

مطالعه ترمودینامیکی تأثیر برخی از اسمولیتها بر پایداری گلوکز اکسیداز

سکینه منصوری

تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرکزی

علی اکبر صبوری*

تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، صندوق پستی ۱۳۸۴-۱۳۱۴۵

چکیده: پایداری و باقی مانده فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز (GO) در محلول ۱۰۰ میلی مولار بافر فسفات با $pH = 5.5$ ، در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، به وسیله روشهای طیف سنجی و میکروکالریتری تیتراسیونی همدمما مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که سینتیک غیرطبیعی شدن آنزیم از معادله سرعت واکنش مرتبه اول، وابسته به غلظت گلوکز اکسیداز، پیروی می کند. ثابت سرعت غیرطبیعی شدن گلوکز اکسیداز در غیاب اسمولیتها ۱۰/۰ بر ساعت به دست آمد. همچنین، ثابتهای سرعت غیرطبیعی شدن آنزیم در مجاورت غلظتهای ۵/۵ میلی مولار هیستیدین، فنیل آلانین و آسپارتیک اسید، به ترتیب، ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۶ و ۰/۰۲۶ بر ساعت حاصل شد. بنابراین، هیستیدین و فنیل آلانین پایدار کننده های مناسب و آسپارتیک اسید یک ناپایدار کننده برای گلوکز اکسیداز محسوب می شوند. این نتایج توافق خوبی با نتایج حاصل از مطالعه باقی مانده فعالیت آنزیم، وابستگی به زمان، دارد. اثر محافظتی و پایدارکنندگی فنیل آلانین با مطالعه رفتار سینتیکی آنزیم در مجاورت پتاسیم تیوسیانات (به عنوان یک عامل مخرب ساختار این آنزیم) در مجاورت و غیاب فنیل آلانین نیز تأیید شده است.

واژه های کلیدی: گلوکز اکسیداز، اسمولیت، پایداری پروتئین، میکروکالریتری همدمما

KEY WORDS: *Glucose oxidase, Osmolyte, Protein stability, Isothermal microcalorimetry*

مقدمه

گلوکز اکسیداز یک گلیکوپروتئین با محتوای ۱۰ تا ۲۴ درصد کربوهیدرات، بستگی به منبع آنزیم، در جرم مولکولی آن (۱۵۰ تا ۱۸۰ کیلو دالتون) است. پیوند کووالانسی کربوهیدرات، فعالیت کاتالیزوری و ساختمان سوم پروتئین را چندان تحت تأثیر قرار نمی دهد [۹-۱۳]. ساختار اول گلوکز اکسیداز شامل ۵۸۳ اسید آمینه در هر دون واحد است [۱۴، ۱۵]. pH ایزوالکتریک این آنزیم ۴/۰۵ تا ۴/۲۰ گزارش شده است [۱۴]. دون واحدهای گلوکز اکسیداز تحت تأثیر غیرطبیعی کننده ها از هم تفکیک شده و سبب جدا شدن فلاوین آدنین دی نوکلئوئید از آن می شود [۱۶]. دودسیل تری متیل آمونیوم برمید (DTAB) و سدیم دودسیل سولفات

گلوکز اکسیداز (GO: EC. 1.1.3.4)، از دسته اکسیدو-ردوکتازها بوده و دارای منابع متفاوتی از جمله زنبور عسل و انواع قارچهاست. این آنزیم سبب کاتالیز شدن اکسایش $D-\beta$ -گلوکز، به وسیله مولکولهای اکسیژن، به گلوکونولاکتون می شود که آن نیز به نوبه خود به گلوکونیک اسید و پراکسید هیدروژن آبکافت می شود [۱-۳]. مولکول گلوکز اکسیداز منابع قارچی یک هومودیمر (با دو پیوند دی سولفیدی و دو گروه سولفیدریلی آزاد) بوده که هر کدام به یک مولکول فلاوین آدنین دی نوکلئوئید (FAD) به طور محکمی پیوند غیر کووالانسی داده است. کوفاکتورهای فلاوین مسئول خواص اکسایش-کاهش گلوکز اکسیداز هستند [۳-۹]. افزون بر آن،

دقیقه، در غیاب و همچنین در مجاورت یک اسید آمینه معین (با غلظت ۵/۵ میلی مولار در هر دوسلول شاهد و نمونه) ثبت شد.

