



Warunki termostabilności i charakterystyka katalityczna dehydrogenazy izocytrynianowej z *Bacillus licheniformis*

Piotr Zabielski, Sławomir Strumiło, Izabela Święcicka
Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, Białystok

Thermostability conditions and catalytic characterization of isocitrate dehydrogenase from *Bacillus licheniformis*

Summary

The NADP⁺ – dependent isocitrate dehydrogenase (IDH) from *Bacillus licheniformis* was partially purified using ammonium sulphate fractionation and gel filtration on Sephadex G-200 column. The enzyme preparation had specific activity of 1.52 U mg⁻¹. The temperature optimum for the IDH activity was about 59°C. The Arrhenius activation energy was determined to be 65.3 kJ/mol below 47°C, and 18.3 kJ/mol above this temperature. The IDH activity at 65°C was much protected by isocitrate and magnesium, but no NADP⁺. Manganese ions were more efficient activators of the enzyme than Mg²⁺. Calcium ions rather inhibited the IDH. The Km values for DL-isocitrate and NADP⁺ in phosphate buffer (pH 7.4) at 20°C were 85.5 and 4.9 μM, respectively; at 58°C the corresponding values were 181.5 and 69.3 μM.

Key words:

isocitrate dehydrogenase, *Bacillus licheniformis*, thermostability, catalytic properties.

Adres do korespondencji

Piotr Zabielski,
Instytut Biologii,
Uniwersytet
w Białymstoku,
ul. Świerkowa 20B,
15-950 Białystok.

1. Wstęp

Enzymy są szeroko stosowane w różnych procesach biotechnologicznych oraz bioanalizy, zatem ważną kwestią jest dobór optymalnych źródeł, zapewniających pożądane właściwości wyodrębnionych z nich biokatalizatorów (1). Dehydrogenaza izocy-

trynianowa (EC 1.1.1.42) jako jeden z licznych enzymów należących do klasy oksydoreduktaz znajduje zastosowanie w bioanalizie powiązanej z niektórymi biotechnologiami (2), oraz diagnostyce laboratoryjno-medycznej (3,4). Enzym ten katalizuje reakcję:



Jest on wykorzystywany mianowicie do oznaczania stężenia D-izocytrynianu w różnych płynach (4,5) oraz może być przydatny do analizy zawartości bardzo rozpowszechnionego koenzymu NADP^+ . Metodyka pomiarów wymienionej substancji w mieszaninach niektórych bioreaktorów oraz płynach ustrojowych polega na stosowaniu zarówno rozpuszczalnej dehydrogenazy izocytrynianowej (DHI) (2), jak i immobilizowanej w składzie elektrody enzymatycznej (6,7). Obie wersje wymagają jednak wystarczająco stabilnych preparatów enzymu.

Celem pracy było zbadanie termostabilności i właściwości funkcjonalno-kinetycznych DHI z *Bacillus licheniformis*, tj. drobnoustroju, z którego jak dotąd enzym ten nie był izolowany i charakteryzowany. Dodatkową przesłanką wskazującą na ewentualną perspektywiczność tego źródła były dane o bardzo wysokiej termostabilności innego enzymu (α -amylazy) wyodrębnionego z *B. licheniformis* (8), chociaż bakteria ta nie należy do typowych termofili, a jest jedynie termotolerancyna (9). W ramach tych badań wyjaśniano ponadto kwestię, czy zachodzą znaczne zmiany właściwości kinetycznych enzymu podczas katalizy w różnej temperaturze. Uzyskanie takiej informacji może być ważne w aspekcie bioanalitycznego zastosowania DHI.

2. Materiał i metody

2.1. Drobnoustrój i jego hodowla

Szczep bakterii *Bacillus licheniformis* pochodził z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku. Hodowlę prowadzono 24 godziny w temperaturze 60°C na szalkach z agarom odżywczym (10). Optymalne warunki hodowli ustalono na podstawie uprzednio przeprowadzonych eksperymentów. Wyrosłe kolonie zawieszono w roztworze fizjologicznym NaCl wirowano przy 3000 g w ciągu 40 minut. Osad został rozpuszczony w płynie fizjologicznym, po czym zawiesinę ponownie wirowano przy 6000 g. Uzyskany osad komórkowy zamrożono i przechowywano w temperaturze -20°C .

2.2. Oznaczanie aktywności DHI

Aktywność DHI mierzono rejestrując na spektrofotometrze Beckman DU-640 wzrost absorbancji przy 340 nm wskutek redukcji NADP^+ . Podstawowa mieszanina reakcyjna (1 ml) zawierała: 50 mM bufor Na-fosforanowy (pH 7,4), 1 mM MgCl_2 , 0,5 mM NADP^+ , 1 mM DL-izocytrynian. Reakcję inicjowano poprzez dodanie do mieszaniny 0,01-0,02 mg białka preparatu DHI.

