

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 $pH = 6.9$ و مطالعات سینتیکی در دماهای مختلف و pH های مختلف (۱۳-۲) انجام شده است. مطالعات دگرگونسازی حرارتی آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل نمایانگر مقدار T_m بالاتر به میزان ۲۰ درجه سانتیگراد نسبت به آنزیم مزوفیل می باشد، مطالعات انجام شده در حضور گوانیدین هیدروکلراید نمایانگر اثرات ناپایدار کنندگی ترکیب فوق بر ساختار آنزیم مزوفیل و اثرات افزایش پایداری آنزیم ترموفیل می باشد. در حضور گوانیدین هیدروکلراید پارامترهای ترمودینامیکی ΔH° و ΔS° برای آنزیم ترموفیل افزایش و برای آنزیم مزوفیل کاهش می یابد. بررسی فعالیت ویژه آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل در حضور گوانیدین هیدروکلراید نمایانگر مقاومت بیشتر آنزیم ترموفیل در مقابل کاهش فعالیت می باشد.

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

مقدمه

سبب شکسته شدن اتصالات دی سولفیدی و یا تعویض آنها می شود (۶). اوره و گوانیدین هیدروکلراید از دگرگون کننده های قوی هستند که بیش از سایر دگرگون کننده ها استفاده می شوند. این دو ترکیب باعث می شوند که آب حلال بهتری برای اسیدهای آمینه غیر قطبی شود (۷). به عبارت دیگر این ترکیبات بر هم کنش آبگریز را تضعیف می نمایند. بررسی ساختمان اوره و گوانیدین

پایداری ساختمانی اغلب پروتئین های کروی پائین و در دامنه ۵ الی ۱۵ کیلو کالری برمول می باشد (۱). برای بیشتر کاربردهای صنعتی استفاده از آنزیمهایی با حداکثر پایداری و دارای فعالیت کافی، مطلوب می باشد مطالعات زیادی جهت افزایش پایداری آنزیمها صورت پذیرفته است (۴-۲). اغلب پروتئینها در دماهای بالا دگرگون می شوند (۵). در برخی از پروتئینها دماهای بسیار بالا

بافر TMCA، ۰/۰۲ M، استفاده شده است. غلظت استفاده شده آنزیم ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد

روشها

۱- بررسی اثر گوانیدین هیدروکلراید بر پایداری آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل بافر سدیم فسفات ۰/۰۲M و pH=۶/۹ 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 ۴۰۰۰ 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 دگرگون سازی در دامنه دمایی ۲۰ الی ۱۰۵ درجه سانتیگراد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ۴۰۰۰ مجهز به سیستم کنترل 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 می شوند که با معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید ترکیب شده کمپلکس رنگی تولید می کنند که حداکثر جذب آن در ۵۴۰ نانومتر می باشد (۱۲).

مالتوز تولید شده (میکرو مول)

$$\text{Unit/mgr} = \frac{\text{مقدار آنزیم در مخلوط واکنش}}{\text{مقدار آنزیم در مخلوط واکنش}}$$

۴- بررسی فعالیت آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و

هیدروکلراید نشان می دهد که این ترکیبات می توانند به عنوان دهنده یا گیرنده پروتون در تشکیل اتصالات هیدروژنی با پروتئین ها 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 می شود. 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 می باشند (۱۱). پایداری ساختمانی یک پروتئین گلبولار بصورت تغییر انرژی آزاد برای تبدیل حالت طبیعی پروتئین به حالت دگرگون محاسبه می گردد (۱). از ترکیب گوانیدین هیدروکلراید به میزان وسیعی برای بررسی پایداری پروتئین ها استفاده شده است (۷). هدف از مطالعات دگرگون سازی بررسی میزان پایداری و عوامل موثر بر پایداری پروتئینها می باشد. 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=۶/۹ به عنوان بافر استفاده شده است در مطالعات مربوط به اثر pH در دامنه (۲ الی ۱۳) بر فعالیت آنزیم از

مقایسه پایداری آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در...

