

مطالعه بر هم کنش آنزیم آلفا آمیلاز از منشاء *B.subtilis* و سدیم دودسیل سولفات

بهزاد شارقى

گروه زیست‌شناسی - دانشگاه شهرکرد

پست الکترونیکی: shareghi@sci.sku.ac.ir

چکیده

میانکنش سدیم *n*-دودسیل سولفات و آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل (*E.C. 3.2.1.1*) از منشاء *B.Subtilis* با استفاده از بررسی‌های اسپکتروفتومتری در ناحیه ماورابنفش و اندازه‌گیری فعالیت ویژه مورد مطالعه قرار گرفته است. اندازه‌گیری‌های طیفی در دامنه دمایی ۲۰ الی ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از تامپون سدیم فسفات $M = 0.02$ ، $pH = 6.9$ در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شده است. مطالعات سینتیکی در دماهای مختلف و $pH = 6.9$ صورت گرفته است. نتایج حاصله به این شرح قابل بیان است: ۱- پایداری حرارتی بسیار زیاد آنزیم. ۲- برهم کنش سدیم دودسیل سولفات (به عنوان یک دگرگون‌ساز قوی) با آنزیم آلفا آمیلاز در دمای کمتر از ۹۰ درجه سانتی‌گراد اثری بر پایداری آنزیم ندارد، اما در دماهای بالاتر سبب تغییرات ساختاری آنزیم شده که با استفاده از آن پارامترهای ترمودینامیکی دگرگون‌ساز محاسبه شده است. ۳- در حضور سدیم دودسیل سولفات پارامترهای ترمودینامیکی ΔH_m° ، ΔS_m° و ΔC_p در دمای بیش از $90^\circ C$ کاهش می‌یابد. ۴- مطالعات سینتیکی انجام شده در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نمایان‌گر کاهش ناچیز در فعالیت آنزیم در حضور سدیم دودسیل سولفات است.

واژه‌های کلیدی: آلفا آمیلاز، پایداری، ترمودینامیک، سینتیک.

مقدمه

می‌باشد [۱]. آنزیم‌های آلفا آمیلاز حاصل از *Bacillus subtilis* و باکتری‌های وابسته بر اساس نحوه عملکرد روی نشاسته به دو گروه *Saccharifying* و *Liquefying* تقسیم‌بندی می‌شوند [۲]. مطالعات انجام گرفته مبین نقش

آنزیم آلفا آمیلاز (*E.C.3.2.1.1*) واکنش هیدرولیز نشاسته و گلیکوژن را کاتالیز می‌نماید و یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت نشاسته

سیگما خریداری شده است. محلول سدیم فسفات $\text{pH}=6/0,9/02 \text{ M}$ به عنوان بافر استفاده شده است و غلظت آنزیم استفاده شده $0/5$ میلی گرم در میلی لیتر می باشد.

روش ها

۱- بررسی اثر حرارت بر پایداری آنزیم آلفا آمیلاز منحنی های دگرگون سازی در دامنه دمای ۲۰ الی ۱۰۵ درجه سانتی گراد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ۴۰۰۰ مجهز به سیستم کنترل حرارتی الکترونیکی با سرعت افزایش حرارت یک درجه سانتی گراد در دقیقه در محلول سدیم فسفات $\text{pH}=6/9, 0/02 \text{ M}$ در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمده است.

۲- بررسی اثر SDS بر پایداری آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل

غلظت های مختلف SDS در دامنه ۱ الی ۸ میلی مولار در بافر سدیم فسفات $\text{pH}=6/9$ و $0/02 \text{ M}$ تهیه شده است. محلول آنزیمی در هر یک از غلظت های مشخص از SDS ساخته شده و مطالعات در غلظت پایین تر از نقطه CMC صورت می گیرد. منحنی های دگرگون سازی در طول موج ۲۸۰ نانومتر و دمای ثابت مورد مطالعه قرار گرفته اند.