2.3. Etapy częściowego oczyszczania DHI

W celu rozbicia ściany komórkowej, do stężonej zawiesiny bakterii w 20 mM buforze fosforanowym zawierającym 5 mM EDTA oraz 1mM fluorek fenylometylosulfonowy (jako inhibitor proteaz), dodano lizozym (Sigma) w proporcji 10 mg/ml. Inkubacja trwała 1 godzinę. Następnie zawiesinę dodatkowo poddano przez 1 minutę działaniu ultradźwięków w dezintegratorze DU-11 (Elpan). Po wirowaniu przy 15 000 g w ciągu 90 min został uzyskany klarowny ekstrakt komórkowy wykazujący aktywność DHI. Białko enzymatyczne wytrącano siarczanem amonowym w zakresie 0,5-0,9 stopnia nasycenia roztworu solą. Uzyskany osad rozpuszczono w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,4) i roztwór poddano filtracji żelowej w kolumnie wypełnionej Sephadexem G-200 (11). Zebrane frakcje o największej aktywności DHI zostały połączone. Aktywność właściwa enzymu w uzyskanym preparacie wyniosła 1,52 U/mg.

2.4. Badanie wpływu różnych czynników na aktywność DHI

Wpływ temperatury na aktywność DHI badano za pomocą termostatu Haake C-10. Temperaturę mieszaniny reakcyjnej w kuwecie podłączonej do termostatu kontrolowano dokładnym minitermometrem. Optimum pH ustalano przy zastosowaniu 50 mM buforu Na-fosforanowego z wartościami pH różniącymi się o 0,2 w zakresie 5,6–8,0. W przypadku badania wpływu jonów różnych metali dwuwartościowych do mieszaniny reakcyjnej nie dodawano buforu fosforanowego, ponieważ jony fosforanu są skłonne do wiązania się z kationami, lecz 50 mM bufor HEPES-NaOH (pH 7,6). Warunki badań zawarte są w opisach pod rysunkami.

2.5. Kinetyczne badania DHI

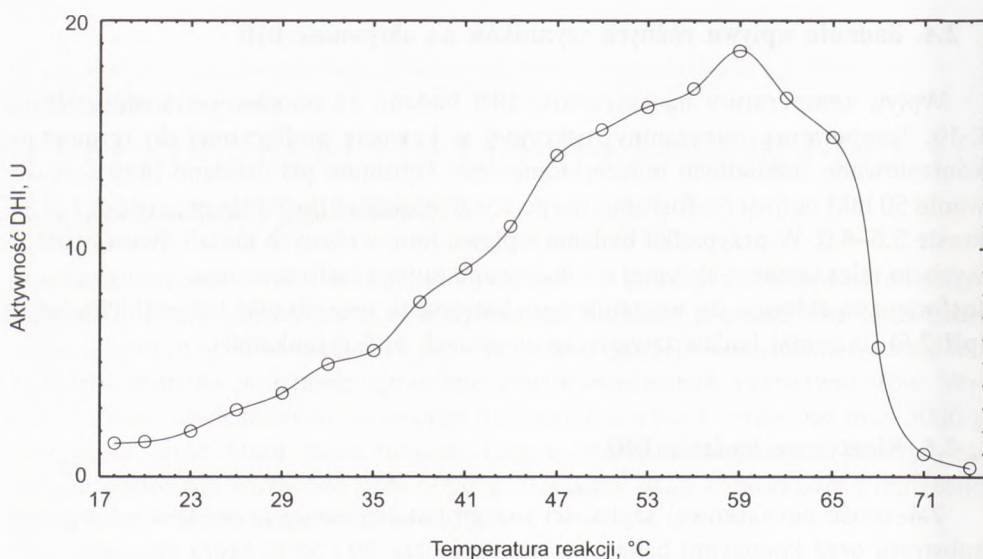
Zależność początkowej szybkości reakcji katalizowanej przez DHI od stężenia substratu oraz koenzymu badano w temperaturze 20 i 58°C, która stanowiła optimum. Stosowane były szerokie zakresy stężeń ligandów: 10-700 μM w przypadku DL-izocytrynianu i 2-500 μM w przypadku NADP^+ . Przetwarzania danych kinetycz-

nych dokonywał „Beckman Enzyme Mechanism Program” zainstalowany w spektrometrze Beckman DU-640. Wyniki były przedstawiane w postaci wykresów Michaelisa-Menten, Lineweaver-Burke'a, Hanes-Woolfa oraz Hilla.

