

اثر یون‌های فلزی کلسیم و پتاسیم بر پایداری حرارتی مالتوژنیک آمیلاز ژئوباسیلوسی

پروانه رحمتی خانه سری¹، رضا حسن ساجدی^{2*}، خسرو خواجه³

- 1- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران
- 2- دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- استاد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*کدپستی 14115-175، تهران، ایران
sajedi_r@modares.ac.ir
(دریافت مقاله: 91/2/27، پذیرش: 92/4/17)

چکیده - مالتوژنیک آمیلازها زیرگروهی از خانواده آلفا-آمیلاز است که توانایی هیدرولیز چندین پیش‌ماده مانند نشاسته، پلولان و سیکلودکسترین‌ها (CDs) را دارد، ولی سیکلودکسترین‌ها را به بقیه ترجیح می‌دهد و برخلاف سایر آلفا-آمیلازها داخل سلولی است. از این آنزیم در فرایندهای صنعتی بسیاری مانند صنایع غذایی، تخمیر و داروسازی می‌توان استفاده کرد. اثر غلظت‌های مختلف یون‌های فلزی Ca^{2+} و K^+ بر پایداری حرارتی آنزیم در دمای 65°C مشخص کرد که یون کلسیم سبب کاهش و یون پتاسیم موجب افزایش پایداری حرارتی می‌شود. بر اساس بررسی‌های پیشین مشخص شده است که غلظت‌های مختلف یون‌های یادشده باعث کاهش یا افزایش فعالیت آنزیم می‌شود. ساختار دوم آنزیم با دورنگ‌نمایی دورانی در حضور و نبود یون‌های کلسیم و پتاسیم بررسی شد که درصد ساختار α -هلیکس در غلظت‌های 1 و 10 میلی‌مولار یون کلسیم نسبت به نبود یون، کاهش داشت اما در غلظت 5 میلی‌مولار، درصد ساختار α -هلیکس، افزایش چشم‌گیری نسبت به نبود یون نشان داد. درصد ساختار α -هلیکس در غلظت‌های 1 و 5 میلی‌مولار یون پتاسیم نسبت به نبود این یون، افزایش و در غلظت 10 میلی‌مولار کاهش داشت؛ در غلظت 10 میلی‌مولار یون پتاسیم، افزایش رندوم کوئیل نسبت به نبود یون دیده شد. برای بررسی ساختار سوم پروتئین در حضور و نبود غلظت‌های فوق، از روش فلورسانس ذاتی (با برانگیختگی در طول موج 280 نانومتر) استفاده شد که نشان داد یون کلسیم در غلظت‌های 1 و 5 میلی‌مولار سبب افزایش و در غلظت 10 میلی‌مولار موجب کاهش ساختار سوم می‌شود. یون پتاسیم نیز در همه‌ی غلظت‌ها سبب افزایش ساختار سوم پروتئین می‌شود. نتایج اسپکتروسکوپی هم‌خوانی خوبی با نتایج مربوط به پایداری حرارتی دارد. محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی نشان می‌دهد که اثر ناپایدارکنندگی کلسیم و پایدارکنندگی پتاسیم به ترتیب آنتالپیک ($\Delta H^\#$) و آنتروپیک ($\Delta S^\#$) است.

کلید واژگان: مالتوژنیک آمیلاز، پایداری حرارتی، یون‌های فلزی Ca^{2+} و K^+ .

1- مقدمه

نسبت به دیگر آلفا-آمیلازها نشان می‌دهند که عبارتند از: (1) فعالیت دوگانه شکست پیوند گلیکوزیدی α -D-(1,4) و α -D-(1,6) (2) ترانس گلیکوزیلاسیون α -D-(1,4) به α -D-(1,3)، α -D-(1,4) یا α -D-(1,6) (3) فعالیت شکست آکاربوز، یک مهارکننده رقابتی سودو-تتراساکارییدی خانواده آلفا آمیلاز [1]. تاکنون مالتوزینیک آمیلاز از باکتری‌های مختلف مانند *Bacillus subtilis*، *Bacillus stearothermophilus*، *Thermus sp.* IM6501 و *Bacillus sp.* WPD616 منابع باکتریایی دیگر شناسایی شده است. از آنجا که پایداری حرارتی از مهم‌ترین ویژگی‌های آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت است و آنزیم مالتوزینیک آمیلاز از گونه ترموفیل *Geobacillus sp.* Gh6 نسبت به سایر مالتوزینیک آمیلازهایی که تاکنون از منابع مختلف استخراج شده پایداری حرارتی بیشتری دارد، در این پژوهش پایداری حرارتی این آنزیم و عوامل مؤثر بر آن بررسی شد [9-11]. همچنین اثر دو یون مهم و معمول، بر پایداری حرارتی آنزیم بررسی شده است.

2- مواد و روش‌ها

1-2- مواد

β -سیلودکسترین، 3 و 5 دی‌نیتروسالسیلیک‌اسید (DNS) از شرکت سیگما (Sigma, St. Louis, MO, USA)، کانامایسین از شرکت (Bio Basic INC, Canada)، IPTG¹ از Vivantis (USA)، Ni-NTA² آگارز² از کیژن (Hilden, Germany)، ایمیدازول از شرکت Applichem (Germany)، استات سدیم، سدیم - پتاسیم تارتارات، CaCl_2 ، NaH_2PO_4 و KCl مواد استفاده‌شده برای تهیه ژل پلی‌اکریل‌آمید مانند اکریل‌آمید و

نشاسته منبع اصلی انرژی برای طیف گسترده‌ای از ارگانایسم‌های زنده است. نشاسته پلیمری از گلوکز است که با پیوندهای گلیکوزیدی α -D-(1,4) یا α -D-(1,6) به هم وصل شده است [1]. آنزیم‌های درگیر در تجزیه و تبدیل نشاسته، بیشتر از خانواده α -آمیلاز (خانواده 13 گلیکوزیل هیدرولازها) است [2]. مالتوزینیک آمیلازها (MAases, EC 3.2.1.133) زیرگروهی از آنزیم‌های آمیلولیتیک‌اند که توانایی شکستن چندین پیش‌ماده شامل نشاسته، پلولان و سیکلودکسترین‌ها (CDs) را دارد [3,4]. اگرچه آمیلازها بیشتر پیوندهای گلیکوزیدی در مولکول‌های نشاسته را می‌شکنند، مالتوزینیک آمیلازها، CD را می‌شکنند و گلوکز و مالتوز تولید می‌کنند، بنابراین مالتوزینیک آمیلاز نامیده می‌شوند. این آنزیم‌ها درون سلولی‌اند و بیشتر واکنش‌های ترانس گلیکوزیلاسیون در حضور مولکول‌های پذیرنده مختلف مانند گلوکز، فروکتوز، سلوبیوز و آکاربوز را با تشکیل پیوندهای گلیکوزیدی α -D-(1,3)، α -D-(1,4) و α -D-(1,6) انجام می‌دهند. از این آنزیم‌ها می‌توان در تعداد بسیاری از فرایندهای صنعتی مانند صنایع غذایی، تخمیر، نساجی، کاغذ، مواد شوینده، صنایع نانوائی، شیرینی پزی و داروسازی استفاده کرد. مالتوزینیک آمیلازها در N-ترمینال (حدود 130 باقی‌مانده) و C-ترمینال (حدود 490 باقی‌مانده) دومین اضافی دارند و به خاطر باریک و عمیق بودن جایگاه فعال، تنها پیش‌ماده‌های کوچک مانند CDs و مالتوالیگوساکاریدها می‌توانند به آسانی در دسترس این آنزیم‌ها قرار گیرند. مالتوزینیک آمیلازها، نقش بیشتری در شکست پیوندهای گلیکوزیدی α -D-(1,4) نسبت به پیوندهای گلیکوزیدی α -D-(1,6) دارند [5-8]. مالتوزینیک آمیلازها، ویژگی‌های متفاوتی را

1. Isopropyl-beta-D-thio galactopyranoside
2. Ni-NT Agarose

(BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد. SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید 12 درصد در شرایط احیایی و بر اساس روش Laemmli [14] انجام شد و بندهای پروتئینی به کمک رنگ‌آمیزی کوماسی آبی، ظاهر شدند.

