------مجلة علوم الرافدين، المجلد 24، العدد 4، ص64-76، 2013------

عزل ودراسة أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز (SDH) من بلازما دم الإنسان

ماهر عبد الستار إبراهيم
فرع الكيمياء الحياتية
كلية طب الموصل
جامعة الموصل

وسن خير ألله علي
قسم الكيميـاء
كلية العلوم
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 6 / 12 / 2012 ؛ تاريخ القبول 18 / 2 / 2013)

الملخص

تضمن البحث عزل وتوصيف انزيم السوربيتول ديهيدروجينيز(SDH) من بلازما الدم لشخص طبيعي متبرع سليم من فصيلة الدم (B) بعمر (34 سنة) باستخدام التقنيات الحيوية المختلفة. وقد أظهرت نتـائج تقنيـة الترشيح الهلامي التي أجريت في عمود الفصـل الحـاوي على الهلام (Sephadex G-100) إحتواء محلول الراسب البروتيني الناتج مـن الترسـيب بكبريتات الامونيوم بعد إجراء عملية الديلـزة على حزمتين بروتينيتين وتبين إمتلاك الحزمة البروتينية الثانية (قمة II) فعالية عالية للانزيم، إذ بلغت عدد مرات التنقية للحزمة البروتينية الثانية (8 مرات)، فضلاً عن ذلك تم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم (SDH) المنقى جزئياً (الحزمة البروتينية II) باستخدام تقنية الترشيح الهلامي وكان مقداره (38672 دالتون). ثم حددت بعد ذلك الظروف المثلى لعمل الأنزيم المنقى جزئياً، وأظهرت النتائج أن الأنزيم يعمل في المحلول المنظم عند تركيز (100µl) لثلاثي ايثانول امين، وأس هيدروجيني قدره (7) ودرجة حرارة مثلى (40°م) وعند تركيز (1.5 مولاري) للفركتوز كمادة أساس. وباستخدام رسم لاينويفر- بيرك وجـد أن السرعة القصوى (V_{max}) التي يعمـل بها الانزيم تسـاوي (0.53) مايكرومول/دقيقة، وان قيمة ثابت ميكيلس- منتن (K_m) تساوي (0.92) مولاري. كذلك أظهرت الدراسة بان هنالك مركبات كيميائية لها تأثير منشط مثل (EDTA, Mg, Zn)، أما مركب فلوريد الصوديوم (NaF) فقد أظهرت النتائج بأن تأثيره مثبط وهو من النوع غير التنافسي لفعالية الأنزيم وعند تركيز (3 m mol/L).

الكلمات الدالة: انزيم السوربيتول ديهيدروجينيز(SDH)، داء السكر.

Isolation and Characterization of Sorbitol Dehydrogenase from Human Plasma

Maher A. Ibrahim
Biochemistry Branch
College of Medicine
University of Mosul

Wasan Kh. Ali
Department of Chemistry
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The research is concerned with the isolation of sorbitol dehydrogenase (SDH) from the normal human plasma using different biochemical techniques. The results of filtration chromatography on sephadex G-100, that the solution contains proteinous precipitate which was resulted by ammonium sulfate precipitation after dialysis. The second bunch (II) shows high effectiveness of the enzyme. The number of purification of the second bunch (II) is (8) times. Furthermore, the approximate molecular weight of the partially purified (SDH), bunch, (II) using gel filtration was found to be (38672) Dalton. Optimum conditions were obtained in this research. The results showed that the enzyme works in the buffer solution using (100µl) of triethanolamine as a buffer, in pH (7), and the incubation temperature was (40˚C), The incubation time was (1min.) and (1.5M) of D-Fructose as a substrate was used. By using lineweaver-Burk plot, it was found that the maximum velocity (V_{max}) was (0.53µmol) and Michaelis constant (Km) was (0.92M). The effect of some chemical compounds on (SDH) activity was also studied. Some compounds have an activator effect like (EDTA, Mg, Zn), whereas sodium floride (NaF) showed uncompetitive inhibition on the activity of the enzyme at a concentration (3 m mol /L).

