

نقش پل نمکی در سطح در دسترس باقیمانده های آمینواسیدی آنزیم α -آمیلاز *B. amyloliquefaciens* (BAA) و اثر آن بر پایداری حرارتی با ایجاد فشردگی موضعی

رزیتا زنوزی^{1*}، خسرو خواجه²، مجید منجمی³، ناصر قائمی⁴

- 1- دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- 2- دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- استاد شیمی، گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- 4- استادیار بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*تهران، صندوق پستی 16535-446

Roseata_Zonouzi@yahoo.com

(دریافت مقاله: 90/12/28، پذیرش: 91/1/19)

چکیده - باقی مانده‌های آمینواسیدی 185 – 177 (ناحیه I یا لوپ) در آنزیم α -آمیلاز *B. amyloliquefaciens* (BAA) بخشی از محفظه (Cage) اتصال به کلسیم را می‌سازد. لوپ موجود در BAA دو باقی مانده آمینواسیدی بیشتر از همتای گرمادوست خود یعنی α -آمیلاز *B. licheniformis* (BLA) دارد و Arg₁₇₆ موجود در این بخش با Glu₁₂₆ ناحیه II (باقی مانده‌های آمینواسیدی 131 – 118) یک پل نمکی می‌سازد؛ این ارتباط در آنزیم BLA به خاطر جایگزینی‌های R₁₇₆Q و E₁₂₆V حذف شده است. همچنین پایداری حرارتی آنزیم BAA، وابستگی زیادی به یون کلسیم دارد. در این پژوهش، اثر پل نمکی در پایداری حرارتی آنزیم بررسی شد. برای مشخص شدن اهمیت ساختاری و عملکردی پل نمکی، ابتدا مدل مولکولی جهش یافته ΔE_{126} به شکل تئوری ساخته شده و سپس موقعیت و آثار آمینواسیدهای دو منطقه I و II با برنامه‌های GETAREA و WHAT IF بررسی شد؛ پس از آن، جهش گفته شده با جهش‌زایی هدفمند در ژن BAA ایجاد و پایداری حرارتی آنزیم جهش یافته و وحشی با هم مقایسه شد. نتایج به دست آمده از مدل مولکولی نشان داد که وجود پل نمکی با اثر بر آمینواسیدهای آب‌دوست و آب‌گریز موجود در دو منطقه I و II، جلوی نفوذپذیری آنزیم به آب، خروج کلسیم و غیرفعال شدن حرارتی آنزیم را می‌گیرد. پایداری حرارتی آنزیم وحشی نسبت به سایر جهش یافته‌ها نیز نتایج بالا را تأیید کرد.

کلید واژگان: α -آمیلاز *B. amyloliquefaciens* (BAA)، جهش‌زایی هدفمند، پایداری حرارتی، پل نمکی، لوپ.

1- مقدمه

شد و آنزیم جهش یافته و وحشی از لحاظ پایداری حرارتی مقایسه شدند.

BAA 117 EVNPNARNRQETSEEY
BLA 119 EVDPADRNRVISGEH
BAA 171 RIFKFRGEGKAW
BLA 172 RIYKFQ G - - KAW

شکل 1 هم‌ردیف‌سازی توالی آمینواسیدی پیرامون باقی‌مانده‌های آمینواسیدی Glu₁₂₆ و Arg₁₇₆ در BAA (PDB Code 3BH4) و BLA (PDB Code 1BLI).

2- مواد و روش‌ها

1-2- مواد شیمیایی

اولیگونوکلئوتیدهای مورد نیاز در شرکت MWG آلمان سنتز شد. کیت استخراج DNA ژنومی از شرکت Real Biotech تایوان و آنزیم PWO (DNA Polymerase) از شرکت Roche آلمان خریداری شد. آنزیم‌های برش دهنده، T₄ لیگاز، Dpn1 (Isopropyl-β-D-1 thiogalacto Pyranoside)، IPTG و محلول‌های مورد نیاز برای PCR از شرکت Fermentase آلمان تهیه شد. Ni-NTA آگاراز از Amersham و وکتور pET21a از شرکت Novagen آمریکا خریداری شد. *Escherichia coli* XL1 Blue و *E. coli* BL21 (DE3) از شرکت Stratagene آمریکا تهیه گردید.