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

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

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 می باشند. چنانکه ملاحظه می شود در مورد آنزیم ترموفیل با افزایش غلظت گوانیدین هیدروکلراید منحنی ها به سمت راست انتقال می یابند در حالیکه در مورد آنزیم مزوفیل جابجایی منحنی به سمت چپ و دمای پائین تر می باشد. این بدان معناست که حضور گوانیدین هیدروکلراید سبب افزایش پایداری آنزیم ترموفیل و کاهش پایداری آنزیم مزوفیل شده است. اشکال ۳ و ۴ نمایانگر منحنی های تغییرات ΔG°_D علیه دما در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل می باشند. نقطه ذوب پروتئین ها، T_m ، دمایی است که ΔG°_D برابر صفر است چنانکه ملاحظه می شود برای آنزیم ترموفیل با افزایش غلظت گوانیدین هیدروکلراید منحنی ها به سمت راست جابجا شده و T_m افزایش می یابد 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 ۶ و ۷ نشان دهنده مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی $\Delta S^{\circ}_m, \Delta H^{\circ}_m$ آنزیم های ترموفیل و مزوفیل می باشد.

مزوفیل

بافر سدیم فسفات ۰/۰۲M و pH=۶/۹ حاوی غلظتهای ۰/۵ الی ۸ مولار گوانیدین 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 Tyr, Typ

روش ادلهاگ برای تعیین تعداد تیروزین و تریپتوفان در غلظت ۶ 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 می شود:

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

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

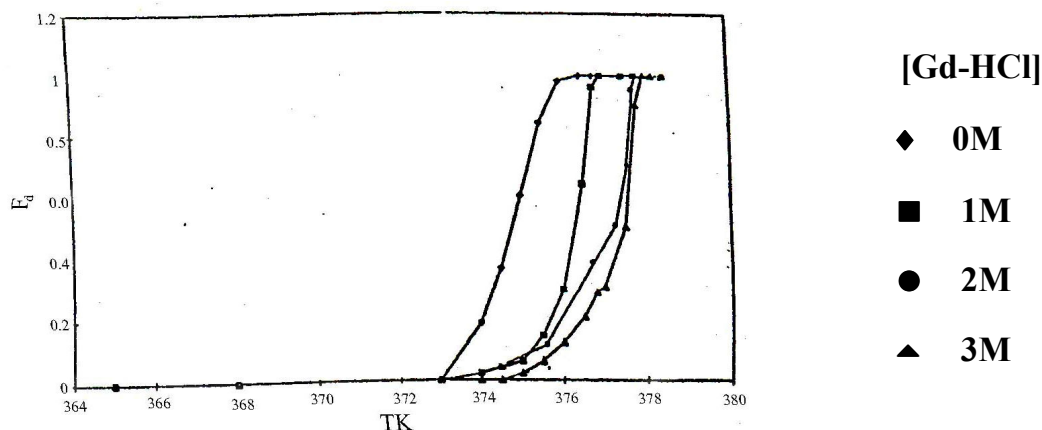
۶- آنالیز نتایج حاصل از دگرگونسازی آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل

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

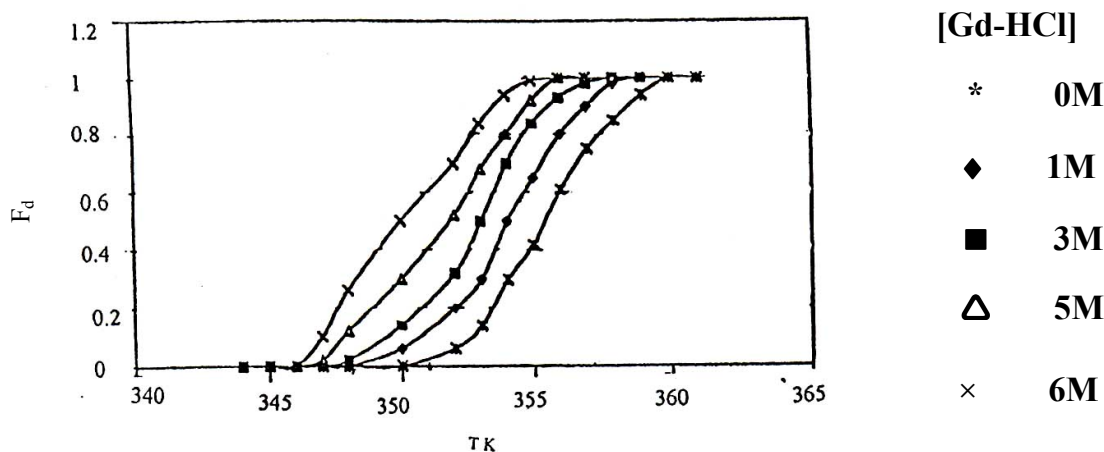
$$F_d = \frac{Y_N - Y_{obs}}{Y_N - Y_D} \quad (۱)$$

