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

بهزاد شارقی

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 ناحیهٔ ماورابنفش و اندازه‌گیری فعالیت ویژه مورد مطالعه قرار گرفته است. اندازه‌گیری‌های طیفی در دامنه دمایی ۲۰ الی ۱۰۵ درجهٔ سانتی‌گراد با استفاده از تامپون سدیم فسفات M ۰/۰۲، $pH=۶/۹$ در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شده است. مطالعات سینتیکی در دماهای مختلف و $pH=۶/۹$ صورت گرفته است. نتایج حاصله به این شرح قابل بیان است: ۱ـ پایداری حرارتی بسیار زیاد آنزیم. ۲ـ برهم کنش سدیم دودسیل سولفات (به عنوان یک دگرگون‌ساز قوی) با آنزیم آلفا آمیلاز در دمای کمتر از ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد اثری بر پایداری آنزیم ندارد، امّا در دماهای بالاتر سبب تغییرات ساختاری آنزیم شده که با استفاده از آن پارامترهای ترمودینامیکی دگرگون‌ساز محاسبه شده است. ۳ـ در حضور سدیم دودسیل سولفات پارامترهای ترمودینامیکی ΔH_m°، ΔS_m° و ΔC_p در دمای بیش از ۹۰^oC کاهش می‌یابد. ۴ـ مطالعات سینتیکی انجام شده در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد نمایانگر کاهش ناچیز در فعالیّت آنزیم در حضور سدیم دودسیل سولفات است.

واژه‌های کلیدی: *آلفا آمیلاز ، پایدرای، ترمودینامیک، سینتیک.*

مقدمه

آنزیم آلفا آمیلاز(E.C.3.2.1.1) واکنش هیدرولیز نشاسته و گلیکوژن را کاتالیز می‌نماید و یکی از مهّم‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت نشاسته می‌باشد [۱]. آنزیم‌های آلفا آمیلاز حاصل از Bacillus subtilis و باکتری‌های وابسته بر اساس نحوهٔ عملکرد روی نشاسته به دو گروه Saccharifying و Liquefying تقسیم‌بندی می‌شوند [۲]. مطالعات انجام گرفته مبین نقش

پایدارسازی یون کلسیم برای آنزیم آلفا آمیلاز می‌باشد [۳]. آنزیم آلفا آمیلاز در دامنهٔ وسیعی از pH پایدار می‌باشد [۴]. وزن مولکولی آنزیم آلفا آمیلاز از منشاء B.subtilis برابر ۶۹ kD می‌باشد. تعداد اسیدهای آمینه ساختار آنزیم ۵۱۴ است [۵]. این آنزیم در ساختار خود حاوی ۱۵/۵ درصد اسیدهای آمینهٔ باردار منفی و ۱۳/۸ درصد اسیدهای آمینهٔ باردار مثبت و ۳۸ درصد اسیدهای آمینهٔ آبگریز می‌باشد [۶]. سرفکتنت‌های یونی نظیر سدیم دودسیل سولفات[1] (SDS) به عنوان یک سرفکتنت آنیونی و دودسیل تری متیل آمونیم برمید (DTAB) به عنوان یک سرفکتنت کاتیونی، معمولاً با پروتئین‌های محلول در آب واکنش داده و ساختار طبیعی آن‌ها را دگرگون می‌نمایند. این واکنش‌ها به طور وسیعی مطالعه شده است و چندین مقاله در مورد آن‌ها منتشر شده است [۷، ۸، ۹ و ۱۰]. میانکنش این ترکیبات با پروتئین‌ها ابتدا با اتصال الکترواستاتیک سر یونی سرفکتنت‌ها با جایگاه‌هایی با بار مخالف در سطح پروتئین آغاز شده و سپس با اتصالات آبگریز به پیش می‌رود [۱۱، ۱۲ و ۱۳]. در این مقاله ما به بررسی تخمین پایداری آنزیم آلفا آمیلاز پرداخته و با استفاده از مطالعات اسپکتروفتومتری و سنجش فعالیّت ویژه آنزیم به تشریح بر هم کنش SDS و آنزیم می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

مواد

آنزیم آلفا آمیلاز از منشاء B.subtilis از شرکت مرک و ترکیب سدیم n- دودسیل سولفات از شرکت سیگما خریداری شده است. محلول سدیم فسفات M ۰/۰۲، pH=۶/۰۹ به عنوان بافر استفاده شده است و غلظت آنزیم استفاده شده ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد.