2-2- ساخت مدل

پس از ایجاد جهش در آنزیم BAA (PDB Code 3BH4) و حذف Glu₁₂₆ از Swiss- Model Protein Modeling Server برای ساخت مدل استفاده شد [9]. برای ارزیابی مدل ساخته‌شده، محاسبه (Root Mean Square Deviation) و انطباق RMSD بعد از جفت شدن (Iterative fitting) و انطباق

در میان آنزیم‌های مؤثر بر نشاسته، α-آمیلاز (E.C 3,2,1,1) اهمیت ویژه‌ای دارد [1] و به‌گونه‌ی گسترده‌ای بررسی شده است [2]. هم‌ردیف‌سازی توالی آمینواسیدهای α-آمیلازهای *B. amyloliquefaciens* (BAA) و *B. licheniformis* (BLA)، 80 درصد یکسانی (Identity) و 87 درصد شباهت (Similarity) نشان می‌دهد. ساختارهای x-ray [3,4] این آنزیم نشان داده که کلسیم، عامل بسیار مهمی در درستی ساختار، پایداری حرارتی و فعالیت آنزیمی می‌باشد [5,1].

مطالعات پیشین نشان داده که لوپ موجود در دو آنزیم که شامل باقی‌مانده‌های آمینواسیدی 177-185 (ناحیه I) است، سازنده بخشی از محفظه (Cage) متصل به کلسیم است [3,6,7] و افزایش آب‌گریزی و تغییر در بار باقی‌مانده‌های آمینواسیدی لوپ، سبب افزایش پایداری حرارتی آنزیم می‌شود [8]. ناحیه I در آنزیم BAA (شکل 1) دو اسیدآمینو (Glu₁₇₈, Gly₁₇₉) بیشتر از BLA دارد؛ از طرفی Arg₁₇₆ موجود در این ناحیه یک برهم‌کنش یونی با Glu₁₂₆ از ناحیه II (باقی‌مانده‌های 131 – 118) دارد که این برهم‌کنش در BLA به‌خاطر جایگزینی‌های Arg₁₇₆Gln و Glu₁₂₆Val حذف شده است [4].

برای بررسی نقش برهم‌کنش یونی بالا در پایداری ساختاری و حرارتی آنزیم BAA، مدل مولکولی آنزیم جهش‌یافته ΔE₁₂₆ ساخته و موقعیت و اثرگذاری باقی‌مانده‌های آمینواسیدی مختلف در ساختار وحشی با مدل جهش‌یافته مقایسه شد، سپس جهش گفته‌شده با روش جهش‌زایی هدفمند (Site-directed mutagenesis) روی ژن BAA ایجاد

Bacillus amyloliquefaciens در محیط کشت شامل (g/L): 5 پپتون، 3 عصاره گوشت، 15 آگار و 0/01 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ در دمای 30°C کشت داده شد. سویه *Escherichia coli* 12 ساعت در محیط کشت LB (Luria Bertani) در 37°C [12] کشت داده شد.

3-4- کلون کردن ژن BAA در pET21a

DNA ژنومی به وسیله کیت استخراج DNA ژنومی جداسازی شد. در طراحی پرایمرها، توالی کدکننده پپتید سیگنال‌دهنده، (Signal peptide) حذف و جایگاه برش آنزیم‌های برش دهنده *NdeI* (Restriction site) و *NotI* به ترتیب در 5' و 3' قرار داده شد.