2-4- تعیین فعالیت مالتوزینک آمیلاز

برای سنجش فعالیت مالتوزینک آمیلاز از روش Bernfeld استفاده شد [15,16]. محلول‌های استفاده شده، بافر استات سدیم 50 mM با pH 6/0، محلول بتا-سیکلودکسترین (β-CD) 1 درصد به عنوان پیش‌ماده (0/01 gr) از پودر بتا-سیکلودکسترین در 1 ml بافر استات سدیم در دمای 60°C حل شد، محلول آنزیمی به دست آمده از تخلیص محلول DNS است. برای بررسی فعالیت آنزیم، حجم مناسبی از محلول آنزیمی به بافر اضافه شد؛ به گونه‌ای که حجم در لوله‌های آزمایش به 100 μl رسید. نمونه شاهد تنها شامل بافر به حجم 50 μl بود. با فواصل زمانی معین، 50 μl از پیش‌ماده (β-CD) به آن‌ها اضافه شد. پس از 5 دقیقه انجام واکنش در دمای 60°C با همان فواصل زمانی، 100 μl محلول DNS به لوله‌ها افزوده شد. سپس لوله‌ها 5 دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند و پس از سرد شدن، 1 ml آب مقطر به آن‌ها اضافه شد. پس از به هم زدن، جذب آن‌ها در طول موج 540 nm، در برابر نمونه شاهد خوانده شد.

2-5- بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت

ناپذیر آنزیم در غلظت‌های گوناگون یون‌های فلزی

برای تعیین پایداری حرارتی نخست محلول آنزیمی در بافر 50 mM استات سدیم با pH 6/0، تهیه و در 65 درجه سانتی‌گراد با فاصله‌های زمانی مختلف در حضور غلظت‌های 1، 5، و 10 mM نمک‌های KCl و CaCl₂ دماهی و بلافاصله به یخ منتقل شد. نمونه‌ها پس از نیم

آمونوم‌پرسولفات (APS) نیز از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) تهیه و استفاده شد.

2-2- میکروارگانیزم‌ها و پلاسמיד

با توجه به این که کلونینگ ژن مالتوزینک آمیلاز و بیان آن در میزبان پروکاریوتی در پژوهش پیشین انجام شد [12]، در این پژوهش از حامل pET28a دارای ژن کد کننده آنزیم MAase استفاده گردید و از سویه‌های DH5α و BL21(DE3) به ترتیب برای به دست آوردن وکتور بیشتر و بیان پروتئین مورد استفاده شد.

2-3- بیان و تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها و تخلیص پروتئین

یک لوپ از باکتری‌های دارای پلاسמיד نو ترکیب بیانی به 5 میلی‌لیتر محیط کشت LB دارای کانامایسین 30 μg/ml، تلقیح و در 37 درجه سانتی‌گراد با دور 250 rpm دماهی شد. سپس 2 میلی‌لیتر باکتری رشد کرده، به 200 میلی‌لیتر محیط کشت LB دارای کانامایسین انتقال داده و تا افزایش OD₆₀₀ به حدود 0/6 در 37 درجه سانتی‌گراد دماهی شد. پس از این مرحله با افزودن IPTG با غلظت نهایی 1 mM، محیط کشت 6 ساعت در 30 درجه سانتی‌گراد دماهی شد. پس از پایان بیان، سوسپانسیون باکتری‌های القا شده 20 دقیقه در 5000 rpm و 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به دست آمده با افزودن بافر لیزکننده به حالت سوسپانسیون درآمد و تحت سونیکاسیون قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ سلول‌های لیز شده، مایع رویی برای آنالیز بیان ژن روی ژل اکریلامید برده شد و کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل - آگارز برای تخلیص پروتئین انجام شد. غلظت پروتئین با روش Bradford [13] اندازه‌گیری و از آلبومین سرم گاوی

JASCO J-715 ثبت شد. طیف‌ها با نرم‌افزار JASCO J-715 شامل Fast fourier-transform noise reduction بدون تغییر در شکل کلی طیف، صاف شد. نتایج به صورت بیضی‌واری مولی $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) و بر اساس میانگین وزنی آمینواسیدهای مالتوژنیک آمیلاز تعیین شد. بیضی‌واری مولی به صورت $[\theta] = (\theta \times 100 \text{MRW}) / (cl)$ به دست آمد؛ به گونه‌ای که c ، غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، l ، طول مسیر نور و θ ، بیضی‌واری اندازه‌گیری شده در دامنه طول موجی UV دور است. نرم افزار JASCO مدل 1.10.02 برای تخمین ساختار دوم برای به دست آوردن میزان درصد هلیکس، به کار گرفته شد [17].

2-8- فلورسانس ذاتی

فلورسانس ذاتی مالتوژنیک آمیلاز در بافر استات سدیم 50 mM با pH 6/0 ارزیابی شد. غلظت نهایی پروتئین در این بررسی، 0/02 mg/ml بود. نمونه‌ها با طول موج 280 nm (برای برانگیختگی Tyr) برانگیخته و نشر آن‌ها در طول موج‌های 300-400nm ثبت شد.

3- یافته‌ها

3-1- بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب

بیان ژن در سلول‌های *E. coli* سویه BL21(DE3) به وسیله‌ی القاگر IPTG با غلظت نهایی 1 میلی‌مولار در 30 درجه سانتی‌گراد با دور 250 rpm انجام شد. پس از 6 ساعت، در محتوای سلولی باکتری‌های برداشت شده، یک باند پروتئینی حدود ناحیه 65 کیلودالتون در ژل ظاهر شد. تخلیص پروتئین به روش کروماتوگرافی تمایلی با ستون نیکل-آگارز انجام شد. در این مرحله همه‌ی پروتئین‌ها از ستون عبور کردند و تنها پروتئین مالتوژنیک آمیلاز به خاطر وجود دنباله هیستیدینی، به ستون وصل شد. سپس به کمک بافر جدا

ساعت دما دهی از یخ خارج شده و فعالیت نسبی آن‌ها در 60°C با مطابق روش معمول اندازه‌گیری شد. زمان صفر دما دهی به عنوان شاهد (100 درصد فعالیت) در نظر گرفته شد.