سینتیک غیرطبیعی شدن خودبه خودی همدما

برای مطالعه سینتیک غیرطبیعی شدن خودبه خودی آنزیم در دمای ثابت که با غیرفعال شدن آنزیم همراه است، از میکرو-کالریمتری همدمای مدل ۲۲۷۷ شرکت ترموتریک سوئد استفاده شد. این دستگاه دارای دو سلول نمونه و شاهد از جنس استیل زنگ نزن با حداکثر حجم ۴ میلی لیتر بوده که در یک حمام آب با دمای کاملاً ثابت و کنترل شده (در این مطالعه ۲۷ درجه سانتی گراد) قرار می گیرد. در حداصل بین سلولها و حمام آب مجموعه ای زوج- گرمایی قرار دارد که قادرند به تغییر دمای حداقل یک میلیونیم درجه سانتی گراد حساسیت نشان داده و هر گونه مبادله گرمایی بین سلولها و حمام آب را ثبت کنند. این دستگاه به طور الکتریکی مدرج شده و تبادل گرمایی را به صورت توان (بر حسب میکرووات) در مقابل زمان ترسیم می کند. این دستگاه به طور کامل کامپیوتری شده، با استفاده از یک نرم افزار ویژه، موسوم به دیجیتام-۳، کلیه محاسبات را خود انجام می دهد. در این پژوهش، ۲ میلی لیتر محلول آنزیم با غلظت ۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر در سلول نمونه و ۲ میلی لیتر بافر در سلول شاهد قرار داده شد و تبادل حرارتی سلول نمونه در مقابل سلول شاهد در زمانهای متفاوت ثبت شد. آزمایش در مجاورت اسید آمینه های معین متفاوت (با غلظت ۵/۵ میلی مولار در هر دو سلول شاهد و نمونه) نیز انجام شد.

نتایج و بحث

پایداری ترمودینامیکی پروتئینها به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است. ولی، پایداری سینتیکی پروتئینها زیاد مورد بررسی قرار نگرفته است که ممکن است به علت سادگی کمتر و زمان بری بیشتر آن باشد. حساسیت و قابلیت اعتماد میکروکالریمتری همدما، تحت شرایط مناسب، آنقدر بالاست که قادر است واکنشی با تغییر آنتالپی کوچک را پیدا کند. در محلول پروتئین به خاطر غیرطبیعی شدن خود به خودش، کاهش خودبه خودی فعالیت بیولوژیکی یک پروتئین، همراه با مبادله گرما است. این میزان کم مبادله گرمایی (q) می تواند به وسیله میکروکالریمتری همدما ثبت شده و به عنوان یک پارامتر فیزیکی خوب برای مطالعه پایداری سینتیکی پروتئینها منظور شود. منحنیهای مقدار تبادل گرمایی فرآیند غیرطبیعی شدن گلوکز اکسیداز در مقابل زمان، در بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با $pH = 5.5$ ، در دمای ثابت ۲۷ درجه سانتی گراد و همچنین در مجاورت سه اسید آمینه هیستیدین (His)، فنیل آلانین (Phe) و آسپارتیک اسید (Asp) در شکل ۱ نشان داده شده است. مقدار گرمای فرآیند (q) باید به یک مقدار حداکثر (q_{max}) برسد که در آن غلظت حالت غیرطبیعی شده آنزیم بیشترین مقدار خواهد بود. اما، در منحنیهای مقدار تبادل گرمایی در مقابل زمان به دست آمده در مورد گلوکز-اکسیداز، مقدار q_{max} مشاهده نمی شود و این به دلیل کافی نبودن زمان انجام واکنش است. در واقع، منحنیهای نشان دهنده مقدار تبادل

(SDS) از جمله غیرطبیعی کننده های گلوکز اکسیداز می باشند [۱۷-۲۱]. برای این آنزیم خواص ضدسرطانی، ضدباکتریایی و ضدویروسی گزارش شده است [۲۲-۲۵].