روش‌ها

۱- بررسی اثر حرارت بر پایداری آنزیم آلفا آمیلاز

منحنی‌های دگرگون‌سازی در دامنه دمای ۲۰ الی ۱۰۵ درجهٔ سانتی‌گراد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ۴۰۰۰ مجهز به سیستم کنترل حرارتی الکترونیکی با سرعت افزایش حرارت یک درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه در محلول سدیم فسفات M ۰/۰۲، pH=۶/۹ در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمده است.

۲- بررسی اثر SDS بر پایداری آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل

غلظت‌های مختلف SDS در دامنهٔ ۱ الی ۸ میلی‌مولار در بافر سدیم فسفات M ۰/۰۲ و pH=۶/۹ تهیّه شده است. محلول آنزیمی در هر یک از غلظت‌های مشخص از SDS ساخته شده و مطالعات در غلظت پایین‌تر از نقطهٔ CMC صورت می‌گیرد. منحنی‌های دگرگون‌سازی در طول موج ۲۸۰ نانومتر و دمای ثابت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

۳- سنجش فعالیّت آنزیم آلفا آمیلاز

در اثر عمل آنزیم آلفا آمیلاز بر روی نشاسته، قندهای احیا کننده ایجاد می‌شوند که با معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید ترکیب شده و کمپلکس رنگی ایجاد می‌شود که حداکثر جذب آن ۵۴۰ نانومتر

1- SDS

می‌باشد. از محلـول ۱٪ نـشاسته بـه عنـوان سوبـسترا استفاده می‌شود و با استفاده از مالتوز در دامنه غلظتـی ۰/۳ الـی ۵ میکرومـول در میلـی‌لیتـر بـافر، منحنـی استاندارد ایجاد شده اسـت[۱۴ و ۱۵]. فعالیّـت ویـژهٔ آنزیم به طریقهٔ زیر محاسبه می گردد:

۴- بررسی اثر SDS بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

فعالیّت آنزیم آلفا آمیلاز در دمای ۳۶۸ کلوین در بـافر سدیم فـسفات ۰/۰۲M و pH=۶/۹ در غلظـت‌هـای مختلف از SDS در دامنه ۱ الی ۸ میلـی‌مـولار مـورد بررسی قرار گرفته است.

نتایج

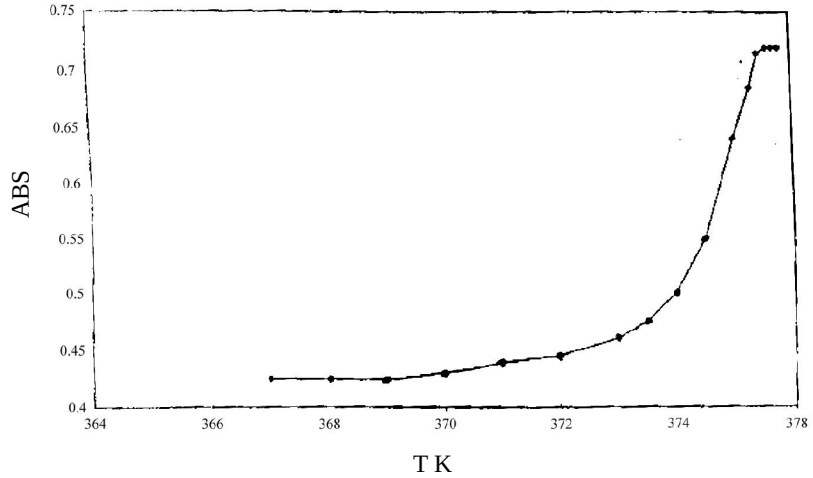
شکل ۱ نشان دهندهٔ منحنـی تغییـرات مقـدار جـذب آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در دماهای مختلف در طول موج ۲۸۰ نانومتر می‌باشد. چنان که مشاهده می‌گردد، تا دمای K ۳۷۲ مقدار جذب تقریباً ثابت می‌باشد. بـه عبارت دیگر تغییر عمده در ساختمان سوّم آنزیم، کـه توسط دستگاه قابل مشاهده باشد صورت نمی‌پـذیرد. پایـداری سـاختمانی آنـزیم آلفـا آمـیلاز ترموفیـل را می‌توان به صورت اختلاف انرژی آزاد بـرای واکـنش زیر در نظر گرفت:

حالت دگرگون شده ⟷ حالت طبیعی

با در نظـر گـرفتن مکـانیزم دو حالتـه کـسر پـروتئین دگرگون شده قابل محاسبه می‌باشد [۱۵].