۳- سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

در اثر عمل آنزیم آلفا آمیلاز بر روی نشاسته، قندهای احیا کننده ایجاد می شوند که با معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید ترکیب شده و کمپلکس رنگی ایجاد می شود که حداکثر جذب آن ۵۴۰ نانومتر

پایدارسازی یون کلسیم برای آنزیم آلفا آمیلاز می باشد [۳]. آنزیم آلفا آمیلاز در دامنه وسیعی از pH پایدار می باشد [۴]. وزن مولکولی آنزیم آلفا آمیلاز از منشاء *B.subtilis* برابر ۶۹ kD می باشد. تعداد اسیدهای آمینه ساختار آنزیم ۵۱۴ است [۵]. این آنزیم در ساختار خود حاوی ۱۵/۵ درصد اسیدهای آمینه باردار منفی و ۱۳/۸ درصد اسیدهای آمینه باردار مثبت و ۳۸ درصد اسیدهای آمینه آبگریز می باشد [۶]. سرفکتانت های یونی نظیر سدیم دودسیل سولفات^۱ (SDS) به عنوان یک سرفکتانت آنیونی و دودسیل تری متیل آمونیم برمید (DTAB) به عنوان یک سرفکتانت کاتیونی، معمولاً با پروتئین های محلول در آب واکنش داده و ساختار طبیعی آنها را دگرگون می نمایند. این واکنش ها به طور وسیعی مطالعه شده است و چندین مقاله در مورد آنها منتشر شده است [۷، ۸، ۹ و ۱۰]. میانکنش این ترکیبات با پروتئین ها ابتدا با اتصال الکترواستاتیک سر یونی سرفکتانت ها با جایگاه هایی با بار مخالف در سطح پروتئین آغاز شده و سپس با اتصالات آبگریز به پیش می رود [۱۱]، [۱۲ و ۱۳]. در این مقاله ما به بررسی تخمین پایداری آنزیم آلفا آمیلاز پرداخته و با استفاده از مطالعات اسپکتروفتومتری و سنجش فعالیت ویژه آنزیم به تشریح بر هم کنش SDS و آنزیم می پردازیم.

مواد و روش ها

مواد

آنزیم آلفا آمیلاز از منشاء *B.subtilis* از شرکت مرک و ترکیب سدیم n- دودسیل سولفات از شرکت

تا دمای ۳۷۲ K مقدار جذب تقریباً ثابت می‌باشد. به عبارت دیگر تغییر عمده در ساختمان سوّم آنزیم، که توسط دستگاه قابل مشاهده باشد صورت نمی‌پذیرد. پایداری ساختمانی آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل را می‌توان به صورت اختلاف انرژی آزاد برای واکنش زیر در نظر گرفت:

حالت دگرگون شده \longleftrightarrow حالت طبیعی

با در نظر گرفتن مکانیزم دو حالتی کسر پروتئین دگرگون شده قابل محاسبه می‌باشد [۱۵].

$$F_d = \frac{Y_N - Y_{obs}}{Y_N - Y_d} \quad (1)$$

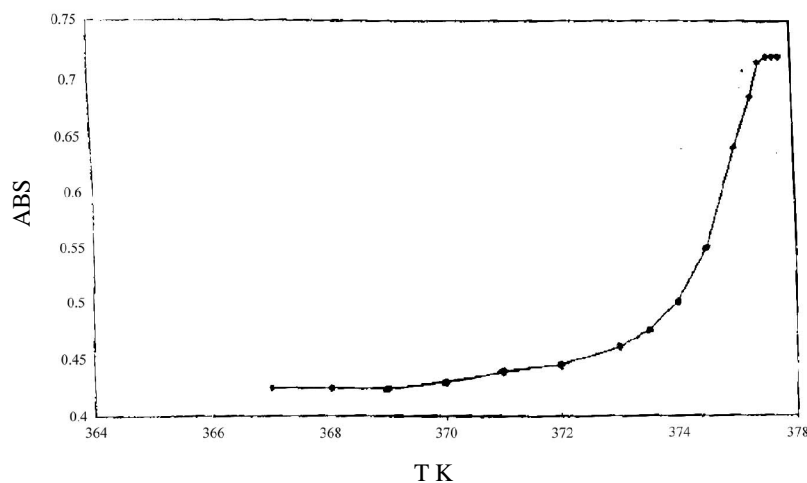
در رابطه فوق Y_N ، Y_d به ترتیب کمیت‌های فیزیکی مورد بررسی مولکول‌های طبیعی و دگرگون شده تحت شرایطی است که Y_{obs} اندازه‌گیری می‌شود.

می‌باشد. از محلول ۱٪ نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود و با استفاده از مالتوز در دامنه غلظتی ۰/۳ الی ۵ میکرومول در میلی‌لیتر بافر، منحنی استاندارد ایجاد شده است [۱۴ و ۱۵]. فعالیت ویژه آنزیم به طریقه زیر محاسبه می‌گردد:

۴- بررسی اثر SDS بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز
فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در دمای ۳۶۸ کلوین در بافر سدیم فسفات ۰/۰۲M و pH=۶/۹ در غلظت‌های مختلف از SDS در دامنه ۱ الی ۸ میلی‌مولار مورد بررسی قرار گرفته است.