در رابطه فوق Y_D, Y_N به ترتیب مقادیر جذب نوری مولکولهای طبیعی و دگرگون شده در حالتی می باشد که Y مورد اندازه گیری واقع شده است (۱۴). برای محاسبه تغییر در انرژی آزاد حالت های طبیعی و دگرگون شده، ΔG°_D ، می توان از رابطه (۲) استفاده نمود.

$$\Delta G^{\circ}_D = -RT \ln \left[\frac{F_d}{1 - F_d} \right] = -RT \ln \left[\frac{Y_n - Y_{obs}}{Y_{obs} - Y_d} \right] \quad (۲)$$



شکل ۱- تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در حضور بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M ، pH = ۶/۹



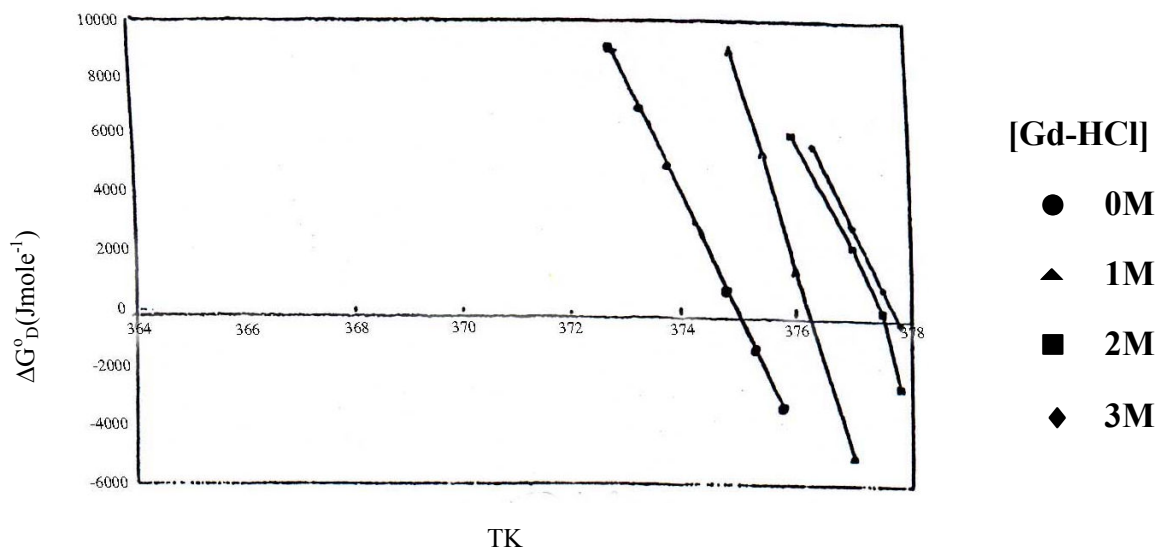
شکل ۲- تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز مزوفیل در حضور بافر سدیم پیروفسفات ۰/۰۲ M ، pH = ۶/۹

ترموفیل در دامنه وسیع تری از pH (۵ الی ۱۱) نسبت به نوع مزوفیل (۶ الی ۱۰) فعالیت خود را حفظ می نماید. شکل ۹ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در مقابل دما می باشد. دمای بهینه برای فعالیت آنزیم ترموفیل ۳۶۸K 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