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

در رابطهٔ فوق Y_N، Y_d به ترتیب کمیّت‌هـای فیزیکـی مورد بررسی مولکـول‌هـای طبیعـی و دگرگـون شـده تحت شرایطی است که Y_{obs} اندازه‌گیری می‌شود.

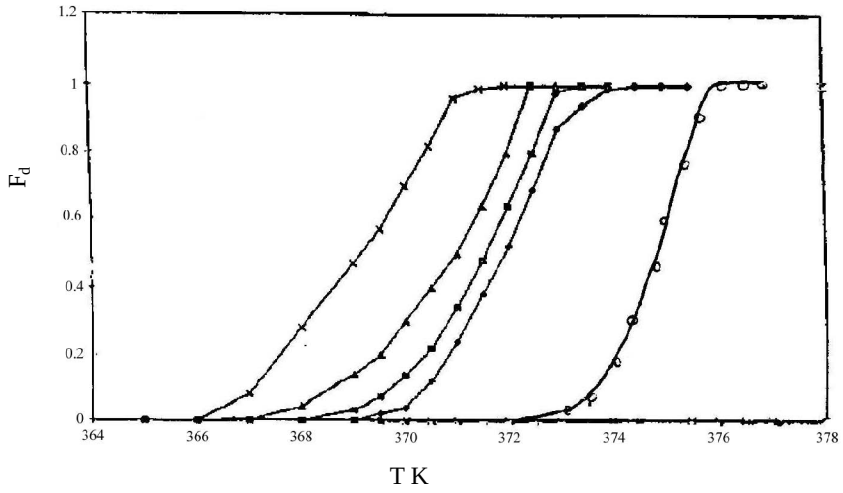


شکل ۱- منحنی تغییرات جذب آنزیم آلفا آمیلاز در مقابل دما در طول موج ۲۸۰ نانومتر در بافر سدیم فسفات pH=۶/۹ ،۰/۰۲ M

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

$$\Delta G_D^\circ = -RT\,1n\left[F_d/(1-F_d)\right] = -RT\,1n\left[(Y_n - Y_{obs})/(Y_{obs} - Y_d)\right] \qquad (۲)$$

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



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

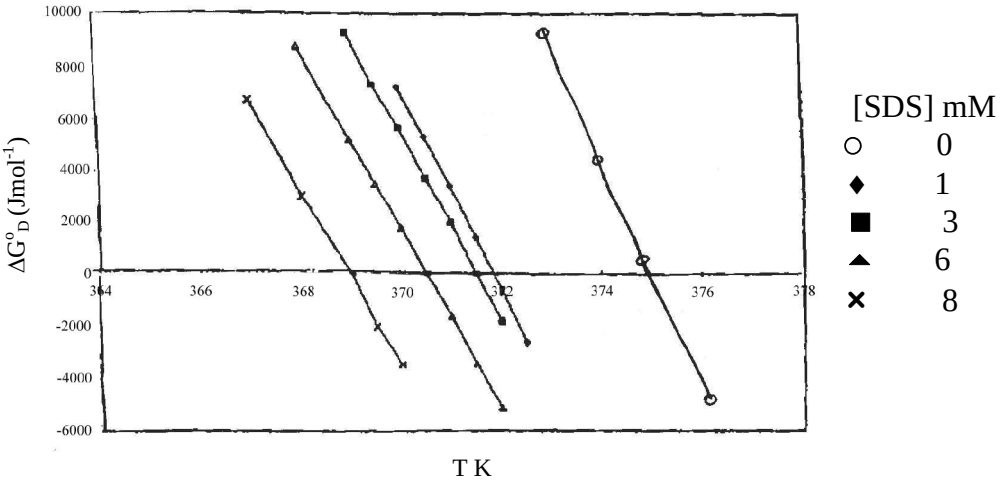
منحنی تغییرات ΔG_D° در مقابل T در غلظت‌های مختلف SDS در شکل ۳ نشان داده شده است. دمای ذوب پروتئین T_m دمایی است که مقدار ΔG_D° برابر صفر می‌شود. بنابراین مقدار T_m برای آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در غیاب SDS، ۳۷۴/۷ K بوده که نمایانگر پایداری حرارتی بسیار زیاد این آنزیم می‌باشد. نتایج حاصل از منحنی‌های تغییرات 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 نقطهٔ T_m برابر ΔS_m° است [۲۱]. برای محاسبهٔ ΔH_m° با در نظر گرفتن مقدار صفر برای ΔG_D° می‌توان از رابطهٔ (۳) استفاده کرد.