2-6- تعیین پارامترهای کمی و ترمودینامیکی پایداری حرارتی

1/2، زمانی که فعالیت باقی‌مانده آنزیم به 50 درصد کاهش می‌یابد، از روی منحنی به دست آمد. برای به دست آوردن ثابت غیرفعال‌سازی ($k_{\text{inactivation}}$)، نخست فعالیت باقی‌مانده آنزیم پس از دما دهی در زمان‌های مختلف، تعیین شد. سپس منحنی لگاریتم درصد باقی‌مانده فعالیت بر زمان دما دهی، رسم شد که شیب آن، $k_{\text{inactivation}}$ است. برای به دست آوردن پارامترهای ترمودینامیکی، نخست انرژی فعال‌سازی (E_a) فرایند با رسم منحنی آرنیوس¹ تعیین شد (با استفاده از شیب منحنی $\text{Ln}k_{\text{inactivation}}$ بر $1/T$). پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال‌سازی به صورت زیر تعیین شدند:

$$\Delta G^\# = RT \ln (k_B T/h) - RT \ln k$$

$$\Delta H^\# = E_a - RT$$

$$\Delta S^\# = (\Delta H^\# - \Delta G^\#) / T$$

k_B ، ثابت بولتزمن ($1.3805 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)، h ، ثابت پلانک ($6.6256 \times 10^{-34} \text{ J.S}$) و k ، ثابت سرعت است که در این فرایند همان $k_{\text{inactivation}}$ است.

2-7- دورنگ نمای دورانی²

طیف دورنگ‌نمایی دورانی (CD) برای تعیین درصد ساختار دوم مالتوژنیک آمیلاز، با غلظت 0/2 mg/ml در بافر استات سدیم 50 mM با pH 6/0 با دستگاه اسپکتروپولاریمتر

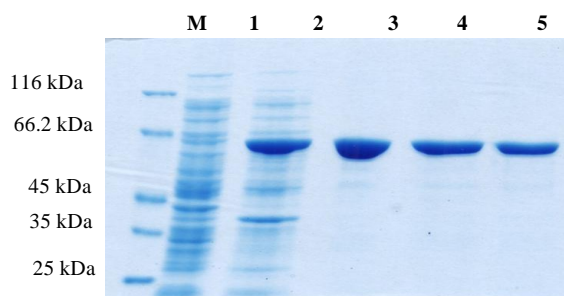
1. Arrhenius

2. Circular Dichroism

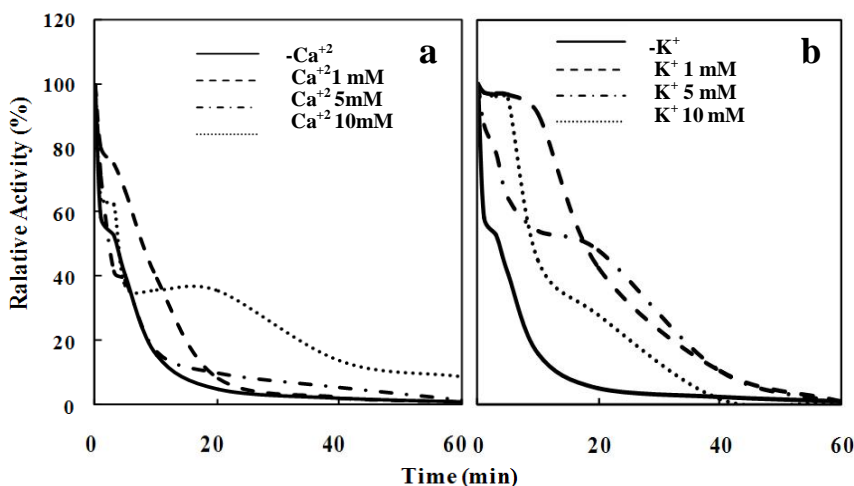
2-3- بررسی اثر یون‌های فلزی کلسیم و پتاسیم بر غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در 65 درجه سانتی‌گراد

اثر یون‌های فلزی کلسیم و پتاسیم بر پایداری حرارتی آنزیم مالتوژنیک آمیلاز با بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در 65°C در بافر استات با $\text{pH } 6/0$ در حضور و نبود غلظت‌های 1، 5 و 10 میلی‌مولار از نمک‌های CaCl_2 و KCl بررسی شد (شکل 2). در این دما، فعالیت آنزیم پس از حدود 20 دقیقه، کامل از دست می‌رود. در حالی‌که یون کلسیم اثر چندانی در پایداری حرارتی آنزیم در این دما ندارد و حتی در برخی غلظت‌ها موجب کاهش آن می‌شود، یون پتاسیم به ویژه در غلظت‌های پایین، موجب افزایش پایداری حرارتی آنزیم می‌شود. چنان‌که در شکل 2 دیده می‌شود، در حضور غلظت 1 میلی‌مولار یون پتاسیم تا 15 دقیقه دماهی در این دما، فعالیت آنزیم کاهش محسوسی ندارد و پس از 20 دقیقه، نزدیک به 50 درصد فعالیت اولیه آنزیم حفظ شده است.

کننده در حضور غلظت بالای ایمیدازول، مالتوژنیک آمیلاز جداسازی شد. ایمیدازول در اتصال به نیکل با دنباله هیستیدینی رقابت می‌کند و سبب جداسدن پروتئین از ستون می‌شود. نمونه خالص‌شده مالتوژنیک آمیلاز روی ژل SDS-PAGE 12 درصد بررسی شد. شکل 1، تک باند حاصل از تخلیص را نشان می‌دهد که بیانگر پروتئینی با وزن مولکولی حدود 65 کیلو دالتون است. برای تعیین غلظت پروتئین تخلیص شده از آزمون برادفورد استفاده شد.



شکل 1 بررسی پروتئین نوترکیب خالص شده روی ژل، M مارکر وزن مولکولی پروتئین (وزن بر حسب کیلودالتون)، (1) محلول رویی از محتوای سلولی القا نشده به عنوان کنترل، (2) محلول رویی از محتوای سلولی القا شده و (3)، (4) و (5) فرکشن‌های مختلف شستشوی ستون با ایمیدازول.



شکل 2 نمودار اثر یون‌های فلزی Ca^{2+} (a) و K^{+} (b) بر غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در دمای 65°C .

