



Original Research Paper

The expression of serine protease gene from *Virgobacillus natechei* based on gene artificial synthesis

Mahboobeh Afrand ¹, Iman Sourinejad ^{*1}, Ahmad Homaei ², Roohullah Hemmati ³

¹ Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

² Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

³ Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Key Words

Gene synthesis
Recombinant protease
PET28a
E. coli BL21(DE3)

Abstract

Introduction: Protein hydrolysis of aquatic wastes is an appropriate and economic strategy to obtain valuable products. In recent years, with researchers turning their attention to the use of green and safe technology in the hydrolysis of proteins obtained from aquatic wastes and choosing a suitable alternative for chemicals, protease enzymes have been introduced to this industry.

Materials & Methods: In the present study, in order to produce a recombinant enzyme, after transferring the synthesized gene of serine protease into the vector PET28a, the structure created in the host *E. coli* BL21(DE3) was transferred, and the accuracy of the transfer was checked by performing colony-PCR. Then, the expression of the recombinant enzyme was performed with a concentration of 1 mM IPTG at a temperature of 28°C for 8 hours.

Results: The result of protein secretion on SDSPAGE was determined by the appearance of a band with an approximate size of 31 kDa.

Conclusion: Considering the successful production of serine protease from the bacterium *Virgobacillus natechei* with the help of artificial synthesis of the gene encoding this enzyme, we could hope that this recombinant enzyme would be a suitable option for use in various industries including fishing industry. This would happen if the activity and biochemical characteristics of the purified enzyme are suitable and additional studies confirm the possibility of optimal production at a high amount.

* Corresponding Author's email: sourinejad@hormozgan.ac.ir

Received: 12 May 2023; Reviewed: 14 June 2023; Revised: 16 July 2023; Accepted: 17 September 2023

(DOI): [10.70102/AEJ.2025.16.4.15](https://doi.org/10.70102/AEJ.2025.16.4.15)

مقاله پژوهشی

بیان ژن سرین پروتئاز از باکتری *Virgibacillus natechei* براساس سنتز مصنوعی ژنمحبوبه افرند^۱، ایمان سوری نژاد^{۱*}، احمد همایی^۲، روح الله همتی^۳^۱ گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران^۲ گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران^۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: هیدرولیز پروتئین ضایعات آبریان یک استراتژی مناسب و اقتصادی جهت دستیابی به محصولات با ارزش می باشد. در سال های اخیر، با معطوف شدن توجه محققان به استفاده از فناوری سبز و ایمن در هیدرولیز پروتئین های حاصل از ضایعات آبریان و انتخاب جایگزین مناسب برای مواد شیمیایی، آنزیم های پروتئازی به این صنعت معرفی شده اند.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر به منظور تولید آنزیم نوترکیب بعد از انتقال ژن سنتز شده سرین پروتئاز به درون وکتور PET28a، سازه ایجاد شده به درون میزبان *E. coli* BL21(DE3) انتقال یافت و درستی انتقال با انجام Colony PCR مورد بررسی قرار گرفت. سپس بیان آنزیم نوترکیب با غلظت یک میلی مولار IPTG در شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۸ ساعت انجام شد.

نتایج: نتیجه ترشح پروتئین بر روی SDSPAGE با نمایان شدن باندهای با اندازه تقریبی ۳۱ کیلودالتون مشخص شد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به موفق بودن تولید سرین پروتئاز از باکتری *Virgibacillus natechei* به کمک سنتز مصنوعی ژن کد کننده این آنزیم، چنانچه فعالیت و ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم تخلیص شده مناسب باشد و مطالعات تکمیلی امکان تولید بهینه و مقدار بالایی را تایید نمایند، می توان امیدوار بود که این آنزیم نوترکیب گزینه مناسبی برای استفاده در صنایع مختلف از جمله صنایع شیلاتی باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sourinejad@hormozgan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۲ اردیبهشت ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۲۴ خرداد ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۲۵ تیر ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۶ شهریور ۱۴۰۲