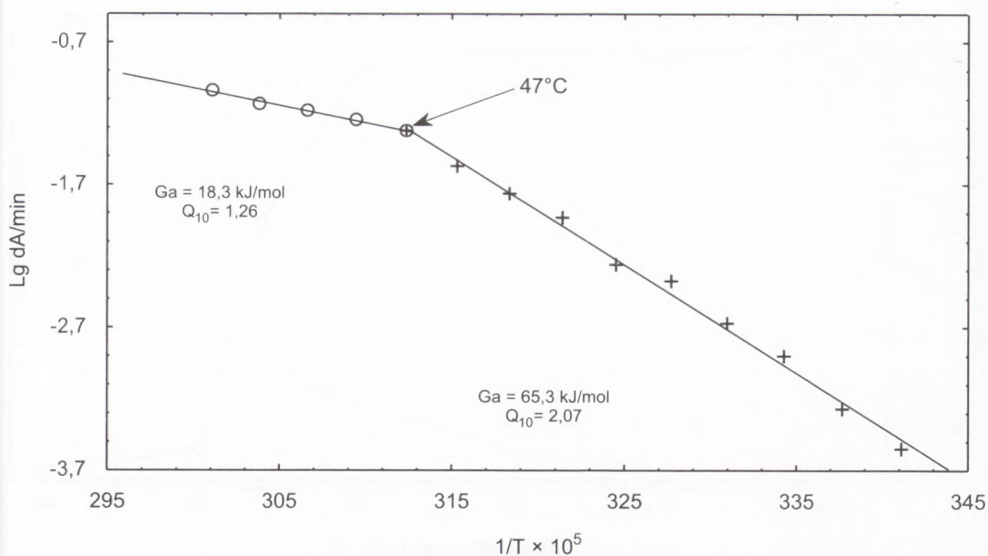
3. Wyniki i ich omówienie

Częściowo oczyszczony preparat DHI z *B. licheniformis* nie wykazywał żadnej aktywności redukującej NADP przy braku izocytrynianu w mieszaninie reakcyjnej, nadawał się on zatem do badań właściwości katalityczno-kinetycznych tego enzymu. Stwierdzono ponadto, że w obecności izocytrynianu zachodzi redukcja wyłącznie NADP⁺, natomiast NAD⁺ nie pełni roli koenzymu DHI z *B. licheniformis*. Bardzo wysoka swoistość względem koenzymu jest zresztą charakterystyczna również dla DHI z innych źródeł (12-14).

Najpierw ustalono optimum pH aktywności enzymu w najbardziej fizjologicznym dla żywych komórek buforze, tj. fosforanowym. Wskaźnik ten obejmował zakres pH 7,4-7,6. Badanie zależności aktywności DHI z *B. licheniformis* od temperatury (rys. 1) wykazało, że enzym ten charakteryzuje się ponadprzeciętną termostabilnością, bowiem optimum temperaturowe wynosi aż 59°C. Jest to wartość tylko o 7°C mniejsza od optimum temperaturowego DHI z termofilnych bakterii *Bacillus stearothermophilus* (15), lecz generalnie wyższa w porównaniu z takim samym wskaźnikiem DHI i innych enzymów z mezofili (16) oraz źródeł zwierzęcych (14).



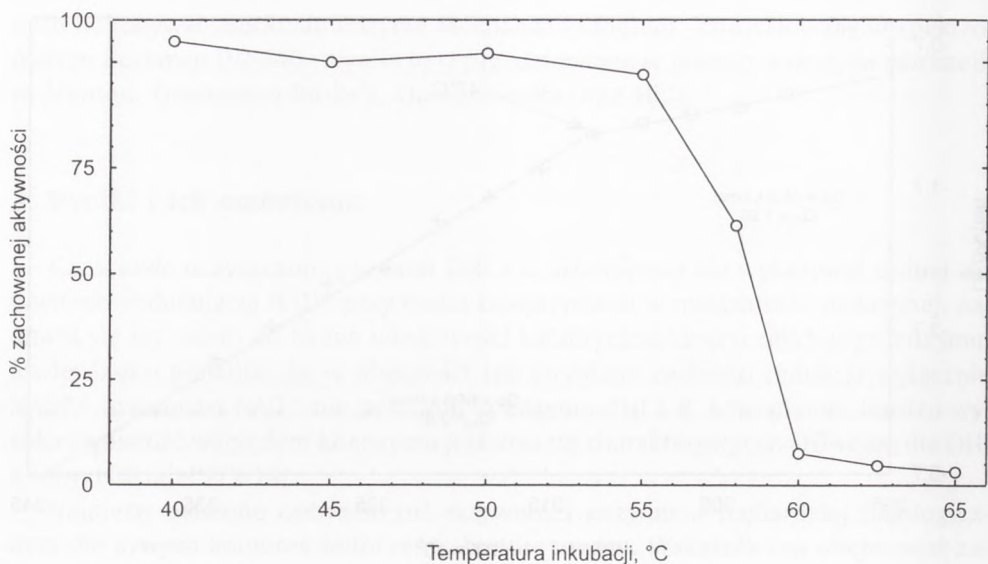
Rys. 1. Aktywność DHI w różnej temperaturze. Reakcja w buforze Na-fosforanowym pH = 7,4, w obecności 0,5 mM NADP⁺, 1 mM izocytrynianu i 1 mM MgCl₂.



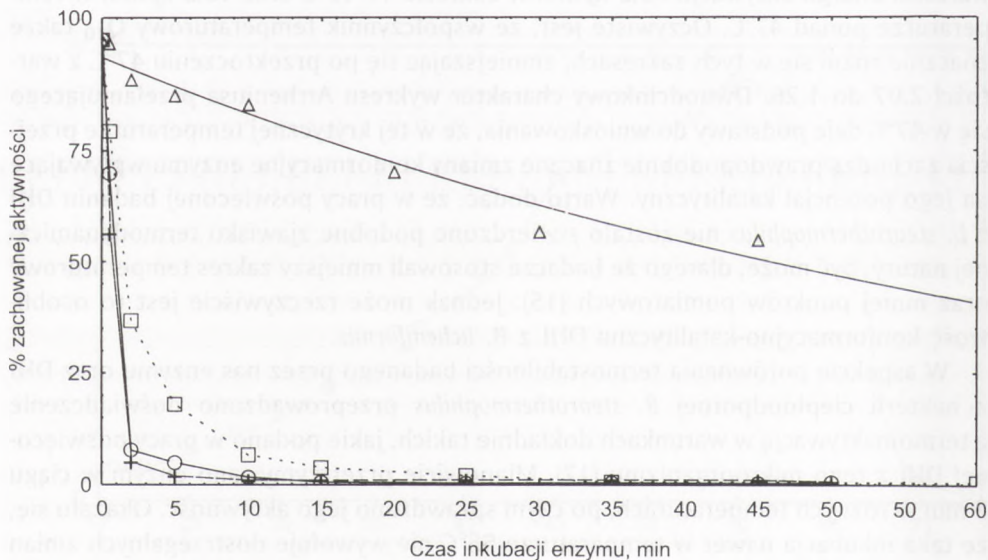
Rys. 2. Zależność wzrostu aktywności DHI od temperatury w postaci wykresu Arrheniusa. Reakcja w buforze Na-fosforanowym pH = 7,4, w obecności 0,5 mM NADP⁺, 1 mM izocytrynianu i 1 mM MgCl₂.

