

## Kinetics studies of peroxidase enzyme in the presence of organic solvents ethanol and butanediol

Maryam Kazemi Nafchi<sup>1</sup>, Behzad Shareghi<sup>2\*</sup>

1. Student of Biochemistry, Shahrekord University, Iran

2. Associate Professor, Shahrekord University, Iran

(Received: Sep. 26, 2014 - Accepted: Aug. 14, 2016)

### Abstract

Peroxidases are a group of oxidoreductases that are produced by a number of microorganisms and plants, and catalyse the reduction of peroxides. Peroxidases are widely used in clinical biochemistry and enzyme immunoassay. Horseradish peroxidase isoenzyme C (HRP) is one of the characterized peroxidases. The structure of the enzyme is largely alpha helical. Kinetics studies of peroxidase enzyme were performed using a spectrophotometer UV-Vis fitted with electronic control system at 35°C and 45°C and pH4 and in the presence ethanol and butanediol. Kinetic parameters show that ethanol and butanediol organic solvents becomes caused the increase of maximum speed ( $V_{MAX}$ ) and activity of the enzyme. Organic solvents have effect on electrostatic interactions of proteins because their dielectric constant with water is different. In general, reduce properties of polar solvents and decreased dielectric constant becomes caused the increases electrostatic repulsion, leading to the opening of the proteins. Enzymes activity in such organic environments increases stability, activity or facilitate reactions that are difficult to perform in aquatic environments.

**Keywords:** Horseradish peroxidase, Kinetic parameters, Ethanol, Butanediol, Oxidoreductases.

## مطالعات سینتیکی آنزیم پراکسیداز در حضور حلال‌های آلی اتانول و بوتاندیول

مریم کاظمی نافچی<sup>۱</sup>، بهزاد شارق<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه شهرکرد

۲. دانشیار دانشگاه شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۲۴)

### چکیده

پراکسیدازها (EC.1.11.1.7) گروهی از آنزیم‌های اکسید و ردوکنازها هستند که توسط تعدادی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید می‌شوند و احیای پراکسیدها را کاتالیز می‌کنند. پراکسیدازها به‌طور وسیعی در بیوشیمی بالینی و آزمایشات ایمنی‌شناسی آنزیمی استفاده می‌شوند. ایزوآنزیم C پراکسیداز ترب کوهی (HRPC) یکی از متداول‌ترین پراکسیدازهای شناخته شده است ساختار این آنزیم به‌طور غالب دارای مارپیچ آلفا است. مطالعات سینتیکی آنزیم پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی در دمای ۳۵°C و ۴۵°C و در pH 4 و در حضور اتانول و بوتاندیول انجام گرفت. بررسی پارامترهای سینتیکی نشان می‌دهند که حلال‌های آلی اتانول و بوتاندیول باعث افزایش سرعت ماکسیمم ( $V_{MAX}$ ) و فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شوند. حلال‌های آلی بر میان کنش‌های الکتروستاتیک پروتئین‌ها اثر می‌گذارند چرا که ثابت دی‌الکتریک آن‌ها با آب متفاوت است. به‌طور کلی کاهش خاصیت قطبی حلال و کاهش ثابت دی‌الکتریک سبب افزایش دافعه الکتروستاتیک شده و منجر به باز شدن پروتئین‌ها می‌شود. فعالیت آنزیم‌ها در چنین محیط‌های آلی باعث افزایش پایداری، فعالیت یا تسهیل واکنش‌هایی می‌شود که در محیط‌های آبی به سختی انجام می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** پراکسیداز ترب کوهی، پارامترهای سینتیکی،

اتانول، بوتاندیول، اکسیدوردوکنازها.