اسمولیتها از نظر شیمیایی به سه دسته اصلی تقسیم می شوند: الکلهای پلی هیدرید، اسیدهای آمینه آزاد و مشتقات آنها و تلفیقی از اوره و متیل آمینها [۲۶]. گزارشهای زیادی در مورد اثر برخی از این ترکیبها، روی ساختار، عملکرد آنزیمها و پروتئینهای متفاوت وجود دارد. اسمولیتها ممکن است مستقل از طبیعت شیمیایی پروتئین، سبب افزایش پایداری آن شده و یا ممکن است آنزیمها را از غیرفعال شدن حرارتی محافظت کنند، به طوری که فعالیت آنزیم در مجاورت آنها، در دمای اتاق، مختل نشود [۲۷-۲۹]. از این رو، ما به طور ترمو-دینامیکی در مورد محافظت آنزیم گلوکز اکسیداز در مجاورت سه نوع اسید آمینه متفاوت تحقیق کرده ایم تا با مطالعه رفتار این آنزیم، شرایط بهینه نگهداری آنزیم را بیابیم. در این مطالعه، از روشهای متفاوتی از جمله میکروکالریمتری همدما، به عنوان یک روش بسیار مستعد و حساس، استفاده شده است که امروزه به طور وسیعی در مطالعه پایداری پروتئینها و برهم کنش لیگاند-بیوماکرومولکول به کار می رود [۳۰-۳۹]. در این پژوهش، از یک روش ترمودینامیکی جهت مطالعه سینتیک غیرفعال شدن آنزیم گلوکز اکسیداز به منظور مطالعه پایداری پروتئین و تأثیر برخی از اسیدهای آمینه به عنوان اسمولیت، استفاده شده است.

بخش تجربی

گلوکز اکسیداز، از منبع اسپرژیلوس نایجر و اورتو-دیانیزیدین از شرکت سیگما و بقیه مواد از شرکت مرک خریداری شد. همه مواد از درصد خلوص بالایی برخوردار بودند. کلیه آزمایشها در بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با $pH = 5.5$ انجام شد و برای این منظور از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم

در سنجش فعالیت آنزیم از روش ورتینگتون استفاده شد که در آن گلوکز اکسیداز با پراکسیداز و اورتو-دیانیزیدین مجاور می شود [۴۰]. محلول آنزیم با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در محیط بافری حاوی یک اسید آمینه معین با غلظت ۵/۵ میلی مولار، در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، نگهداری شده و به فواصل زمانی معین مورد سنجش آنزیمی قرار گرفت و با آزمایش کنترل (غیاب اسید آمینه) مقایسه شد. یک واحد فعالیت گلوکز اکسیداز، مقداری از آنزیم است که در مدت ۱ دقیقه بتواند ۱ میکرومول پراکسید هیدروژن را در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد تولید کند.

غیرطبیعی کردن حرارتی آنزیم

برای مطالعه غیرطبیعی کردن حرارتی آنزیم از طیف-نورسنج گیلفورد مدل ۲-۲۴۰۰ استفاده شد. تغییرهای جذب نمونه آنزیمی (با غلظت ۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر) در مقابل بافر، در طول موج ۲۷۸ نانومتر، در اثر افزایش دما با سرعت ۵/۵ درجه سانتی گراد بر

بدیهی است:

$$\alpha = \frac{q}{q_{\max}} \quad (۳)$$

از این رو، معادله (۲) به صورت زیر نوشته می‌شود:

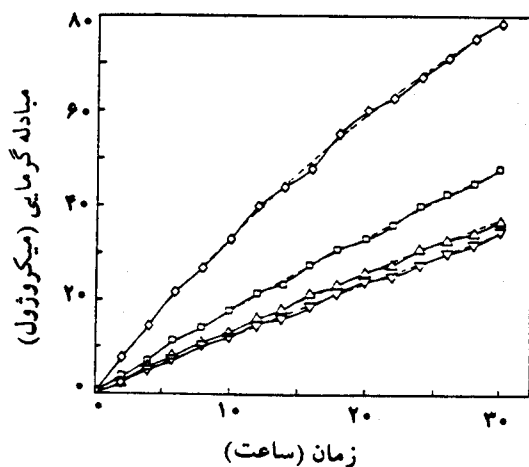
$$\ln \left(1 - \frac{q}{q_{\max}} \right) = -k t \quad (۴)$$

چنانچه $\ln [1 - (q/q_{\max})]$ در مقابل t خط راستی باشد، فرض رفتار سینتیکی مرتبه اول انتقال حالت N به D صحیح بوده و از شیب آن مقدار k (ثابت سرعت غیرطبیعی شدن یا غیرفعال شدن) محاسبه می‌شود. از آنجا که مقدار q_{\max} از داده‌های تجربی گلوکز اکسیداز (شکل ۱) به طور مستقیم قابل حصول نیست، چنین نموداری را نمی‌توان در مورد این آنزیم رسم کرد. اما، داده‌های تجربی را می‌توان در معادله (۴) جایگزین نمود و بهترین مقادیرهای k و q_{\max} را در هر شرایط تعیین نمود. جایگزینی داده‌های تجربی در معادله (۴) نشان می‌دهد که معادله سرعت واکنش مرتبه اول، معادله مناسبی برای داده‌های فوق بوده و مقادیرهای q به دست آمده از معادله (۴)، با جایگزینی مقادیرهای k و q_{\max} تعیین شده در آن، با مقادیرهای q تجربی در زمانهای مشابه، تطابق خوبی نشان می‌دهد. این تطابق در شکل ۱ نیز نشان داده شده است. نتایج حاصل از جایگزینی داده‌های تجربی در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- نتایج حاصل از جایگزینی داده‌های تجربی در معادله سرعت واکنش مرتبه اول

نوع اسمولیت	k/h	$q_{\max}/\mu J$	$q_{\max}/kJ \text{ mol}^{-1}$	$t_{\alpha=0.99}/h$
حالت کنترل	۰/۰۱۰	۱۸۵	۱۵/۱۷۹	۲۳۰/۳
هیستیدین	۰/۰۰۷	۱۹۷	۱۶/۱۶۶	۳۲۸/۹
فنیل آلانین	۰/۰۰۶	۲۰۸	۱۷/۰۶۷	۳۸۳/۸
آسپارتیک اسید	۰/۰۲۶	۱۴۶	۱۱/۹۷۹	۸۸/۶

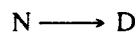
نتایج خلاصه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که هیستیدین و فنیل آلانین قدری سرعت انتقال حالت N به D (غیرفعال شدن آنزیم) را کاهش داده (کاهش k) در حالی که آسپارتیک اسید سبب افزایش این سرعت (افزایش k) می‌شود. لذا، دو اسید آمینه هیستیدین و فنیل آلانین نقش پایدارکنندگی و اسید آمینه آسپارتیک نقش ناپایدارکنندگی، نسبت به حالت کنترل (محیط صرفاً بافر، بدون هرگونه افزایش) دارند. بیشترین مقدار q_{\max} (به عنوان میزانی از مقاومت پروتئین در مقابل تغییر ساختار) متعلق به محیط حاوی فنیل آلانین می‌باشد. پس، فنیل آلانین سبب استحکام ساختار آنزیم نیز می‌شود. مجاورت آسپارتیک اسید سبب کاهش q_{\max} و در نتیجه کاهش مقاومت آنزیم در مقابل تغییر ساختار می‌شود. همچنین، زمان لازم جهت ۹۹ درصد غیرطبیعی شدن ($t_{\alpha=0.99}$) در مورد هیستیدین و فنیل آلانین، نسبت به حالت کنترل، افزایش یافته، در حالی که آسپارتیک اسید این زمان را تا ۳۸ درصد حالت کنترل کاهش می‌دهد. شکل ۲ ابقاء فعالیت گلوکز اکسیداز را در مدت ۳۰ ساعت، در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و $pH=5.5$ ، در مجاورت و غیاب این