نتایج

شکل ۱ نشان دهنده منحنی تغییرات مقدار جذب آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در دماهای مختلف در طول موج ۲۸۰ نانومتر می‌باشد. چنان که مشاهده می‌گردد،



شکل ۱- منحنی تغییرات جذب آنزیم آلفا آمیلاز در مقابل دما در طول موج ۲۸۰ نانومتر در بافر سدیم فسفات

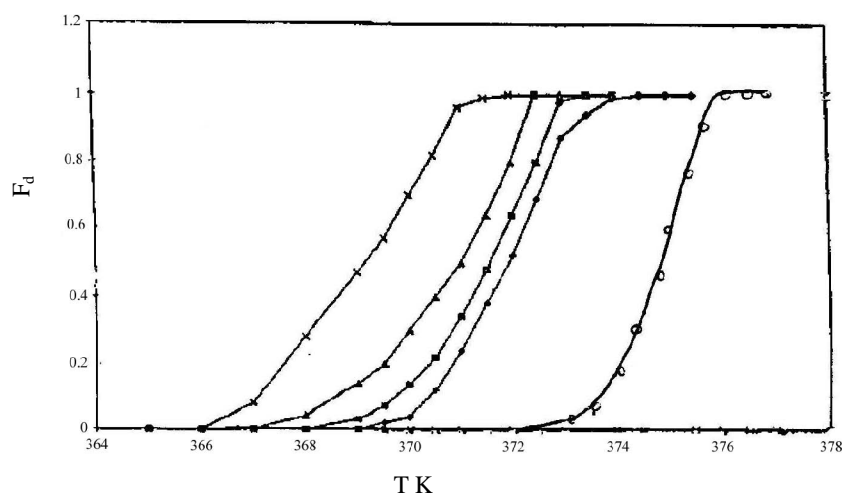
pH=۶/۹ ، ۰/۰۲ M

پایداری آنزیم در حضور SDS کاهش یافته است. برای محاسبه تغییر در انرژی آزاد حالت‌های طبیعی و دگرگون شده، ΔG_D° ، می‌توان از رابطه (۲) استفاده نمود [۱۶].

$$\Delta G_D^\circ = -RT \ln \left[\frac{F_d}{(1 - F_d)} \right] = -RT \ln \left[\frac{(Y_n - Y_{obs})}{(Y_{obs} - Y_d)} \right] \quad (2)$$

در این رابطه R ثابت گازها و T دمای کلین می‌باشد.

شکل ۲ نمایانگر تغییرات منحنی‌های کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت‌های از SDS می‌باشد. چنان‌که مشاهده می‌شود در غیاب SDS، F_d تا دمای ۳۷۲K برابر صفر بوده ولی با افزایش بیشتر دما مقدار F_d نیز افزایش می‌یابد. اطلاعات حاصله از منحنی‌های کسر پروتئین دگرگون شده بیانگر این نکته است که با افزایش غلظت SDS مقدار F_d برای آنزیم آلفا آمیلاز دگرگون شده در دمای پایین‌تری به یک می‌رسد. به عبارت دیگر



شکل ۲- منحنی تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده آنزیم آلفا آمیلاز در غلظت‌های مختلف از SDS در بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M، pH=۶/۹

خطی ΔG_D° علیه دما در غلظت‌های مختلف SDS مبین کاهش مقدار T_m با افزایش غلظت SDS است. نتایج در جدول ۱ ثبت شده است. شیب منحنی در نقطه T_m برابر ΔS_m° است [۲۱]. برای محاسبه ΔH_m° با در نظر گرفتن مقدار صفر برای ΔG_D° می‌توان از رابطه (۳) استفاده کرد.