## مقدمه

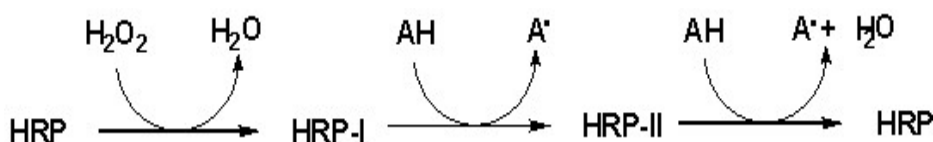
فلورسانس مهیا می‌کند (Tayefi-Nasrabadi *et al.*, 2006). در واقع پراکسیدازها اکسیداسیون سوسترهای مختلف را با استفاده از پراکسید هیدروژن یا دیگر پراکسیدها کاتالیز می‌کنند. چرخه کاتالیتیک پراکسیداز شامل فرم‌های آنزیمی حدواسط مجزا است (Mantha *et al.*, 2002). در مرحله آغازی آنزیم طبیعی فریک توسط پراکسید هیدروژن به فرم یک حدواسط ناپایدار به نام ترکیب I اکسید می‌شود، و در نتیجه پراکسید به آب احیا می‌شود. سپس ترکیب I سوسترای الکترون‌دهنده را اکسید می‌کند و به ترکیب II تبدیل می‌شود، و یک رادیکال آزاد رها می‌شود. ترکیب II سپس توسط یک مولکول سوسترای دوم کاهش می‌یابد، دوباره وضعیت آهن III را ایجاد می‌کند و یک رادیکال آزاد دیگر تولید می‌شود (شکل ۱).

پراکسیدازها به طور وسیع در بیوشیمی بالینی و ایمنونواسی آنزیمی (Lin *et al.*, 1996) استفاده می‌شوند. بعضی کاربردهای جدید که برای پراکسیدازها پیشنهاد شده است شامل تیمار پسماندهای حاوی ترکیبات فنولی، سنتز مواد شیمیایی آروماتیک مختلف و حذف پراکسید از موادی مانند مواد غذایی و پسماندهای صنعتی (Agostini *et al.*, 2002) می‌باشد. برجستگی‌های ریشه گیاه ترب کوهی به‌عنوان منبع تجاری تولید پراکسیداز استفاده می‌شود (Saitou *et al.*, 1991). اگرچه گونه‌های کشت داده شده دیگر هم، به‌ویژه انواع نوترکیب، ممکن است پراکسیدازهایی با ویژگی‌های مشابه یا بهتر تولید کنند (Egorov *et al.*, 1995).

پراکسیدازها (EC 1.11.1.7) در طبقه‌بندی آنزیم‌ها در گروه اکسیدوردوکتازها قرار می‌گیرند و توسط تعدادی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها دارای گروه هم (heme) بوده و گروه پروستتیک آن‌ها آهن (III) پروتوپورفیرین IX (فری پروتوپورفیرین IX) است. آن‌ها دارای وزن مولکولی از ۳۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰۰ دالتون می‌باشند. این آنزیم‌ها عمل احیای پراکسیدها مثل پراکسید هیدروژن، و اکسیداسیون مواد آلی و معدنی مختلف را کاتالیز می‌کنند (Veitch, 2004).

فعالیت پراکسیدازی در گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و حیوانات شناخته شده و پراکسیدازها نقش‌های مهمی را ایفا می‌کنند. در گیاهان آن‌ها در فرآیندهای چوب‌سازی (Wakamatsu & Takahama, 1993) و در مکانیزم‌های دفاعی در آسیب فیزیکی یا بافت‌های آلوده شرکت می‌کنند (Biles & Martyn, 1993).