شکل ۱- تبادل گرمای یک نمونه آنزیمی با غلظت ۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در $pH=5.5$ (فسفات بافر ۱۰۰ میلی‌مولار) و دمای ثابت ۲۷ درجه سانتی‌گراد به دلیل غیرطبیعی شدن خودبه‌خود آنزیم در غیاب اسمولیت (□) و در مجاورت اسید آمینه‌های فنیل آلانین (▽)، هیستیدین (Δ) و آسپارتیک اسید (◇) با غلظت ۵/۵ میلی‌مولار. منحنیهای منقطع بر اساس محاسبه مقادیرهای گرما در زمانهای متفاوت، با استفاده از معادله (۴) و جایگزینی داده‌های جدول ۱ در آن، رسم شده‌اند.

گرمایی گلوکز اکسیداز در زمانهای بیش از ۳۰ ساعت، به حالت اشباع می‌رسند. در مورد آنزیم الکل دهیدروژناز منحنی اشباع کامل توسط نویسنده گزارش شده که در آن زمان حصول به q_{\max} آنزیم منطبق بر غیرفعال شدن کامل آنزیم فوق بوده است [۳۹]. در هر حال، وقتی از آزمایش مقدار q_{\max} به طور مستقیم مشاهده نشود، این مقدار می‌تواند به روش جایگزینی داده‌های تجربی در بهترین معادله سرعت واکنش که در زیر پیشنهاد می‌شود، به دست آورده شود. مفهوم فیزیکی q_{\max} عبارت است از مقدار گرمای لازم برای تخریب ساختار پروتئین، به گونه‌ای که فعالیت کاتالیزوری آنزیم صفر شود.

آنچه مسلم است، تبادل گرمایی مورد بحث مربوط به فرآیند فرضاً دو حالتی، تبدیل حالت طبیعی (N) به حالت غیرطبیعی (D) ماکرومولکولهای آنزیم است:



فرض کنید در زمان t ، کسرهای α و $1-\alpha$ از ماکرومولکولها، به ترتیب، به دو حالت طبیعی و غیرطبیعی پروتئین وجود داشته باشد. با فرض رفتار سینتیکی مرتبه اول برای انتقال دو حالتی فوق می‌توان نوشت:

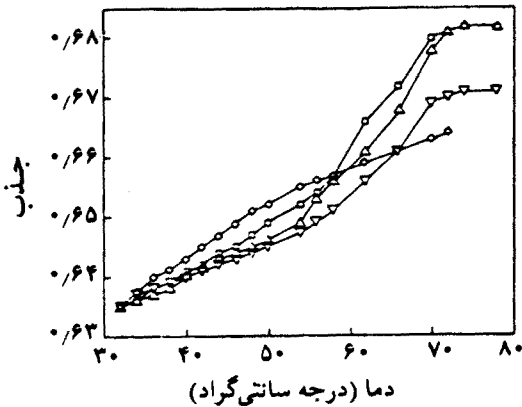
$$\frac{d\alpha}{dt} = k(1-\alpha) \quad (۱)$$

که در آن k ثابت سرعت مرتبه اول می‌باشد. با انتگرال‌گیری از معادله قانون سرعت، به صورت

