Archive of SID

مقایسه پایداری آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در حضور گوانیدین هیدروکلراید

بهزاد شارقی

گروه زیست شناسی دانشگاه شهرکرد

چکیده

میانکنش گوانیدین هیدروکلراید با آنزیم های آلفا امیلاز ترموفیل از منشا B.subtilis و B.amyloliquefaciens با استفاده از مطالعات اسپکتروفتومتری در ناحیه ماوراء بنفش و مطالعات سینتیکی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات طیف سنجی در دماهای مختلف (۲۰ الی ۱۰۵ درجه سانتیگراد) و pH = ٦/٩ و مطالعات سینتیکی در دماهای مختلف و pH های مختلف (۱۳-۲) انجام شده است. مطالعات دگرگونسازی حرارتی آنزیم آلفاآمیلاز ترموفیل نمایانگر مقدار T_m بالاتر به میزان ۲۰ درجه سانتیگراد نسبت به آنزیم مزوفیل می‌باشد، مطالعات انجام شده در حضور گوانیدین هیدروکلراید نمایانگر اثرات ناپایدار کنندگی ترکیب فوق بر ساختار آنزیم مزوفیل و اثرات افزایش پایداری آنزیم ترموفیل می‌باشد. در حضور گوانیدن هیدروکلراید پارامترهای ترمودینامیکی $\Delta H^\circ m$ و $\Delta S^\circ m$ برای آنزیم ترموفیل افزایش و برای آنزیم مزوفیل کاهش می‌یابد. بررسی فعالیت ویژه آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل در حضورگوانیدین هیدروکلراید نمایانگر مقاومت بیشتر آنزیم ترموفیل در مقابل کاهش فعالیت می‌باشد.

کلمات کلیدی: آلفا آمیلاز، گوانیدین هیدروکلراید، دگرگونسازی، پایداری ساختمانی

مقدمه

پایداری ساختمانی اغلب پروتئین های کروی پائین و در دامنه ۵ الی ۱۵ کیلو کالری برمول می‌باشد (۱). برای بیشتر کاربردهای صنعتی استفاده از آنزیمهایی با حداکثر پایداری و دارای فعالیت کافی، مطلوب می‌باشد مطالعات زیادی جهت افزایش پایداری آنزیمها صورت پذیرفته است (٤-۲). اغلب پروتئین‌ها در دماهای بالا دگرگون می‌شوند (۵). در برخی از پروتئین‌ها دماهای بسیار بالا سبب شکسته شدن اتصالات دی سولفیدی و یا تعویض آنها می‌شود (٦). اوره و گوانیدین هیدروکلراید از دگرگون کنندههای قوی هستند که بیش از سایر دگرگون کننده‌ها استفاده می‌شوند. ایندو ترکیب باعث می‌شوند که آب حلال بهتری برای اسیدهای آمینه غیر قطبی شود (۷). به عبارت دیگر این ترکیبات بر هم کنش آبگریز را تضعیف می‌نمایند. بررسی ساختمان اوره و گوانیدین

www.SID.ir

Archive of SID

هیدروکلراید نشان می‌دهد که این ترکیبات می‌توانند به عنوان دهنده یا گیرنده پروتون درتشکیل اتصالات هیدروژنی با پروتئین‌ها نقش داشته باشند (۸). آنزیم آلفا آمیلاز بصورت گسترده ای در اشکال حیاتی مختلف نظیر پستانداران، قارچها، باکتریها و گیاهان وجود دارد (۹). آنزیم آلفا آمیلاز از منشاء Bacillus subtilis یکی از آنزیمهای اکستراسلولار است که بصورت گسترده ای در صنعت از آن استفاده می‌شود. مقایسه توالی آلفا آمیلازهای مختلف بیان گر این نکته است که آنها از یک ژن اجدادی واحد مشتق شده اند (۱۰). برخی از آنزیمهای آلفا آمیلاز تولید شده توسط ارگانیسم های مزوفیل (گونه باسیلوس) دارای خصوصیات ترموفیل می‌باشند (۱۱).پایداری ساختمانی یک پروتئین گلبولار بصورت تغییر انرژی آزاد برای تبدیل حالت طبیعی پروتئین به حالت دگرگون محاسبه می‌گردد (۱). از ترکیب گوانیدین هیدروکلراید به میزان وسیعی برای بررسی پایداری پروتئین‌ها استفاده شده است (۷). هدف از مطالعات دگرگونسازی بررسی میزان پایدرای و عوامل موثر بر پایداری پروتئینها می‌باشد. در این مطالعه اثر گوانیدین هیدروکلراید بر پایداری و فعالیت ساختمانی آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل در دماهای گوناگون مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

آلفا آمیلاز از منشا *B.subtilis* از شرکت مرک و آلفا آمیلاز از منشاء *B.amyloliquefaciens* از شرکت سیگما خریداری گردیده است. محلول سدیم فسفات ۰/۰۲M در pH=٦/٩ به عنوان بافر استفاده شده است در مطالعات مربوط به اثر pH در دامنه (۲ الی ۱۳) بر فعالیت آنزیم از بافر TMCA، ۰/۰۲ M استفاده شده است. غلظت استفاده شده آنزیم ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد

روشها

۱- بررسی اثر گوانیدین هیدورکلراید بر پایداری آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل

بافر سدیم فسفات ۰/۰۲M و pH=٦/٩ حاوی غلظتهای ۰ الی ۸ مولار گوانیدین هیدروکلراید تهیه شد. منحنی های دگرگون سازی آلفا آمیلاز در حضور گوانیدین هیدروکلراید در طول موج ۲۸۰ نانومتر بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ٤۰۰۰ با استفاده از محلولهای آلفا آمیلاز با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد.