Z wykresu Arrheniusa (rys. 2) wynika, że DHI z *B. licheniformis* wykazuje dwie wartości energii aktywacji: 65,3 kJ/mol w zakresie 17-47°C oraz 18,3 kJ/mol w temperaturze ponad 47°C. Oczywiście jest, że współczynnik temperaturowy Q_{10} także znacznie różni się w tych zakresach, zmniejszając się po przekroczeniu 47°C z wartości 2,07 do 1,26. Dwudcinkowy charakter wykresu Arrheniusa przełamującego się w 47°C daje podstawy do wnioskowania, że w tej krytycznej temperaturze przejścia zachodzą prawdopodobnie znaczne zmiany konformacyjne enzymu wpływające na jego potencjał katalityczny. Warto dodać, że w pracy poświęconej badaniu DHI z *B. stearothermophilus* nie zostało stwierdzone podobne zjawisko termodynamicznej natury, być może, dlatego że badacze stosowali mniejszy zakres temperaturowy oraz mniej punktów pomiarowych (15). Jednak może rzeczywiście jest to osobliwość konformacyjno-katalityczna DHI z *B. licheniformis*.

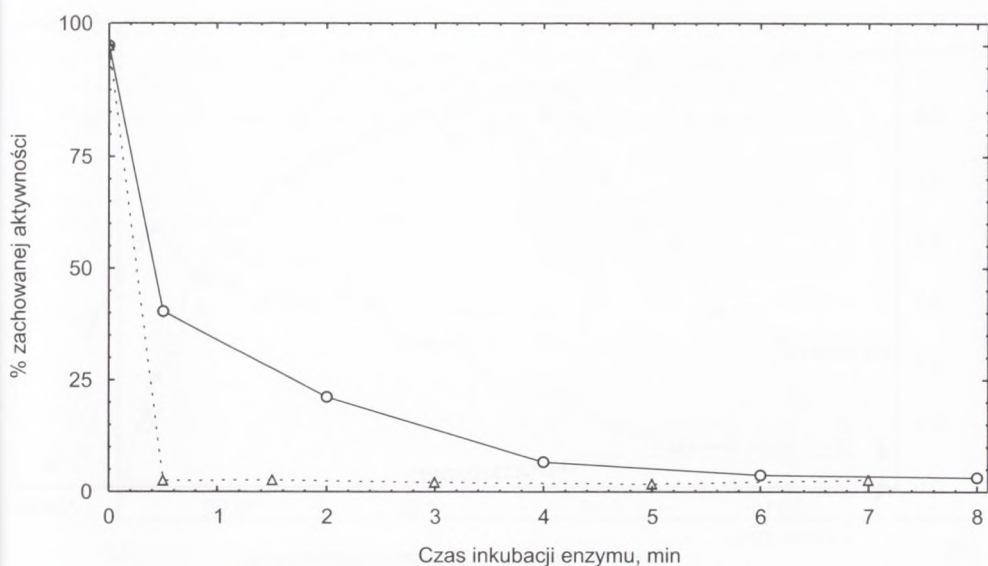
W aspekcie porównania termostabilności badanego przez nas enzymu oraz DHI z bakterii ciepłoodpornej *B. stearothermophilus* przeprowadzono doświadczenie z termoinaktywacją w warunkach dokładnie takich, jakie podano w pracy poświęconej DHI z tego mikroorganizmu (17). Mianowicie przetrzymywano enzym w ciągu 8 min w różnych temperaturach, po czym sprawdzano jego aktywność. Okazało się, że taka inkubacja nawet w temperaturze 55°C nie wywołuje dostrzegalnych zmian aktywności DHI z *B. licheniformis*. Natomiast po przekroczeniu tej temperatury następowała szybka i głęboka termoinaktywacja (rys. 3). W przypadku enzymu z *B. stearothermophilus* taką krytyczną temperaturą było nie 55, a 60°C. Stąd wniosek, że ba-



Rys. 3. Zmiany aktywności DHI po 8-minutowej inkubacji w różnej temperaturze. Enzym inkubowano bez ligandów w 0,05 M buforze Na-fosforanowym pH = 7,4.



Rys. 4. Zmiany aktywności DHI jako funkcji czasu podczas inkubacji enzymu w temperaturze 65°C. Mieszanka inkubacyjna zawierała: (○) sam enzym, (□) enzym oraz 3,3 mM izocytrynian, (+) enzym oraz 2,5 mM NADP⁺, (Δ) enzym oraz 2,5 mM MgCl₂ i 2,5 mM izocytrynian.