(DOI): 10.70102/AEJ.2025.16.4.15

مقدمه

با توجه به رشد جمعیت و محدودیت منابع پروتئینی خشکی، میزان تقاضا برای غذاهای دریایی در سال‌های اخیر با روند افزایشی همراه بوده است. هر ساله محصولاتی که از دریا صید می‌شوند به فرآورده‌های مختلفی عمل‌آوری می‌شوند. در صنعت فرآوری ماهی حدود ۶۰ درصد محصولات جانبی مانند سر، پوست، فلس، باله، اسکلت، امعا و احشاء، تولید می‌گردد و تنها حدود ۴۰ درصد از آن برای مصارف انسانی قابل استفاده می‌باشد (۱). مشکلاتی که امروزه صنعت آبزیان با آن روبرو است، مدیریت نامناسب این ضایعات و ضررهای اقتصادی و مشکلات زیست‌محیطی توأم با آن می‌باشد (۲). در معنای واقعی این ضایعات صنایع شیلاتی، حاوی مقدار قابل توجهی از پروتئین هستند که اگر به روش مطلوب مورد استفاده قرار گیرند از یک سو کاهش آلودگی زیست محیطی و از سوی دیگر تولید محصولاتی با ارزش افزوده بالا از مواد خام کم ارزش، را به دنبال خواهند داشت (۲، ۳). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در زمینه تولید پپتیدهای پروتئینی هیدرولیز شده از منابع دریایی، به دلیل پتانسیل قابل توجه آن‌ها صورت گرفته است. این پپتیدها به دلیل داشتن تعادل بالایی از اسیدهای آمینه، قابلیت هضم بالا، جذب سریع و هم‌چنین برخی ویژگی‌های عملکردی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی برای استفاده در جیره غذایی آبزیان از ارزش بالایی برخوردار می‌باشند (۴، ۵). استفاده از این پروتئین‌ها به عنوان مکمل در تغذیه آبزیان، اثرات سودمندی از جمله بهبود رشد و بازماندگی، استفاده بیش‌تر از خوراک، عملکردهای ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها به همراه داشته است (۶). بنابراین هیدرولیز پروتئین از ضایعات آبزیان یک استراتژی مناسب و اقتصادی جهت دستیابی به محصولاتی با ارزش می‌باشد. در سال‌های اخیر، با معطوف شدن توجه محققان به استفاده از فناوری سبز و ایمن در هیدرولیز پروتئین‌های حاصل از ضایعات آبزیان و انتخاب جایگزین مناسب برای مواد شیمیایی به دلیل هزینه بالا و پرخطر بودن آن‌ها برای محیط زیست، آنزیم‌های پروتئازی به این صنعت معرفی شده‌اند (۷). تقریباً ۷۵ درصد از آنزیم‌های صنعتی، آنزیم‌های هیدرولایزکننده هستند که پروتئازها به عنوان یکی از سه گروه بزرگ آنزیم‌های صنعتی حدود ۶۰ درصد از کل تجارت آنزیم‌ها در سراسر جهان را به خود اختصاص داده‌اند (۹). این آنزیم‌ها از طریق اضافه کردن مولکول آب پیوندهای پپتیدی بین دو اسید آمینه در یک زنجیره پلی پپتیدی را هیدرولیز می‌کنند (۹). پروتئازها از لحاظ فیزیولوژیکی برای تمام موجودات زنده ضروری هستند بنابراین، در منابع مختلف گیاهی، جانوری و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند. طبق تحقیقات انجام شده