$$\Delta H_m^\circ = T_m \Delta S_m^\circ \quad (3)$$

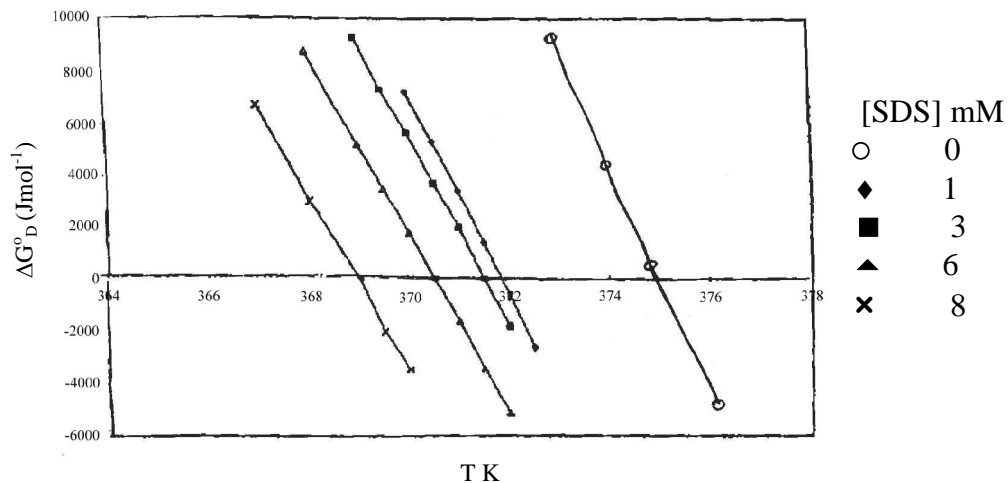
منحنی تغییرات ΔG_D° در مقابل T در غلظت‌های مختلف SDS در شکل ۳ نشان داده شده است. دمای ذوب پروتئین T_m دمایی است که مقدار ΔG_D° برابر صفر می‌شود. بنابراین مقدار T_m برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در غیاب SDS، ۳۷۴/۷ K بوده که نمایانگر پایداری حرارتی بسیار زیاد این آنزیم می‌باشد. نتایج حاصل از منحنی‌های تغییرات

ترمودینامیکی ΔH_m° و ΔS_m° را می توان به صورت زیر بیان کرد [۱۸]:

$$\Delta H_m^\circ = H_m^\circ(D) - H_m^\circ(N) \quad (۴)$$

$$\Delta S_m^\circ = S_m^\circ(D) - S_m^\circ(N) \quad (۵)$$

ΔS_m° و ΔH_m° به ترتیب تغییرات انتروپی و انتالپی در دمای T_m می باشند. مقادیر ΔH_m° و ΔS_m° با افزایش غلظت SDS کاهش می یابد (جدول ۲). با در نظر گرفتن این که پروتئین ها دارای دو حالت ماکروسکوپی پایدار و قابل تشخیص می باشند توابع



شکل ۳- منحنی تغییرات ΔG_D° آنزیم آلفا آمیلاز در غلظت های مختلف از SDS در مقابل دما در بافر سدیم فسفات pH=۶/۹، ۰/۰۲ M

پایداری فوق العاده زیاد آنزیم مانع از تغییرات ساختمانی قابل ثبت در طول موج ۲۸۰ نانومتر می گردد. شکل ۴ نشان دهنده کاهش مقدار ΔG_D° با افزایش غلظت SDS در دمای ثابت می باشد. این بدین معناست که افزایش غلظت SDS سبب جابجایی تعادل:



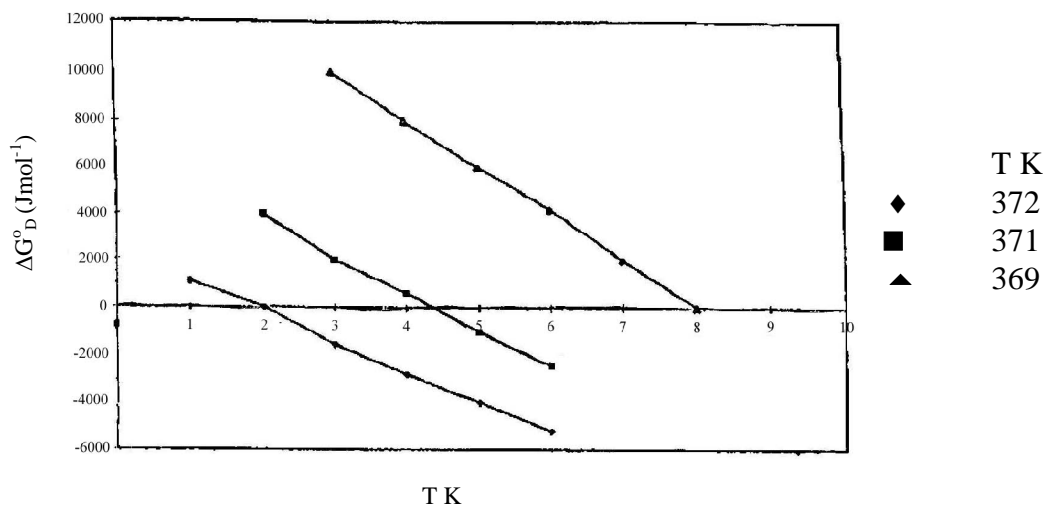
به سمت راست شده و به عبارت دیگر سهم پروتئین دگرگون شده افزایش یافته که خود نمایانگر باز شدن ساختمان آنزیم می باشد. وابستگی حرارتی ΔG_D° با