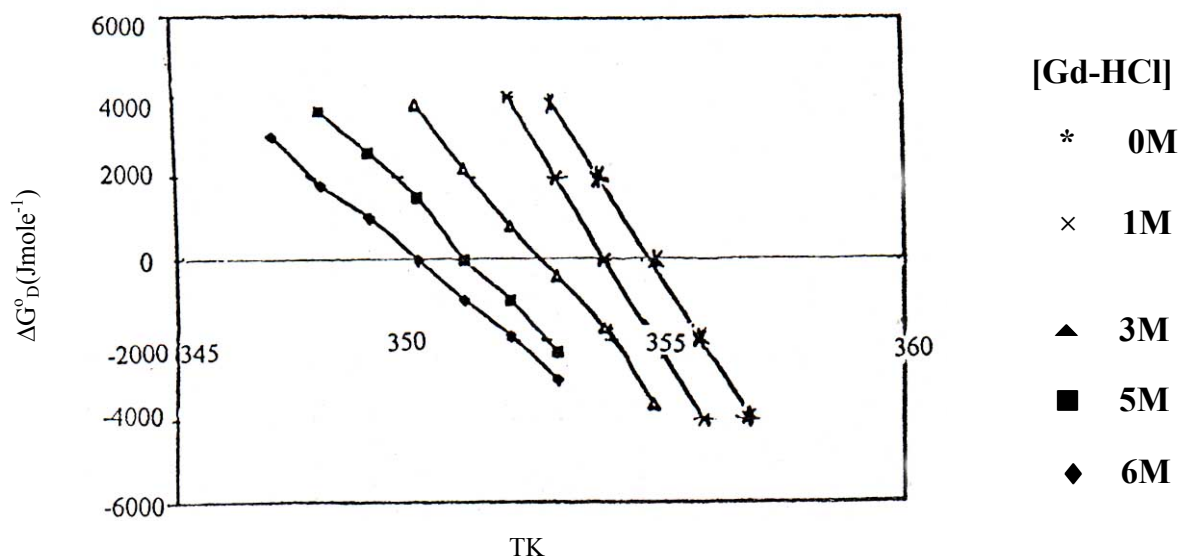
درمورد آنزیم ترموفیل با افزایش گوانیدین هیدروکلراید مقادیر $\Delta S^{\circ}_m, \Delta H^{\circ}_m$ افزایش و درمورد آنزیم مزوفیل مقادیر فوق کاهش یافته است به عبارت دیگر آنزیم ترموفیل شکل پایداری را بدست آورده است در حالیکه ساختار آنزیم مزوفیل تا حدودی دچار باز شدگی می گردد.

شکل ۸ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در مقابل تغییرات pH می باشد. آنزیم

مقایسه پایداری آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در...



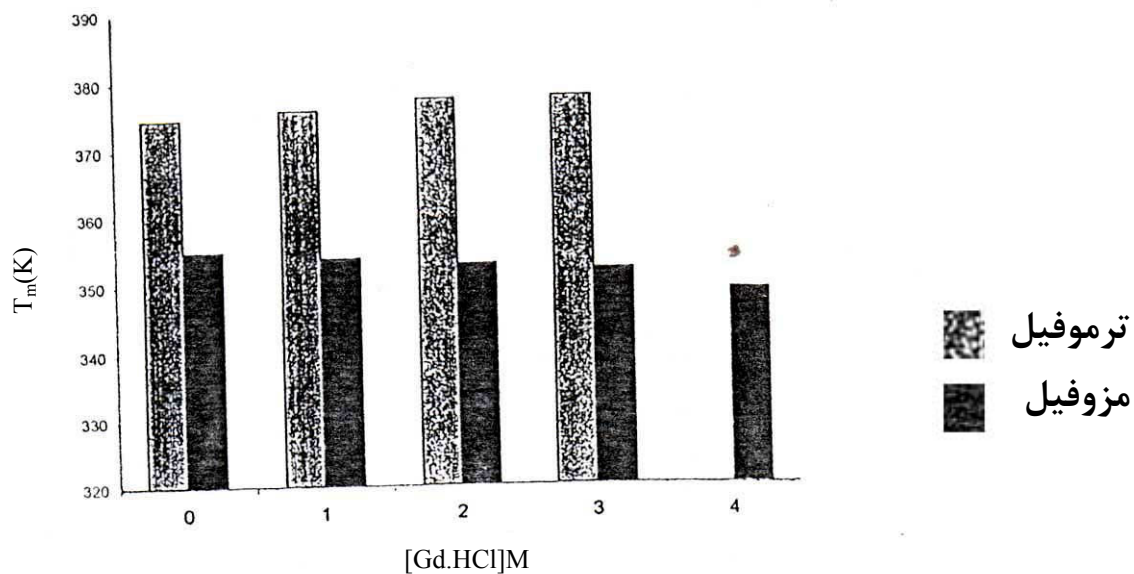
شکل ۳- منحنی تغییرات $\Delta G^{\circ}D$ در مقابل دما برای آنزیم آلفا امیلاز ترموفیل در حضور بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M، $pH = 6/9$