$$\Delta H_m^\circ = T_m \Delta S_m^\circ \qquad (۳)$$

ΔS_m°و ΔH_m° به ترتیب تغییرات انتروپی و انتالپی در دمای T_m می‌باشند. مقادیر ΔH_m° و ΔS_m° با افزایش غلظت SDS کاهش می‌یابد (جدول ۲). با در نظر گرفتن این که پروتئین‌ها دارای دو حالت ماکروسکوپی پایدار و قابل تشخیص می‌باشند توابع ترمودینامیکی ΔH_m° و ΔS_m° را می‌توان به صورت زیر بیان کرد [۱۸]:

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

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



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

با توجّه به این که حالت دگرگون شدهٔ پروتئین‌ها، به صورت پیچه بی‌نظم در نظر گرفته می‌شود کاهش مقادیر ΔH_m° و ΔS_m° مبین باز شدن ساختمان طبیعی آنزیم و به عبارت دیگر افزایش سهم پروتئین دگرگون شده می‌باشد. 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 می‌باشد. نکتهٔ قابل توجّه در مورد بر هم کنش SDS و آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل این است که ترکیب SDS اگرچه در دماهای پایین‌تر از ۳۶۳ K هم به آنزیم متصل می‌گردد، ولی پایداری فوق العاده زیاد آنزیم مانع از تغییرات ساختمانی قابل ثبت در طول موج ۲۸۰ نانومتر می‌گردد. شکل ۴ نشان دهندهٔ کاهش مقدار ΔG_D° با افزایش غلظت SDS در دمای ثابت می‌باشد. این بدین معناست که افزایش غلظت SDS سبب جابجایی تعادل:

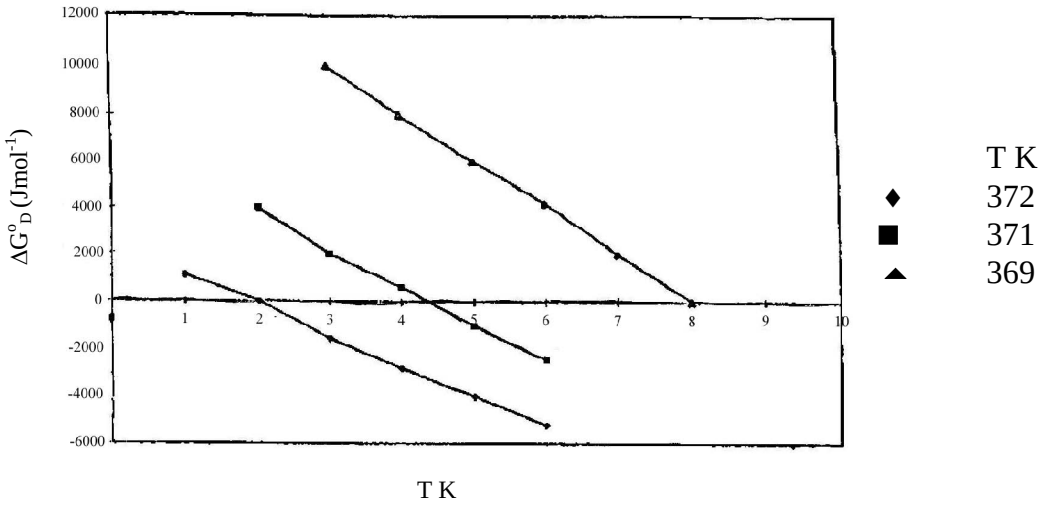
حالت دگرگون شده $\rightleftharpoons$ حالت طبیعی

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

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

$$\Delta G_D^{\circ}(T) = \Delta H_m^{\circ}(1 - T/T_m) - \Delta C_p\left[T_m - T + T\ln(T/T_m)\right] \qquad (۶)$$

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.



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

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].