N-5GGAATTCCATATGGTAAACGGTACGCTGATGCAG-3' (forward)

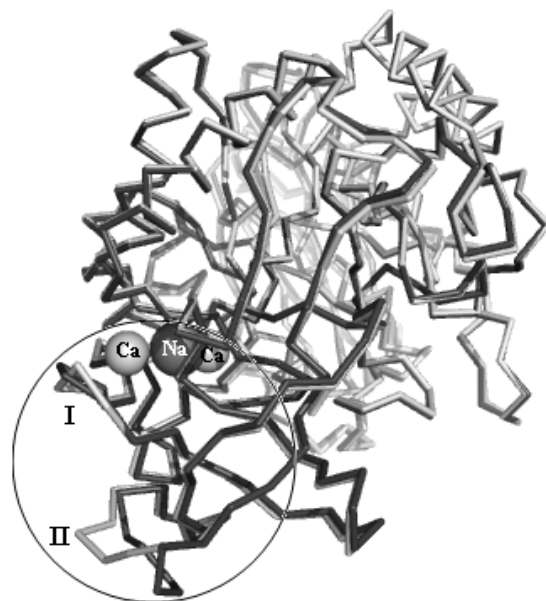
C-5ATAAGAATGCGGCCGCTTTCGAACATAAATGGAGACGG-3' (reverse)

ژن α - آمیلاز با استفاده از DNA خالص شده با روش واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) تکثیر شد. محصول PCR با آنزیم‌های برش دهنده *NdeI* و *NotI* هضم و با آنزیم T_4DNA لیگاز به pET21a دارای جایگاه برش (در دمای 37°C به مدت 12 ساعت) وصل شد [13]. سپس مخلوط به *E. coli* XL1 Blue انتقال داده شد [14]. برای تأیید مراحل کلون‌سازی، محصول به وسیله شرکت MWG آلمان با پرایمرهای پیشرو و خاتمه T_7 تعیین توالی شد.

2-5- جهش‌زایی هدفمند

جهش‌زایی هدفمند با روش QuikChange انجام شد [15]. یک جفت اولیگونوکلئوتید با توالی‌های زیر طراحی شد:

مولکول وحشی و جهش یافته (شکل 2) انجام شد. سطح در دسترس حلال برای باقی مانده‌های آمینواسیدی مختلف با برنامه GETAREA [10] تعیین شد. علاوه بر این، ساختار پروتئین وحشی و نمونه جهش یافته با برنامه WHAT IF [11] ارزیابی شد.



شکل 2 مدل انطباق مولکولی آنزیم BAA وحشی (سیاه) و جهش یافته (خاکستری) که بر اساس ساختار کریستالی *B. amyloliquefaciens* α -amylase بدست آمده (رشته A) و نواحی I و II در آن نشان داده شده است. شکل‌ها با برنامه Pymol 0.99v طراحی شده است.

2-3- انواع سویه‌های باکتری، پلاسمید و شرایط رشد

Bacillus amyloliquefaciens (ATCC 23350)، جداسازی شده از نمونه‌های خاک، از مرکز جمع‌آوری باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی ایران تهیه شد. *Escherichia coli* XL1 Blue و *E. coli* BL 21 (DE3) به ترتیب به عنوان میزبان کلونینگ و بیان استفاده شد. محصول PCR در وکتور بیانی (+) pET 21a کلون شد.

سونیکاتور در بافر شامل 50 mM Tris-HCl، 50 mM NaCl در 4 °C لیز شد. باقیمانده‌های سلولی به وسیله سانتریفوژ (15 min، 6000 g) جمع‌آوری شده و در بافر لیزکننده (50 mM Tris-HCl، 300 mM NaCl، 6 M Urea، pH= 7/5) 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. محصول با دیالیز متوالی در غلظت‌های 0، 1، 2، 3 و 4 مولار اوره تاخوردگی مجدد شد. باقیمانده‌های سلولی به وسیله سانتریفوژ (10000 g، 20 دقیقه) در 4 °C زدوده شده و محلول رویی برای مراحل خالص‌سازی استفاده شد. نمونه به‌دست‌آمده به وسیله ستون Ni-NTA آگارز با روش Amersham Bioscience خالص‌سازی شد.