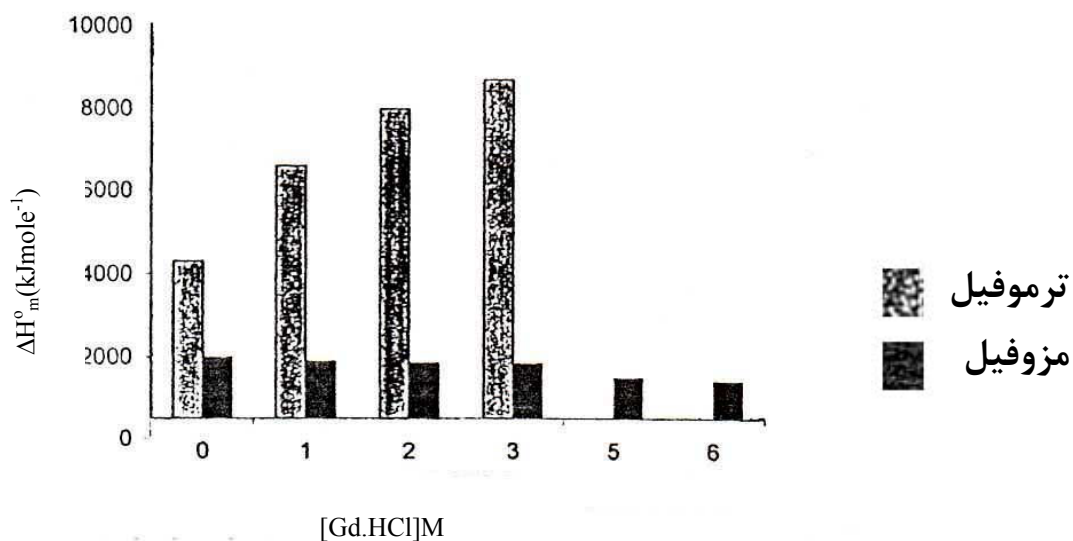
شکل ۴- منحنی تغییرات $\Delta G^{\circ}D$ در مقابل دما برای آنزیم آلفا آمیلاز مزوفیل در حضور بافر سدیم فسفات، $pH = 6/9$ ، ۰/۰۲ M

برای تخمین تعداد Tyr, Trp استفاده بعمل آمد. نتایج حاصل نمایانگر در معرض قرار گرفتن ۶ اسید آمینه Tyr و ۸ اسید آمینه Trp برای آنزیم ترموفیل و ۱۴ اسید آمینه Tyr و ۱۸ اسید آمینه Trp برای آنزیم مزوفیل در حضور غلظت ۶ مولار گوانیدین هیدروکلراید می باشد. این مقادیر برای آنزیم ترموفیل ۲۵ درصد و برای آنزیم

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 می پردازد چنانکه مشاهده می شود گوانیدین هیدروکلراید اثر بیشتری در کاهش فعالیت آنزیم مزوفیل دارد. از روش ادلهاگ



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



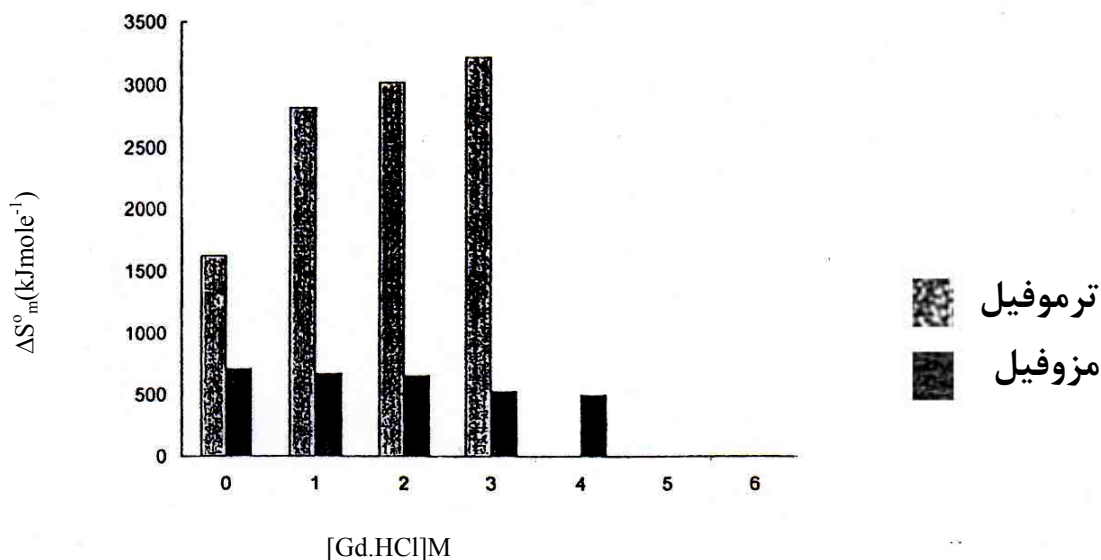
شکل ۶- منحنی تغییرات ΔH°_m در مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل

بحث

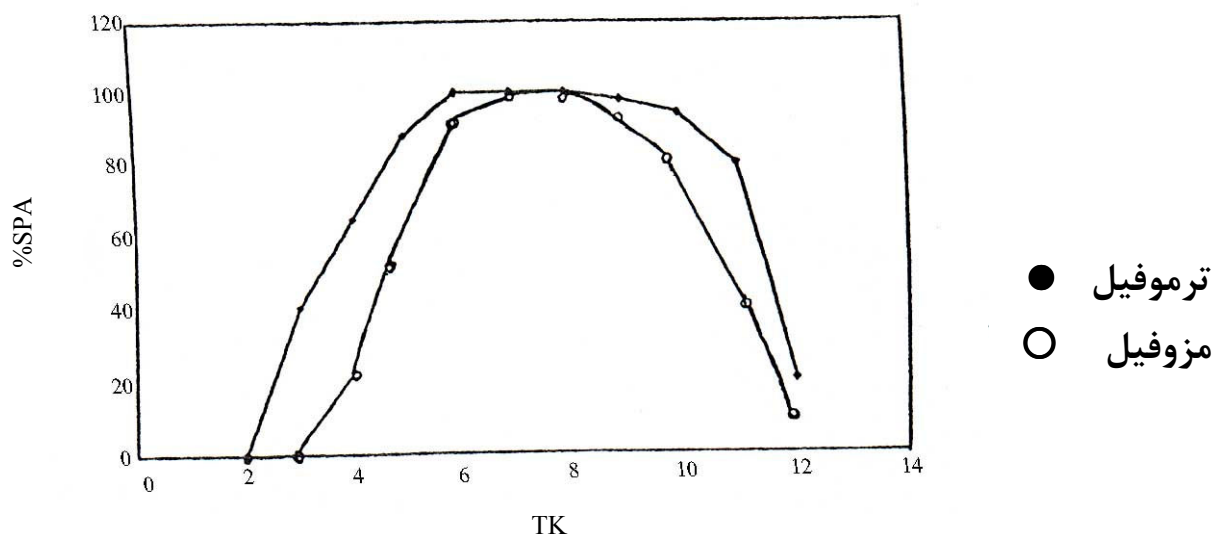
مطالعات دگرگونسازی حرارتی آنزیم آلفا آمیلاز از منشاء *B.amyloliquefaciens* مقدار T_m برابر ۳۵۵ K را بدست می دهد که در مقایسه با آنزیم ترموفیل کاهش

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

مقایسه پایداری آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در...



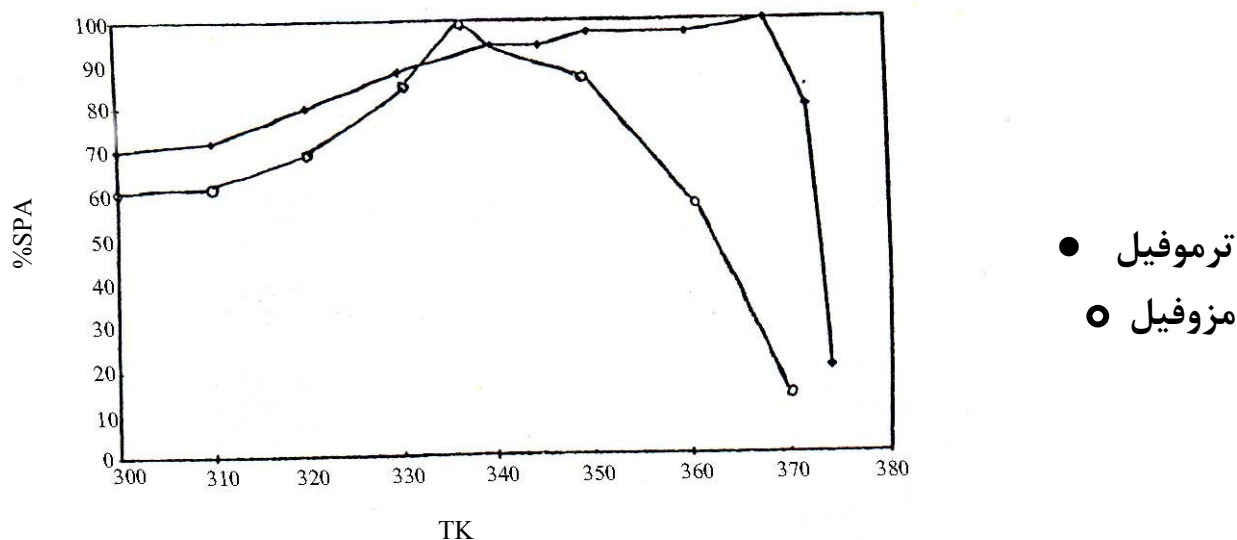
شکل ۷- منحنی تغییرات ΔS^o_m در مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل



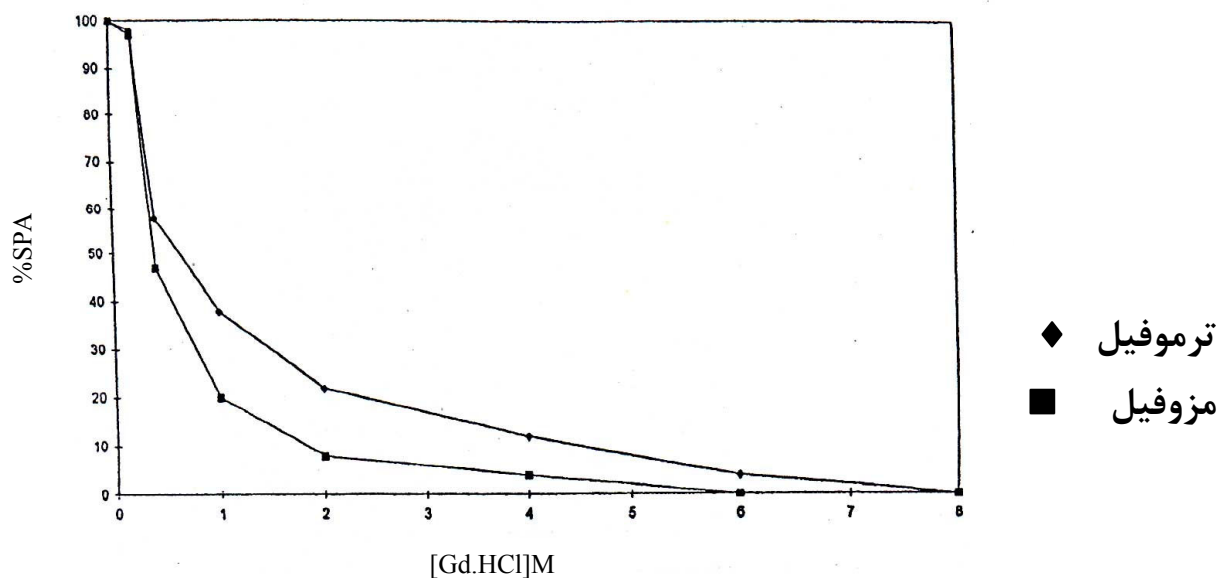
شکل ۸- تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در مقابل pH در حضور بافر - TMCA در دمای ۳۰ oC

معادل ۲۰ درجه را نشان می دهد. مطالعات انجام گرفته مؤید این نکته است که پایداری بسیار زیاد آنزیمهای ترموفیل در مقابل حرارت به عوامل متعددی وابسته است که می توان به بر هم کنش های هیدروفوبیک، پیوندهای یونی، پیوندهای دی سولفید و محتوای اسید های آمینه آلیفاتیک اشاره نمود (۱۵). مقایسه مقادیر $\Delta S^o_m, \Delta H^o_m$ محاسبه شده آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل نشان دهنده مقادیر بیشتر پارامترهای ترمودینامیکی فوق برای آنزیم ترموفیل نسبت به نوع مزوفیل می باشد به نحوی که برای آنزیم ترموفیل مقدار $\Delta S^o_m, \Delta H^o_m$ به ترتیب 1611 kJmole^{-1} و $4/3$ و برای آنزیم مزوفیل به ترتیب برابر 710 kJmole^{-1}

مقادیر $\Delta S^o_m, \Delta H^o_m$ محاسبه شده آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل نشان دهنده مقادیر بیشتر پارامترهای ترمودینامیکی فوق برای آنزیم ترموفیل نسبت به نوع مزوفیل می باشد به نحوی که برای آنزیم ترموفیل مقدار $\Delta S^o_m, \Delta H^o_m$ به ترتیب 1611 kJmole^{-1} و $4/3$ و برای آنزیم مزوفیل به ترتیب برابر 710 kJmole^{-1}



شکل ۹- تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در مقابل دما در حضور بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M ، pH = ۶/۹.