آنزیم پراکسیداز ترب کوهی شناخته‌شده‌ترین عضو خاندان پراکسیدازها می‌باشد و دارای ایزوآنزیم‌های متعددی است که فراوان‌ترین آن‌ها ایزو آنزیم C می‌باشد. این ایزو آنزیم دارای ساختار غالب ماریچ آلفا با ۱۸ هلیکس، ۱ صفحه بتا، ۱ سنجاق سر بتا، دو رشته بتا، یک پیچ گاما، ۲۷ میانکنش ماریچ- ماریچ، ۴ اتصال دی سولفید و ۲ یون کلسیم است. رزیدوهای کاتالیتیک این آنزیم اسپارژین ۷۲، آرژینین ۳۸ و هیستیدین ۴۲ هستند (Veitch, 2004). نقطه ایزو الکتریک آنزیم ۸/۹ است (Wang *et al.*, 2008). این آنزیم دارای گروه پروستتیک هم است که به‌خاطر خصوصیات طیفی آن ویژگی‌های منحصر بفردی را برای تکنیک‌های بیوفیزیکی مثل اسپکتروسکوپی



شکل ۱. چرخه کاتالیتیک پراکسیداز ترب کوهی

اتانول و بوتاندیول از شرکت مرک و ارتو- دی آنیزیدین از شرکت سیگما استفاده شد.

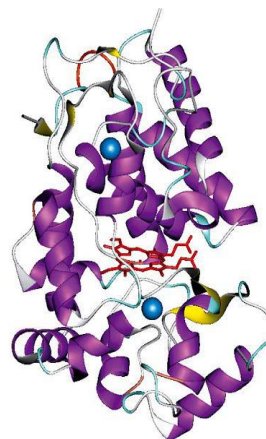
#### طرز تهیه تامپون استات سدیم

جهت تهیه تامپون استات ۰/۱ مولار مقدار ۱۳/۶۰۸ گرم از استات سدیم در آب مقطر دو بار تقطیر حل شد سپس توسط دستگاه pH متر، pH آن روی ۴ تنظیم گردید و در بالن ۱ لیتری به حجم رسانده شد. علت انتخاب pH ۴ این است که طبق مطالعات گذشته تناسب بالاتری برای یون آهن ۶ کوردینات در pH ۴ نسبت به pH ۷ وجود دارد که طیف جذبی را آشفته نمی‌کند ( Smulevich et al., 1997; Laurenti et al., 2000). تمامی آزمایشات این مطالعه در pH ۴ انجام شد.

#### مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در حضور اتانول در دماهای مختلف

در این مطالعه از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS مدل pharmacia 4000 استفاده شد. غلظت نمونه آنزیم مورد مطالعه ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. تامپون استات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۴ مورد استفاده قرار گرفت. سوبسترای مورد استفاده ارتو- دی آنیزیدین بود که محلول غلیظ آن با غلظت ۲۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. محلول غلیظ پراکسید هیدروژن نیز با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. در این آزمایشات ارتو- دی آنیزیدین به‌عنوان سوبسترای ثابت با غلظت ۵ میلی‌مولار در هر نمونه و پراکسید هیدروژن با غلظت‌های ۵-۱ میلی‌مولار به‌عنوان سوبسترای متغیر در نظر گرفته شدند. طول موج منتخب ۴۶۰ نانومتر مخصوص پیگیری محصول تولید شده از اکسیداسیون ارتو- دی آنیزیدین است. محلول غلیظ اتانول با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه و اثر غلظت‌های ۰-۳۰ میلی‌مولار آن، پس از ۵ دقیقه آنکوباسیون با آنزیم،

دو مکان اتصال کلسیم در موقعیت‌های پروکسیمال و دیستال نسبت به صفحه هم‌قرار گرفته‌اند و به‌وسیله شبکه‌ای از باندهای هیدروژنی به ناحیه هم‌متصل هستند. هر مکان کلسیم به صورت ۷- کوردیناسیون است که با لیگندهای اکسیژن‌دهنده‌ای که از ترکیب کربوکسیلات‌های زنجیر جانبی اسید آمینه‌ها (آسپارتیک اسید)، گروه هیدروکسیل (سرین، ترئونین)، کربونیل‌های اسکلتی و یک مولکول آب ساختاری (فقط در سمت دیستال) ایجاد می‌شوند. از دست رفتن کلسیم باعث کاهش فعالیت و پایداری گرمایی می‌شود و همچنین تغییرات ظریف در محیط هم که می‌تواند از طریق اسپکتروسکوپی بررسی شود (Veitch, 2004). ساختار آنزیم به طور زیادی دارای مارپیچ آلفا است گرچه یک ناحیه کوچک صفحه بتا نیز وجود دارد. دو دومین پروکسیمال و دیستال دیده می‌شود که گروه هم بین آن‌ها قرار گرفته است. این دومین‌ها احتمالاً در اثر یک دو برابر شدن ژنی منشأ گرفته‌اند (شکل ۲).