با توجه به این که حالت دگرگون شده پروتئین ها، به صورت پیچیده بی نظم در نظر گرفته می شود کاهش مقادیر ΔH_m° و ΔS_m° مبین باز شدن ساختمان طبیعی آنزیم و به عبارت دیگر افزایش سهم پروتئین دگرگون شده می باشد. نتایج فوق یعنی کاهش مقادیر T_m ، ΔH_m° و ΔS_m° نمایانگر کاهش پایداری آنزیم در حضور SDS و افزایش کسر پروتئین دگرگون شده می باشد. نکته قابل توجه در مورد بر هم کنش SDS و آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل این است که ترکیب SDS اگرچه در دماهای پایین تر از ۳۶۳ K هم به آنزیم متصل می گردد، ولی

در این رابطه $\Delta G_D^\circ(T)$ مقدار ΔG_D° در دمای T ، T_m دمای ذوب پروتئین، ΔH_m° تغییر آنتالپی در دمای T_m و ΔC_p اختلاف در ظرفیت حرارتی آرایش فضایی تا خورده و دگرگون شده است.

استفاده از شکل دگرگون شده معادله گیبس - هلمهولتز قابل ارائه است [۲۱].

$$\Delta G_D^\circ(T) = \Delta H_m^\circ(1 - T/T_m) - \Delta C_p [T_m - T + T \ln(T/T_m)] \quad (۶)$$



شکل ۴- منحنی تغییرات ΔG_D° در مقابل غلظت‌های مختلف از SDS در دمای مختلف در بافر سدیم فسفات M pH=۶/۹، ۰/۰۲

تغییرات ΔG_D° نسبت به غلظت دگرگون کننده در ناحیه انتقال حالت پروتئین به صورت خطی بوده و با رابطه زیر بیان می‌گردد:

$$\Delta G_D^\circ = \Delta G_D^\circ(H_2O) - m[D] \quad (۸)$$

در رابطه فوق $\Delta G_D^\circ(H_2O)$ تخمین مقدار در غیاب دگرگون کننده و m اندازه وابستگی تغییرات ΔG_D° به غلظت دگرگون کننده است [۱۶]. نتایج حاصله مؤید کاهش مقادیر $\Delta G_D^\circ(H_2O)$ و $[SDS]_{1/2}$ با افزایش دما می‌باشد (جدول ۳). $[SDS]_{1/2}$ غلظتی از SDS است که مقدار ΔG_D° برابر صفر می‌شود. با افزایش دما، اثر دگرگون‌کنندگی بیشتری بر ساختار پروتئین خواهد داشت و چنان که ملاحظه

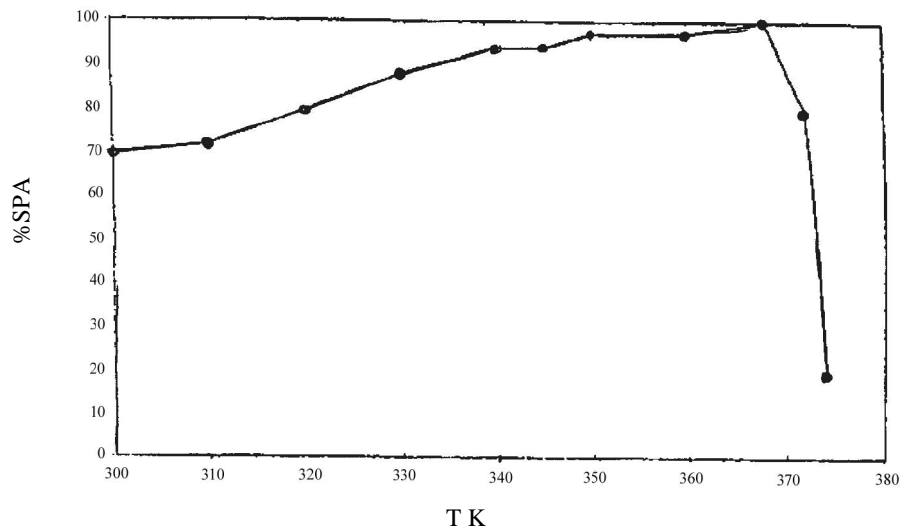
نتایج مربوط به مقادیر ΔC_p در حضور غلظت‌های مختلف SDS در جدول ۲ ثبت شده است. نتایج حاصل از تغییرات مقادیر ΔC_p مؤید باز شدن ساختمان آنزیم در حضور SDS می‌باشد. ΔC_p اختلاف ظرفیت حرارتی حالت‌های دگرگون شده آنزیم $C_p(U)$ و حالت طبیعی $C_p(N)$ می‌باشد [۱۹].