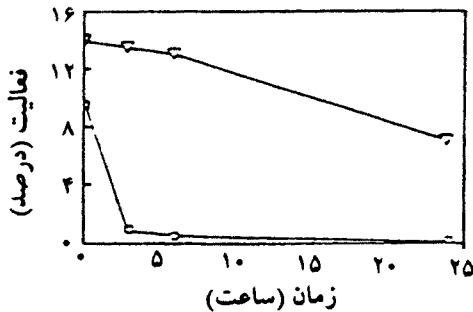
$$\int_0^{\alpha} \frac{d\alpha}{1-\alpha} = k \int_0^t dt$$

نتیجه می‌شود:

$$\ln(1-\alpha) = -k t \quad (۲)$$



شکل ۳- جذب یک نمونه آنزیمی با غلظت ۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر در $pH=5/5$ (فسفات بافر ۱۰۰ میلی مولار) در طول موج ۲۷۸ نانومتر در مقابل افزایش دما، در غیاب اسمولیت (□) و در مجاورت اسید آمینه های فنیل آلانین (∇)، هیستیدین (Δ) و آسپارتیک اسید (◇) با غلظت ۵/۵ میلی مولار.



شکل ۴- درصد فعالیت یک نمونه آنزیمی با غلظت ۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر، در حضور نمک پتاسیم تیوسیانات با غلظت ۱ مولار، در $pH=5/5$ (فسفات بافر ۱۰۰ میلی مولار) و دمای ثابت ۲۷ درجه سانتی گراد در زمانهای متفاوت نگهداری شده، در غیاب فنیل آلانین (□) و در مجاورت فنیل آلانین با غلظت ۵/۵ میلی مولار (∇).

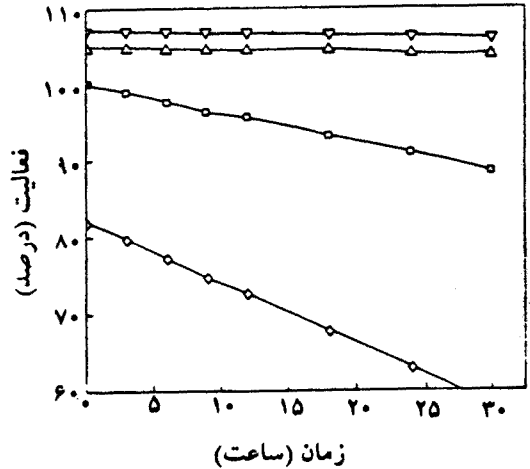
حاوی بار منفی سبب برهم کنشهای ناپایدارکنندگی می شود. افزایش دما حاوی بار مثبت سبب برهم کنشهای پایدارکنندگی شده، ولی به اندازه برهم کنشهای آب گریز سبب پایداری نمی شود. فنیل آلانین می تواند نقش مؤثری در حفاظت آنزیم گلوکز اکسیداز در مقابل غیرطبیعی شدن حرارتی و عوامل شیمیایی، نظیر پتاسیم تیوسیانات داشته باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی و دانشگاه تهران به خاطر کمکهای مالی و محبتهای بی شائبه و همچنین از مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، بخش شیمی دانشکده علوم دانشگاه شهیدبهشتی و مجتمع علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، به خاطر دراختیار گذاشتن اطلاعات و برخی امکانات تشکر و قدردانی می شود.

تاریخ دریافت: ۷۸/۲/۱۴، تاریخ پذیرش: ۷۸/۷/۱۲

سه اسمولیت نشان می دهد. فنیل آلانین و هیستیدین، نه تنها سبب ابقاء فعالیت آنزیم شده اند، بلکه به ترتیب، آنزیم را ۷ و ۵ درصد نسبت به حالت کنترل (غیاب اسمولیت) فعالتر نموده اند. مجاورت آسپارتیک اسید سبب افت فعالیت آنزیم به مقدار قابل ملاحظه ای شده است. این نتایج تطابق خوبی با نتایج حاصل از مطالعات میکروکالریتری دارد.



