

فرم اطلاعیه دفاع رساله دکتری



دانشکده مهندسی نساجی

عنوان رساله

ارزیابی پایداری حرارتی آنزیم کیوتیناز برای هیدرولیز آنزیمی پلی استر با استفاده از جهش‌زایی هدایت یافته مکانی

ارائه کننده

افسانه زارعی

استاد راهنما

دکتر فرزانه علی حسینی

استاد مشاور

دکتر فرزانه جعفری

اساتید ممتحن

دکتر شهرزاد آهنگرزاده

دکتر اکبر خدای

دکتر حمید زیلویی

زمان

روز: شنبه تاریخ: ۱۴۰۴/۱۱/۱۸ ساعت: ۱۰:۰۰

مکان

سالن سمینار دانشکده نساجی

چکیده

باتوجه به مصرف روزافزون پلی استر در صنایع مختلف از جمله صنعت نساجی و نگرانی‌های گسترده‌ی جهانی پیرامون زیست تخریب ناپذیری این پلیمر، رویکرد این پژوهش مهندسی نوعی آنزیم استر هیدرولاز از خانواده کیوتینازها موسوم به LCC باهدف افزایش پایداری حرارتی آن و امکان‌سنجی استفاده از آن برای هیدرولیز سطحی و یا تخریب پلی استر بود. در این راستا در ابتدا با استفاده از روش داکینگ مولکولی و مولکول C₉C کمپلکس آنزیم/سوبسترا تهیه شد و سپس توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) و آنالیز نتایج RMSF و RMSD آمینواسیدهای کلیدی که در دمای نزدیک به دمای انتقال شیشه‌ای پلی استر که بیش‌ترین تأثیر را بر ناپایداری حرارتی آنزیم داشتند شناسایی شدند. در نتیجه‌ی این بررسی‌ها و هم‌ترازی توالی نوکلئوتیدی با توالی همولوگ‌های این آنزیم، آمینواسیدهای T₆₀ موجود در صفحه‌ی β_1 و N₁₂₂ موجود در حلقه‌ی متصل‌کننده‌ی $\alpha_3 - \beta_4$ به ترتیب با لایزین و ایزولوسین جایگزین شدند. در ادامه مجدداً کمپلکس آنزیم موتانت C₉C/KI توسط روش داکینگ مولکولی تهیه شده و تأثیر جهش‌های ایجاد شده بر کل پروتئین و بر تک‌تک آمینواسیدها توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده‌ی کاهش نسبی RMSF و RMSD در برخی قسمت‌ها به‌ویژه در برخی قسمت‌ها به‌ویژه در نواحی جهش داده شده بود. سپس توالی نوکلئوتیدی آنزیم اصلاح شده طراحی شده و برای سنتز ارسال شد. آنالیز توالی‌یابی سنگر و الکتروفورز ژل آگارز گویای سنتز صحیح توالی بودند. در ادامه توالی نوکلئوتیدی مذکور به همراه LCC توسط وکتور بیانی pET ۲۶b(+) طی فرایند کلونینگ در باکتری *E. Coli* BL۲۱ (DE۳) بیان و توسط روش IMAC خالص‌سازی شدند. پس از آن فعالیت ۵۰۰ میکرولیتر از آنزیم‌ها در ۵۵ درجه‌سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد که به ترتیب ۴/۲۸۱ $\mu\text{mol/L.min}$ و ۴/۰۱۴ $\mu\text{mol/L.min}$ بودند. بررسی دما و pH بهینه‌ی عملکرد آنزیم‌ها توسط سوبسترای مایع پارانیتروفیل بوتیرات انجام شد. نتایج نشان داد دمای بهینه‌ی