3-3- ترمودینامیک فرایند غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر

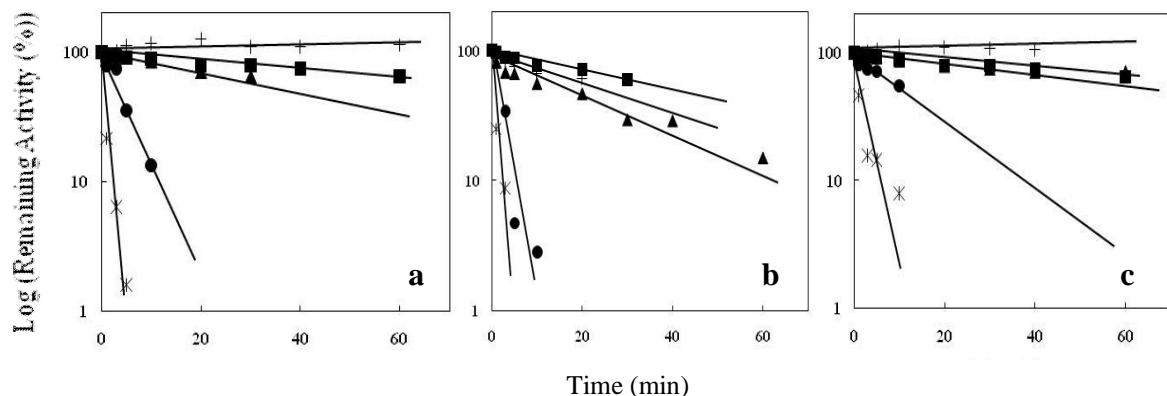
نمودار آرنیوس فرایند غیرفعال شدن حرارتی با داشتن ثابت سرعت غیرفعال شدن ($k_{inactivation}$) در دماهای مختلف در حضور و نبود غلظت 10 mM از نمک‌های KCl و $CaCl_2$ رسم شد (شکل 3). همان‌گونه که پیش‌تر گفته شد، شیب منحنی آرنیوس با انرژی فعال‌سازی (E_a) واکنش دنا‌توراسیون ارتباط دارد و این پارامتر نیز مرتبط با میزان ΔH^\ddagger (انتالپی فعال‌سازی واکنش دنا‌توراسیون) است. ΔG^\ddagger واکنش دنا‌توراسیون با استفاده از مقدار

$k_{inactivation}$ در $60^\circ C$ به دست آمد (جدول 1). محاسبات نشان می‌دهد که انرژی فعال‌سازی (E_a) آنزیم در نبود پتاسیم و کلسیم بیشتر است و این یعنی در حضور این یون‌ها، میان‌کنش‌های کمتری باید شکسته شود تا پروتئین دنا‌توره شود. میزان ΔG^\ddagger در حضور پتاسیم بیشتر است. پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی در جدول 1 دیده می‌شود. برای بیان کمی پایداری حرارتی آنزیم، پارامتر $t_{1/2}$ (نیمه‌عمر غیرفعال شدن) در دماهای مختلف اندازه‌گیری شد (جدول 1): نیمه عمر آنزیم در حضور پتاسیم افزایش می‌یابد.

جدول 1 پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم

[Salt]	Half-lives (min) at ($^\circ C$)					Inactivation (kcal.mol ⁻¹)			
	55	60	65	70	75	E_a	ΔH^\ddagger	ΔG^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
No added	S ^c	70	28	4	2	74.5	73.9	25.3	48.6
10 mM $CaCl_2$	28	21	15	2	1	47.7	47	24.4	22.6
10 mM KCl	S ^c	89	55	9	1	59.5	58.8	25.9	32.9

S^c = Stable

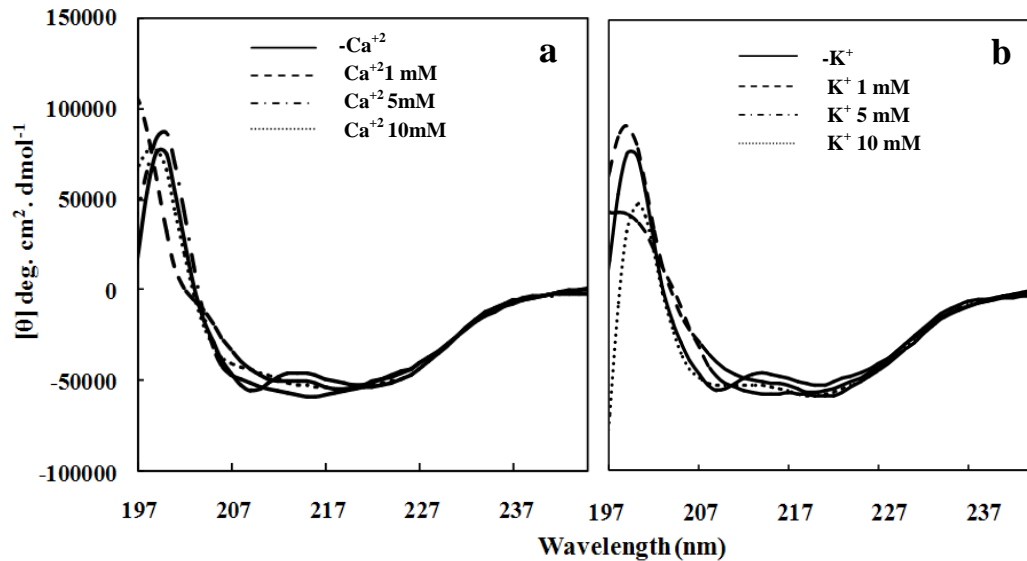


شکل 3 غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم در دماهای $55^\circ C$ (+)، $60^\circ C$ (◐)، $65^\circ C$ (▲)، $70^\circ C$ (●) و $75^\circ C$ (*) در عدم حضور یون (a)، در حضور 10 میلی مولار $CaCl_2$ (b) و در حضور 10 میلی مولار KCl (c).

3-4- دورنگ‌نمایی دورانی (CD)

ساختار دوم مالتوزنیک آمیلاز با اسپکتروسکوپی CD در ناحیه UV دور در حضور و نبود غلظت‌های 1، 5 و 10 میلی‌مولار یون‌های کلسیم و پتاسیم ارزیابی شد. بافر طیف‌سنجی

نمونه‌ها، استات سدیم 50 میلی‌مولار با pH 6/0 و غلظت 0/2 mg/ml بود. نتایج در شکل 4 و جدول 2 دیده می‌شود. به‌طورکلی، در حضور این یون‌ها در غلظت‌های استفاده شده، تغییر زیادی در ساختار دوم ایجاد نشد.



شکل 4 طیف CD ناحیه دور UV مربوط به مالتوزنیک آمیلاز، اثر یون Ca^{2+} (a) و اثر یون K^+ (b)

جدول 2 تخمین درصد ساختارهای مالتوزنیک آمیلاز در شرایط حضور و عدم حضور یون‌های Ca^{2+} و K^+ با استفاده از تکنیک CD.