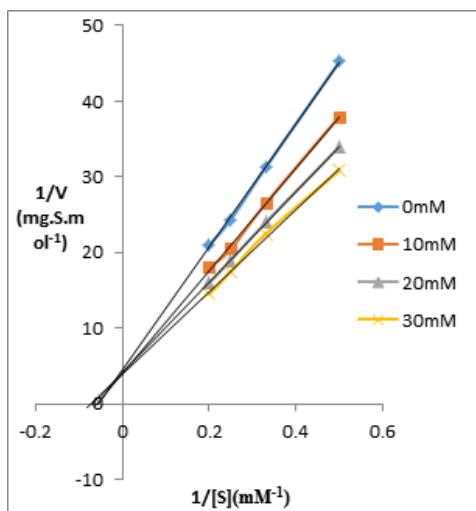
شکل ۲. ارائه ساختار سه بعدی کریستال اشعه ایکس ایزوآنزیم C پراکسیداز ترب کوهی. گروه هم به رنگ قرمز در بین دامین‌های پروکسیمال و دیستال قرار گرفته که هر یک حاوی یک اتم کلسیم (کره آبی رنگ) می‌باشند. مناطق مارپیچ آلفا و صفحه بتا به ترتیب به رنگ بنفش و زرد نشان داده شده است.

#### مواد و روش‌ها

##### ماده مصرفی

پراکسیداز ترب کوهی و پراکسید هیدروژن ۳۰٪ و

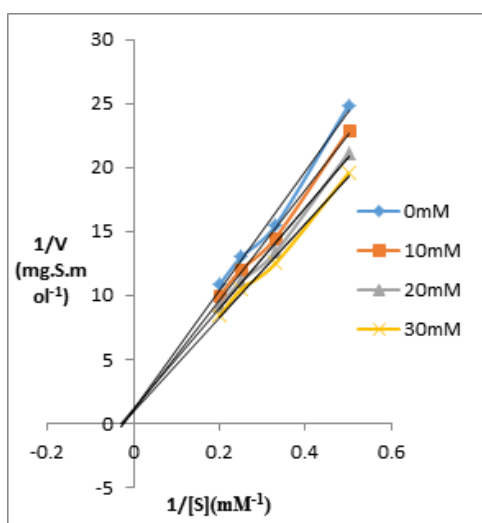
جدول‌های ۱ و ۲ مقادیر  $K_m$  و  $V_{MAX}$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اتانول نشان می‌دهد.



نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف اتانول بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در دمای  $35^{\circ}\text{C}$

جدول ۱. مقادیر  $K_m$  و  $V_{MAX}$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اتانول در دمای  $35^{\circ}\text{C}$

$K_m$ (mM)	$V_{MAX}$ ( $\text{mol.mg}^{-1}.\text{S}^{-1}$ )	غلظت اتانول (میلی‌مولار)
۱۸	۰/۲۳	۰
۱۷/۶۶	۰/۲۴	۱۰
۱۷/۸۶	۰/۲۵	۲۰
۱۶/۷۱	۰/۲۶	۳۰



نمودار ۲. اثر غلظت‌های مختلف اتانول بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در دمای  $45^{\circ}\text{C}$