۲- بررسی اثر حرارت بر پایداری آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل

منحنی های دگرگونسازی در دامنه دمایی ۲۰ الی ۱۰۵ درجه سانتیگراد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ٤۰۰۰ مجهز به سیستم کنترول درجه حرارتی الکترونیکی با استفاده از محلولهای آلفا آمیلاز با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر بدست آمد.

۳- تعیین فعالیت آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل

در اثر عمل آنزیم آلفا آمیلاز بر روی نشاسته قندهای احیا کننده ایجاد می‌شوند که با معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید ترکیب شده کمپلکس رنگی تولید می‌کنند که حداکثر جذب آن در ٥٤۰ نانومتر می‌باشد (۱۲).

$$\text{Unit/mgr} = \frac{\text{مالتوز تولید شده (میکرو مول)}}{\text{۳× مقدار آنزیم در مخلوط واکنش}}$$

٤- بررسی فعالیت آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و

www.SID.ir

Archive of SID

مزوفیل

بافر سدیم فسفات ۰/۰۲M و pH=٦/٩ حاوی غلظتهای ۰/۵ الی ۸ مولار گواندین هیدروکلراید تهیه شد. محلول آنزیمی با هر یک از بافرهای فوق تهیه و فعالیت آن مورد سنجش قرار گرفت. در مطالعات مربوط به بررسی اثرات pH در دامنه (۱۳-۲) بر فعالیت از بافر TMCA، ۰/۰۲M استفاده شد.

۵- تخمین تعداد Typ , Tyr

روش ادلهاگ برای تعیین تعداد تیروزین و تریپتوفان در غلظت ٦ مولار گوانیدین هیدروکلراید مورد استفاده قرار گرفت (۱۳).تعداد گروه های تیروزین و تریپتوفان به روش اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۸۰ و ۲۸۸ نانومتر با استفاده از روابط زیر تعیین می‌شود:

$$A_{288} = N_{Trp}4815 + M_{Tyr}385$$
$$A_{280} = N_{Trp}5690 + M_{Tyr}1280$$

٦- آنالیز نتایج حاصل از دگرگونسازی آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل

نتایج حاصل از مطالعات اسپکتروفتومتری با استفاده از مدل ترمودینامیکی دو حالته (two-state)مورد آنالیز قرار گرفتند. کسر پروتئین دگرگون شده با استفاده از رابطه شماره (۱) محاسبه می‌گردد.

$$F_d = \frac{Y_N - Y_{obs}}{Y_N - Y_D} \qquad (۱)$$

در رابطه فوق Y_D, Y_N به ترتیب مقادیر جذب نوری مولکولهای طبیعی و دگرگون شده در حالتی می‌باشد که Y مورد اندازه گیری واقع شده است (١٤). برای محاسبه تغییر در انرژی آزاد حالتهای طبیعی و دگرگون شده، ΔG°_D ، می‌توان از رابطه (۲) استفاده نمود.

$$\Delta G^0_D = -RT\ln[F_d/(1-F_d)] = -RT\ln[(Y_n - Y_{obs})/(Y_{obs} - Y_d)] \qquad (۲)$$

در رابطه فوق R ثابت گازها و T دمای کلوین می‌باشد. دمای ذوب پروتئین (T_m) دمایی است که مقدار ΔG°_D برابر صفر می‌شود. شیب منحنی ΔG°_D علیه دما درنقطهT_m برابر ΔS°_m است. برای محاسبه ΔH°_m با در نظر گرفتن مقدار صفر برای ΔG°_D می‌توان از رابطه (۳) استفاده نمود.

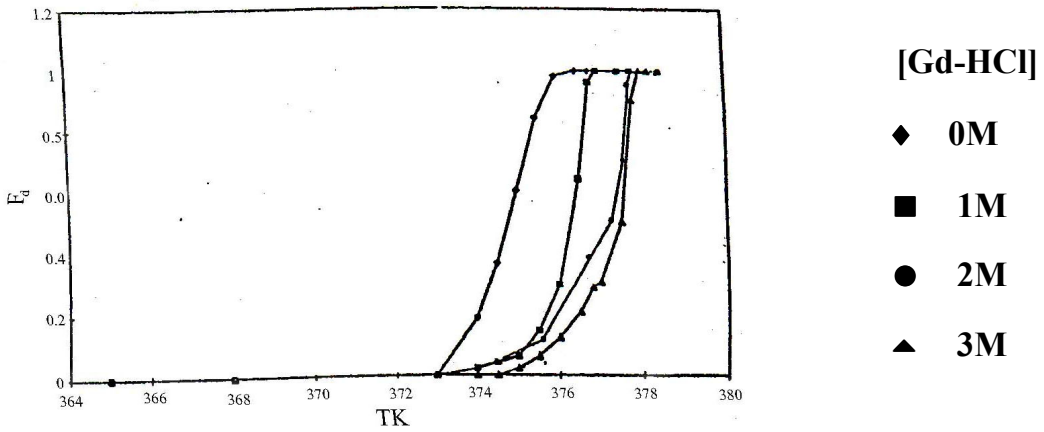
$$\Delta H^{\circ}_m = T_m \Delta S^{\circ}_m \qquad (۳)$$