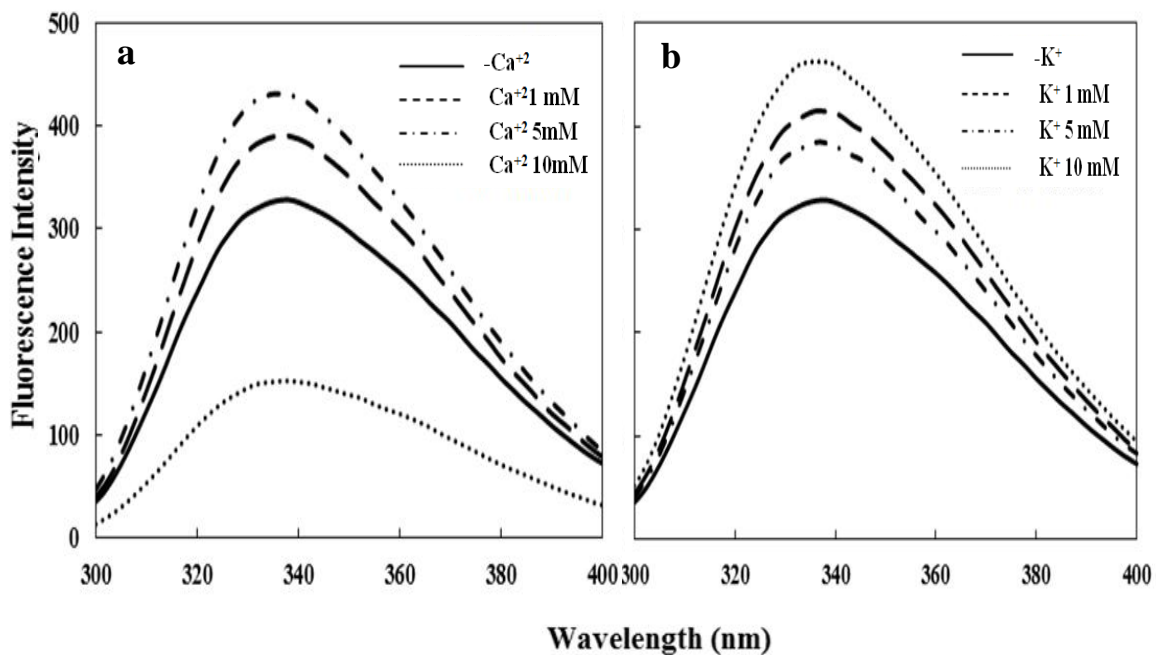
Ion	[Salt] (mM)	α - Helix	β -Sheet	Turn	Random coil
No added	-	31.9	0.0	39.1	29.1
Ca^{2+}	1 mM	24.8	44.5	15.0	15.6
	5 mM	74.2	0.0	0.0	25.8
	10 mM	28.5	21.7	30.0	19.8
K^+	1 mM	54.7	0.0	27.2	18.1
	5 mM	43.1	0.0	29.8	27.2
	10 mM	20.0	0.0	32.6	47.3

3-5- فلورسانس ذاتی

برای بررسی تغییرات ساختار سوم پروتئین از روش فلورسانس در حضور و عدم نبود غلظت‌های 1، 5 و 10 میلی‌مولار از یون‌های Ca^{2+} و K^+ استفاده شد. شکل 5 مربوط به طیف نشری فلورسانس ذاتی مالتوژنیک آمیلاز است که با طول موج 280 نانومتر مربوط به آمینواسید تیروزین برانگیخته شد.

با توجه به شکل 5a، در غلظت‌های 1 و 5 میلی‌مولار یون کلسیم نسبت به نبود یون، شدت پیک فلورسانس افزایش یافته است، به عبارت دیگر، حضور یون کلسیم سبب غیرقطبی (آب‌گریز) شدن محیط پیرامون آمینواسیدهای آروماتیک شده و احتمالاً

انعطاف پذیری ساختار پروتئین کاهش یافته است. در غلظت 10 میلی‌مولار یون کلسیم نسبت به نبود یون، شدت پیک فلورسانس کاهش یافته است، حضور این یون موجب قطبی (آب‌دوست) شدن محیط پیرامون آمینواسیدهای آروماتیک شده و احتمالاً انعطاف پذیری ساختار پروتئین را افزایش داده است. همان‌گونه که در شکل 5b دیده می‌شود، در اثر حضور یون پتاسیم در همه‌ی غلظت‌ها نسبت به نبود یون، شدت طیف نشری تیروزین و تریپتوفان افزایش دارد، به عبارت دیگر، یون پتاسیم موجب قرارگیری این باقی‌مانده‌ها در محیط غیرقطبی (آب‌گریز) می‌شود و انعطاف پذیری کاهش می‌یابد.



شکل 5 طیف فلورسانس ذاتی مالتوژنیک آمیلاز، (a) اثر یون Ca^{2+} در 280 نانومتر و (b) اثر یون K^+ در 280 نانومتر

4- بحث

بررسی پیشین فعالیت مالتوزنیک آمیلاز در دماهای مختلف ($30-80^{\circ}\text{C}$) نشان داد که این آنزیم در بازه $55-65^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد فعالیت بالایی دارد و بهینه دمای فعالیت این آنزیم 65°C تعیین شد که از مالتوزنیک آمیلازهای جدا شده از *Bacillus subtilis* (45°C)، *B. licheniformis* (50°C)، *B. stearothermophilus* (55°C)، *Bacillus sp.* WPD616 (50°C)، *Geobacillus thermophilus* (50°C) و *Thermus sp.* TK4 (50°C) و IM6501 (60°C) بالاتر است. این آنزیم در دماهای پایین‌تر از 30°C فعالیتی ندارد [9, 8, 18]. از آنجا که آنزیم مالتوزنیک آمیلاز استخراج شده از *Geobacillus sp.* Gh6 یک آنزیم گرمادوست است و نسبت به سایر مالتوزنیک آمیلازهایی که تاکنون از منابع مختلف استخراج شده، پایداری حرارتی بیشتری دارد؛ و همان‌گونه که می‌دانیم، پایداری حرارتی از مهم‌ترین ویژگی‌های آنزیم‌های استفاده شده در صنعت است، بنابراین، در این پژوهش، پایداری حرارتی این آنزیم بررسی بیشتری شده است.

در پژوهش پیشین از اثر نمک‌های کلرید کاتیون‌های مختلف (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^{+} , Na^{+})، Sn^{4+} ، Ba^{2+} ، Ni^{2+} ، Hg^{2+} ، Fe^{2+} ، Al^{3+} ، Cr^{3+} و Fe^{3+}) در غلظت‌های 1، 5 و 10 میلی‌مولار بر فعالیت آنزیم استفاده شد که نشان داد بیشتر این کاتیون‌ها اثر مهارکنندگی روی فعالیت آنزیم دارند، در صورتی که اضافه شدن K^{+} ، Li^{+} و Sn^{4+} ، افزایش فعالیت آنزیمی را نشان داد. درصد فعالیت نسبی آنزیم در حضور غلظت‌های 1، 5 و 10 میلی‌مولار کلسیم به ترتیب 102، 143/8 و 32 و در حضور یون پتاسیم در غلظت‌های بالا به ترتیب 186/6، 152/2 و 107 است. با توجه به نتایج بررسی پیشین و با دانستن این که

در آلفا-آمیلازهای شناخته شده، حداقل یک یون کلسیم در هر مولکول وجود دارد که در پایداری ساختار، نقش کلیدی دارد [19، 12]، با استفاده از دو یون کلسیم و پتاسیم، اثر این کاتیون‌ها در غلظت‌های 1، 5 و 10 میلی‌مولار بر پایداری حرارتی آنزیم ارزیابی شد.

چنان که در شکل a 2 دیده می‌شود، نتایج بررسی فعالیت آنزیم نشان می‌دهد که یون کلسیم اثر چندانی در پایداری حرارتی آنزیم در 65°C درجه سانتی‌گراد ندارد و حتی در غلظت 5 میلی‌مولار موجب کاهش آن می‌شود. در حالی که بیشتر آنزیم‌ها در خانواده آلفا-آمیلاز برای فعالیت و پایداری حرارتی خود به شدت به یون کلسیم وابسته‌اند. پایداری حرارتی در این خانواده در حضور یون Ca^{2+} افزایش می‌یابد [20].