بیش‌ترین سهم از بازار تجاری پروتئازها به دلیل تولید محصول بالا، صرف زمان کم‌تر، نیاز به فضای کم‌تر، دستکاری عالی ژنتیکی و مقرون به صرفه بودن مربوط به پروتئازهایی با منشأ باکتریایی است (۱۰، ۱۱). طبق تحقیقات انجام شده، پروتئازهای استخراج شده از میکروب‌های دریایی در مقایسه با هومولوگ‌های زمینی خود پایداری قابل توجهی در برابر درجه حرارت بالا، یون‌های فلزی، حلال‌های آلی، سورفاکتانت‌ها، مواد شوینده و اکسیدکننده‌ها نشان می‌دهند و این ویژگی‌های منحصر به فرد آن‌ها باعث شده که به منبع ارزشمندی برای تولید آنزیم‌های مهم و پرکاربرد در صنعت تبدیل شوند (۱۲، ۱۳). پروتئاز سرین فراوان‌ترین گروه از پروتئازها است که در pH قلیایی فعال بوده و جایگاه فعال در آن‌ها شامل یک باقی‌مانده سرینی است که برای فرآیند هیدرولیز ضروری می‌باشد (۱۴، ۱۵). امروزه می‌توان ژن کدکننده هر پروتئین را از میزبان طبیعی جدا و به همراه یک حامل مناسب به یک میزبان مناسب وارد نمود تا پروتئین در یک موجود بیگانه تولید شود (۷). در سال‌های اخیر، تقاضا برای سنتز مصنوعی ژن به منظور مطالعه ساختار، بیان و عملکرد ژن به طور چشمگیری افزایش یافته است. در واقع سنتز مصنوعی ژن، به محققان اجازه دسترسی آسان به توالی DNA مورد نظر زمانی که الگوی آن به آسانی در دسترس نیست، یا بهینه‌سازی توالی DNA طبیعی را با هدف دستیابی به حداکثر پتانسیل بیان می‌دهد (۱۶، ۱۷). به دلیل کاربرد گسترده پروتئاز در صنایع مختلف تاکنون پژوهش‌هایی در زمینه کلون و بیان این آنزیم‌ها با منشأ میکروبی متفاوت و در میزبان‌های مختلف انجام شده است. Gulmes و همکاران، ژن پروتئاز نو ترکیب پروتئاز شناسایی شده از باکتری *Bacillus subtilis* (PTCC, Iran) را به منظور بررسی پتانسیل استفاده در شوینده‌ها سنتز نموده و بعد از کلون در میزبان *E. coli* BL21 (DE3) بیان و با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی تخلیص انجام شد (۱۸). طبق نتایج به دست آمده از آنالیزهای گوناگون، توانایی این آنزیم نو ترکیب برای استفاده در فرمولاسیون شوینده‌ها ثابت شد. Masilamani و Natarajan، از رسوبات اعماق دریا باکتری *Marinobacter aquaeolei* MS2-1 را بر اساس توالی یابی ژن srRNA ۱۶ شناسایی کردند و سپس ژن جدید مربوط به سرین پروتئاز قلیایی را با وکتور pET28a در باکتری *E. coli* بیان کردند. نتایج به دست آمده از آنالیزها نشان داد که سرین پروتئاز قلیایی جدید تولید شده می‌تواند در صنایع شوینده و هم‌چنین به عنوان ماده ضد انعقاد در کاربردهای زیست پزشکی استفاده شود (۱۹). Raval و همکاران، به منظور بررسی‌های ساختاری یک ژن کدکننده مربوط به سرین پروتئاز از باکتری سازگار با شرایط قلیایی و نمک دوست متعلق به آب دریا در ابتدا ژن مورد نظر را در وکتور TA کلون کردند و در وکتور بیانی pUC ۱۹ ساب کلونینگ شد. نتایج حاصل