در دماهای  $35^{\circ}\text{C}$  و  $45^{\circ}\text{C}$  بر سینتیک آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

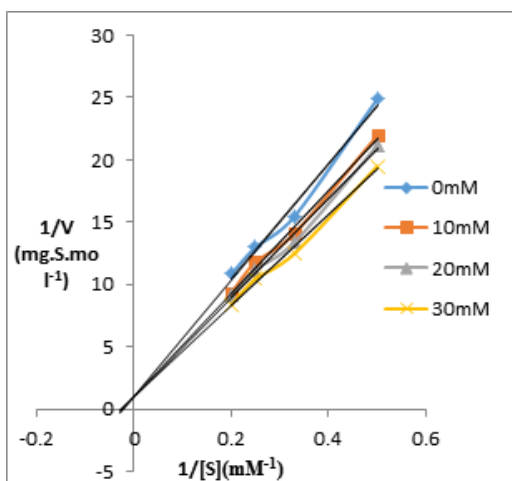
### مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در حضور ۱ و ۴ بوتانیدیول در دماهای مختلف

در این مطالعه از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS مدل pharmacia 4000 استفاده شد. غلظت نمونه آنزیم مورد مطالعه  $0.075$  میلی‌گرم در میلی لیتر بود. تامپون استات سدیم  $0.1$  مولار با  $\text{pH}$  ۴ مورد استفاده قرار گرفت. سوبسترای مورد استفاده ارتو-دی آنیزیدین بود که محلول غلیظ آن با غلظت  $20$  میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. محلول غلیظ پراکسید هیدروژن نیز با غلظت  $100$  میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. در این آزمایشات ارتو-دی آنیزیدین به‌عنوان سوبسترای ثابت با غلظت  $5$  میلی‌مولار در هر نمونه و پراکسید هیدروژن با غلظت‌های  $5-1$  میلی‌مولار به‌عنوان سوبسترای متغیر در نظر گرفته شدند. طول موج منتخب  $460$  نانومتر مخصوص پیگیری محصول تولیدشده از اکسیداسیون ارتو-دی آنیزیدین است. محلول غلیظ ۱ و ۴ بوتانیدیول با غلظت  $100$  میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه و اثر غلظت‌های  $30-0$  میلی‌مولار آن، پس از  $5$  دقیقه انکوباسیون با آنزیم، در دماهای  $35^{\circ}\text{C}$  و  $45^{\circ}\text{C}$  بر سینتیک آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

#### بررسی نتایج مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در حضور اتانول در دماهای مختلف

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اتانول، در دماهای  $35$  و  $45$  درجه سانتی‌گراد، بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی بررسی شد. نتایج در نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در دماهای  $35^{\circ}\text{C}$  و  $45^{\circ}\text{C}$  با افزایش غلظت اتانول، مقدار  $V_{MAX}$  افزایش یافته است بنابراین اثر فعال‌کنندگی روی آنزیم دارند.



نمودار ۴. اثر غلظت‌های مختلف ۴و۱ بوتان‌دیول بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در دمای ۴۵°C

جدول ۴. مقادیر  $K_m$  و  $V_{MAX}$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور ۴و۱ بوتان‌دیول در دمای ۴۵°C

$K_m$ (mM)	$V_{MAX}$ (mol.mg <sup>-1</sup> .S <sup>-1</sup> )	غلظت بوتان‌دیول (میلی مولار)
۴۱	۱	۰
۴۰/۵۰	۱/۱۷	۱۰
۴۰	۱/۲۸	۲۰
۴۰	۱/۵۵	۳۰

