برداشت آنزیم می‌تواند بهینه‌سازی فرآیندهای بیوتکنولوژیکی را بهبود بخشد و بازده تولید را افزایش دهد. این یافته‌ها بر اهمیت تعیین زمان مناسب برداشت آنزیم در تولید صنعتی تأکید دارند(۲۸).

با توجه به نتایج این تحقیق که نشاسته ذرت را به عنوان یک سوبسترای مؤثر و مقرون‌به‌صرفه در تولید آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس*[3] معرفی کرد، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی امکان استفاده از این ماده در مقیاس نیمه‌صنعتی بررسی شود. همچنین بهینه‌سازی شرایط تخمیر (pH، دما، زمان و نسبت تلقیح) با استفاده از روش‌های آماری مانند طراحی سطح پاسخ (RSM) می‌تواند به افزایش بازده کمک کند. به‌کارگیری اصلاح ژنتیکی جهت تقویت بیان ژن‌های مسئول تولید آمیلاز نیز می‌تواند عملکرد آنزیمی را ارتقا دهد. از سوی دیگر، بررسی ترکیب نشاسته ذرت با سایر سوبستراها مانند سبوس گندم ممکن است به اثرات هم‌افزا و بهبود تولید آنزیم منجر شود. این اقدامات می‌توانند مسیر توسعه پایدار و اقتصادی تولید آمیلاز در صنایع مختلف را هموار سازند.

در مطالعه سیلوا-سالیناس[4] و همکاران در سال ۲۰۲۱ یک آنزیم α-آمیلاز مقاوم به گرما از *باسیلوس لیکنی فورمیس* سویه LB۰۴ استخراج و خالص‌سازی شد. آنزیم به‌دست‌آمده در دماهای بالا پایدار بود و قابلیت فعالیت در pHهای قلیایی را نیز داشت. نتایج نشان داد که این آنزیم برای کاربردهای صنعتی مانند فرآوری مواد غذایی و زیست تبدیل نشاسته

[1] *Bacillus licheniformis*
[2] Patel
[3] *Bacillus licheniformis*
[4] Silva-Salinas

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

مناسب است(۲۹). فینکان[1] وهمکاران در سال ۲۰۲۱ در این پژوهش آنزیم -αآمیلاز را از *باسیلوس لیکنی فورمیس* سویه So-B۳ خالص‌سازی کردند (۳۰). این آنزیم قادر بود نشاسته خام را به طور مؤثر هیدرولیز کند و در دماهای بالا بدون کاهش فعالیت پایدار باقی بماند. این ویژگی‌ها نشان‌دهنده کاربرد بالای آن در فرآیندهای صنعتی بی‌نیاز از ژلاتینه‌سازی نشاسته است.

درسال ۲۰۲۲ مطالعه ای بر روی ویژگی‌های ترمودینامیکی آنزیم -αآمیلاز استخراج‌شده از گونه‌های *باسیلوس* توسط مایکل[2] و همکاران صورت گرفت و نتایج نشان دادندکه این آنزیم‌ها دارای انرژی فعال‌سازی بالا و دمای بهینه مناسب برای استفاده در کاربردهای صنعتی هستند(۳۱). به این ترتیب مطالعه حاضر اطلاعات مهمی برای مهندسی آنزیم و طراحی فرایندهای صنعتی فراهم می کند.