سلول‌های مستعد، یک تک کلون از باکتری *E. coli* DH5 α برداشته و در لوله‌های آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع LB به مدت یک شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه شیک داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری به لوله استریل حاوی ۵ میلی لیتر از محیط کشت LB انتقال داده شد و به مدت ۳-۲ ساعت در انکوباتور بادهای ۳۷ درجه با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه شیک شد تا غلظت (OD) آن در طول موج ۶۰۰ به ۰/۶-۰/۵ برسد. سپس ۱/۵ میلی لیتر از کشت باکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ دقیقه در ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز مایع رویی خالی شده و رسوب ایجاد شده در ۳۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید ۰/۱ مولار سرد حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس مجدداً در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ حذف شده و رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر کلسیم کلرید ۰/۱ مولار حل شد و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه روی یخ مجدداً سانتریفیوژ به صورت قبل انجام و فاز رویی حذف گردید. این بار رسوب حاصل در ۸۰ میکرولیتر از بافر کلسیم کلرید حل شده و پس از قرارگیری روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه و کتور آماده شده به ۴۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد اضافه و ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و بعد از این مرحله سریعاً به دمای ۴۲ درجه منتقل و پس از ۹۰ ثانیه مجدداً به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از طی شوک حرارتی، ۸۰۰ میکرولیتر محیط LB فاقد آنتی بیوتیک اضافه کرده و به آرامی پایپت انجام شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک گردید. نهایتاً به مدت ۱ دقیقه در ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از حذف فاز رویی، ۱۵۰ میکرولیتر روی سطح پتری دیش حاوی محیط جامد LB حاوی کانامایسین پخش گردید و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. باید توجه داشت که بعد از برداشت مقدار مورد نیاز از سلول‌های مستعد شده به مابقی ۱۵ درصد گلیسرول افزوده و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

شناسایی کلنی‌های حاوی ژن مورد نظر: واکنش PCR با پلاسمیدهای نو ترکیب: به منظور تایید حضور ژن سرین پروتئاز درون وکتور PET28a، به کمک پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر طراحی شده در نرم افزار Geneious IR9.1.8، واکنش کلونی PCR انجام شد. در این مرحله به عنوان نمونه تعدادی تک کلونی انتخاب شد و با سر سمپلر کریستالی مقداری از آن برداشته و با ۱۰ میکرولیتر آب مخلوط کرده و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد.

افزایش بیان پروتئین با وزن مولکولی تقریباً ۳۸ کیلو دالتون نشان داد (۲۰). از آن جاکه پروتئاز تولید شده از منابع طبیعی برای تجاری سازی و تولید انبوه مقرون به صرفه نمی‌باشد و هم‌چنین با توجه به دردسترس نبودن باکتری جهت جداسازی ژن کدکننده سرین پروتئاز، هدف از این پژوهش سنتز ژن تولیدکننده آنزیم پروتئاز از باکتری دریایی *Virgobacillus natechei* و بیان آن در باکتری *E. coli* سویه BL21 می‌باشد تا مقدمه‌ای برای تولید ارزشمند یک سرین پروتئاز به عنوان آنزیمی کاربردی در بازیابی صنایع شیلاتی با رویکردی مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست باشد.

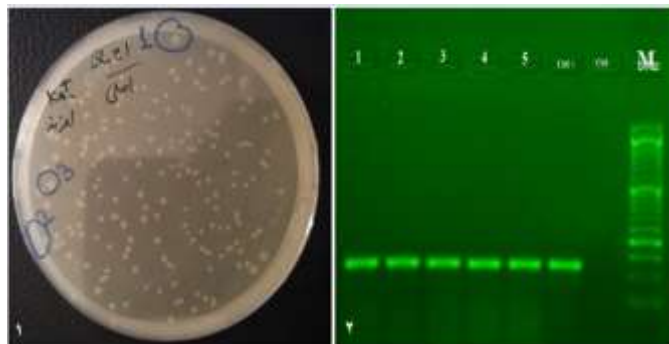
مواد و روش‌ها

سنتز مصنوعی ژن سرین پروتئاز: در این مطالعه از ژن کدکننده سرین پروتئاز شناسایی شده از باکتری دریایی *Virgobacillus natechei* استفاده شد (۲۱). دلیل این انتخاب، بیان بالا، ترشح خارج سلولی، پایداری نسبتاً مناسب و فعالیت بالای آنزیم در دماها و pH بحرانی و هم‌چنین ویژگی‌های سنتیکی بهینه پروتاز تولیدی می‌باشد. در ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن کدکننده سرین پروتئاز از باکتری *V. natechei* با شماره الحاق ژنی MN094794 از بانک ژن NCBI استخراج و با استفاده از برنامه Translate (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) به توالی آمینواسیدی ترجمه گردید. به منظور اپتی‌م‌سازی کدون‌های ژن و تناسب داشتن آن‌ها با ژنوم میزبان و در نهایت سنتز ژن به شرکت بیوتکنولوژی مولکولی Shine Gene ژاپن ارسال گردید.