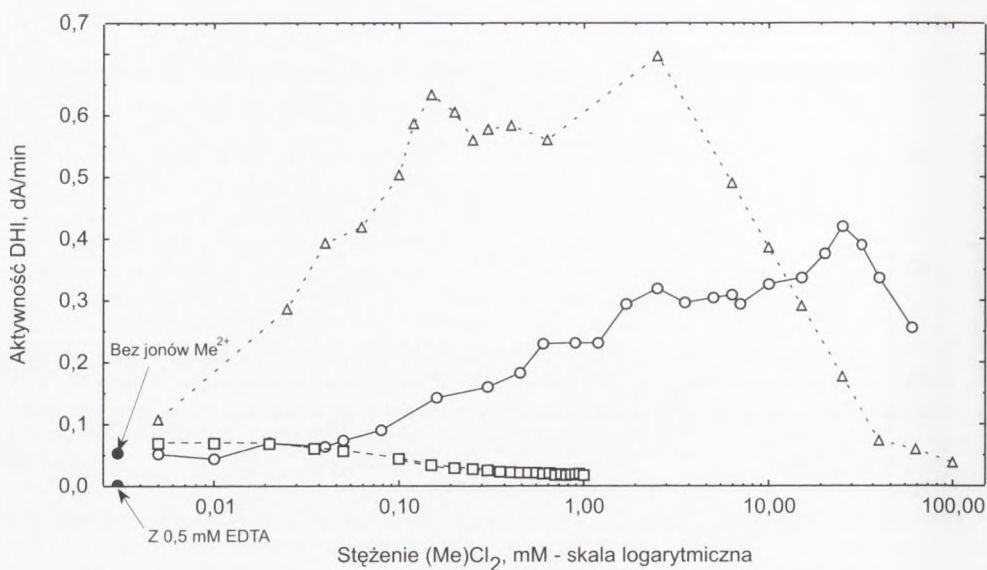
Rys. 5. Ochronny wpływ izocytrynianu z Mg^{2+} na aktywność DHI w temperaturze $70^{\circ}C$. Mieszanina inkubacyjna zawierała: (O) sam enzym, (Δ) enzym oraz 2,5 mM $MgCl_2$ i 2,5 mM izocytrynian.

dana przez nas DHI jednak ustępuje nieco pod względem termostabilności enzymowi z termofilnego źródła.

Na rysunku 4 przedstawiono zmiany aktywności DHI podczas inkubacji enzymu w temperaturze $65^{\circ}C$ bez oraz w obecności specyficznych ligandów. Czas połowicznej inaktywacji samej DHI był bardzo krótki, wynosił on około 1 min. Prawie nie wydłużało tego czasu dodanie do mieszaniny inkubacyjnej jonów magnezu oraz koenzymu $NADP^{+}$. Natomiast obecność izocytrynianu kilkakrotnie zwiększyła termostabilność DHI.

Najbardziej ochronne działanie wykazał izocytrynian w kompleksie z jonami magnezu. W tym przypadku czas połowicznej inaktywacji enzymu w temperaturze $65^{\circ}C$ wzrósł około 45-krotnie. Jest to logiczne, ponieważ izocytrynian właśnie w kompleksie z jonami metali dwuwartościowych (Mg^{2+} , Mn^{2+}) pełni rolę właściwego substratu (12,18), który wiążąc się w centrach aktywnych DHI znacznie stabilizuje jej strukturę. Nawet w temperaturze $70^{\circ}C$, która natychmiast inaktywuje sam enzym, daje się dostrzec ochronne działanie izocytrynianu w kompleksie z jonami magnezu (rys. 5).

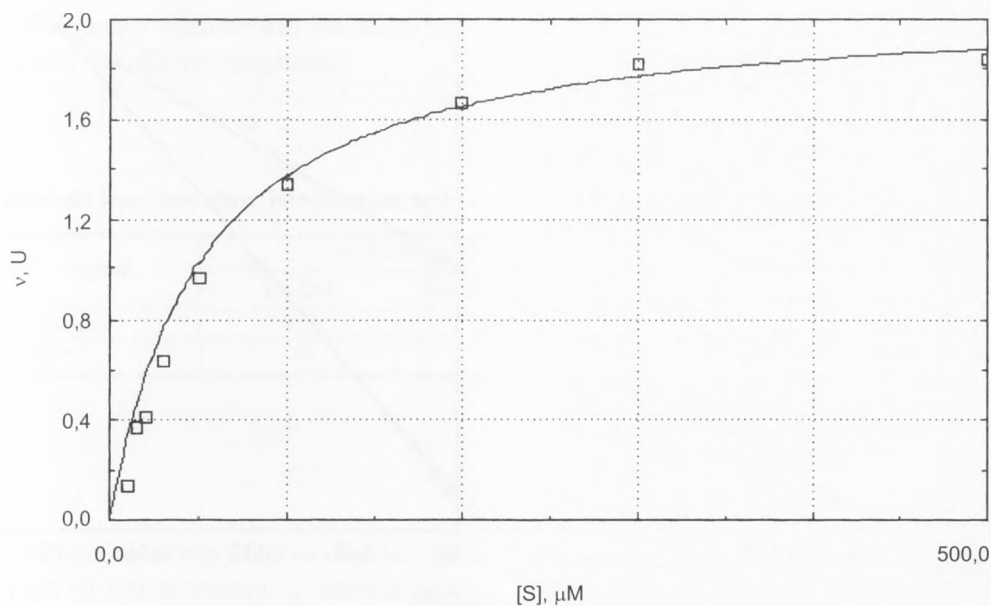
Jony metali dwuwartościowych odgrywają ważną rolę w wiązaniu przez DHI substratu i następującej po tym jego oksydacyjnej dekarboksylacji (13,15). Enzym ten, zależnie od źródła, wykazuje nieco odmienną wrażliwość wobec jonów niektórych metali dwuwartościowych (18,19). Badanie pod tym kątem DHI z *B. licheniformis* potwierdziło, że dla przeprowadzenia katalizy przez enzym absolutnie niezbędne są