المقـدمة

ينتمي أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز (SDH) (EC 1.1.1.14) إلى عائلة أنزيمات الأكسدة والاختزال، ويتواجد بتراكيز عالية بوصفه عاملاً مساعداً في تكوين سايتوبلازم الخلية لكبد الثديات، بينما تواجده في المايتوكوندريا والعضلات الهيكلية بنسبة (7.9و15.6%) على التوالي (Pakuts *et al*., 1988). يلاحظ بأن ارتفاع مستوى أنزيم (SDH) في الدم هو مؤشـر للأمراض التي تصيب الكبد وكذلك مرض السكري (Gerlach and Hiby, 1974). إن السوربيتول، او ما يسمى كذلك ألبوليول (Polyol)، هو كحول سكري في معظمه، ويتواجد في العديد من المنتجات الغذائية (Jeffery and Jornvall, 1988). يؤلف السوربيتول (60%) تقريبا مـن الحلويات على شكل سكر وذلك بتحريره (1-3) سعرة حرارية، إذ أن له مذاق حلو وناعم (Casslen and Nilson, 1984). إن السوربيتول لا يؤدي إلى مشاكل التسوس في الأسنان لكن يرتفع مستواه في أمراض السكري، وهو مناسب لتطبيقات الحمية الغذائية لكنه يسـبب مشاكل معوية للبالغين إذا استهلكت كميات كبيرة

منه أي ما يقارب (10-50 gm.) تقريباً في اليوم الواحد (Jonathan *et al*., 1988). يتم اختزال سكر الكلوكوز إلى السوربيتول بواسطة أنزيم الالـدوز ريدكتيز (A.D) (Aldose reductase) ويتبع ذلك أكسدة السوربيتول إلى فركتوز بوجود الأنزيم، أي يتم أكسدة (D– سوربيتول) إلى (D- فركتوز) في تفاعل متوازن بواسطة أنزيم (SDH) بوجود المرافق الأنزيمي نيكوتين أمايد أدنين ثنائي النيوكلوتيد (NAD^+) (Finn *et al*., 2003).

$$\text{D-Sorbitol} + NAD^+ \overset{\text{SDH}}{\longleftrightarrow} \text{D-Fructose} + NADH + H^+$$

يتواجد السوربيتول ديهيدروجينيز (SDH) وبتراكيز عالية في الكبد، وهو أنزيم سايتوبلازمي يمتلك عمر نصف قصير(4 hours >)، حيث يعمل أنزيم (SDH) على تحفيز تحول الفركتوز إلى سوربيتول (Dunlop, 2000). يعتبر (SDH) أنزيما غير مستقر، وهو مؤشر ودليل لجميع أنواع أمراض الكبد، بالرغم من إن الإرتفاع يمكن أن يحدث في مراحل أمراض الكبد الأولية أو الثانوية، مثال ذلك الأمراض والالتهابات التي تصيب المعـدة والأمعاء، إذ يكون مستوى أنزيم (SDH) مرتفعاً. ويمكن الاستفادة من تسرب أنزيمات الكبد الخلوية للكشف عن إصابات خلايا الكبد (Burtis *et al*., 1999) إذ أن الزيادة في فعالية الأنزيم في مصل الدم تمثل مؤشر لحالة تسرب الأنزيم من الخلايا نتيجة تلف أغشية الخلايا. ويعتمد مستوى فعالية الأنزيم في مصل الدم على كلٍ من عدد الخلايا المؤثرة وخطورة الإصابة للخلية الواحدة. وقد يؤدي مرض السكري إلى ارتفاع تركيز كل من السوربيتول والفركتوز في عدسة العين، ونتيجة لذلك يصاب المريض بظهور مرض ماء العين (Cataract)(Bron *et al*., 1993). وليس للسوربيتول القابلية على الانتشار خلال أغشية الخلايا لكن تراكمه يسبب حالة من الضرر الازموزي (Osmotic damage). إن أنزيم (SDH) هو أنزيم رباعي (Tetramer) يحتوي على أربع وحدات فرعية (Subunits)، ويتراوح وزنه الجزيئي بين (38-40 الف دالتون) ويحتوي على (4) ذرات زنك لكل وحدة ذرة زنك واحدة. يعد مسار البوليول من مسارات أيض الكلوكوز التي لها دوراً رئيسياً في إطار بعض الشروط مثل فرط سكر الدم، أي أنه عند زيادة سكر الدم يتنشط مسار البوليول كثيرا (Rellose, 1998).

طريقة العمل

بلازما الدم: Blood Plasma

تم الحصول على بلازما الدم من مصرف الدم الرئيسي في الموصل.