شکل ۱۰- تغییرات فعالیت ویژه آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M ، pH = ۶/۹ در دمای ۹۵ oC

هیدرو فوبتر بوده و قدرت بر هم کنش هیدروفوب تابع درجه حرارت می باشد (۱۵). از جمله پارامترهای موثر در پایداری آنزیمها می توان به نسبت Arg/Arg+lys اشاره نمود (۱۷). مقایسه میزان هیدروفوبیسیته آنزیمهای آلفا

2 kJmole^{-1} می باشد. افزایش مقدار جزئی پیوندهای یونی، میانکنش های هیدروفوبیسیته و اتصالات هیدروژنی سبب افزایش انرژی آزاد پایدار کنندگی یک آنزیم می گردند (۱۶). آنزیمهای ترموفیل نسبت به مزوفیل

مقایسه پایداری آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل در...

$\Delta S^{\circ}_m, \Delta H^{\circ}_m$ را می توان بصورت زیر بیان کرد.

$$\Delta H^{\circ}_m = H^{\circ}_m(D) - H^{\circ}_m(N) \quad (4)$$

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

با توجه به اینکه حالت دگرگون شده بصورت پیچیده بی نظم در نظر گرفته می شود کاهش مقادیر ΔS°_m و ΔH°_m مبین باز شدن شکل طبیعی آنزیم و به عبارت دیگر افزایش سهم پروتین دگرگون شده و افزایش مقادیر ΔS°_m و ΔH°_m مبین فشرده تر شدن شکل طبیعی آنزیم میباشد. مطالعه اثر pH بر فعالیت آنزیمهای ترموفیل و مزوفیل نشان می دهد که آنزیم ترموفیل از دامنه pH پنج الی یازده و آنزیم مزوفیل در دامنه pH شش الی ده دارای فعالیت قابل توجهی می باشند. در مورد هر دو نوع آنزیم افزایش pH به بالاتر از یازده و کمتر از پنج سبب کاهش شدید فعالیت می شود که این امر ناشی از تیترا شدن اسیدهای آمینه حاوی گروههای آمین و کربوکسیل موجود در جایگاه فعال نظیر Asp, Glu, Arg, Lys می باشد. مطالعات انجام شده در طول موج 280 nm در دامنه pH دو الی دوازده مؤید عدم تغییر میزان جذب و عبارت دیگر عدم تغییرات ساختار آنزیم می باشد. بعبارت دیگر کاهش فعالیت بواسطه نقش مکانیزی رخ می دهد. مقایسه اثر گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت آنزیمهای آلفا آمیلاز ترموفیل و مزوفیل نشان دهنده کاهش بیشتر میزان فعالیت آنزیم مزوفیل در مقایسه با نوع ترموفیل در حضور گوانیدین هیدروکلراید می باشد. 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) می یابد.

آمیلاز ترموفیل و مزوفیل نمایانگر افزایش میزان هیدروفوبیسیته به میزان پنج درصد برای آنزیم ترموفیل می باشد هم چنین نسبت Arg/Arg+Lys برای آنزیم ترموفیل نسبت به مزوفیل افزایش معادل 1/5 را نشان می دهد (18).

میزان اسید های آمینه باردار آنزیم ترموفیل نسبت به نوع مزوفیل بیش از 1/7 برابر می باشد. بر هم کنش گوانیدین هیدروکلراید با آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل سبب افزایش پایداری و با آنزیم آلفا آمیلاز مزوفیل تا حدودی سبب کاهش پایداری می گردد. به نحوی که غلظت گوانیدین هیدروکلراید 4M منجر به مقدار T_m بالاتر از 105 درجه سانتیگراد برای آنزیم ترموفیل می شود ترکیب گوانیدین هیدروکلراید از طرفی سبب کاهش پلاریته حلال و ثابت دی الکتریک آن می شود و از طرف دیگر می تواند به اتصالات پپتیدی در سطح پروتئین اتصال برقرار نماید. نظر به اینکه مطالعات صورت گرفته در pH=6/9 صورت گرفته است و در این pH گروههای آمین حاوی بار مثبت می باشند بنابراین اتصال گوانیدین هیدروکلراید و سطح پروتئین از نوع میانکنشهای الکترواستاتیک می باشد و چنین اتصالاتی سبب افزایش دانسیته باری در سطح 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 (19).

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 پروتئین ها دارای دو حالت ماکروسکوپی پایدار و قابل تشخیص میباشند، توابع ترمودینامیکی

منابع

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).
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. O.T.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).