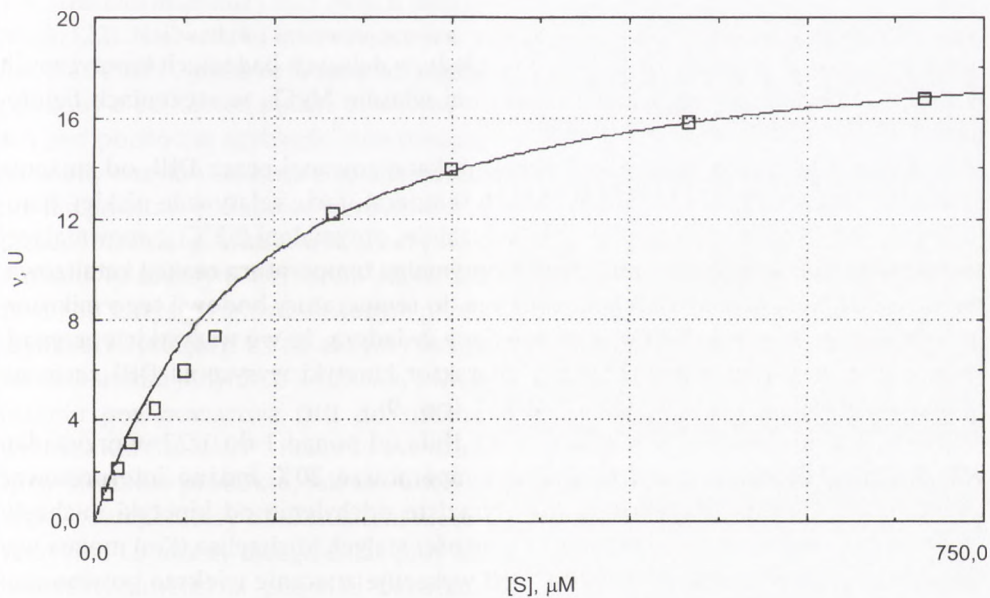
Rys. 6. Zależność aktywności DHI od obecności jonów Mg^{2+} , Mn^{2+} oraz Ca^{2+} w różnych stężeniach. Reakcja w 50 mM buforze HEPES-NaOH przy pH = 7,6. (Δ) jony Mn^{2+} , (O) jony Mg^{2+} , (□) jony Ca^{2+} . Punkty kontrolne (●) – aktywność bez jonów.

jony dwuwartościowe, ponieważ związanie ich śladowych ilości w mieszaninie reakcyjnej przez EDTA prowadzi do całkowitej utraty aktywności DHI (rys. 6). Jednocześnie dodanie do mieszaniny jonów Mg^{2+} lub Mn^{2+} wywołuje silną aktywację enzymu. Bardziej efektywne są jony manganu, których optymalne stężenia mieszczą się w zakresie 0,2-2,5 mM. Natomiast zakres efektywnych stężeń Mg^{2+} jest przesunięty o około jeden rząd wielkości, z optimum sięgającym aż 25,0 mM (rys. 6). Warto zaznaczyć, że w pewnych dość szerokich zakresach stężeniowych ma miejsce wystarczająco proporcjonalna zależność aktywności DHI od stężeń Mg^{2+} i Mn^{2+} przedstawianych w skali logarymicznej. Daje to pewne podstawy do ewentualnego wykorzystywania tego enzymu w celach bioanalitycznych wobec wymienionych jonów (3). Co się tyczy Ca^{2+} , to jony te w bardzo niskich stężeniach wywoływały nieznaczny efekt aktywacyjny, który po przekroczeniu wartości 0,02 mM zmieniał się na postępującą wraz ze wzrostem stężenia inhibicję DHI (rys. 6). Uzyskane dane o największej efektywności jonów Mn^{2+} jako aktywatorów tego enzymu generalnie zgadzają się z wynikami badań DHI z szeregu innych źródeł (14,15,19).