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

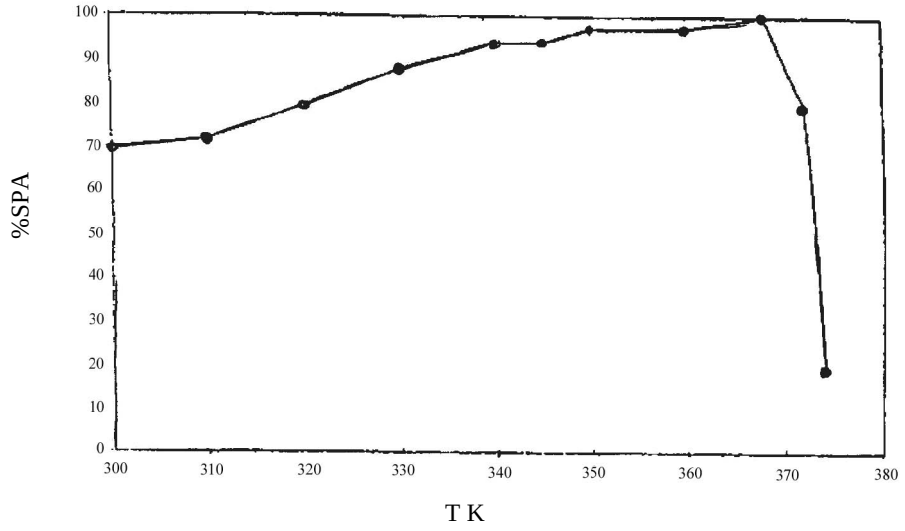
با افزایش غلظت SDS، ΔC_p کاهش می‌یابد این مسئله به دلیل تمایل رو به ازدیاد تبدیل شکل طبیعی آنزیم به شکل دگرگون شده با افزایش SDS می‌باشد.

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

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

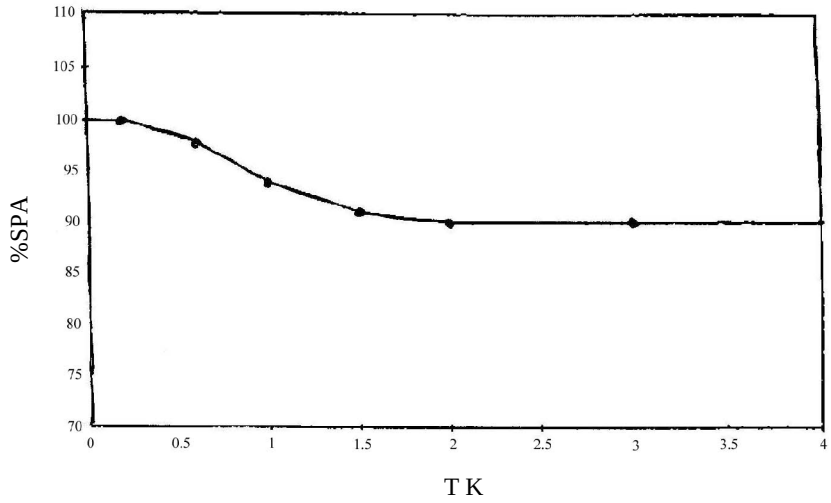
در رابطهٔ فوق $\Delta G_D^{\circ}(H_2O)$ تخمین مقدار در غیاب دگرگون کننده و m اندازه وابستگی تغییرات ΔG_D° به غلظت دگرگون کننده است [۱۶]. نتایج حاصله مؤید کاهش مقادیر $\Delta G_D^{\circ}(H_2O)$ و $[SDS]_{1/2}$ با افزایش دما می‌باشد(جدول ۳). $[SDS]_{1/2}$ غلظتی از SDS است که مقدار ΔG_D° برابر صفر می‌شود.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

می‌شود مقدار $[SDS]_{1/2}$ کاهش می‌یابد. شکل ۵ نمایانگر تغییرات فعالیّت آنزیم آلفا آمیلاز در مقابل دما می‌باشد. چنان که مشاهده می‌گردد آنزیم در دامنه وسیعی از حرارت فعالیّت خود را حفظ می‌کند. دمای بهینهٔ فعالیّت آنزیم K ۳۶۸ است، که خود نمایانگر ترموفیل بودن آنزیم و دارا بودن فعالیّت کاتالیتیکی در دماهای بسیار بالا است. دماهای بالاتر منجر به کاهش فعالیّت می‌شوند که این مسئله به واسطهٔ دگرگون شدن ساختار آنزیم می‌باشد.



شکل ۵- منحنی تغییر فعالیّت ویژهٔ آنزیم آلفا آمیلاز در مقابل دما در بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M، pH=۶/۹

شکل ۶ نشان دهندهٔ تغییرات فعالیّت آنزیم در حضور SDS در دمای K ۳۶۸ می‌باشد. چنان که ملاحظه می‌گردد در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار SDS فعالیّت آنزیم به حدود ۹۰ درصد رسیده و غلظت‌های بالاتر اثری بر فعالیّت آنزیم ندارد. به عبارت دیگر در دمای فوق SDS اثر چندانی بر فعالیّت آنزیم که خود تابعی از ساختمان فضایی آنزیم است، ندارد. نتیجهٔ 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 K ۳۶۸ می‌باشند.