نتایج

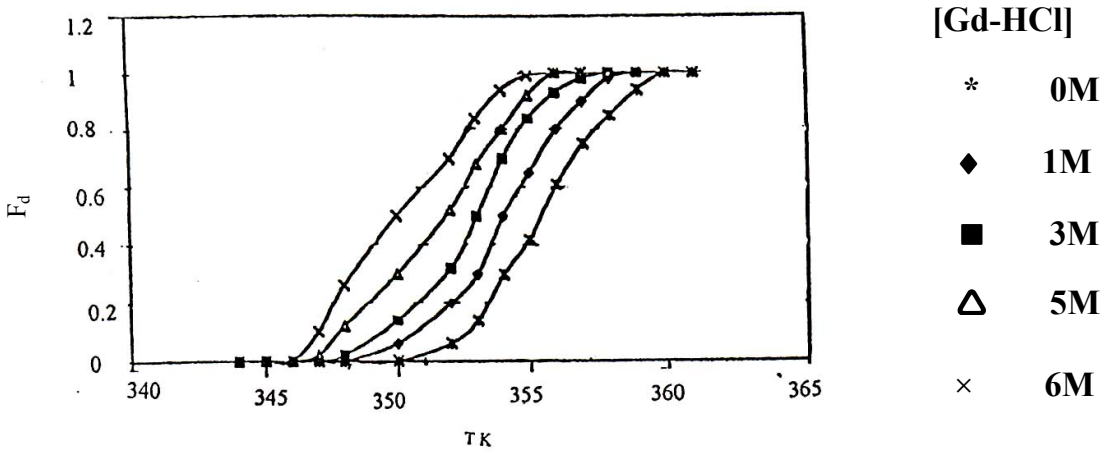
اشکال شماره ۱ و ۲ نمایانگر منحنی های کسر پروتئین دگرگون شده آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در غلظتهای مختلف از گوانیدین هیدروکلراید می‌باشند. چنانکه ملاحظه می‌شود در مورد آنزیم ترموفیل با افزایش غلظت گوانیدین هیدروکلراید منحنی‌ها به سمت راست انتقال می‌یابند در حالیکه در مورد آنزیم مزوفیل جابجایی منحنی به سمت چپ و دمای پائین تر می‌باشد. این بدان معناست که حضور گوانیدین هیدروکلراید سبب افزایش پایداری آنزیم ترموفیل وکاهش پایداری آنزیم مزوفیل شده است. اشکال ۳ و ٤ نمایانگر منحنی های تغییرات ΔG°_D علیه دما در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل می‌باشند. نقطه ذوب پروتئین ها، T_m، دمایی است که ΔG°_D برابر صفر است چنانکه ملاحظه می‌شود برای آنزیم ترموفیل با افزایش غلظت گوانیدین هیدروکلراید منحنی‌ها به سمت راست جابجا شده و T_m افزایش می‌یابد در حالیکه در مورد آنزیم مزوفیل مقدار T_m کاهش یافته است شکل ۵ نمایانگر تغییرات T_m برای آنزیمهای نوع ترموفیل و مزوفیل است. اشکال ٦ و ۷ نشان دهنده مقادیر پارامتر های ترمودینامیکی $\Delta S^{\circ}_m, \Delta H^{\circ}_m$ آنزیم های ترموفیل و مزوفیل می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱-تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در حضور بافر سدیم فسفات M ۰/۰۲، pH = ٦/٩



شکل ۲- غییرات کسر پروتئین دگرگون شده در غلظت های مختلف گوانیدن هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز مزوفیل در حضور بافر سدیم پیروفسفاتM ۰/۰۲، pH = ٦/٩

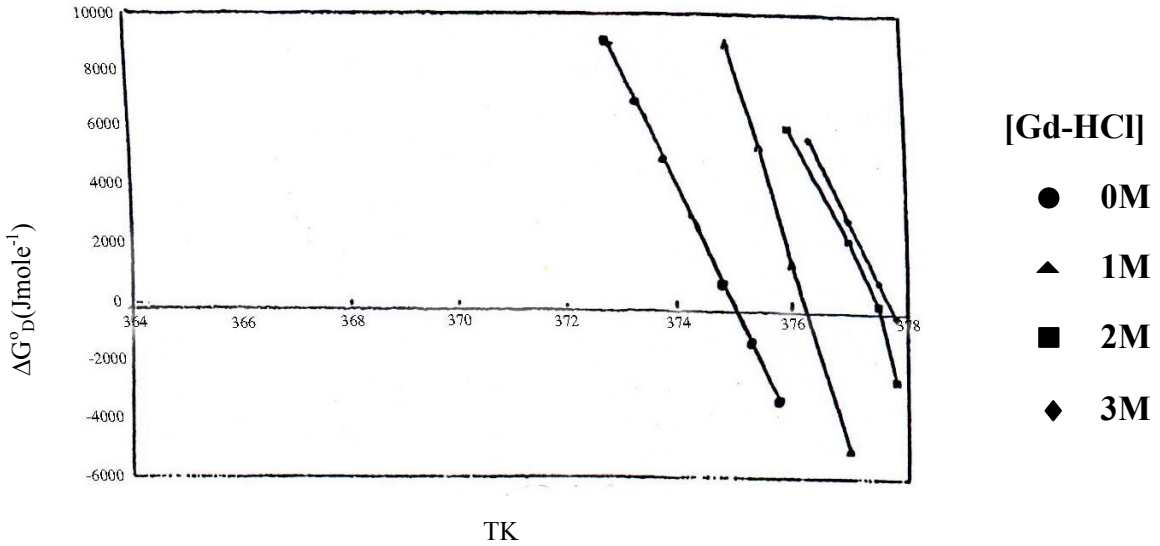
درمورد آنزیم ترموفیل با افزایش گوانیدین هیدروکلراید مقادیر $\Delta S^{\circ}_{m}, \Delta H^{\circ}_{m}$ افزایش و درمورد آنزیم مزوفیل مقادیر فوق کاهش یافته است به عبارت دیگر آنزیم ترموفیل شکل پایدارتری را بدست آورده است در حالیکه ساختار آنزیم مزوفیل تا حدودی دچار باز شدگی می‌گردد.