در این پژوهش تأثیر سه نوع سوبسترا شامل نشاسته ذرت، مالتوز و گلوکز بر تولید آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* در شرایط تخمیر غوطه‌ور بررسی شد. نتایج نشان داد که نوع سوبسترا نقش مهمی در افزایش بهره‌وری تولید آنزیم دارد و انتخاب سوبستراهای بهینه می‌تواند منجر به بهبود عملکرد فرآیندهای صنعتی شود. با این وجود، مشکلات و محدودیت‌هایی نیز در این مطالعه مشاهده گردید که لازم است در تحقیقات آینده به آنها توجه شود.این مطالعه با محدودیت هایی مانند بررسی سوبستراها محدود به سه نوع (نشاسته ذرت، مالتوز و گلوکز) بود و استفاده از منابع متنوع تر مانند سبوس گندم یا ضایعات کشاورزی می‌تواند نتایج کاربردی‌تر فراهم نماید. از سوی دیگر پارامترهای مهم مانند pH و دماهای متفاوت بررسی نشد که برای بهینه‌سازی فرآیند ضروری که می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات تکمیلی کاربردی صنعتی در مطالعات آینده باشد.در نهایت، توصیه می‌شود برای دستیابی به تولید پایدار و اقتصادی‌تر آنزیم آمیلاز، پژوهش‌های آتی به بررسی هم‌زمان تأثیر پارامترهای محیطی، انواع سوبستراها و شرایط تخمیر بپردازند. این اقدامات می‌تواند راهکارهای عملی برای افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه‌ها در صنایع بیوتکنولوژی و غذایی ارائه دهد و زمینه‌ساز توسعه فناوری‌های نوین در این حوزه باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس*[3] رشد مناسبی در محیط نوترینت آگار و نوترینت براث از خود نشان داد و ویژگی‌های مورفولوژیکی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی این باکتری با یافته‌های قبلی در مورد این گونه کاملاً منطبق بود. این باکتری به صورت باسیل‌های گرم مثبت، متحرک و اندوسپورزا مشاهده شد که بیانگر مقاومت و سازگاری آن با شرایط محیطی مختلف است. همچنین، فعالیت مثبت کاتالاز، توانایی هیدرولیز نشاسته و ژلاتین و رشد در دماهای بالا، تأییدکننده ویژگی‌های متابولیکی و زیستی این سویه برای کاربردهای صنعتی است. بررسی تأثیر نوع سوبسترا بر تولید آنزیم آمیلاز نشان داد که نشاسته ذرت به عنوان یک پلی‌ساکارید پیچیده، نقش کلیدی در افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سنتز آمیلاز و در نتیجه تولید بالای این آنزیم دارد. فعالیت آمیلاز در حضور نشاسته ذرت به میزان میانگین U/mL ۱۵۰ رسید که به طور قابل توجهی بیشتر از میزان تولید آنزیم در حضور مالتوز (۱۱۰ U/mL) و گلوکز (۷۵ U/mL) بود. این تفاوت با توجه به انحراف معیار پایین و تکرارپذیری نتایج، اهمیت انتخاب سوبسترا در بهینه‌سازی تولید آنزیم را نشان می‌دهد. مطالعه روند زمانی تولید آمیلاز نیز بیانگر افزایش تدریجی و قابل توجه فعالیت آنزیم از ۱۲ h تا ۳۶ h بود، به طوری که در ۳۶ h با میانگین فعالیت ۱۵۰ U/mL به حداکثر رسید و پس از آن در ۴۸ h فعالیت آنزیمی تثبیت شد. این الگو نشان‌دهنده هم‌زمانی اوج تولید آنزیم با مرحله لگاریتمی

[1] Fincan
[2] Miłek
[3] *Bacillus licheniformis*

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

و فاز اوج رشد باکتری است. محدودیت منابع یا شرایط محیطی ممکن است در مرحله بعدی از افزایش فعالیت آنزیمی جلوگیری کند. در نتیجه، پیشنهاد می‌شود برداشت آنزیم در حدود ۳۶ h پس از شروع تخمیر انجام شود تا ضمن جلوگیری از هدررفت منابع، حداکثر بازده تولید حاصل شود. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* گزینه‌ای مناسب برای تولید صنعتی آنزیم آمیلاز است و با انتخاب سوبسترای مناسب مانند نشاسته ذرت و کنترل دقیق زمان تخمیر می‌توان تولید آنزیم را بهینه کرد. این یافته‌ها می‌تواند زمینه‌ساز توسعه فرایندهای بیوتکنولوژیکی کارآمد در صنایع مختلف مانند غذایی، دارویی و نساجی باشد و راهکاری اقتصادی و پایدار برای تولید آنزیم‌های صنعتی ارائه دهد.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

منابع

1.Roger Arthur Sheldon ،John Michael Woodley. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. Chemical Reviews. 2018;118(2):801-838.