2-7- تعیین فعالیت آنزیمی و غلظت پروتئین

α- آمیلاز در دمای 37 °C با استفاده از نشاسته سیب‌زمینی به عنوان سوبسترا در بافر شامل 50 mM Tris-HCl، 50 mM NaCl، 50 mM CaCl₂ و 10 mM pH= 7/5 سنجش شد. غلظت قندهای احیاکننده به‌دست‌آمده از واکنش کاتالیز آنزیمی به وسیله دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به روش برنفلد [16] اندازه‌گیری شد. غلظت پروتئین با روش لوری [17] تعیین شد.

2-8- غیرفعال شدن حرارتی آنزیم‌ها

آنزیم BAA خالص، وحشی و جهش‌یافته، در بافر حاوی 50 mM Tris-HCl، 50 mM NaCl و 10 mM CaCl₂ در pH= 7/5 و در دمای 80 °C، در مدت زمان‌های متفاوت انکوبه شدند. نمونه‌ها بعد از سرد شدن در یخ سنجش شده و فعالیت باقی‌مانده آن‌ها در دمای 37 °C

ΔGlu126 forward:

5'-GGCCAATAGAAATCAG|ACTTCGGAGGAATATC-3'

ΔGlu126 reverse:

5'-GATATTCCTCCGAAGT|CTGATTTCTATTTGGCC-3'

مخلوط PCR در حجم نهایی 50 μl شامل: 0/2 μg از DNA الگو، 10 x بافر PCR، 15 μM از هر پرایمر، 0/2 mM از هر dNTP و آنزیم PWO پلی‌مراس (1/25 unit) بود. مخلوط در 95 °C، 5 دقیقه حرارت داده شد و سپس در 22 سیکل دمایی در 95 °C، 1 دقیقه، در 55 °C، 1 دقیقه و در 68 °C، 13 دقیقه قرار داده شد. برای هضم رشته الگو، محصول PCR همراه DpnI، 2 ساعت در 37 °C انکوبه شد. محصول پس از خالص‌سازی به *E.coli* XL1 Blue انتقال داده شد و پنج کلونی به صورت تصادفی انتخاب و برای تأیید جهش، تعیین توالی شد.

2-6- بیان و خالص‌سازی پروتئین وحشی و

جهش‌یافته

پلاسمید بیانی ساخته‌شده به *E.coli* BL 21 (DE3) انتقال داده شد. باکتری‌های حامل ژن BAA وحشی و جهش‌یافته در دمای 37 °C، 12 ساعت در 10 ml محیط کشت LB دارای 100 mg/ml آمپی‌سیلین رشد داده شد. در ادامه 1500 μl از کشت شبانه به 300 ml محیط کشت تازه افزوده شد. پس از رسیدن OD₆₀₀ به محدوده 0/6، IPTG در غلظت نهایی 1/5 mM به محیط کشت افزوده و 12 ساعت در 22 °C انکوبه شد. سلول‌های کشت‌یافته به وسیله سانتریفوژ مدل Hettich Rotina 380R Benchtop Centrifuge (5000 g، 15 دقیقه) در 4 °C جمع‌آوری و به وسیله

از حذف Glu_{126} ، Arg_{176} تنها با Glu_{130} برهم کنش دارد (شکل 3). Glu_{126} از نظر موقعیت مکانی تقریباً در نیمه‌ی ناحیه I (باقی مانده‌های آمینواسیدی 118-131) قرار گرفته است و از نظر فاصله به Arg_{176} نزدیک‌تر است و همان‌گونه که در ساختار مدل مشاهده می‌شود (شکل 3) این اسید آمینه نقش مؤثرتری در کشیدگی ناحیه I به سمت II داشته و Glu_{130} که در فاصله بیشتری از Arg_{176} قرار گرفته و برهم کنش ضعیف‌تری با آن دارد، نقش بسیار کمی ایفا می‌کند.

در بررسی‌های پیشین نیز نشان داده شد که وجود برهم کنش گفته شده از طریق کاهش انعطاف پذیری نواحی I و II در پایداری حرارتی آنزیم مؤثر است [18].