شکل ۸ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلا ترموفیل و مزوفیل در مقابل تغییرات pH می‌باشد. آنزیم ترموفیل در دامنه وسیع تری از pH (۵ الی ۱۱) نسبت به نوع مزوفیل (٦ الی ۱۰) فعالیت خود را حفظ می‌نماید.

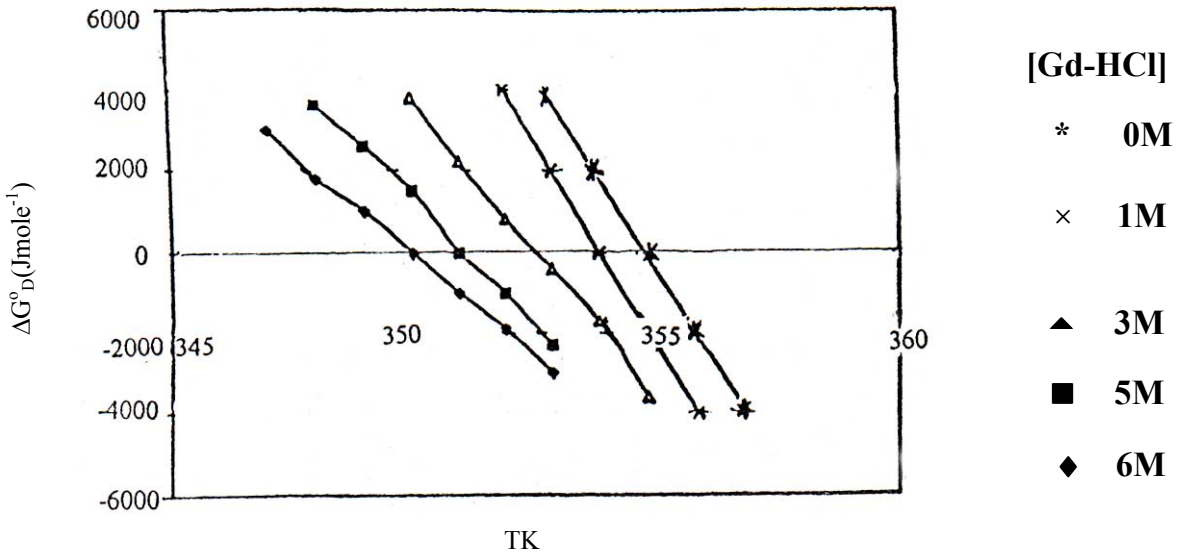
شکل ۹ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل ومزوفیل در مقابل دما می‌باشد. دمای بهینه برای فعالیت آنزیم ترموفیل ۳٦۸K و برای آنزیم مزوفیل ۳۳۵K است. دمای بهینه فعالیت آنزیم مزوفیل ۳۳ درجه پائین تر از نوع مزوفیل است. به عبارت دیگر پایداری ساختمانی آنزیم نوع ترموفیل سبب افزایش دمای بهینه به

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- منحنی تغییرات ΔG°_{D} در مقابل دما برای آنزیم الفا امیلاز ترموفیل درحضور بافر سدیم فسفات M ۰/۰۲، pH = ٦/٩



شکل ٤- منحنی تغییرات ΔG°_{D} در مقابل دما برای آنزیم آلفا آمیلاز مزوفیل در حضور بافر سدیم فسفات، M ۰/۰۲ pH = ٦/٩

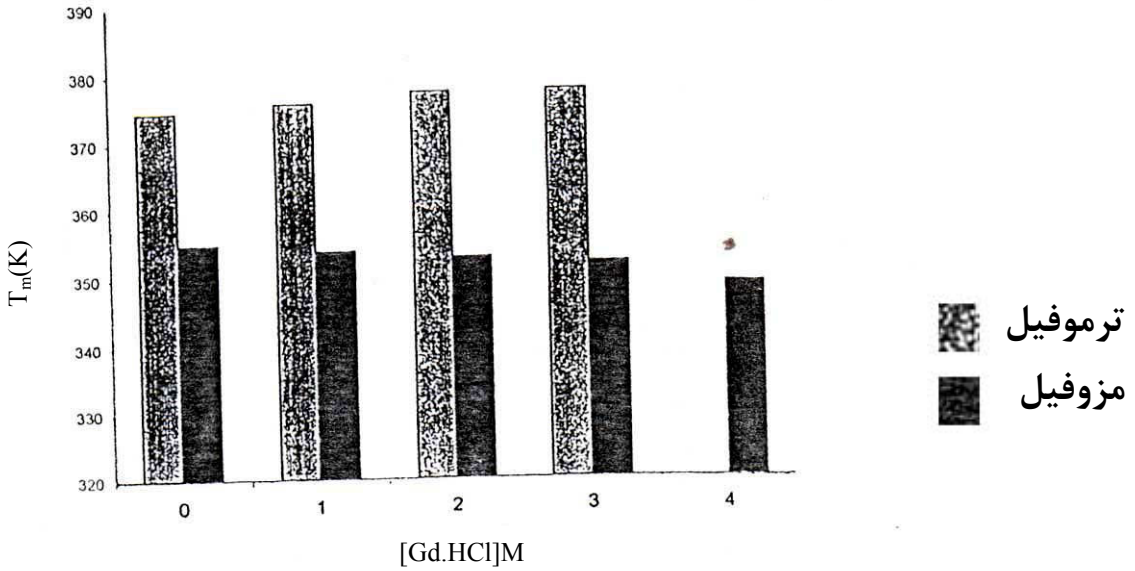
میزان قابل توجهی نسبت به نوع مزوفیل شده است.