شکل b 2 نشان می‌دهد که در حضور غلظت 1 میلی‌مولار یون پتاسیم، تا 15 دقیقه گرمادهی در این دما، فعالیت آنزیم را کاهش نمی‌دهد و پس از 20 دقیقه حدود 50 درصد فعالیت اولیه آنزیم حفظ شده است. افزوده شدن یون پتاسیم در غلظت‌های 1 و 5 میلی‌مولار باعث افزایش پایداری حرارتی آنزیم شده است.

غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم در 55، 60، 65، 70 و 75°C درجه سانتی‌گراد در بافر استات با $\text{pH}=6/0$ در حضور و نبود غلظت 10 mM نمک‌های KCl و CaCl_2 ، بیشتر بررسی شد (شکل 3). فعالیت مالتوزنیک آمیلاز سویه Gh6 پس از 60 دقیقه گرمادهی در دمای 60°C به طور کامل حفظ می‌شود و در دمای 60°C نیز پس از 60 دقیقه بیش از 60 درصد فعالیت اولیه را دارد. در حالی که آنزیم در 70°C پس از 3 دقیقه دمادهی، یک کاهش فعالیت ناگهانی دارد. بررسی ما نشان داد که 10 mM کلسیم موجب کاهش و پتاسیم، موجب افزایش پایداری حرارتی آنزیم می‌شود. آنزیم، پایداری خود را در

55، 60 و 65 درجه سانتی‌گراد در حضور پتاسیم در مدت زمان بررسی، حفظ کرده است. برای بیان کمی میزان پایداری حرارتی آنزیم در حضور و نبود کلسیم و پتاسیم، پارامتر $t_{1/2}$ (نیمه‌عمر غیرفعال شدن) در دماهای مختلف اندازه‌گیری شد (جدول 1). پتاسیم (پایدارکننده) باعث شد نیمه‌عمر آنزیم در مقایسه با حالتی که پتاسیم حضور ندارد، به میزان 27، 96 و 125 درصد به ترتیب در 60، 65 و 70 درجه سانتی‌گراد، افزایش یابد.

نمودار آرنیوس غیرفعال شدن حرارتی با در دست داشتن سرعت غیرفعال شدن ($k_{inactivation}$) در دماهای گفته شده در حضور و نبود غلظت 10 mM نمک‌های KCl و $CaCl_2$ رسم شد (شکل 3) و سپس پارامترهای ترمودینامیکی به دست آمد (جدول 1). کاهش سرعت آنفولدینگ و افزایش انرژی فعال‌سازی واکنش به عنوان سازوکارهای اصلی سازگاری حرارتی پروتئین‌ها شناخته شده است. ارزیابی پارامترهای ترمودینامیکی انرژی فعال‌سازی (E_a) برای فرایندهای غیرفعال‌سازی نشان می‌دهد که سرعت غیرفعال‌سازی حرارتی ($k_{inactivation}$) برای حالتی که کلسیم وجود دارد، بالاتر است. انرژی فعال‌سازی (E_a) بالاتر یعنی در این حالت باید میان‌کنش بیشتری شکسته شود تا پروتئین دناتوره شود. از سوی دیگر، ΔG^\ddagger بزرگ‌تر برای واکنش دناتوراسیون به معنی مقدار انرژی مورد نیاز بیشتر برای دناتوراسیون در این شرایط و به عبارت دیگر به معنی پایداری بیشتر است. بنابراین مقدار زیاد ΔG^\ddagger بیانگر افزایش سد انرژی برای دناتوراسیون پروتئین است. میزان ΔG^\ddagger زمانی که پتاسیم وجود دارد، بیشتر است. افزایش ΔG^\ddagger در حضور KCl، یعنی این نمک پایدارکننده است. افزایش سد انرژی (ΔG^\ddagger) می‌تواند به خاطر افزایش مؤلفه ΔH^\ddagger یا کاهش مؤلفه ΔS^\ddagger باشد. افزایش ΔH^\ddagger به معنی افزایش تعداد

میان‌کنش است که باید در فرایند غیرفعال‌سازی آنزیم شکسته شود و کاهش ΔS^\ddagger به معنی کاهش آنتروپی حالت برانگیخته¹ و یا افزایش آنتروپی حالت پایه² است. آنچه درباره‌ی ریشه‌ی این تغییر و پایداری می‌توان گفت، این است که پایدارسازی پروتئین در حضور K^+ (افزایش ΔG^\ddagger) متأثر از تغییر ΔS^\ddagger است. هرچند در حضور پتاسیم، میزان ΔH^\ddagger نامطلوب‌تر شده است، کاهش بی‌نظمی در حالت گذار واکنش دناتوراسیون، انجام دناتوراسیون را سخت‌تر و بنابراین ایجاد پایداری کرده است و با توجه به میزان ΔH^\ddagger کاهش یافته می‌توان انتظار داشت که کاهش ΔS^\ddagger به سبب افزایش آنتروپی حالت پایه و نه کاهش آنتروپی حالت برانگیخته بوده است؛ زیرا کاهش پیوندها می‌تواند موجب آزادی بیشتر زنجیره پلی‌پپتیدی (حالت پایه) شود. با وجود این که ΔG^\ddagger غیرفعال‌سازی در حضور یون K^+ در مقایسه با نبود آن، تغییرات کمی را نشان می‌دهد (اندکی ΔG^\ddagger افزایش یافته است)، اما تغییرات آنتالپی و آنتروپی در این دو حالت، تفاوت بسیار زیادی را نشان می‌دهند. در حضور یون پتاسیم، ΔH^\ddagger کاهش یافته که تغییری نامطلوب در فرایند غیرفعال‌سازی است اما پارامتر $T\Delta S^\ddagger$ در راستای دلخواه تغییر کرده است. بنابراین افزایش سد انرژی واکنش غیرفعال‌سازی (ΔG^\ddagger) یک پدیده آنتروپیک است (کاهش ΔS^\ddagger). از سوی دیگر در حضور کلسیم ΔG^\ddagger کاهش یافته است؛ کاهش ΔG^\ddagger در حضور $CaCl_2$ به خاطر اثر ناپایدارکنندگی کلسیم است. آنتروپی واکنش غیرفعال‌سازی در حضور کلسیم، کاهش یافته است؛ که بیانگر اثر دلخواه کلسیم بر حالت گذار واکنش آنزیمی است. این تغییری دلخواه در فرایند

1. Excited state
2. Ground state

غیرفعال‌سازی است؛ اما ΔH^\ddagger در حضور کلسیم، کاهش یافته که تغییری در راستای نامطلوب است. بنابراین به نظر می‌رسد که تعداد یا قدرت میان‌کنش‌هایی که باید طی غیرفعال‌سازی بشکنند، کاهش یافته است. بنابراین اثر ناپایدارکنندگی کلسیم (کاهش سد انرژی واکنش غیرفعال‌سازی (ΔG^\ddagger)). آنتالپیک (کاهش ΔH^\ddagger) است.