### بحث و نتیجه گیری

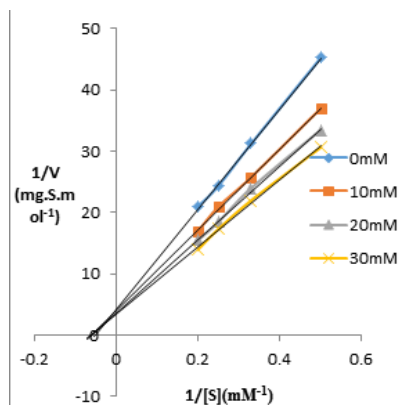
استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی و میزان کاربرد تجربی آنها گسترش یافته است. استفاده از آنزیم‌ها در حضور غلظت‌های مختلفی از محلول‌های الکلی امروزه رشد قابل توجهی یافته است. فعالیت آنزیم‌ها در چنین محیط‌هایی باعث افزایش پایداری، فعالیت یا تسهیل واکنش‌هایی می‌شود که در محیط‌های آبی به سختی انجام می‌شود (FernNdez et al., 2004).

حلال‌ها بر روی خصوصیات کاتالیتیکی و پایداری آنزیم‌ها به‌طور قابل توجهی اثر می‌گذارند پایداری آنزیم‌ها یکی از پیچیده‌ترین مسائل در شیمی پروتئین است. مولکول‌های پروتئین در محلول‌های آبی به وسیله یک پوسته هیدراته احاطه می‌شود، که از مولکول‌های آب تشکیل شده است که به سطح

جدول ۲. مقادیر  $K_m$  و  $V_{MAX}$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور اتانول در دمای ۴۵°C

$K_m$ (mM)	$V_{MAX}$ (mol.mg <sup>-1</sup> .S <sup>-1</sup> )	غلظت اتانول (میلی مولار)
۴۱	۱	۰
۴۰/۸۰	۱/۱۵	۱۰
۴۰/۷۰	۱/۲۵	۲۰
۴۰/۵۰	۱/۴۵	۳۰

بررسی نتایج مطالعه سینتیکی پراکسیداز ترب کوهی در حضور ۱و۴ بوتان‌دیول در دماهای مختلف در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف ۱و۴ بوتان‌دیول، در دماهای ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی بررسی شد. نتایج در نمودارهای ۳ و ۴ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در دماهای ۳۵°C و ۴۵°C با افزایش غلظت ۱و۴ بوتان‌دیول، مقدار  $V_{MAX}$  افزایش یافته است بنابراین اثر فعال‌کنندگی روی آنزیم دارند. جدول‌های ۳ و ۴ مقادیر  $K_m$  و  $V_{MAX}$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور ۱و۴ بوتان‌دیول نشان می‌دهد.



نمودار ۳. اثر غلظت‌های مختلف ۴و۱ بوتان‌دیول بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در دمای ۳۵°C

جدول ۳. مقادیر  $K_m$  و  $V_{MAX}$  پراکسیداز ترب کوهی در حضور ۴و۱ بوتان‌دیول در دمای ۳۵°C

$K_m$ (mM)	$V_{MAX}$ (mol.mg <sup>-1</sup> .S <sup>-1</sup> )	غلظت بوتان‌دیول (میلی مولار)
۱۸	۰/۲۳	۰
۱۷/۸۰	۰/۲۴	۱۰
۱۷/۵۰	۰/۲۷	۲۰
۱۷	۰/۳۰	۳۰

فعالیت بیشتری دارد تغییر می‌دهد (Carrea, 1984). مزیت‌های استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی از قبیل:

۱. جلوگیری از اتولیز (در مورد پروتئازها)
۲. افزایش پایداری دمایی به دلیل کاهش تحریک ساختاری (Fitzpatrick *et al.*, 1994; Griebenow & Klibanov, 1995). در حقیقت، نشان داده شده است که آنزیم‌ها می‌توانند در حلال‌های آلی در دماهای بالاتر از دمایی که آنزیم‌ها در محیط‌های آبی دناتوره می‌شوند کاتالیز انجام دهند با این وجود غیر فعال شدن آنزیم‌ها در حلال‌های آلی گزارش شده است (Castillo *et al.*, 2005).
۳. کاربرد محیط‌های آلی اجازه استفاده از آنزیم‌ها برای فرایندهای سنتزی به کاتالیز استریفیکاسیون، ترانس استریفیکاسیون، ترانس پیتیداسیون و ... را می‌دهد.
۴. بعضی ترانسفورماسیون‌های زیستی آنزیمی نیاز دارند که حلال‌های آلی برای حل شدن سوبسترا (قندها و مشتقات آنها) به دلیل قطبیت بالای آنها استفاده شوند (Simon *et al.*, 1998).
۵. شیفت واکنش‌های تعادلی در جهت مطلوب همانند استفاده از هیدرولازها برای واکنش‌های سنتزی
۶. کاهش خطر رشد میکروبی
۷. بازده انرژی پروسه‌های با سرعت پایین وقتی که حلال‌های فرار استفاده می‌شوند.
۸. بازیابی و استفاده مجدد آنزیم حتی بدون ایموبیلیزه شدن<sup>۱</sup>
۹. استفاده سوبستراهای حساس به رطوبت راحت باشد/عوامل شبیه انیدریک اسید
۱۰. امکان کنترل اختصاصیت سوبسترا، اختصاصیت ناحیه (Gupta, 1993).

پروتئین می‌چسبند. اگر یک حلال آلی حضور داشته باشد، مولکول‌های حلال تمایل دارند جایگزین مولکول‌های آب در هر دو قفسه هیدراته و داخلی پروتئین شوند، بنابراین اینترکشن‌های تعیین‌کننده آرایش فضایی آنزیم تخریب می‌شوند (Simon *et al.*, 2007). حلال‌های آلی بر میان کنش‌های الکتروستاتیک پروتئین‌ها اثر می‌گذارند چرا که ثابت دی‌الکتریک آنها با آب متفاوت است. به‌طور کلی کاهش خاصیت قطبی حلال و کاهش ثابت دی‌الکتریک سبب افزایش دافعه الکتروستاتیک شده و منجر به باز شدن پروتئین‌ها می‌شود.

هدف از انتخاب این دو حلال آلی اتانول و ۴و۱ بوتانیدیول، بررسی این موضوع می‌باشد که افزایش تعداد کربن‌ها و گروه‌های هیدروکسیل چه تغییراتی روی سینتیک آنزیم پراکسیداز دارد. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف اتانول و ۴و۱ بوتانیدیول بر سینتیک آنزیم پراکسیداز در دماهای مختلف ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی پارامترهای سینتیکی نشان می‌دهند که این حلال‌ها باعث افزایش سرعت ماکسیمم ( $V_{MAX}$ ) آنزیم پراکسیداز شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اتانول و ۴و۱ بوتانیدیول به عنوان فعال‌کننده برای آنزیم پراکسیداز محسوب می‌شوند و با تغییرات ساختمانی در آنزیم باعث پایداری و افزایش فعالیت آن شده‌اند. احتمال دارد که در معرض قرار گرفتن آنزیم پراکسیداز با حلال‌های آلی باعث ایجاد تغییراتی در ساختمان آنزیم شده که منجر به افزایش میزان در دسترس بودن جایگاه فعال آنزیم برای سوبسترا می‌شود. سیمون و کورتون نشان داده‌اند که حلال‌های الکلی سبب تغییرات شدید در ساختمان بسیاری از آنزیم‌های هیدرولیتیک شده است. حلال‌ها نیز سبب تغییرات آرایش فضایی آنزیم شده که این آرایش فضایی دارای فعالیت بیشتر بوده است و یا اینکه حلال‌های آلی تعادل بین فرم آنزیم با فعالیت زیاد و فرم آنزیم با فعالیت کمتر را به فرمی که