شکل ۱۰ به مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در غلظتهای غلظت گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد می‌پردازد چنانکه مشاهده می‌شودگوانیدین هیدروکلراید اثر بیشتری درکاهش فعالیت آنزیم مزوفیل دارد. از روش ادلهاگ برای تخمین تعداد Tyr,Trp استفاده بعمل آمد. نتایج حاصل نمایانگر در معرض قرار گرفتن ٦ اسید آمینه Tyr و ۸ اسید آمینه Trp برای آنزیم ترموفیل و ١٤ اسید آمینه Tyr و ۱۸ اسید آمینه Trp برای آنزیم مزوفیل در حضور غلظت ٦ مولار گوانیدین هیدروکلراید می‌باشد.

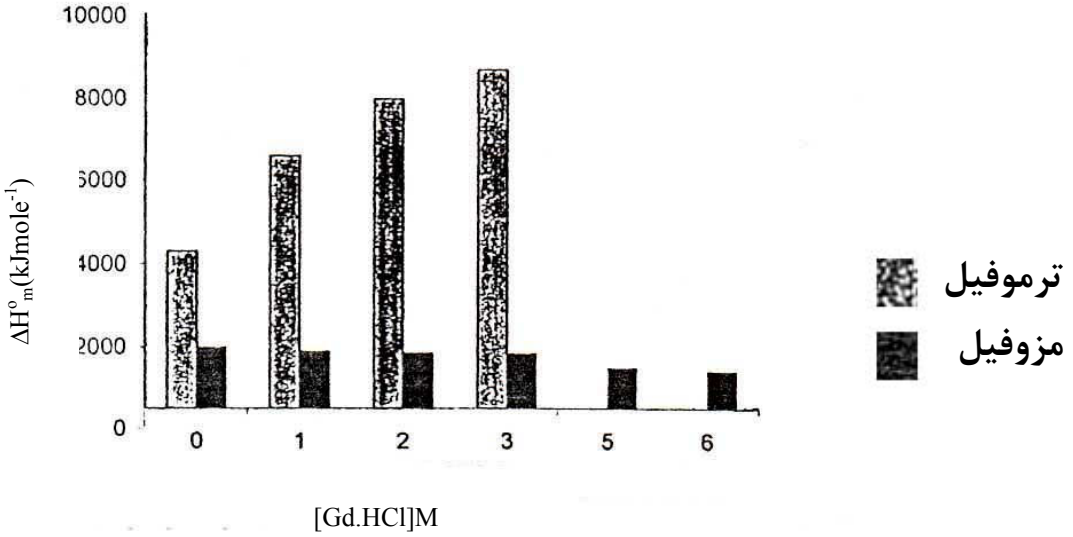
این مقادیر برای آنزیم ترموفیل ۲۵ درصد و برای آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- منحنی تغییرات Tmدر مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل



شکل ٦- منحنی تغییرات ΔH°_m درمقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل

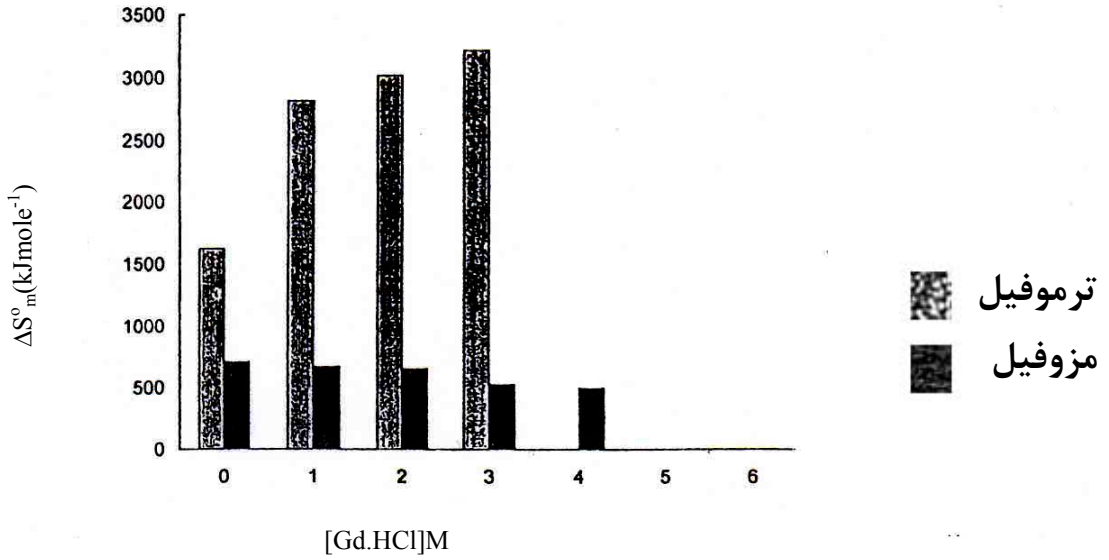
مزوفیل حدوداً ۵۰ درصد مقادیر واقعی بوده که دلالت بر پایداری ساختمانی بیشتر آنزیم ترموفیل نسبت به نوع مزوفیل دارد.