2.Roger Arthur Sheldon. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. Green Chemistry. 2016;18(11):3180-3183. doi:10.1039/C6GC90055A

3. David L Nelson ،Michael M Cox. Lehninger principles of biochemistry. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2021.

4. Ramesh Gupta ،Nidhi Gupta ،Praveen Rathi. Industrial applications of enzymes: a review. Biotechnology Reports (Amsterdam). 2021;29:e00574.

5. Amit Kumar ،Anil Singh ،Pradeep Tripathi. Enhanced production of α-amylase from Bacillus licheniformis and its potential industrial applications. Enzyme and Microbial Technology. 2021;148:109800. doi:10.1016/j.enzmictec.2021.109800

6. سعید جلال هاشمی، سمیه رحمتی، یاسر قاسمی. کاربرد آنزیم‌ها در صنعت دارویی: پیشرفت‌های اخیر. مجله بین‌المللی ماکرومولکول‌های زیستی. ۱۴۰۱؛۱۰۰۶:۲۰۹-۱۰۱۸.

7. سارا حبیب رضوی، محمد غلامی، سمیه حسینی. تولید بیواتانول آنزیمی: وضعیت فعلی و چشم‌اندازهای آینده. انرژی‌های تجدیدپذیر. ۱۴۰۲؛۱۴۴:۲۰۰-۱۵۶.

8. John Smith ،Lisa Brown ،Kevin Taylor. Industrial enzyme applications: current trends and future prospects. Biotechnology Advances. 2022;55:107900.

9. Rajesh Singh ،Pankaj Singh ،Mukesh Rai. Recent advances in microbial amylases: sources, production, and applications. International Journal of Biological Macromolecules. 2022;195:406-420.

10. محمد حسنی، مهرداد صدرنیا، آتنا وزیری. بررسی تولید آنزیم آمیلاز توسط Bacillus subtilis در تخمیر غوطه‌ور. فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی. ۱۳۹۹؛۶(۱).

11. Amit Kumar ،Rajesh Singh ،Ramesh Gupta. Applications of enzymes in textile industry: a review. Environmental Chemistry Letters. 2020;18:1493-1512.

12. محمد محقق‌زاده، سعید غضنفری. مروری بر تخمیر صنعتی و نقش آن در بیوتکنولوژی. مجله ایرانی بیوتکنولوژی. ۱۴۰۰؛۱۹(۳):e852.

13. Rajesh Singh ،Vivek Kumar ،Mukesh Rai. Advances in fermentation technology: industrial applications and sustainability. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 2023;107(5):2055-2070.

14. مهدی رضایی، نسرین قاسمی، فاطمه علیزاده. بررسی کاربردهای صنایع تخمیری در تولید فرآورده‌های دارویی و غذایی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ایران. ۱۴۰۰؛۲۳(۱):۴۵-۵۶.

15. سعید عبدی، رضا حیدری، فرید واعظی. غربالگری و شناسایی سویه‌های آنزیم‌ساز در ضایعات کمپوست شهری. مجله علوم زیستی ایران. ۱۴۰۲؛۳۰(۲):۷۰-۷۸.

16. ناصر حسینی، سارا محمدی، مهدی رضایی. مطالعه کاربردهای صنعتی آنزیم‌های تولید شده توسط باکتری‌های بومی ایران. فصلنامه میکروبیولوژی ایران. ۱۴۰۱؛۱۹(۱):۵۵-۶۴.

17. سارا محمدی، ناصر حسینی، محمد تهرانی. بررسی توانایی تولید آنزیم آمیلاز توسط Bacillus licheniformis جداشده از خاک‌های کشاورزی ایران. مجله علوم زیستی ایران. ۱۳۹۹؛۲۸(۳):۱۱۲-۱۲۰.

18. Ashok Pandey ،Pratyoosh Nigam ،Carlos Ricardo Soccol ،Vanete T Soccol ،Deepak Singh ،Rajesh Mohan. Production, purification and properties of microbial amylases. Biotechnology Advances. 2000;18(5):435-483.