با توجه به جدول 2، طیف‌های ناحیه دور CD حاصل از مالتوزنیک آمیلاز در نبود یون کلسیم (بافر تنها)، ساختاری نزدیک به ماریچ آلفا دارد، اما در حضور غلظت‌های مختلف کلسیم، ساختار طیف کمی متفاوت شده است. در غلظت‌های 1 و 10 میلی‌مولار یون کلسیم، درصد ساختار α -هلپیکس، کاهش بسیار اندکی نسبت به نبود یون نشان می‌دهد ولی میزان ساختار صفحات β در غلظت 1 میلی‌مولار، افزایش یافته است. در غلظت 5 میلی‌مولار یون کلسیم، درصد ساختار α -هلپیکس افزایش چشم‌گیری، در حدود 44 درصد، نسبت به نبود یون کلسیم دارد. در ارتباط با اثر غلظت‌های مختلف یون پتاسیم بر ساختار دوم، همان‌گونه که جدول 2 نشان می‌دهد، پروتئین در غلظت‌های 1 و 5 میلی‌مولار یون پتاسیم نسبت به نبود یون، ساختاری شبیه تر به ماریچ آلفا دارد، اما در غلظت 10 میلی‌مولار به نظر می‌رسد درصد ساختار α -هلپیکس نسبت به نبود یون، کاهش یافته است. این یافته نشان دهنده نقش احتمالی ساختار α -هلپیکس در ایجاد شکل مناسب جایگاه فعال است؛ به گونه‌ای که جایگاه فعال از دیدگاه فضایی در ساختار و شکل مورد نظر برای انجام فعالیت خود قرار می‌گیرد [21]. البته هرگونه نتیجه‌گیری در این مورد، نیازمند بررسی ساختاری دقیق‌تر است.

جدول 2 اثر غلظت‌های مختلف یون پتاسیم را بر ساختار دوم نشان می‌دهد؛ درصد ساختار α -هلپیکس در

غلظت‌های 1 و 5 میلی‌مولار یون پتاسیم نسبت به نبود یون، افزایش یافته که موجب فشرده شدن پروتئین می‌شود. در این دو غلظت، افزون بر فشرده شدن ساختار پروتئین با توجه به افزایش درصد ساختار α -هلپیکس، درصد ساختار رندوم کوئل¹ نسبت به نبود یون، کاهش می‌یابد که احتمالاً موجب کاهش انعطاف پذیری پروتئین می‌شود. در غلظت 10 میلی‌مولار یون پتاسیم، کاهش درصد ساختار α -هلپیکس و افزایش رندوم کوئل نسبت به نبود یون دیده می‌شود. در این حالت، برهم‌خوردن ساختار و شکل فضایی جایگاه فعال بر اثر کاهش درصد ساختار α -هلپیکس و شل شدن جایگاه فعال بر اثر افزایش درصد رندوم کوئل، انتظار می‌رود.

برای بررسی ساختار سوم پروتئین از فلورسانس استفاده شد. آمینواسیدهای آروماتیک فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین فلورسانس ذاتی دارند و به عنوان یک مولکول گزارش‌گر از موقعیت خود در ساختار پروتئین عمل می‌کنند. جذب پروتئین‌ها در طول موج 280 نانومتر به خاطر آمینواسیدهای تیروزین و تریپتوفان است، اما در طول موج 295-305 نانومتر، بیشتر به خاطر تریپتوفان است. تغییرات نشر فلورسانس ذاتی، به دنبال تغییرات ساختاری است که می‌تواند در اثر قرار گرفتن باقی‌مانده‌های تریپتوفان و تیروزین در محیط آب‌گریز یا آب‌دوست، یا به خاطر تغییر موقعیت آمینواسیدهای باردار با اثر خاموش‌کنندگی نسبت به باقی‌مانده‌های تریپتوفان باشد. بنابراین در فلورسانس ذاتی، افزون بر تغییرات ساختاری، بار نیز اهمیت دارد، زیرا تغییرات ساختاری ممکن است باعث قرار گرفتن باقی‌مانده‌های آروماتیک کنار آمینواسیدهای باردار با ویژگی خاموش‌کنندگی شوند [22].

1. Random Coil

در بخش‌های گوناگون پروتئین، آثار مختلفی از خود نشان می‌دهد. افزایش پایداری حرارتی پروتئین در حضور غلظت‌های پایین پتاسیم به این معناست که فعالیت پروتئین با پایداری موضعی¹ بخش یا بخش‌هایی از ساختار ارتباط دارد که این بخش‌ها را می‌توان با در نظر داشتن ساختار سوم محیط پیرامون باقی‌مانده‌های آروماتیک تخمین زد زیرا با وجود کاهش کلی پایداری² ساختاری آنزیم، در این مناطق، با افزایش فشردگی و در نتیجه پایداری ساختار روبرویم. به عبارت دیگر، احتمالاً سیگنالی که در طول موج 280 نانومتر مربوط به باقی‌مانده‌های آروماتیک، دریافت می‌کنیم، تابعی از تغییرات ساختاری پروتئین در جایگاه فعال است. باز و بسته شدن ساختار پروتئین به صورت موضعی در بخش‌هایی از ساختار که با فعالیت پروتئین ارتباط دارد با باقی‌قسمت‌های ساختار هماهنگ نبوده و می‌توان گفت تغییرات ساختاری این بخش‌ها به صورت متعاون³ با بقیه بخش‌ها رخ نمی‌دهد.

نیاز به یون کلسیم برای حفظ یکپارچگی ساختاری (structural integrity)، پایداری حرارتی و فعالیت آنزیمی، ویژگی مشترک اعضای خانواده آلفا-آمیلاز است. همه آلفا-آمیلازهایی که تاکنون ساختارشان تعیین شده، در ساختار خود یک یون کلسیم با تمایل بالا در جایگاه حفظ شده اتصال به کلسیم دارند که میان دمین‌های A و B قرار دارد. این جایگاه که جایگاه نخست کلسیم نام دارد، دمین‌های A و B را به هم وصل کرده و باعث پایداری ساختار جایگاه فعال و تشکیل جایگاه گسترش یافته اتصال به پیش ماده می‌شود [20,23,24]. این جایگاه در آلفا-آمیلازهای حاصل از گونه‌های بسیار دور