فصـل البروتين بطريقة الإزاحة الملحيـة:

من الطرائق الشائعة الاستعمال لترسيب البروتينات هي إضافة الأملاح المتعادلة إلى المحاليل البروتينية، ومن أكثر هذه الأملاح استخداما هو كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ التي تتميز بقابليتها على الذوبان بسرعة عالية وعدم حدوث أي تغيير في طبيعة البروتين المرسب لذلك تعد هذه الطريقة مفيدة جداً لتنقية البروتينات القابلة للذوبان في خارج الخلية (Wiley, 2005).

الفرز الغشائي: Dialysis

أظهرت عملية الفرز الغشائي للراسب الناتج من عملية الترسيب زيادة في فعالية انزيم (SDH) وذلك بسبب خروج المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزئية الصغيرة (التي تقل عن 14000 دالتون)، إذ يتم الاحتفاظ بجزيئات بروتينية ذات أبعاد أكبر بكثير من قطر المسام داخل كيس السليفان، وتعد هذه التقنية مفيدة لإزالة ايونات الملح (كبريتات الامونيوم) والجزيئات الصغيرة الأخرى (Plummer, 1978)، مما يؤدي إلى زيادة الفعالية النوعية للانزيم في المحلول الناتج من الفرز الغشائي على الرغم من حدوث عملية تخفيف للمحلول نتيجة عملية الفرز الغشائي.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي: Gel filtration chromatography

يتضمن كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي فصل المركبات عن بعضها استنادا إلى الاختلاف في الحجم والوزن الجزيئي عند إمرارها من خلال العمود الحاوي على حبيبات ذات مسامية معينة منتفخة ومتراصة (محبة للماء) تدعى الهلام (gell)، مثل هلام السيفاديكس (Sephadex). فالجزيئات الكبيرة لا تستطيع اختراق ثقوب حبيبات الهلام المنتفخة وإنما تمر من خارج الحبيبات فتخرج من العمود مع السائل الراشح (الروغان) أولا إذ يمكن فصلها وجمعها بواسطة جهاز جامع الأجزاء التلقائي (Fractions Collector)، ويجمع على شكل أنابيب صغيرة ومتسلسلة، أما الجزيئات الصغيرة فإنها تخترق حبيبات الهلام وتخرج من العمود مع السائل المترشح ثانياً (Verbeuren, 1976). يتم حسـاب حجم الماء المقطر لإزاحة كل بروتين من عمود الفصل. وتعزل المواد البروتينية من خلال قراءة شدة الامتصاصية للأجزاء المفصولة عند طول موجي قدره (280 nm)، إذ أن الهلام المستخدم في تقنية الترشيح الهلامي هـ و (Sephadex G-100) (Mikkelsen, 2004).

تعبئة عمود الفصل:

أستخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (1.8×96 cm) الذي يحتوي على هلام الديكستران من نوع (Sephadex G-100) على ارتفاع (86 cm)، الذي يفصل المركبات ذات الأوزان الجزئية لغاية (150000

دالتون). واعتماداً على حجم العمود الذي يساوي (260 ml) تم وضع الهلام وذلك بسكب الهلام على جدران عمود الفصل (بهدوء وبشكل مائل لمنع تكون الفقاعات)، بعد وضع قطعة مناسـبة من صوف الزجاج الأبيض. وقد تمت عملية حقن المواد المذكورة آنفاً بحجم (2 ml) في عمود الفصل بشكل دائري وعلى جدران العمود من الداخل، ثم تبعها الغسل بالماء المقطر وبنفس الحجم. تمت عملية الجمع بمعدل جريان (60 ml/hour) وبمعـدل (5 دقائق) لكل جزء من جهاز جامع الأجزاء الذي يعمل بنظام الدقائق. وأجريت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قياس شدة الامتصاص للأجزاء المفصولة في جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي قدره (280 nm) (Robert and White, 1987).

تقدير كمية البروتين:

استخدمت طريقة الباحث لاوري المحورة (Schacterle and Pollak, 1973) لتقدير تركيز البروتين.

تقدير فعالية انزيم السوربيتول ديهيدروجينيز(SDH) بطريقة الباحث (Gerlach and Hiby, 1974) .