19. Rajesh Singh ،Pradeep Shukla ،Manpreet Kaur. Thermostable α-amylase from Bacillus licheniformis: purification and characterization for industrial application. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2017;12:116-124. doi:10.1016/j.bcab.2017.08.010

20. مهدی رضایی، فاطمه حسینی، سارا نوری. بررسی تأثیر زمان و دما بر تولید آمیلاز توسط Bacillus subtilis در محیط حاوی نشاسته ذرت. مجله علوم و فناوری زیستی ایران. ۱۳۹۷؛۱۲(۳):۴۵-۵۴.

21. Pradeep Garg ،Sunil Verma ،Sanjay Singh. Thermostable α-amylase production by Bacillus licheniformis: a potential candidate for industrial applications. Journal of Microbial Biotechnology. 2022;14(3):201-211. doi:10.1016/j.micbt.2022.01.005

22. Ahmed M Mahmoud ،Mohamed S El-Sayed ، Ahmed S El-Sayed. Optimization of α-amylase production from Bacillus licheniformis using agro-industrial wastes. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2021;193(4):1261-1275. doi:10.1007/s12010-020-03498-2

23. Priya Sharma ،Anil N Yadav. Advances in microbial amylases: Bacillus licheniformis as a versatile producer for industrial uses. Biotechnology Reports. 2022;35:e00735. doi:10.1016/j.btre.2022.e00735

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

24. Anup Shyaula ،Suman Shrestha. Characterization of thermostable cellulase from Bacillus licheniformis PANG L isolated from the Himalayan soil. International Journal of Microbiology. 2023;2023:3615757. doi:10.1155/2023/3615757
25. Ramesh N Patel ،Tej Chandra. Thermostable enzymes from extremophiles: a review. Critical Reviews in Biotechnology. 2020;40(4):477-491. doi:10.1080/07388551.2020.1742767
26. Yong Zhou ،Jun Li ،Hong Wang. Wheat bran as a sustainable substrate for enhanced α-amylase production by Bacillus species under solid-state fermentation. Bioresource Technology Reports. 2022;17:100875. doi:10.1016/j.biteb.2022.100875
27. Sujit Das ،Arijit Ghosh ،Soumya Roy. Utilization of cereal starch and agro-industrial byproducts for enhanced microbial enzyme production: a review. International Journal of Biological Macromolecules. 2023;250:123933. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123933
28. علی محمدی، محمد کریمی، رضا احمدی. بهینه‌سازی شرایط تخمیر برای تولید آنزیم آمیلاز با استفاده از سوبستراهای کشاورزی. مجله بیوتکنولوژی کاربردی. ۱۳۹۸؛۷(۱):۲۳-۳۰.
29. Alejandro Silva-Salinas ،María Rodríguez-Delgado ،José Gómez-Treviño ،Uriel López-Chuken ،Carlos Olvera-Carranza ،Elena A Blanco-Gámez. Novel thermotolerant amylase from Bacillus licheniformis strain LB04: purification, characterization and agar-agarose. Microorganisms. 2021;9(9):1857. doi:10.3390/microorganisms9091857
30. Serap A Fincan ،Serap Özdemir ،Ayşe Karakaya ، Burak Enez ،S D Mustafov ،M S Ulutaş ،Fikret Şen. Purification and characterization of thermostable α-amylase produced from Bacillus licheniformis So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. Life Sciences. 2021;264:118639. doi:10.1016/j.lfs.2020.118639
31. Jan Miłek ،Joanna Lamkiewicz. The starch hydrolysis by α-amylase Bacillus spp.: an estimation of the optimum temperatures, activation and deactivation energies. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2022;147:14459-14466. doi:10.1007/s10973-022-11738-1
32. Rajesh Singh ،Nidhi Gupta. Characterization and industrial potential of α-amylase from Bacillus licheniformis. International Journal of Industrial Microbiology. 2023;19(1):34-45. doi:10.1016/j.ijim.2023.02.012

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]