با بررسی دقیق مدل‌ها، چرخش چشم‌گیری در باقی مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست و آب‌گریز دو ناحیه I و II مشاهده می‌شود. این شرایط با محاسبه سطح در دسترس برای هر باقی مانده آمینواسیدی و زنجیر جانبی‌اش با برنامه GETAREA [10] در مدل پروتئینی وحشی و جهش یافته (جدول 2) نشان داده شده است. بر این اساس در ناحیه II در اثر جهش، سطح در دسترس باقی مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست، افزایش یافته است که برای نمونه، چرخش $Asn_{119,124}$ ، Thr_{127} ، Ser_{128} و Glu_{130} به سطح خارجی آنزیم است. باقی مانده‌های آمینواسیدی این ناحیه تا حد زیادی در بخش سطحی آنزیم است و معمولاً میزان آب‌گریزی و در دسترس بودن آمینواسیدها باهم رابطه معکوس دارد [19]؛ بنابراین حضور پل نمکی در آنزیم وحشی، باقی مانده‌های آب‌دوست را به داخل آنزیم جهت داده است.

اندازه‌گیری شد. منحنی درصد فعالیت باقیمانده آنزیم‌ها در برابر زمان (شکل 4) رسم شد.

3- یافته‌ها و بحث

3-1- مدل سازی کامپیوتری

پس از ساخت مدل جهش یافته، برای ارزیابی آن و بررسی شباهت ساختار سه‌بعدی دو مولکول، RMSD کتوردیناسیون‌های اتمی C_{α} اندازه‌گیری شد. بر این اساس، ساختار پروتئین وحشی و جهش یافته از لحاظ انرژی و موقعیت فضایی باقی مانده‌های آمینواسیدی، بهینه‌سازی، جفت و برهم منطبق شد. نتایج به دست آمده (جدول 1) نشان‌دهنده بهینه بودن مدل ایجاد شده است.

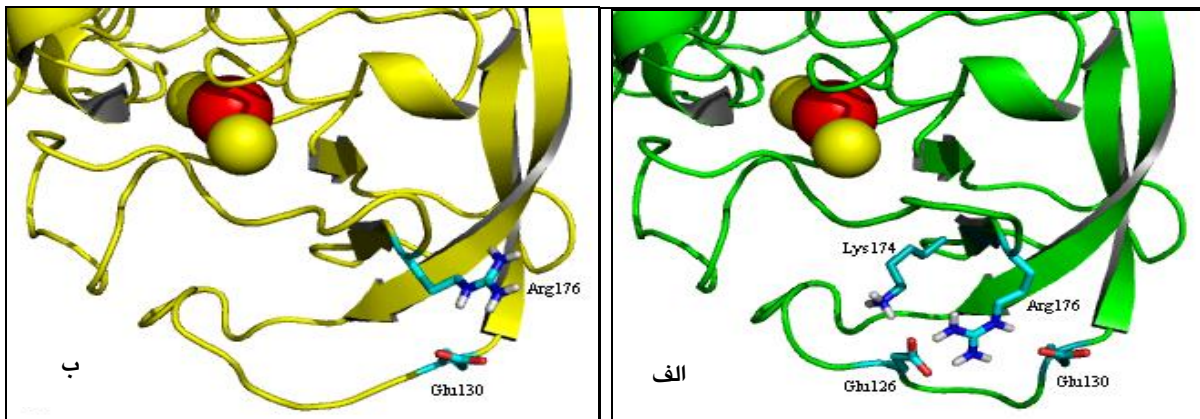
جدول 1 RMSD به دست آمده از انطباق مولکولی آنزیم وحشی و جهش یافته برای C_{α} و اسکلت کربنی در نواحی I و II.