$$\Delta C_p = C_p(U) - C_p(N) \quad (۷)$$

با افزایش غلظت SDS، ΔC_p کاهش می‌یابد این مسئله به دلیل تمایل رو به ازدیاد تبدیل شکل طبیعی آنزیم به شکل دگرگون شده با افزایش SDS می‌باشد.

ترموفیل بودن آنزیم و دارا بودن فعالیت کاتالیتیکی در دماهای بسیار بالا است. دماهای بالاتر منجر به کاهش فعالیت می‌شوند که این مسئله به واسطه دگرگون شدن ساختار آنزیم می‌باشد.

می‌شود مقدار $[SDS]_{1/2}$ کاهش می‌یابد. شکل ۵ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در مقابل دما می‌باشد. چنان که مشاهده می‌گردد آنزیم در دامنه وسیعی از حرارت فعالیت خود را حفظ می‌کند. دمای بهینه فعالیت آنزیم ۳۶۸ K است، که خود نمایانگر

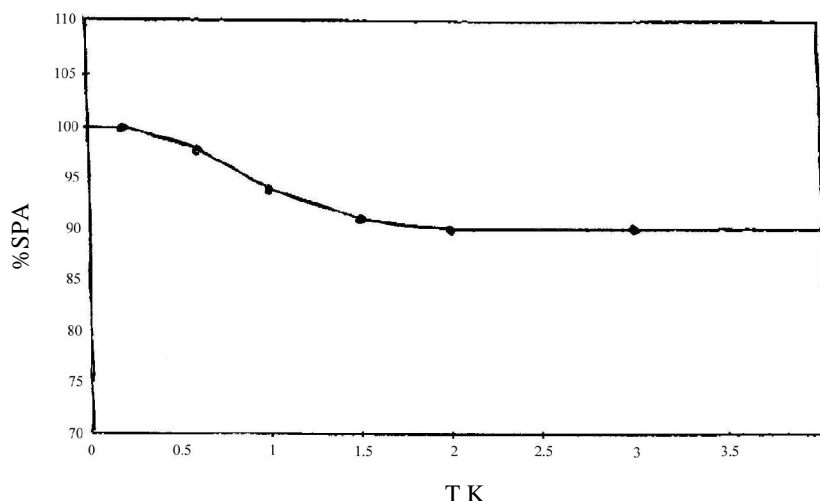


شکل ۵- منحنی تغییر فعالیت ویژه آنزیم آلفا آمیلاز در مقابل دما در بافر سدیم فسفات

pH=۶/۹، ۰/۰۲ M

فعالیت آنزیم که خود تابعی از ساختمان فضایی آنزیم است، ندارد. نتیجه فوق با نتایج حاصل از منحنی‌های کسر پروتئین دگرگون کاملاً همخوان بوده و به عبارت دیگر مطالعات ترمودینامیکی و سینتیکی صورت گرفته به میزان زیادی مؤید حفظ ساختار آنزیم در دمای ۳۶۸ K می‌باشند.

شکل ۶ نشان دهنده تغییرات فعالیت آنزیم در حضور SDS در دمای ۳۶۸ K می‌باشد. چنان که ملاحظه می‌گردد در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار SDS فعالیت آنزیم به حدود ۹۰ درصد رسیده و غلظت‌های بالاتر اثری بر فعالیت آنزیم ندارد. به عبارت دیگر در دمای فوق SDS اثر چندانی بر



شکل ۶- منحنی تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در مقابل غلظت‌های مختلف از SDS در دمای ۳۶۸ درجه کلوین در بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M، pH=۶/۹