باکتری و حامل مورد استفاده: در این مطالعه از باکتری *E. coli* سویه BL21 به عنوان میزبان بیانی و PET 28a به عنوان حامل دارای ژن مقاومت به کانامایسین استفاده گردید.

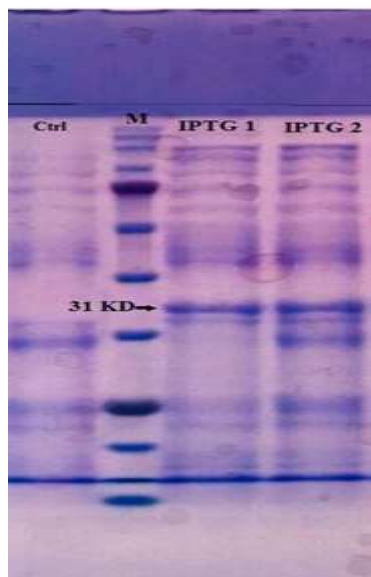
اتصال ژن و وکتور PET28a با کمک آنزیم لیگاز T4: مراحل ذیل مطابق با دستورالعمل‌های Maniatis و همکاران، انجام شد (۲۲). قبل از انجام عمل اتصال، پلاسمید و ژن مورد نظر توسط آنزیم‌های برشی NcoI و XhoI برش خورده سپس با آنزیم لیگاز T4 به یکدیگر متصل شدند. مقادیر مورد استفاده شامل: بافر لیگاز ۱۰x (۱/۵ میکرو لیتر)، قطعه هضم شده (۶ میکرولیتر)، وکتور هضم شده (۴ میکرو لیتر)، آنزیم لیگاز ۵ واحد آنزیمی بر میکرولیتر (۱ میکرولیتر) و آب مقطر (۲/۵ میکرولیتر) به آن‌ها اضافه شد و در ادامه به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶ درجه قرار گرفت.

مراحل مستعد کردن باکتری *E. coli* BL21 به روش تیمار با کلسیم کلرید و انتقال وکتور حاوی ژن به میزبان: برای تهیه



شکل ۱: محیط کشت حاوی کلنی‌های باکتری نوترکیب *E. coli* BL21 (۱) نتیجه کلنی PCR (۲)، ۵-۱ نمونه‌ها، کنترل مثبت، کنترل منفی، M: مارکر

بررسی بیان ژن در میزبان *E. coli* BL21 با استفاده از الکتروفورز عمودی SDS-PAGE: پس از اطمینان از صحت انتقال وکتور نوترکیب به میزبان بیانی *E. coli* BL21 باکتری روی محیط کشت مایع دارای کانامایسین به صورت شبانه کشت داده شد و بعد از مرحله جوان سازی کشت و رسیدن به غلظت مناسب القای بیان با IPTG در آن صورت گرفت. وجود باند پروتئینی واضح در محدوده تقریبی ۳۱ کیلوالتون بر روی ژل SDS-PAGE ۸ ساعت پس از افزودن IPTG با غلظت یک میلی مولار بیانگر تولید موفق پروتئین نوترکیب بود (شکل ۲).



شکل ۲: ژل SDS PAGE نمونه‌های القا شده با IPTG: ۱ و ۲، M: مارکر، Ctrl: نمونه قبل از القاء IPTG

جدول ۱: پرایمرهای طراحی شده در مطالعه حاضر

پرایمر	(5-3) توالی	قطعه تکثیر کننده
SerPro-F	AGGTATCATCACCGACCACAA	۱۱۷ جفت باز
SerPro-R	ACAACCTCGTCAGCTTCTTCG	

واکنش کلونی PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر در دستگاه PeQstar (PeQlab, Germany) شامل ۷/۵ میکرولیتر از ترکیب اصلی PCR آنزیم TaqDNA polymerase (Ampliqon RED2x kit, Denmark)، ۰/۷ میکرولیتر از پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی ژن، ۱ میکرو لیتر از وکتور نوترکیب و ۶/۱ آب مقطر استریل در برنامه دمایی ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و برای بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. در این واکنش از وکتور نوترکیب به عنوان کنترل مثبت و از وکتور غیر نوترکیب به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد و با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید.