همان‌گونه که در شکل 5a دیده می‌شود، طیف نشری فلورسانس ذاتی مالتوزنیک آمیلاز با طول موج 280 نانومتر در حضور و نبود یون کلسیم، برانگیخته شد. در این طول موج، شدت پیک فلورسانس در حضور یون کلسیم با غلظت‌های 1 و 5 میلی‌مولار نسبت به نبود یون، افزایش یافته است؛ به بیان دیگر، وجود یون کلسیم سبب غیرقطبی شدن محیط پیرامون آمینواسیدهای آروماتیک شده و احتمالاً موجب کاهش انعطاف‌پذیری ساختار پروتئین می‌شود. در حضور یون کلسیم با غلظت 10 میلی‌مولار نسبت به نبود یون، شدت پیک فلورسانس، کاهش یافته است؛ یعنی یون کلسیم موجب قطبی شدن محیط پیرامون آمینواسیدهای آروماتیک شده و احتمالاً باعث افزایش انعطاف‌پذیری ساختار پروتئین می‌شود. یون کلسیم در غلظت‌های 1 و 5 میلی‌مولار در طول موج 280 نانومتر سبب پایداری نسبی پروتئین می‌شود، در حالی که یون کلسیم در غلظت 10 میلی‌مولار پایداری را کاهش می‌دهد. شکل 5b تغییرات پروتئین مالتوزنیک آمیلاز را در حضور یون پتاسیم در طول موج 280 نانومتر نشان می‌دهد. در این طول موج با حضور یون پتاسیم در همه ی غلظت‌ها، شدت طیف نشری افزایش یافته است؛ به عبارت دیگر، یون پتاسیم موجب قرارگیری آمینواسیدهای آروماتیک در محیط غیرقطبی (آب‌گریز) می‌شود. این‌جا ساختار پروتئین در محیط پیرامون این باقی‌مانده‌ها، فشرده‌تر شده و از انعطاف‌پذیری آن‌ها کاسته می‌شود. نتایج فلورسانس ذاتی نشان می‌دهد که تغییرات ساختار سوم در بخش‌های مختلف پروتئین، یکسان نیست و در محیط پیرامون باقی‌مانده‌های آروماتیک، فشردگی ساختار و افزایش پایداری رخ می‌دهد.

در مورد پروتئین مالتوزنیک آمیلاز می‌توانیم بگوییم که اثر یون پتاسیم بر ساختار این پروتئین، یکنواخت نیست و

1. Local Stability
2. Global Stability
3. Cooperative

Molecular cloning and biochemical chemical characterization of the first archaeal maltogenic amylase from the hyperthermophilic archaeon *thermoplasma volcanium* GSS1. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 661-669.

- [5] Kolcuoglu, Y., Colak, A., Faiz, O., and Belduz, A. O. (2010). Cloning expression and characterization of high thermo-and pH-stable maltogenic amylase from a thermophilic bacterium *geobacillus caldolosilyticus* TK4. *Process Biochem.* 45, 821-828.
- [6] Park, K. H., Kim, T. J., Cheong, T. K., Kim, J. W., Oh, B. H., and Svensson, B (2000). Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. *Biochim. Biophys. Acta* 1478, 165-185.
- [7] Oh, S. W., Jang, M. U., Jeong, C. K., Kang, H. J., Park, J. M., and Kim, T. J (2008). Modulation of hydrolysis and transglycosylation activity of thermus maltogenic amylase by combinatorial saturation mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18(8), 1401-1407.
- [8] Park, S. H., Kang, H. K., Shim, J. H., Woo, E. J., Hong, J. S., Kim, J. W., Oh, B. H., Lee, B. H., Cha, H., and Park, K. H (2007). Modulation of substrate preference of *Thermus* maltogenic amylase by mutation of the residues at the interface of a dimer. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(6), 1564-1567.

نیز حفظ شده است اما در مالتوژنیک آمیلازهایی که ساختارشان تاکنون تعیین شده، دیده نشده است [۱،۹].

5- سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه علوم و تحقیقات فارس به خاطر فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی سپاسگزارند.

6- مراجع

- [1] Kim, J. S., Cha, S. S., Kim, H. J., Kim, T. J., Ha, N. C., Oh, S. T., Cho, H. S., Cho, S. H., Kim, M. J., Lee, H. S., Kim, J. W., Choi, K. Y., Park, K. H., and Oh, B. H. (1999). Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility. *J. Biol. Chem.* 274(37), 26279-26286.
- [2] Turner P., Labes A., Fridjonsson O. H., Hreggvidson G. O., Schonheit P., Kristjansson J. K., Holst O., and Karlsson E. N. (2005). Two novel cyclodextrin-degrading enzymes isolation from thermophilic bacteria have similar domain structure but differ in oligomeric state and activity profile. *J. Biosci. Bioeng.* 100(4), 380-390.
- [3] Kim, Y. W., Choi, J. H., Kim, J. W., Park, C., Kim, J. W., Cha, H., Lee, S. B., Oh, B. H., Moon, T. W., and Park, K. H. (2003). Directed evolution of *Thermus* maltogenic amylase toward enhanced thermal resistance. *Appl. Environ. Microb.* 4866-4874.
- [4] Kim, J. W., Kim, Y. H., Lee, H. S., Yang, S. J., Kim, Y. W., Lee, M. H., Kim, J. W., Seo, N. S., Park, C. S., and Park, K. H. (2007).

- [15] Bernfeld, P. (1955). Amylase, α and β . *Methods Enzymol.* 1, 149-151.
- [16] Jorgensent, S., Vorgias, C. E., and Antranikian, G. (1997). Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 272, 16335-16342.
- [17] Takakuwa, T., Konno, T., and Meguro, H. A. (1985). New standard substance for calibration of circular dichroism: ammonium d-10-camphorsulfonate. *Anal. Sci.* 1, 215-225.
- [18] Kim, T. J., Kim, M. J., Kim, B. C., Kim, J. C., Cheong, T. K., Kim, J. W., and Park, K. H. (1999). Modes of action of acarbose hydrolysis and transglycosylation catalyzed by a thermostable maltogenic amylase, the gene for which was cloned from a *Thermus* strain. *Appl. Environ. Microb.* 65, 1644-1651.
- [19] Violet, M., and Meunier, J. C. (1989). Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis* α -amylase. *Biochem. J.* 263, 665-670.
- [20] Sajedi, R. H., Taghdir, M., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ranjbar, B. (2007). Nucleotide sequence, structural investigation and homology modeling studies of a Ca^{2+} -independent α -amylase with acidic pH-profile. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 315-324.
- [21] Bactel, W. J. and Schellman, J. A. (1987). Protein stability curves. *Biopolymers.* 26, 1859-1876.
- [9] Lee, H. S., Kim, M. S., Cho, H. S., Kim, J. I., Kim, T. J., Choi, J. H., Park, C., Lee, H. S., Oh, B. H., and Park, K. H. (2002). Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J. Biol. Chem.* 277(24), 21891-21897.
- [10] Liu, B., Wang, Y., and Zhang, X. (2006). Characterization of recombinant maltogenic amylase from deep sea thermophilic *Bacillus* sp. WPD616. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 805-810.
- [11] Cho, H. Y., Kim, Y. W., Kim, T. J., Lee, H. S., Kim, D. Y., Kim, J. W., Lee, Y. W., Lee, S. B., and Park, K. H. (2000). Molecular characterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH4-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1478, 333-340.
- [12] Nasrollahi, S., Golalizadeh, L., Sajedi, R. H., Taghdir, M., Asghari, S. M., and Ressa, M. (2013). Substrate preference of a *Geobacillus* maltogenic amylase: a kinetic and thermodynamic analysis. *Int. J. Biol. Macromol.* 60, 1-9.
- [13] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [14] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- [24] Tachibana, Y., Leclere, M. M., Fujiwara, S., Takagi, M. and Imanaka, T. (1996) Cloning and expression of the α -amylase gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1 and characterization of the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 224–232.
- [22] Gore, M. G. (2000). *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. Oxford University Press, USA.
- [23] Nielsen, J. E. and Borchert, T. V. (2000). Protein engineering of bacterial α -amylases *Biochim. Biophys. Acta.* 1543, 253-274.