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

بحث

آنـزیم آلفـا آمـیلاز از منـشأ B.subtilis پایـداری حرارتی بسیار قابل توجّهی را از خود نشان مـی‌دهـد. مقدار بالای T_m این آنزیم (۳۷۴/۷ K) در مقایـسه بـا اغلب آنزیم‌های معمولی، نمایانگر پایـداری حرارتـی بسیار زیاد آنزیم فوق می‌باشد. مطالعات انجام گرفتـه مؤید این نکته است که پایداری بسیار زیاد آنزیم‌هـای ترموفیل در مقابل حرارت به عوامل متعـددی وابـسته است که می‌توان به برهم کـنش‌هـای هیـدر فوبیـک، پیونـدهای یـونی پیونـدهای دی سـولفید و محتـوای اسیدهای آمینه آلیفاتیک اشاره نمود [۶]. آنـزیم فـوق دارای ۱۵/۵ در صد اسیدهای آمینهٔ باردار منفی، ۱۳/۸ در صـد اسـیدهای آمینـهٔ بـاردار مثبـت و ۳۸ درصـد اسیدهای آمینهٔ آبگریـز اسـت. وجـود میـانکنش‌هـای واندروالسی مربوط به اسیدهای آمینه آبگریز و وجود برهم کنش‌های الکترواسـتاتیک بـین اسـیدهای آمینـهٔ باردار در افزایش پایداری آنزیم نقش دارند [۲۰].

محاسـبهٔ پارامترهـای ترمودینـامیکی $\Delta C_p, \Delta S_m^\circ, \Delta H_m^\circ$ در حضور غلظت‌هـای مختلـف SDS نمایانگر کاهش مقادیر پارامترهای فوق بـرای آنـزیم ترموفیـل مـی‌باشـد. کـاهش مقـادیر $\Delta C_p, \Delta S_m^\circ, \Delta H_m^\circ$ مبین کاهش پایـداری سـاختمان آنزیم در حضور SDS می‌باشد. دتر جنت‌های یـونی نظیـر SDS سـبب ناپایـداری سـاختمانی اغلـب پـروتئین‌هـای کـروی در غلظـت‌هـای بـسیار پـایین می‌شوند. مکانیزم دگرگون‌سازی پروتئین‌ها به وسـیلهٔ SDS به این صورت است که در ابتدا ترکیـب فـوق که دارای سربار دار منفی و دنبالـهٔ آبگریـز ۱۲ کربنـه است از طریق سرباردار خود به بارهای مثبت موجـود در سطح پروتئین متـصل مـی‌گـردد [۱۲]. ایـن بـرهم کنش‌های اوّلیه سبب باز شدن ساختار پـروتئین شـده

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 محدودهٔ K ۳۳۳ الی K ۳۸۳ دارای فعالیّت کاتالتیکی می‌باشند [۲۳ و ۲۲]. محدودهٔ فعالیّت کاتالتیکی آنزیم‌های معمولی K ۲۹۳ الی K ۳۳۳ است [۲۲ و ۲۳]. دمای بهینهٔ فعالیّت آنزیم آلفا آمیلاز K ۳۶۸ است که نمایانگر ترموفیل بودن آن و توانایی جهت فعالیّت کاتالتیکی 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 کاتالتیکی آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل در مقابل غلظت‌های مختلف SDS در دمای K ۳۶۸ بوده که در تطابق با پایداری ساختمان آنزیم و نتایج حاصل از مطالعات انجام گرفته روی سایرآنزیم‌های 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

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.,

Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat– and pH–stable a-amylase of Bacillus licheniformis: comparison of amino acid sequence of three bacterial liquefying a–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. Liquefyiny alpha amylase Bacillus subtilis. J. Biochem (Tokyo), 77 (1995) 957-963.

[5] Buisson, G., Hasser, R. and Payan, F., Three dimentional structure of porcine pancreatic alpha–amylase at 2.9A° 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 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. Colliod 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 amyloliqufaciens a-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 alpha Amylase study using an agar medium. Clin. Chim Acta, 36 (1972) 419– 423.

[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.

[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.