القای بیان ژن سرین پروتئاز در باکتری‌های حاوی وکتور

نوترکیب: بعد از تایید کلونی‌های حاوی وکتور نوترکیب، باقی مانده آن را در شرایط کاملاً استریل در ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی کانامایسین تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه را در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی کانامایسین اضافه کرده و تا رسیدن به غلظت ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (در ۳۷ درجه سانتی گراد با شیک ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از رسیدن به کدورت مورد نظر، ۲ میلی لیتر از محیط به عنوان نمونه کنترل برداشته شد. به منظور القای بیان IPTG، میلی مولار به محیط کشت فوق اضافه شد و محیط کشت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با شیک ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۸ ساعت قرار گرفت و بعد از سانترفیوژ محیط کشت در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سوپرناتانت جدا کرده و بیان آنزیم به کمک SDS PAGE ۱۲ درصد بررسی شد.

نتایج

بررسی صحت انتقال وکتور نوترکیب به باکتری میزبان

E. coli BL21: کلنی‌های تشکیل شده بعد از ترانسفورماسیون و صحت انتقال و تایید حضور ژن با طول قطعه ۱۱۷ جفت باز در میزبان *E. coli* BL21 بر روی ژل آگارز در شکل ۱ قابل مشاهده است.

بحث

ایجاد نشود، صورت گرفت. نتایج تولید آنزیم با استفاده از سنتز ژن نشان می‌دهد که سرین پروتئاز با منشا *Virgibacillus natechei* می‌تواند انتخاب مناسبی برای مطالعات بیش‌تر در زمینه بیوشیمیایی و ساختاری آنزیم باشد. با توجه به ترشح آنزیم در سیستم *E. coli* می‌توان امیدوار بود که در صورت داشتن فعالیت آنزیمی قابل توجه، انتخاب مناسبی برای کاربردهای صنعتی از جمله صنایع شیلاتی باشند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور از طرح شماره ۹۹۰۲۴۶۹۴ انجام شده است.

منابع

1. Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H.G. and Marshall, M.R., 2011. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. Food Chemistry. 124(2): 640-645.
2. Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A. and Prentice, C., 2018. Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview. Marine Biotechnology. 20(2): 118-130.
3. Shirahigue, L.D., Silva, M.O., Camargo, A.C., Sucasas, L.F.D.A., Borghesi, R., Cabral, I.S.R., Savay da-Silva, L.K., Galvão, J.A. and Oetterer, M., 2016. The feasibility of increasing lipid extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste by proteolysis. Journal of Aquatic Food Product Technology. 25(2): 265-271.
4. Xu, H., Mu, Y., Liang, M., Zheng, K. and Wei, Y., 2017. Application of different types of protein hydrolysate in high plant protein diets for juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture Research. 48(6): 2945-2953.
5. Sierra Lopera, L.M., Sepúlveda Rincón, C.T., Vásquez Mazo, P., Figueroa Moreno, O.A. and Zapata Montoya, J.E., 2018. Byproducts of aquaculture processes: development and prospective uses. Review. Vitae. 25(3): 128-140.
6. Siddik, M.A., Howieson, J. Fotedar, R. and Partridge, G.J., 2020. Enzymatic fish protein hydrolysates in finfish aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture. 13(1): 406-430.
7. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. and Ashraf, M., 2019. Microbial proteases applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 7: 110 p.
8. Maruthiah, T., Somanath, B., Immanuel, G. and Palavesam, A., 2015. Deproteinization potential and antioxidant property of haloalkalophilic organic solvent tolerant protease from marine Bacillus sp. APCMST-RS3 using marine shell wastes. Biotechnology Reports. 8: 124-132.
9. Homaei, A., Lavajoo, F. and Sariri, R., 2016. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. International Journal of Biological Macromolecules. 88: 542-552.