شکل ۲- درصد فعالیت یک نمونه آنزیمی با غلظت ۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر در $pH=5/5$ (فسفات بافر ۱۰۰ میلی مولار) و دمای ثابت ۲۷ درجه سانتی گراد در زمانهای متفاوت نگهداری شده، در غیاب اسمولیت (□) و در مجاورت اسید آمینه های فنیل آلانین (∇)، هیستیدین (Δ) و آسپارتیک اسید (◇) با غلظت ۵/۵ میلی مولار.

استحکام بیشتر ساختار گلوکز اکسیداز به دلیل وجود فنیل آلانین و استحکام کمتر آن به دلیل وجود آسپارتیک اسید را می توان در منحنیهای غیرطبیعی شدن حرارتی آنزیم مشاهده کرد. در شکل ۳ تغییرهای جذب در طول موج مربوط به حداکثر جذب گلوکز اکسیداز ($\lambda_{max}=278 \text{ nm}$) در مقابل افزایش دما نشان داده شده است. در مجاورت فنیل آلانین و هیستیدین بیشترین دمای انتقالی (یا به اصطلاح دمای ذوب پروتئین که در واقع دمای مربوط به نقطه میانی سیگموئیدهای غیرطبیعی شدن است)، به تقریب ۶۲ درجه سانتی-گراد، و در مجاورت آسپارتیک اسید کمترین دمای انتقالی، به تقریب ۵۱ درجه سانتی گراد، مشاهده می شود. این دما در غیاب افزایش دمای اسمولیتی به تقریب ۵۹ درجه سانتی گراد می باشد.

رفتار سینتیکی آنزیم در مجاورت پتاسیم تیوسیانات (به عنوان یک عامل مخرب ساختار این آنزیم) در مجاورت و غیاب فنیل آلانین، به منظور تعیین اثر محافظتی و پایدارکنندگی فنیل آلانین نیز انجام شد که نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می شود، مجاورت فنیل آلانین از سرعت افت فعالیت آنزیم، تحت تأثیر نمک پتاسیم تیوسیانات، می کاهد.

فنیل آلانین دارای یک گروه غیرقطبی، هیستیدین دارای یک گروه قطبی با بار مثبت و آسپارتیک اسید دارای یک گروه قطبی با بار منفی است. بنابراین، نتیجه گرفته می شود که برهم کنشهای آب گریز بین افزایش دما و گلوکز اکسیداز سبب پایداری شده و افزایش