بحث

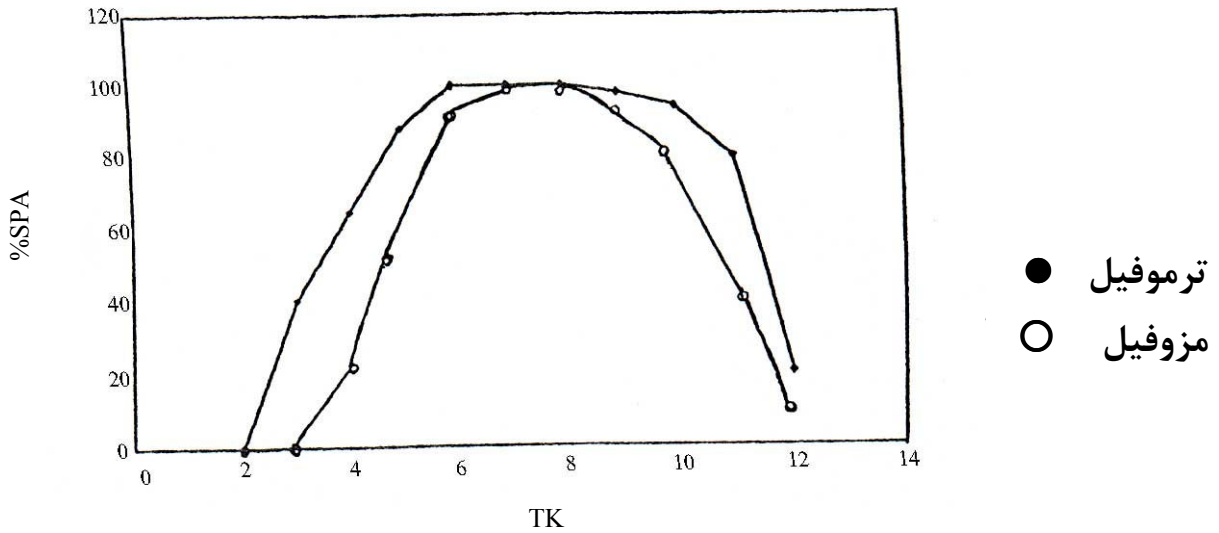
مطالعات دگرگونسازی حرارتی آنزیم آلفا آمیلار از منشاء *B.amyloliquefaciens* مقدار T_m برابر ۳۵۵ K را بدست می‌دهد که در مقایسه با آنزیم ترموفیل کاهشی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- منحنی تغییرات ΔS°_{m} در مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل

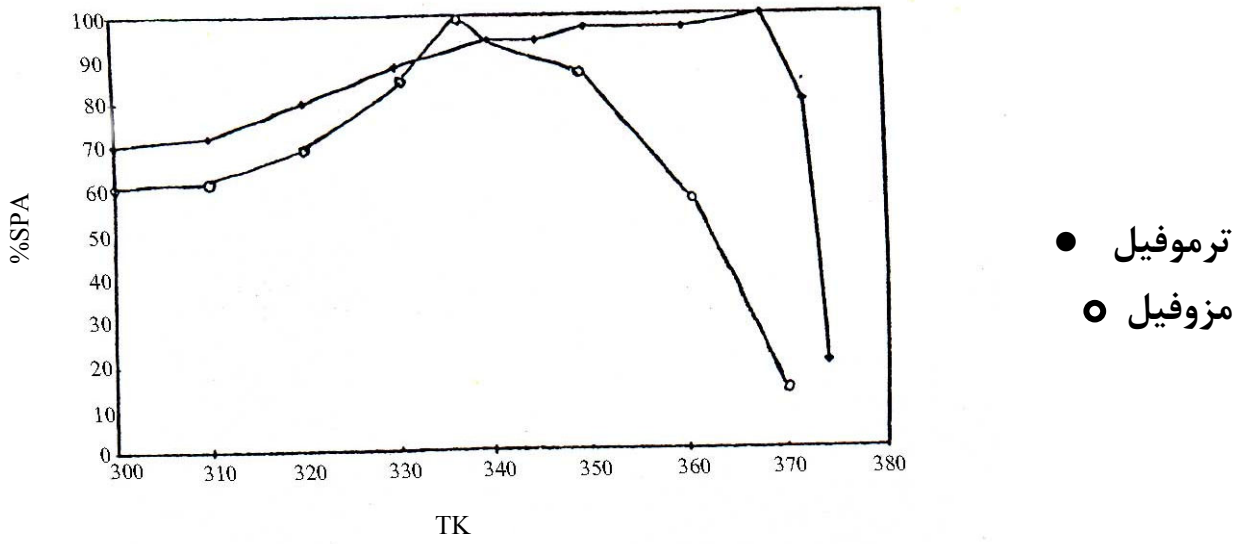


شکل ۸- تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل ومزوفیل در مقابل pH در حضور بافر – TMCA در دمای ۳۰ oC