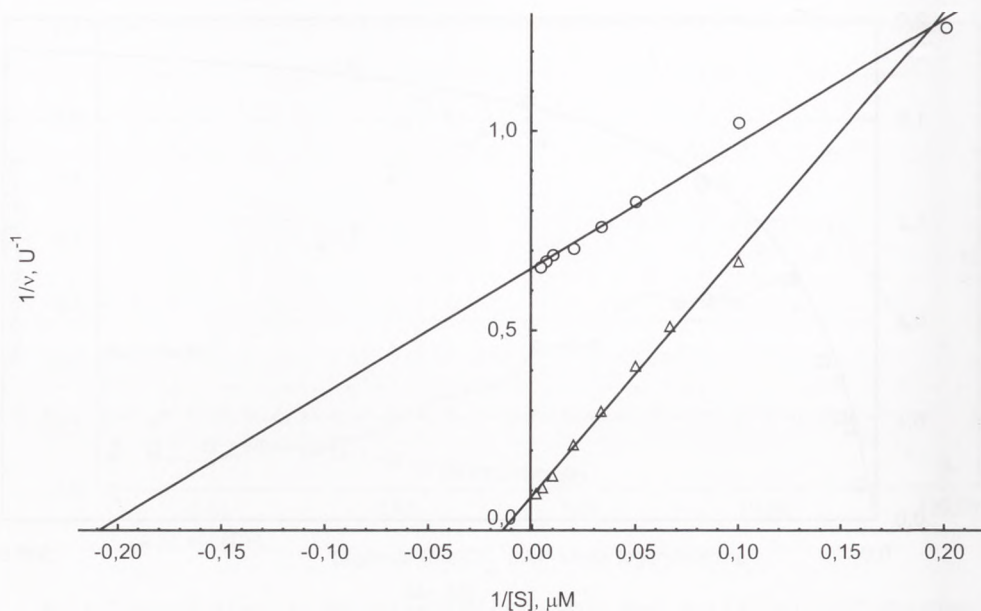
Logicznym tłumaczeniem jest to, że atom manganu mający najmniejszy promień van der Waalsa, w postaci jonu potrafi znaleźć się najbliżej czynnych grup izocytrynianu, stabilizując ich ładunek ujemny, który ma duże znaczenie dla wiązania przez enzym substratu i sprawnej katalizy (20). Inną sprawą jest to, że w żywych komórkach *in situ* stężenia Mn^{2+} są wielokrotnie mniejsze niż Mg^{2+} (21), zatem nawet przy generalnie niższej efektywności jony magnezu na pewno odgrywają pierwszoplanową



Rys. 7. Zależność początkowej szybkości reakcji katalizowanej przez DHI w temperaturze 20°C od stężenia izocytrynianu przedstawiona w postaci wykresu Michaelisa-Menten.



Rys. 8. Zależność początkowej szybkości reakcji katalizowanej przez DHI w temperaturze 58°C od stężenia izocytrynianu przedstawiona w postaci wykresu Michaelisa-Menten.



Rys. 9. Zależność początkowej szybkości reakcji katalizowanej przez DHI w temperaturze 20 i 58°C od stężenia NADP^{2+} , w postaci wykresu Lineweavera-Burke'a. Punkty oznaczają (○) reakcja w temperaturze 20°C, (Δ) reakcja w temperaturze 58°C.

nową rolę jako aktywatory DHI. Z tego względu w dalszych badaniach kinetycznych enzymu dodawano do mieszaniny reakcyjnej właśnie MgCl_2 w stężeniach fizjologicznych.

Zależność początkowej szybkości reakcji, katalizowanej przez DHI, od stężenia substratu oraz koenzymu badano w dwóch temperaturach: relatywnie niskiej, fizjologicznej (20°C) oraz tej ustalonej doświadczalnie, optymalnej (58°C), zapewniającej maksymalną aktywność enzymu. Zresztą optymalna temperatura reakcji katalizowanej przez DHI z *B. licheniformis* była zbliżona do temperatury hodowli tego mikroorganizmu, która wynosiła 60°C. Uzyskane dane świadczą, że we wszystkich przypadkach ma miejsce raczej hiperboliczny charakter kinetyki wysycenia DHI zarówno przez izocytrynian (rys. 7,8), jak i NADP^{2+} (rys. 9).

Nieduży wzrost wartości współczynnika Hilla od ponad 1 do 1,23 w przypadku zależności od stężenia izocytrynianu w temperaturze 20°C można interpretować najwyżej jako pewną tendencję, a nie wyraziste odchylenie od kinetyki Michaelisowskiej. Z przedstawionych w tabeli 1 wartości stałych Michaelisa (K_m) można wywnioskować, że w temperaturze 20°C DHI wykazuje znacznie większe powinowactwo do koenzymu, niż do substratu. Natomiast w temperaturze 58°C wartości współczynników tych stają się bardziej zbliżone do siebie, głównie za sprawą około

14-krotnego wzrostu K_m dla $NADP^+$ na tle jedynie nieco ponad 2-krotnego zwiększenia K_m dla izocytrynianu.

Tabela 1

Wskaźniki kinetyczne DHI w różnej temperaturze

Ligand	Temperatura 20°C		Temperatura 58°C	
	K_m (μM)	Współczynnik Hilla	K_m (μM)	Współczynnik Hilla
izocytrynian	85,5	1,23	181,5	1,02
$NADP^+$	4,9	1,10	69,3	1,09