RMSD (A°)		
Regions	C_{α}	Backbone
I ₁₇₀ -G ₁₈₀ (I)	3/07	0/55
N ₁₂₀ -E ₁₃₁ (II)	3/03	0/66

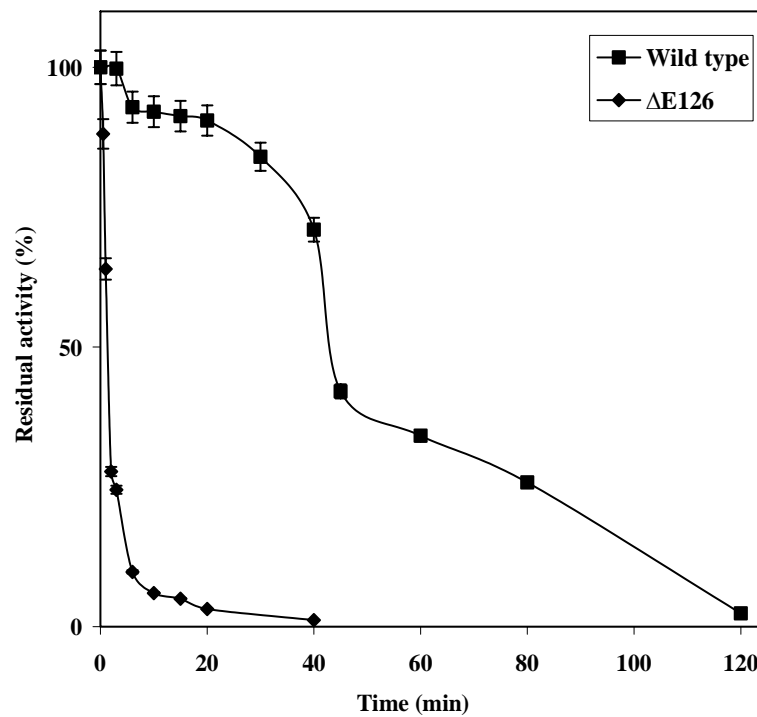
3-2- ارزیابی و مقایسه مدل آنزیمی وحشی و

جهش یافته

ساختار آنزیم وحشی و نمونه جهش یافته در مدل‌های تئوری با برنامه WHAT IF [11] مقایسه شد. این مقایسه نشان داد که در مدل وحشی، اسید آمینه Arg_{176} دارای دو برهم کنش یونی با Glu_{126} و Glu_{130} است و Glu_{126} نیز با Arg_{176} و Lys_{174} برهم کنش دارد؛ اما بعد



شکل 3 الف- پل نمکی به دست آمده از برهم کنش Arg176 با Glu126 و Glu130 و نیز Glu126 با Arg176 و Lys174 در آنزیم وحشی. ب- برهم کنش یونی بین Arg176 و Glu130 در آنزیم جهش یافته. کره قرمز، یون سدیم و زرد، یون کلسیم را نشان می دهد.



شکل 4 غیرفعال شدن دمایی آنزیم BAA وحشی (■) و جهش یافته (◆) در بافر 50 mM Tris-HCl، 50 mM NaCl و pH=7/5 در دمای 80°C در حضور 10mM CaCl₂. انحراف استاندارد مقادیر عددی حدود 5 درصد به دست آمد.

در ناحیه I یا لوپ نیز سطح در دسترس باقی مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست و آب‌گریز افزایش یافته است. با توجه به این‌که در لوپ‌ها معمولاً آب‌گریزی سطح داخلی بالاست [20]، تغییرات برجسته‌ای که در آمینواسیدهای Arg176 (چرخش به خارج لوپ و کاهش کشش) و Lys175 (چرخش به داخل لوپ) بعد از جهش رخ داده، سبب کاهش برهم‌کنش‌های آب‌گریز در سطح داخلی لوپ و گسترش فاصله بین دو منطقه (I و II) می‌شود (شکل 3)؛ در حالی که یکی از ویژگی‌های چشم‌گیر در ساختارهای پروتئینی، فشردگی آن‌ها است [21 و 22].

در مجموع، جهش، سبب نفوذپذیری بیشتر منطقه II به آب و هدایت آن از طریق حفره ایجادشده بین دو منطقه، به سمت ناحیه I شده و خروج کلسیم را سبب می‌شود.