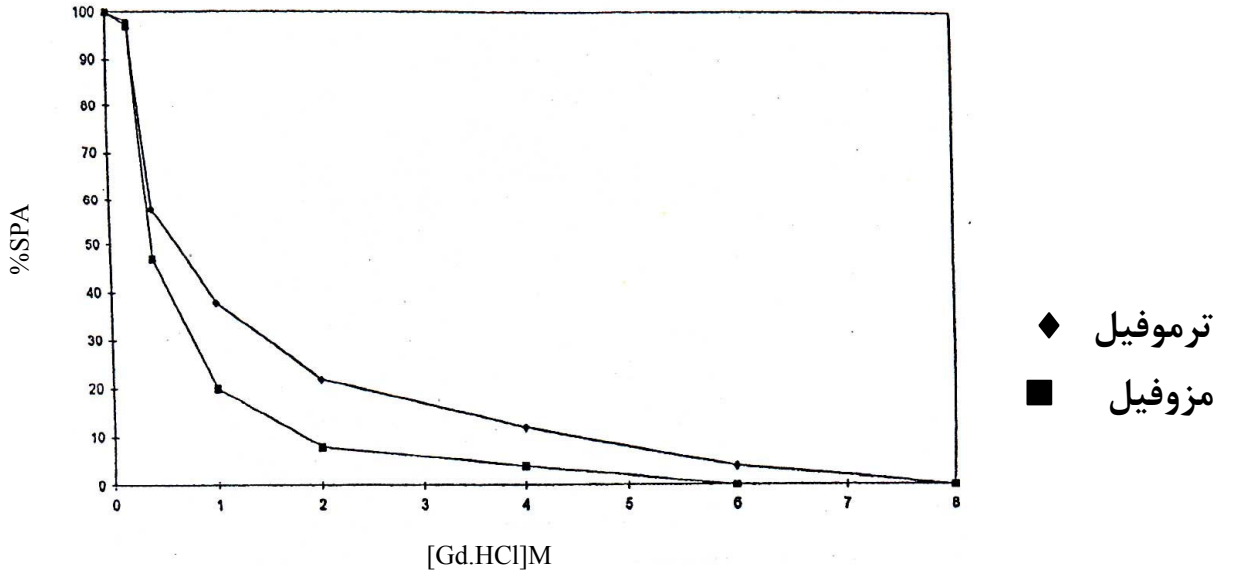
معادل ۲۰ درجه را نشان می‌دهد. مطالعات انجام گرفته مؤید این نکته است که پایداری بسیار زیاد آنزیمهای ترموفیل در مقابل حرارت به عوامل متعددی وابسته است که می‌توان به بر هم کنش های هیدروفوبیک، پیوندهای یونی، پیوندهای دی سولفید و محتوای اسید های آمینه آلیفاتیک اشاره نمود (۱۵). مقایسه مقادیر $\Delta S^{\circ}_{m}, \Delta H^{\circ}_{m}$ محاسبه شده آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل نشان دهنده مقادیر بیشتر پارامترهای ترمودینامیکی فوق برای آنزیم ترموفیل نسبت به نوع مزوفیل می‌باشد به نحوی که برای آنزیم ترموفیل مقدار $\Delta S^{\circ}_{m}, \Delta H^{\circ}_{m}$ به ترتیب ۱۶۱۱ kJmole^{-1} و kJmole^{-1} ۴/۳ و برای آنزیم مزوفیل به ترتیب برابر ۷۱۰ kJmole^{-1} و

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۹- تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل ومزوفیل در مقابل دما در حضور بافر سدیم فسفات M ۰/۰۲ ، pH = ٦/٩.



شکل ۱۰-تغییرات فعالیت ویژه آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدورکلراید در بافر سدیم فسفات M ۰/۰۲ ، pH = ٦/٩ در دمای oC ٩٥

$kJmole^{-1}$ ۲ می‌باشد. افزایش مقدار جزئی پیوندهای یونی، میانکنش های هیدرفوبیسیته و اتصالات هیدروژنی سبب افزایش انرژی آزاد پایدار کنندگی یک آنزیم می‌گردند (١٦). آنزیمهای ترموفیل نسبت به مزوفیل هیدرو فوبتر بوده و قدرت بر هم کنش هیدروفوب تابع درجه حرارت می‌باشد (١٥). از جمله پارامترهای موثر در پایداری آنزیمها می‌توان به نسبت Arg/Arg+lys اشاره نمود (١٧). مقایسه میزان هیدروفوبیسیته آنزیمهای آلفا

www.SID.ir

Archive of SID

آمیلاز ترموفیل ومزوفیل نمایانگر افزایش میزان هیدورفوبیسیته به میزان پنج درصد برای آنزیم ترموفیل می‌باشد هم چنین نسبت Arg/Arg+lys برای آنزیم ترموفیل نسبت به مزوفیل افزایش معادل ۱/۵ را نشان می‌دهد (۱۸).

میزان اسید های آمینه باردار آنزیم ترموفیل نسبت به نوع مزوفیل بیش از ۱/۷ برابر می‌باشد. بر هم کنش گوانیدین هیدروکلراید با آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل سبب افزایش پایداری و با آنزیم آلفا آمیلاز مزوفیل تا حدودی سبب کاهش پایداری میگردد. به نحوی که غلظت گوانیدین هیدروکلراید ٤M منجر به مقدار T_m بالاتر از ۱۰۵ درجه سانتیگراد برای آنزیم ترموفیل می‌شود ترکیب گوانیدین هیدروکلراید از طرفی سبب کاهش پلاریته حلال و ثابت دی الکترویک آن می‌شود و از طرف دیگر می‌تواند به اتصالات پپتیدی در سطح پروتئین اتصال برقرارنماید. نظر به اینکه مطالعات صورت گرفته در pH=٦/٩ صورت گرفته است و در این pH گروههای آمین حاوی بار مثبت می‌باشند بنابراین اتصال گوانیدین هیدروکلراید وسطح پروتئین از نوع میانکنشهای الکترواستاتیک می‌باشد و چنین اتصالاتی سبب افزایش دانسیته باری درسطح پروتئین شده که این افزایش دانسیته بار در تقابل با اثر گوانیدین هیدروکلراید در کاهش پلاریته حلال، برای آنزیم ترموفیل سهمی مهمتر داشته و سبب افزایش پایداری آن شده است (۱۹).

محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی $\Delta S^{\circ}_m, \Delta H^{\circ}_m$ در حضور غلظتهای مختلف گوانیدین هیدروکلراید نمایانگر افزایش مقدار پارامترهای فوق برای آنزیم ترموفیل و کاهش آن برای آنزیم مزوفیل شده است. با در نظر گرفتن اینکه پروتئین‌ها دارای دو حالت ماکروسکوپی پایدار و قابل تشخیص میباشند، توابع ترمودینامیکی $\Delta S^{\circ}_m, \Delta H^{\circ}_m$ را می‌توان بصورت زیر بیان کرد.

$$\Delta H^{\circ}_m = H^{\circ}_m(D) - H^{\circ}_m(N) \qquad (۴)$$

$$\Delta S^{\circ}_m = S^{\circ}_m(D) - S^{\circ}_m(N)$$

با توجه به اینکه حالت دگرگون شده بصورت پیچه بی نظم در نظر گرفته می‌شود کاهش مقادیر ΔH°_m و ΔS°_m مبین باز شدن شکل طبیعی آنزیم و به عبارت دیگر افزایش سهم پروتین دگرگون شده و افزایش مقادیر ΔH°_m و ΔS°_m مبین فشرده تر شدن شکل طبیعی آنزیم میباشد. مطالعه اثر pH بر فعالیت آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل نشان می‌دهد که آنزیم ترموفیل از دامنه pH، پنج الی یازده و آنزیم مزوفیل در دامنه pH، شش الی ده دارای فعالیت قابل توجهی می‌باشند. درمورد هر دو نوع آنزیم افزایش pH به بالاتر از یازده و کمتر از پنج سبب کاهش شدید فعالیت می‌شود که این امر ناشی از تیتر شدن اسیدهای آمینه حاوی گروههای آمین و کربوکسیل موجود در جایگاه فعال نظیر Asp,Glu,Arg,Lys می‌باشد. مطالعات انجام شده در طول موج ۲۸۰ nm در دامنهpH دو الی دوازده مؤید عدم تغییر میزان جذب و بعبارت دیگر عدم تغییرات ساختارآنزیم می‌باشد. بعبارت دیگر کاهش فعالیت بواسطه نقش مکانیزمی رخ می‌دهد. مقایسه اثر گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل نشان دهنده کاهش بیشترمیزان فعالیت آنزیم مزوفیل در مقایسه با نوع ترموفیل در حضور گوانیدین هیدروکلراید می‌باشد. این امر ناشی از پایداری ساختمانی بالاتر آنزیم نوع ترموفیل است. در مجموع مطالعات انجام گرفته در این مقاله نمایانگر پایداری بیشتر آنزیم نوع ترموفیل در مقایسه با نوع مزوفیل در مقابله با دگرگون شدن و حفظ فعالیت بوده و پایداری آن در حضور گوانیدین هیدروکلراید افزایش بیشتری (T_m بالاتر) می‌یابد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. C.N., Pace, B. A., Shirely, and J. A. Thomson, Protein Structure: A Practical Approach (Greightion, T. E., ed.) PP. 311-330. IRL (1989).
2. M., Standgren, and C., Mitchinson, Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for Thermal stability. Protein Sience 12 848-860. (2003).
3. M. W. Pantoliano, Protein engineering of subtilisin. Biochemistry 26 2077-2082. (1987).
4. p., Joyet and C., Gaillardin, Hyper Thermostable Varients of a highly Thermostable a-Amylase. Bio Technology 10 1579-1583. (1992).
5. C., Tanford, Protein denaturation. Adv. Protein chem. 23 121-282. (1968).
6. OT.E. Creightion, Proteins (Second Edition): Structure and Molecular Properties. Freeman (2002).
7. J.A. Schellman Pathways in Two-state Protein Folding. Biochem. 18 682-693. (1989).
8. C.N., Pace, D.V., Laurents, and R.E. Erickson, urea Denaturation of Barnase. Biochemistry 31 11196-11202. (1995).
9. J.P. Guyot, and G. Aguilar, Purification and characterization of and characterization of an extracellular a-Amylase by lactobacillus manihotivorans. Enzyme and Microbial Technology 27 406-413. (2000).
10. C. C., Pompeyo, M. S., Gomez, and S., Gasparin, Comparison of amylolytic Properties of Lactobacilus amylovorus. Curr Microsiol 23 207-13. (1991).
11. L. M., Hamilton, C. T., Kelly, and W. M. Fogarty, Cyclodextrin and their interaction with amylolytic enzyme. Enzyme and Microbial Technology 26 261-267. (2000).
12. P. Bernfeld, Methods in Enzymology. Vol. 1 Academic Press NewYork. (1995).
13. H., Edelhoch, Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. Biochemistry 6 1948-54. (1967).
14. C-N. Pace, Measuring and increasing Protein Stability TIB TECK 8 63-68. (1990).
15. A. M., Kilibanov, and T. S. Ahren, Thermal Stasility of Proteins In: Oxender DL. Fox CR (eds) Protein engineering. Liss. NewYork 213-218. (1987).
16. W. V. Shaw, Protein engineering: The design, synthesis and characterization of factitious proteins. Biochem J 246 1-17. (1987).
17. H. B. Bull, and K. Breese, Thermal Stability of proteins. Arch Bichem Biophys 158 681-686. (1973).
18. H. Yamazaki, Change in The properties and molecular weights of Bacillus subtilis m-type alpha amylases J. Bactriol 327 156. (1983).
19. C.N.E., Pace, E. Freire, Tempergture and Guanidine Hydrochoride Bependence of the Structural Stability of Rnase Ti Biochemistry 31 11196-11202.
20. P. L., Privalov, Stability of Proteins Adv. Protein Chem 35 1-104. (1981).

www.SID.ir