## REFERENCES

- Agostini, E.; Hernandez Ruiz, J.; Arnao, M.B.; Milrad, S.R.; Tugier, H.A.; Acosta, M.; (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(1): 1-7.
- Biles, C.L.; Martyn, R.D.; (1993). Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant physiology and biochemistry*, 31(4): 499-506.
- Carrea, G.; (1984). Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. *Trends in biotechnology*, 2(4): 102-106.
- Castillo, B.; Pacheco, Y.; AL-Azzam, W.; Griebenow, K.; Devi, M.; Ferrer, A.; Barletta, G.; (2005). On the activity loss of hydrolases in organic solvents: I. Rapid loss of activity of a variety of enzymes and formulations in a range of organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35(4-6): 147-153.
- Egorov, A.M.; Reshetnikova, I.A.; Fechina, V.A.; Gazaryan, I.G.; (1995). Comparative Studies of Plant and Fungal Peroxidases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 750(1): 469-472.
- Fernandez, M.; Fragoso, A.; Cao, R.; BaOs, M.; Ansorge-Schumacher, M.; Hartmeier, W.; Villalonga, R.; (2004). Functional properties and application in peptide synthesis of trypsin modified with cyclodextrin – containing dicarboxylic acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31(1): 47-52
- Fitzpatrick, P.A.; Ringe, D.; Klivanov, A.M.; (1994). X-ray crystal structure of cross-linked subtilisin Carlsberg in water vs acetonitrile. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198(2): 675-681.
- Griebenow, K.; Klivanov, A.M.; (1995). Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24): 10969-10976.
- Gupta, M.N.; (1993). Enzyme function in organic solvents. *EJB Reviews*. Springer, 203: 25-32.
- Laurenti, E.; Suriano, G.; Ghibaudi, E.M.; Ferrari, R.P.; (2000). Ionic strength and pH effect on the Fe (III)-imidazole bond in the heme pocket of horseradish peroxidase: An EPR and UV-visible combined approach. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 81(4): 259-266.
- Lin, Z.; Chen, L.; Zhang, W.; (1996). Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L) SW. Isolation, purification and some properties. *Process Biochemistry*, 31(5): 443 - 448.
- Mantha, R.; Biswas, N.; Taylor, K.E.; Bewtra, J.K.; (2002). Removal of nitroaromatics from synthetic wastewater using two - step zero - valent iron reduction and peroxidase – catalyzed oxidative polymerization. *Water environment research*, 74(3): 280-287.
- Saitou, T.; Kamada, H.; Harada, H.; (1991). Isoperoxidase in hairy roots and regenerated plants of horseradish (*Armoracia lapathifolia*). *Plant Science*, 75(2): 195-201.
- Simon, L.M.; Kotorman, M.; Szabo, A.; Nemcsok, J.; Laczko, I.; (2007). The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin. *Process Biochemistry*, 42(5): 909-912.
- Simon, L.M.; Laszlo, K.; Vertesi, A.; Bagi, K.; Szajani, B.; (1998). Stability of hydrolytic enzymes in water - organic solvent systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4(1-2): 41-45.
- Smulevich, G.; Paoli, M.; De Sanctis, G.;

- Mantini, A.R.; Ascoli, F.; Coletta, M.; (1997). Spectroscopic evidence for a conformational transition in horseradish peroxidase at very low pH. *Biochemistry*, 36(3): 640-649.
- Tayefi-Nasrabadi, H.; Keyhani, E.; Keyhani, J.; (2006). Conformational changes and activity alterations induced by nickel ion in horseradish peroxidase. *Biochimie*, 88(9): 1183-1197.
- Veitch, N.C.; (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3): 249-259.
- Wakamatsu, K.; Takahama, U.; (1993). Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88(1): 167-171.
- Wang, Z.; Li, M.; Su, P.; Zhang, Y.; Shen, Y.; Han, D.; Ivaska, A.; Niu, L.; (2008). Direct electron transfer of horseradish peroxidase and its electrocatalysis based on carbon nanotube / thionine / gold composites. *Electrochemistry communications*, 10(2): 306-310.