بحث

آنزیم آلفا آمیلاز از منشأ *B.subtilis* پایداری حرارتی بسیار قابل توجهی را از خود نشان می‌دهد. مقدار بالای T_m این آنزیم (۳۷۴/۷ K) در مقایسه با اغلب آنزیم‌های معمولی، نمایان‌گر پایداری حرارتی بسیار زیاد آنزیم فوق می‌باشد. مطالعات انجام گرفته مؤید این نکته است که پایداری بسیار زیاد آنزیم‌های ترموفیل در مقابل حرارت به عوامل متعددی وابسته است که می‌توان به برهم کنش‌های هیدر فوبیک، پیوندهای یونی پیوندهای دی سولفید و محتوای اسیدهای آمینه آلیفاتیک اشاره نمود [۶]. آنزیم فوق دارای ۱۵/۵ درصد اسیدهای آمینه باردار منفی، ۱۳/۸ درصد اسیدهای آمینه باردار مثبت و ۳۸ درصد اسیدهای آمینه آبگریز است. وجود میانکنش‌های واندروالسی مربوط به اسیدهای آمینه آبگریز و وجود

برهم کنش‌های الکترواستاتیک بین اسیدهای آمینه باردار در افزایش پایداری آنزیم نقش دارند [۲۰]. محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی ΔC_p , ΔS_m° , ΔH_m° در حضور غلظت‌های مختلف SDS نمایان‌گر کاهش مقادیر پارامترهای فوق برای آنزیم ترموفیل می‌باشد. کاهش مقادیر ΔC_p , ΔS_m° , ΔH_m° مبین کاهش پایداری ساختمان آنزیم در حضور SDS می‌باشد. دتر جنت‌های یونی نظیر SDS سبب ناپایداری ساختمانی اغلب پروتئین‌های کروی در غلظت‌های بسیار پایین می‌شوند. مکانیزم دگرگون‌سازی پروتئین‌ها به وسیله SDS به این صورت است که در ابتدا ترکیب فوق که دارای سربار دار منفی و دنباله آبگریز ۱۲ کربنه است از طریق سرباردار خود به بارهای مثبت موجود در سطح پروتئین متصل می‌گردد [۱۲]. این برهم کنش‌های اولیه سبب باز شدن ساختار پروتئین شده

جدول ۲- پارامترهای ترمودینامیکی اثر SDS در دگرگون‌سازی آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل

[SDS]mM	ΔS_m° Jmol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG_D° kJmol ⁻¹	ΔC_p kJmol ⁻¹ K ⁻¹
۰	۴۳۰۰	۱۶۱۱/۲۱	۶/۴۱
۱	۴۰۲۹	۱۴۹۸/۸	۴/۱۳
۳	۴۰۰۰	۱۴۸۶	۲/۱۳
۶	۳۶۰۰	۱۳۳۳	۱/۹۵
۸	۳۴۵۱	۱۲۵۴	۱/۰۶

جدول ۳- پارامترهای مشخصه اثر SDS بر آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل

TK	$\Delta G_D^\circ(H_2O)$ kJmol ⁻¹	[SDS] _{1/2} mM
۳۶۹	۱۶	۸
۳۷۱	۶/۶	۴/۴
۳۷۲	۲/۶	۲

مراجع

- [1] Hee Heons, C., Young Wans, K. and Kwan Hwa, P., Molecular characterisation of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH 4-2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1476 (2000) 333-340.
- [2] Yuuki, T., Nomura, T., Tezuka, H., Tsuboi, A. and Yamagata, H.,

که به دنبال آن جایگاه‌های بیشتری در معرض قرار می‌گیرند و در نتیجه دنباله‌های آبگریز SDS می‌توانند به جایگاه‌های آبگریز آنزیم اتصال یابند. نتایج فوق، با بررسی‌های به عمل آمده در خصوص اثرات و دگرگون‌سازی ساختاری SDS بر آنزیم‌های دیگر مانند تریپسین و پپسین مطابقت دارد [۱۱، ۱۲ و ۱۳]. آنزیم‌های ترموفیل در محدوده ۳۳۳ K الی ۳۸۳ K دارای فعالیت کاتالیتیکی می‌باشند [۲۲ و ۲۳]. محدوده فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌های معمولی ۲۹۳ K الی ۳۳۳ K است [۲۲ و ۲۳]. دمای بهینه فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ۳۶۸ K است که نمایان‌گر ترموفیل بودن آن و توانایی جهت فعالیت کاتالیتیکی در دماهای بسیار بالاست. آنزیم‌های ترموفیل نه تنها پایداری غیر معمولی در مقابل دما دارند بلکه نسبت به دیگر دگرگون‌کننده‌ها نظیر حلال‌های آلی، دترجنت‌ها نیز مقاوم می‌باشند. نتایج حاصله نمایان‌گر پایداری کاتالیتیکی آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در مقابل غلظت‌های مختلف SDS در دمای ۳۶۸ K بوده که در تطابق با پایداری ساختمان آنزیم و نتایج حاصل از مطالعات انجام گرفته روی سایر آنزیم‌های ترموفیل می‌باشد [۲۴].