3-3- غیرفعال شدن حرارتی

داناتوراسیون حرارتی آنزیم‌ها، معمولاً با تخریب اتصالات غیرکووالان شامل برهم‌کنش‌های آب‌گریز انجام می‌شود [23]. برای درک نقش پل نمکی بین Arg176 و Glu126 در مدل تئوری، سرعت غیرفعال شدن دمایی آنزیم وحشی و جهش‌یافته در دمای 80°C در حضور 10 mM CaCl₂ تعیین شد. همان‌طور که در منحنی 4 نشان داده شده، آنزیم وحشی و جهش‌یافته به ترتیب نیمه‌عمرهایی برابر 43 و 1/2 دقیقه دارند که نشان‌دهنده حساسیت بالای آنزیم جهش‌یافته به حرارت است.

بعد از جهش، به‌خاطر چرخش باقی‌مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست منطقه II به سطح خارجی آنزیم، نفوذپذیری این ناحیه به آب بیشتر شده و سبب ورود آب به حفره ایجادشده در حد فاصل منطقه I و II می‌شود. حفره ایجادشده، حاصل کاهش فشردگی منطقه در اثر حذف پل نمکی است؛ زیرا برهم‌کنش Arg176 و Glu126 سبب کشیدگی منطقه II به سمت I و فشردگی موضعی در آنزیم می‌شود. این نبود فشردگی حاصل از جهش، خود سبب نفوذپذیری ناحیه I به آب می‌شود. حذف Glu126 به‌خاطر کاهش کشیدگی در Arg176 باعث چرخش اسکلت کربنی آنزیم در ناحیه لوپ و کاهش برهم‌کنش‌های آب‌گریز در سطح داخلی آن می‌شود و از آن‌جا که بخشی از باقی‌مانده آمینواسیدی موجود در لوپ، سازنده محفظه اتصال کلسیم به آنزیم است، تغییرات گفته‌شده بعد از جهش، به‌ویژه در دماهای بالا که آن‌تروپی مولکول‌های آب زیاد است، سبب نفوذ آب به منطقه I و خروج کلسیم می‌شود و چون غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم BAA یک سازوکار وابسته به کلسیم است [18]، حذف برهم‌کنش سبب ناپایداری حرارتی آنزیم BAA می‌شود.

در مجموع، برهم‌کنش یونی Arg176 و Glu126 با اثر بر باقی‌مانده‌های آمینواسیدی آب‌دوست و آب‌گریز دو منطقه I و II و ایجاد فشردگی در ساختار، در پایداری حرارتی آنزیم BAA نقش حیاتی دارد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که حتی تغییر یک اسیدآمینه می‌تواند شبکه یونی و در نتیجه ساختار آنزیم را تغییر داده و بر پایداری ساختاری و حرارتی آن مؤثر باشد.

جدول 2 درصد سطح در دسترس باقی مانده‌های آمینواسیدی مدل آنزیمی وحشی و جهش یافته در نواحی I و II.

Residues (Region I)	Ratio(%) In/Out				Residues (Region II)	Ratio(%) In/Out			
	Wild-type		Mutant			Wild-type		Mutant	
Ile ₁₇₂	21/1		13/8	i	Thr ₁₁₄	51/8	o	22/1	
Phe ₁₇₃	0/00	i	0/00	i	Ala ₁₁₅	0/00	i	0/00	i
Lys ₁₇₄	15/7	i	21/4		Val ₁₁₆	0/20	i	6/00	i
Phe ₁₇₅	0/00	i	0/00	i	Glu ₁₁₇	21/0		43/3	
Arg ₁₇₆	34/4		62/9	o	Val ₁₁₈	0/00	i	0/00	i
Gly ₁₇₇	46/6		17/6	i	Asn ₁₁₉	27/9		62/1	o
Glu ₁₇₈	100	o	74/4	o	Pro ₁₂₀	77/0	o	86/1	o
Gly ₁₇₉	69/4		91/4	o	Ala ₁₂₁	91/2	o	100	o
Lys ₁₈₀	6/50	i	1/00	i	Asn ₁₂₂	45/1		53/6	o
Ala ₁₈₁	83/6	o	81/1	o	Arg ₁₂₃	7/50	i	6/40	i
Trp ₁₈₂	3/40	i	5/60	i	Asn ₁₂₄	55/2	o	74/9	o
Asp ₁₈₃	0/00	i	0/00	i	Gln ₁₂₅	51/1	o	19/5	i
Trp ₁₈₄	71/9	o	59/9	o	Glu ₁₂₆	38/0		-	-
Glu ₁₈₅	27/7		25/4		Thr ₁₂₇	35/0		100	o
Val ₁₈₆	0/10	i	0/00	i	Ser ₁₂₈	18/9	i	68/0	o
Ser ₁₈₇	0/80	i	1/50	i	Glu ₁₂₉	92/0	o	59/6	o
Ser ₁₈₈	66/0		53/5	o	Glu ₁₃₀	55/6	o	43/0	