یکی از مهم‌ترین مشکلاتی است که امروزه صنعت آبزیان با آن روبرو است مدیریت نامناسب ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان است. این ضایعات صنایع شیلاتی حاوی مقدار قابل توجهی از پروتئین هستند (۲، ۲۳). یکی از راهکارهای بازیابی ضایعات، هیدرولیز آن‌ها است. از آن‌جاکه تاکید زیادی بر روی توسعه فرایندهای سازگار با محیط زیست شده، پروتئازها می‌توانند به عنوان فرآیند سازگار با محیط زیست جایگزینی مناسب، برای بسیاری از مواد شیمیایی موجود در فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی باشند (۷، ۲۴). در سال‌های اخیر تکنولوژی DNA نو ترکیب باعث رشد و توسعه سریع بازار آنزیم‌های صنعتی شده است. از مهم‌ترین مزایای آنزیم‌های نو ترکیب، افزایش راندمان تولید آنزیم، تنوع آنزیم‌های تولید شده، بهبود خصوصیات آنزیم نظیر افزایش پایداری حرارتی و تولید آنزیم‌هایی با خلوص بالاتر نسبت به روش‌های شیمیایی می‌باشد (۷). در حال حاضر توانایی سنتز مصنوعی توالی‌های DNA پیشرفت‌های چشمگیری در بسیاری از تحقیقات حوزه بیوتکنولوژی از جمله فناوری DNA نو ترکیب را سبب شده است و در بسیاری از موارد از جمله عدم دسترسی به DNA الگو و یا بهینه نبودن کدون‌های آن به منظور بیان در میزبان می‌تواند بهترین انتخاب باشد (۱۷). امروزه منبع اصلی آنزیم‌های مفید در مطالعات علمی و صنعتی، میکروارگانیسم‌های با منشا دریایی هستند (۲۵، ۲۶). شناسایی تنوع میکروبی، محرک اصلی برای یافتن و شرح محصولات زیستی است. در این مطالعه، کلونینگ ژن سرین پروتئاز در باکتری *E. coli* BL21 صورت گرفت. شرایط بهینه بیان برای این باکتری نو ترکیب، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، زمان ۸ ساعت و غلظت IPTG یک میلی‌مولار بود و یک باند با وزن مولکولی ۳۱ کیلو دالتون مشابه با آن‌چه که از Mechrie و همکاران گزارش شده بود بر روی ژل نمایان شد. به‌طور مشابه Rajeswari و همکاران، وزن مولکولی پروتئاز به دست آمده از باکتری *Virgibacillus dokdonensis* VITP14 را ۳۶۱ کیلو دالتون گزارش کردند (۲۷). Raval و همکاران، وزن مولکولی نوعی از سرین پروتئاز قلیایی باکتریایی را ۳۸ کیلو دالتون گزارش کردند (۲۰). در گزارشی دیگر وزن مولکولی پروتئازهای به دست آمده از گونه‌های مختلف *Halobacterium* در محدوده ۱۳۰-۴۰ کیلو دالتون بود (۲۸). با توجه به بیان پروتئین به صورت خارج سلولی و به کمک سنتز مصنوعی ژن، به نظر می‌رسد که آنزیم تخلیص شده پس از مراحل سنجش عملکرد، انتخاب بسیار مهمی برای مطالعات و بهینه‌سازی بیش‌تر باشد. مطالعه حاضر با هدف تولید آنزیم سرین پروتئاز به کمک سنتز مصنوعی ژن انجام شد. سنتز مصنوعی ژن با استفاده از بهینه‌سازی کدون‌های آمینواسیدی به طوری که در آمینواسیدهای آن تغییری