جدول ۱- تغییرات T_m آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در مقابل SDS

[SDS]mM	$T_m(K)$
۰	۳۷۴/۷
۱	۳۷۲
۳	۳۷۱/۵
۶	۳۷۰/۵
۸	۳۶۹

- of FAD. *Int. J. Biol. Macromol*, 19 (1996) 9-13.
- [8] Ajloo, D., Moosavi Movahedi, A.A., Hakimelahi G.H., Saboury, A.A. and Gharibi, H., The effect of dodecyltrimethyl ammonium bromide on the formation of Methemoglobins and hemichrome. *Colloid and Surface, Biointerface*, 26 (2000) 85-196.
- [9] Jones, M.N., *Biological Interface* chapter 5 Elsevier, 1975.
- [10] Jones M.N., *Chemical Society Reviews*, 2 (1991) 127-152.
- [11] Jones, M.N., A microcalorimetric study of the interaction between trypsin and sodium dodecyl sulphate, 49 (1977) 121-128.
- [12] Deo, N. and Steffen, S., *Surfactant Interactions with zein Protein. Langmuir*, 19 (2003) 5083-5088.
- [13] Tanaka, A. and Hoshino, E., Similarities between the thermal inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* α -Amylase in an aqueous solution of sodium dodecyl sulphate and the kinetics in the solution of anionic- Phospholipid vesicles. *Biotech. Appl Biochem*, 38 (2003) 175-181.
- [14] Cezka, M., A comparative α Amylase study using an agar medium. *Clin. Chim Acta*, 36 (1972) 419- 423.
- Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α -amylase of *Bacillus licheniformis*: comparison of amino acid sequence of three bacterial liquefying α -Amylase deduced from DNA sequences. *J. Biochem* 98 (1985) 1147-1156.
- [3] Agarwal, R. and Henkin, R., Metal binding characteristic of human salivary and porcine pancreatic amylase, 262 (1987) 2568-2573.
- [4] Hirome, K., Ohnishi, M. and Matsomoto, T., The pH Jump study of enzyme proteins. I. Liquefying α amylase *Bacillus subtilis*. *J. Biochem (Tokyo)*, 77 (1995) 957-963.
- [5] Buisson, G., Hasser, R. and Payan, F., Three dimensional structure of porcine pancreatic α -amylase at 2.9Å resolution. *EMBO J.* 6 (1987) 3909-3916.
- [6] Cozzon, P., Passero, L. and Marchis Mouren, G., Characterisation of porcine pancreatic isoamylase chemical and physical studies *Biochim. Biophys Acta*, 107 (1970) 490-495.
- [7] Shareghi, B. and Moosavi Movahedi A.A., Kinetic and Thermodynamic studies on the interaction of D-amino acid oxidase and SDS at the presence

- [20]Klibanov, A.M., Improving enzymes by using them in organic solvent. Nature, 409 (2001) 241-246.
- [21]Pace, C.N., Methods in Enzymology, 131 (1986) 267-279.
- [22]Brock, T.D., Life at high temperature. Science, 230 (1985) 132-138.
- [23]Deming, J.W., The biotechnological future for newly described extremely thermophilic bacteria. Microbilo Ecol, 12 (1986) 111-119.
- [24]Fontana How nature Engineers Protein (Thermo) Stability Biochemical Adaptation, (1990) 89-113.
- [15]Bernfeld P., Methods in Enzymology, Academic Press. New York, 1 (1995) 149-151.
- [16]Pace, C.N., Measuring and increasing protin stability TIB TECK, 8 (1990) 63-68.
- [17]Pace, C.N. and Shirley, B.A., Protion structure: A practical approach, (1989) 75-112.
- [18]Privalov, P.L., Stablity of proteins. Adv. Protein Chem. 35 (1982) 1-104.
- [19]Privalov, P.L., Thermodynamic problem of protein structure Annu. Rev. Biophys. Chem. 18 (1989) 47-69.