- content of α -amylases of various origins. *J. Biol. Chem.* 234, 2901-2905.
- [6] Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. (1995) Crystal structure of calcium depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 246, 545-559.
- [7] Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C. (2000) Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* 301, 1041-1057.
- [8] Suzuki, Y., Ito, N., Yuuki, T., Yamagata, H., Udaka, S. (1989) Amino acid residues stabilizing a *Bacillus* alpha-amylase against irreversible thermoinactivation. *J. Biol. Chem.* 264, 18933-18938.
- [9] Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl. Acids. Res.* 31, 3381-3385.
- [10] Fontana, A., Zamboni, M., de Filipis, V., de Laureto, P.P. (1995) Limited proteolysis of cytochrome c in trifluoroethanol. *FEBS. Lett.* 362, 266-270.
- [11] Vriend, G. (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8, 52-56.
- 4- مراجع**
- [1] Nielsen, J.E., Borchert, T.V. (2000) Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1543, 253-274.
- [2] MacGregor, E.A., Janecek, S., Svensson, B. (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1546, 1-20.
- [3] Machius, M., Declerck, N., Huber, R., Wiegand, G. (1998) Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder→order transition of the substrate-binding site mediated by calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure.* 6, 281-292.
- [4] Alikhajeh, J., Khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., Lin, Y. H., Liu, E., Guan, H.H., Hsieh, Y.C., Chuankhayan, P., Huang, Y.C., Jeyaraman, J., Liu, M.Y., Chen, C.J. (2010) The Crystal Structure of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase at High Resolution: Implications for Thermal Stability. *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66, 121-129.
- [5] Vallee, B.L., Stein, E.A., Sumerwell, W.N., Fischer, E. H. (1959) Metal

- stability of α -amylase of *B. amyloliquefaciens* (BAA). *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 7-14.
- [19] Samanta, U., Bahadur, R.P., Chakrabarti, P. (2002) Quantifying the accessible surface area of protein residues in their local environment. *Protein. Eng.* 15, 659-667.
- [20] Hirakawa, H., Kuhara, S. (1999) The hydrophobic cores of proteins predicted by wavelet analysis. *Bioinformatics.* 15, 141-148
- [21] Chothia, C. Structural invariants in protein folding. (1975) *Nature.* 254, 304-308.
- [22] Richards, F.M. (1977) Areas, volumes, packing and protein structure. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6, 151-176.
- [23] Daniel, R.M. (1996) the upper limits of enzyme thermal stability. *Enzyme. Microb. Tech.* 19, 74-79.
- [24] Tanaka, A., Hoshino, E. (2002) Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase determined by inactivation kinetics. *Biochem. J.* 364, 635-639.
- [12] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [13] Haghani, K., Khajeh, Kh., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B. 2012. Evidence regarding the hypothesis that the histidine-histidine contact pairs may affect protein stability. *Int. J. Biol. Macromol.* 50: 1040-1047.
- [14] Chung, C.Y., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2172-2175.
- [15] Fisher, C.L., Pei, G.K. (1997) Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Bio. Techniques.* 23, 570-574.
- [16] Bernfeld, P. (1955) Amylase, α and β . *Methods. Enzymol.* 1, 149-151.
- [17] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- [18] Zonouzi, R., Khajeh, K., Monajjemi, M., Ghaemi, N. (2013) the role of salt bridge between Arg₁₇₆ and Glu₁₂₆ in the thermal