Ponadto należy mieć na uwadze, że są to wartości K_m w odniesieniu do stosowanego DL-izocytrynianu, tj. produkowanej przez firmę Fluka mieszaniny dwóch stereoizomerów, z których tylko D-izocytrynian jest właściwym substratem DHI. Podane w tabeli 1 wartości K_m dla substratu są zatem z tego powodu około 2-krotnie zawyżone. Jednak nawet przy uzasadnionym zredukowaniu wartości K_m DHI z *B. licheniformis* dla izocytrynianu do około 43 μM (20°C) i 92 μM (58°C) pozostają one kilkakrotnie większe w porównaniu z tym samym wskaźnikiem kinetycznym enzymu z *B. stearothermophilus* (15) i innych mikroorganizmów: *T. aquaticus*, *B. subtilis*, *C. reinhardti* (22). Najbardziej interesujące jest zjawisko dużego zwiększenia K_m , szczególnie dla $NADP^+$, wraz ze wzrostem temperatury. Inni autorzy (23) także stwierdzali podobny efekt i mieli pewne problemy z jego interpretacją. Ponieważ współczynnik K_m jest pochodną szybkości powstawania kompleksu ES i jego dysocjacji nie tylko na wolny enzym i substrat (reakcja wsteczna), ale także na enzym plus produkt (24), nie ma podstaw traktować wzrostu wartości K_m w wyższej temperaturze wyłącznie jako obniżenie powinowactwa enzymu do substratu. Na pewno jest to związane z około 10-krotnym wzrostem aktywności enzymu po przejściu z temperatury od 20 do 58°C (rys. 1) spowodowanym przede wszystkim dużym zwiększeniem właśnie szybkości dysocjacji ES na enzym i produkt. W przypadku izocytrynianu wbrew obserwowanemu jedynie 2-krotnemu zwiększeniu K_m nie możemy wcale mówić o obniżeniu powinowactwa DHI do substratu, natomiast w przypadku 14-krotnego wzrostu K_m dla $NADP^+$ może to być skutkiem zarówno dużego przyspieszenia reakcji w kierunku produktu, jak też wstecznej dysocjacji na wolny enzym i koenzym. Wzrost temperatury obniża zatem nieco powinowactwo DHI jedynie do koenzymu. Wszystko to należy uwzględniać przy zastosowaniu DHI z *B. licheniformis* do celów bioanalitycznych, na przykład oznaczania w płynach stężenia izocytrynianu lub $NADP^+$. W przypadku tego drugiego, jak się wydaje, bardziej uzasadnione jest przeprowadzanie reakcji katalizowanej przez DHI w niższej temperaturze.

4. Podsumowanie

Dehydrogenaza izocytrynianowa z nowego źródła, termotolerancyjnej bakterii *Bacillus licheniformis*, w postaci częściowo oczyszczonego preparatu wykazuje umiarkowaną termostabilność, która znacznie wzrasta w obecności izocytrynianu w kompleksie z jonami magnezu. W temperaturze 47°C zachodzą prawdopodobnie zmiany konformacyjne enzymu, którym towarzyszy ponad 3-krotne obniżenie energii jego aktywacji. DHI z *B. licheniformis* wykazuje szereg podobieństw w odniesieniu do właściwości tego samego enzymu z innych mikroorganizmów, różni się natomiast nieco mniejszym powinowactwem do substratu. Druga istotna osobliwość, to 14-krotnie większa wartość K_m dla $NADP^+$ w temperaturze 58°C w porównaniu z temperaturą 20°C. DHI z tego źródła generalnie może być przydatna do zastosowań bioanalityczno-biotechnologicznych z uwzględnieniem stwierdzonych jej osobliwości kinetycznych.

Literatura

1. Synowiecki J., (1998), *Biotechnologia*, 42, 98-105.
2. Bergner-Lang B., (1977), *Deutsche Lebensmittel – Rundschau*, 73, 211-216.
3. Stone M. J., Chowdrey P. E., Miall P., Price C. P., (1996), *Clin. Chem.*, 42, 1474-1477.
4. Graef V., Schmidtman H., Jarrar K., (1984), *Urological Research*, 12, 71-72.
5. Wallrauch S., Greiner G., (1977), *Flussiges Obst.*, 44, 241-245.
6. Schubert F., Scheller F., Renneberg R., (1985), *Acta biotechnol.*, 5, 375-378.
7. Sugier H., (1994), *Biotechnologia*, 24, 133-147.
8. Tomazic S. J., Klibanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 3092-3096.
9. Stephens M. A., Ortlepp S. A., Ollington J. F., McConnell D. J., (1984), *J. Bacteriol.*, 158, 369-372.
10. Gordon R. T., Haynes C. W., Nor-Nay P., (1973), *The Genus Bacillus*, USA Department of Agriculture, Washington D.C.
11. Bai C., Fernandez E., Yang H., Chen R., (1999), *Protein Expression and Purification*, 15, 344-348.
12. Olano J., Soler J., Busto F., de Arriaga D., (1999), *Eur. J. Biochem.*, 261, 640-649.
13. Sankaran B., Chavan A. J., Haley B. E., (1996), *Biochemistry*, 35, 13501-13510.
14. Strumilo S. A., Viktorovich N. M., Vinogradov V. V., (1984), *Biochemistry (Moscow)*, 49, 194-200.
15. Howard R. L., Becker R. R., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 3186-3194.
16. Ochiai T., Fukunaga N., Sasaki S., (1979), *J. Biochem.*, 86, 377-384.
17. Hibino Y., Nosoh Y., Samejima T., (1974), *J. Biochem.*, 75, 553-561.
18. Strumilo S. A., Taranda N. I., Senkevich S. B., Vinogradov V. V., (1986), *Biochemistry (Moscow)*, 52, 620-626.
19. Popova T. N., (1993), *Biochimija*, (1993), 58, 1861-1879.
20. Hurley J. H., Dean A. M., Koshland D. E., Stoud R. M., (1991), *Biochemistry*, 30, 8671-8678.
21. Paynter D. I., (1979), *Anal. Chem.*, 51, 2086-2089.
22. Ramaley R. F., Hudock M. O., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 315, 22-36.
23. Gonzalez-Villasenor L. I., Powers D. A., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 11471-11477.
24. Keleti T., (1986), *Basic enzyme kinetics*, Akademiai Kiado, Budapest.