25. **Mohamadi, S. and Mehrabi, M., 2019.** Product optimization of an extracellular alkalophilic organic solvent-resistant protease enzyme secreted by *Bacillus* sp. Journal of Animal Environment. 11(4): 397-408. (In Persian)
26. **Hosseini, S.D. and Hesaree, M., 2019.** Isolation and protease enzyme activity survey in *Bacillus* isolates collected from Mahalat warm water springs. Journal of Animal Environment. 11(4): 389-396. (In Persian)
27. **Rajeswari, V.D., Jayaraman, G. and Sridharan, T., 2012.** Purification and characterization of extracellular protease from halotolerant bacterium *Virgibacillus dokdonensis* VITP14. Asian J Biochem. 7: 123-132.
28. **Akolkar, A.V. and Desai, A.J., 2010.** Catalytic and thermodynamic characterization of protease from *Halobacterium* sp. SP1 (1). Research in Microbiology. 161(5): 355-362.
10. **Nisha, N.S. and Divakaran, J., 2014.** Optimization of alkaline protease production from *Bacillus subtilis* NS isolated from sea water. African Journal of Biotechnology. 13(16): 1707-1713.
11. **Ali, N., Ullah, N., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S.N., Sadiq, A. and Adnan, M., 2016.** Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. Extremophiles. 20(4): 395-402.
12. **Barzkar, N., Homaei, A., Hemmati, R. and Patel, S., 2018.** Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. Extremophiles. 22(3): 335-346.
13. **Imada, C., 2004.** Enzyme inhibitors of marine microbial origin with pharmaceutical importance. Marine Biotechnology. 6(3): 193-198.
14. **Da Silva, R.R., 2017.** Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. Applied Biochemistry and Biotechnology. 183(1): 1-19.
15. **Ward, O.P., Rao, M.B. and Kulkarni, A., 2009.** Proteases Production. Elsevier. 495-511.
16. **Gulmez, C., Atakisi, O. and Yildizdalginli, K., 2017.** A novel biocatalytic detergent additive: Organic solvent stable and thermo-alkaline recombinant subtilisin. International Journal of Biological Macromolecules. 108: 436-443.
17. **Li, G., Dong, B.X., Liu, Y.H., Li, C.J. and Zhang, L.P., 2013.** Gene synthesis method based on overlap extension PCR and DNAWorks program. In Synthetic Biology. 9-17.
18. **Ghasemi, Y., Dabbagh, F. and Ghasemian, A., 2012.** Cloning of a fibrinolytic enzyme (subtilisin) gene from *Bacillus subtilis* in Escherichia coli. Molecular Biotechnology. 521: 1-7.
19. **Masilamani, R. and Natarajan, S., 2015.** Molecular cloning, overexpression and characterization of a new thiol-dependent, alkaline serine protease with destaining function and fibrinolytic potential from Marinobacter aquaeolei MS2-1. Biologia. 70(9): 1143-1149.
20. **Raval, V.H., Rawal, C.M., Pandey, S., Bhatt, H.B., Dahima, B.R. and Singh, S.P., 2015.** Cloning, heterologous expression and structural characterization of an alkaline serine protease from sea water haloalkaliphilic bacterium. Annals of Microbiology. 65(1): 371-381.
21. **Mechri, S., Bouacem, K., Amziane, M., Dab, A., Natche, F. and Jaouadi, B., 2019.** Identification of a new serine alkaline peptidase from the moderately halophilic *Virgibacillus natchei* sp. nov., strain FarDT and its application as bioadditive for peptide synthesis and laundry detergent formulations. BioMed Research International. 6470897.
22. **Maniatis, T., Fritsch, E.E. and Sambrook J., 2001.** Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
23. **Deng, J.J., Mao, H.H., Fang, W., Li, Z.Q., Shi, D., Li, Z.W., Zhou, T. and Luo, X.C., 2020.** Enzymatic conversion and recovery of protein, chitin, and astaxanthin from shrimp shell waste. Journal of Cleaner Production. 271: 122655.
24. **Suberu, Y., Akande, I., Samuel, T., Lawal, A. and Olaniran, A., 2019.** Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 20: 101264.