مراجع

- [1] Schepartz, A.I. and Subers, M.H., *Biochem. Biophys. Acta*, **85**, 228 (1964).
- [2] Schepartz, A.I., *Biochem. Biophys. Acta*, **118**, 637 (1966).
- [3] Swoboda, B.E.P. and Massey, V., *J. Biol. Chem.*, **240**, 2209 (1965)
- [4] Swoboda, B.E.P., *Biochem. Biophys. Acta*, **175**, 365 (1969).
- [5] Ye, W.N. and Combes, D., *Biochem. Biophys. Acta*, **999**, 86 (1989).
- [6] Okuda, J., Negamine, J. and Yagi, K., *Biochem. Biophys. Acta*, **566**, 245 (1979).
- [7] Sanner, C., Macheroux, P., Ruterjans, H., Mullere, F. and Bacher, A., *Eur. J. Biochem.*, **196**, 663 (1991).
- [8] Malley, J.J. and Weaver, J.L., *Biochemistry*, **11**, 3527 (1972).
- [9] Tsuge, H., Natsuaki, O. and Ohashi, K., *J. Biochem.*, **78**, 835 (1975).
- [10] Lee, Y.C., Scocca, J.R. and Muir, L., *Phys. Biochem.*, **27**, 559 (1969).
- [11] Patur, J.H., Kleppe, K. and Cepure, A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 351 (1965).
- [12] Nakamura, S. and Hayashi, S., *FEBS Letters*, **41**, 327 (1974).
- [13] Nakamura, S., Hayashi, S. and Koga, K., *Biochem. Biophys. Acta*, **445**, 294 (1976).
- [14] Kalis, H., Hendle, J. and Schmid, R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 502 (1997).
- [15] Fredrich, K.R., Tung, J., Emerick, R.S., Masiarz, F.R., Chamberlian, S.H., Vasavada, A., Rosenberg, S., Chakarabarty, S., Schoper, L.M. and Massey, V., *J. Biol. Chem.*, **265**, 3793 (1990).
- [16] Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. and Schomburg, D., *J. Mol. Biol.*, **229**, 153 (1993).
- [17] Moosavi-Movahedi, A.A. and Mansouri, S., *Scientica Iranica*, **4**, 65 (1997).
- [18] Moosavi-Movahedi, A.A., Housaindokht, M.R. and Moghaddasi, J., *Thermochim. Acta*, **219**, 143 (1993).
- [19] Housaindokht, M.R. and Moosavi-Movahedi, A.A., *Int. J. Biol. Macromol.*, **16**, 77 (1994).
- [20] Housaindokht, M.R. and Moosavi-Movahedi, A.A., *Thermochim. Acta*, **235**, 189 (1994).
- [21] Housaindokht, M.R., Moosavi-Movahedi, A.A., Moghaddasi, J. and Jones, M.N., *Int. J. Biol. Macromol.*, **15**, 337 (1993).
- [22] Combes, S.H., Morgan, C.D. and Enersc, T., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **204**, 306 (1993).
- [23] Yamagaguchi, Y., Semmel, M., Stanislawski, L., Stroberg, A.O. and Stanislawski, M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 26 (1993).
- [24] Kiang, S.W., Kuan, J.W., Kuan, S.S. and Guilbarlt, G., *Clin. Chem.*, **22**, 1378 (1976).
- [25] Tina, M. and Sandholm, M., *Int. Food Microbiol.*, **8**, 165 (1989).
- [26] Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N., *Science*, **217**, 1214 (1982).
- [27] Taneja, S. and Ahmad, F., *Biochem. J.*, **303**, 147 (1994).
- [28] Arakawa, T. and Timasheff, S.N., *Biochemistry*, **21**, 6536 (1982).
- [29] Back, J.F., Oakenfull, D. and Smith, M.B., *Biochemistry*, **18**, 5191 (1979).
- [30] Saboury, A.A., Bordbar, A.K. and Moosavi-Movahedi, A.A., *J. Chem. Thermodyn.*, **28**, 1077 (1996).

- [31] Saboury, A.A., Bordbar, A.K. and Moosavi-Movahedi, A.A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 3031 (1996).
- [32] Bordbar, A.K., Saboury, A.A. and Moosavi-Movahedi, A.A., *Thermochim. Acta*, **287**, 343 (1996).
- [33] Saboury, A.A. and Moosavi-Movahedi, A.A., *J. Enz. Inhibition*, **12**, 273 (1997).
- [34] Nazari, K., Saboury, A.A. and Moosavi-Movahedi, A.A., *Thermochim. Acta*, **302**, 131 (1997).
- [35] Ghadermarzi, M., Saboury, A.A. and Moosavi-Movahedi, A.A., *Polish J. Chem.*, **72**, 2024 (1998).
- [36] Saboury, A.A., *Thermochim. Acta*, **320**, 131 (1998).
- [37] Saboury, A.A., Dahot, M.U., Ghobadi, S., Chamani, J. and Moosavi-Movahedi, A.A., *J. Chim. Chem. Soc.*, **45**, 667 (1998).
- [38] Bathaie, Moosavi-Movahedi, A.A. and Saboury, A.A., *Nuc. Acid Res.*, **27**, 1001 (1999).
- [39] Saboury, A.A., Miroliaie, Nemat-Gorgani, M. and Moosavi-Movahedi, A.A., *Thermochim. Acta*, **326**, 127 (1999).
- [40] Worthington, C.C., "Worthington Enzyme Manual", Freehold, New Jersey, USA, pp. 19-21 (1972).