النتائج و المناقشة

تم ترسيب البروتين من خلال أخذ بلازما دم شخص متبرع سليم بعمر (34 سنة) ومن فصيلة الدم (B) من مركز نقل الدم الرئيسي في الموصل، وأجريت عمليات التنقية الجزئية مثل الفرز الغشائي (الديلزة) لفصل الأوزان الجزيئية الكبيرة عن الجزيئات الصغيرة، ثم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم (SDH) من خلال تقنية الترشيح الهلامي وباستخدام (Sephadex G-100) ومقداره (38672 دالتون) وهو ما يتفق مع الأدبيات والبحوث التي أجراها الباحثين، إذ وجد بعض الباحثين أن الوزن الجزيئي لأنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز بحـدود (38-40) ألف دالتون (Ohta *et al*., 2005; Kenneth *et al*., 1992). ومن خلال عملية التجفيد تم تركيز محلول الأنزيم وقياس فعاليته في كل خطوة لغرض دراسة الظروف المثلى لعمل أنزيم (SDH) وباستخدام رسم لاينويفر- بيـرك (Lineweaver-Burk plot) وجد أن قيمة السرعة القصوى (Vmax) وثابت ميكيلس (Km) لانزيم (SDH) هي (0.53 مايكرومول/دقيقة) و (0.92 مولاري) على التوالي.

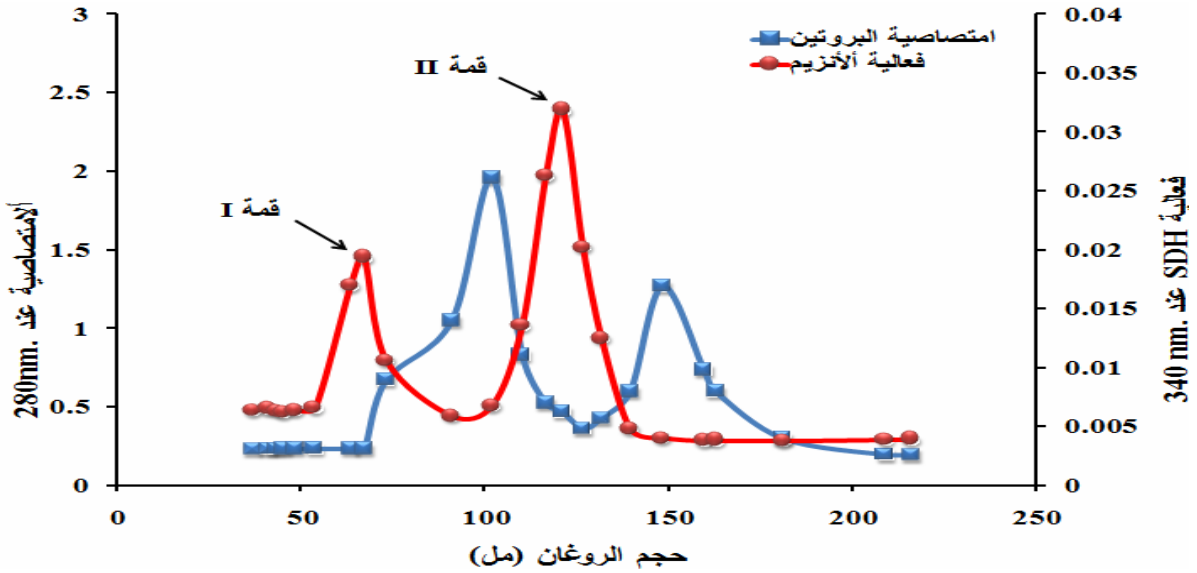
الجدول 1: خلاصة نتائج مراحل تنقية أنزيم (SDH) من بلازما الدم

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية U/ml	الفعالية الكلية	الفعالية النوعية	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
البلازما	100	71.0	1.520	152	0.0214	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم (75%)	52	68.0	1.706	88.71	0.0250	1.168	58.363
الراشح	30	56.0	0.664	19.92	0.011	0.514	13.105
الترشيح الهلامي G-100 حزمة I	68	21.0	0.706	48.00	0.033	1.570	31.578
الترشيح الهلامي G-100 حزمة II	61.0	7.3	1.265	77.165	0.173	8.097	50.766

الفعالية: عدد وحدات الأنزيم الموجودة في مللتر من المحلول البروتيني.

فعالية الأنزيم: هي عبارة عن كمية الأنزيم التي تحول مايكرومول واحد من المادة الأساس إلى ناتج في الدقيقة الواحدة تحت الظروف المحددة للقياس ويرمز لها بالرمز(v) الذي يشير إلى معدل سرعة التفاعـل الأنزيمي.

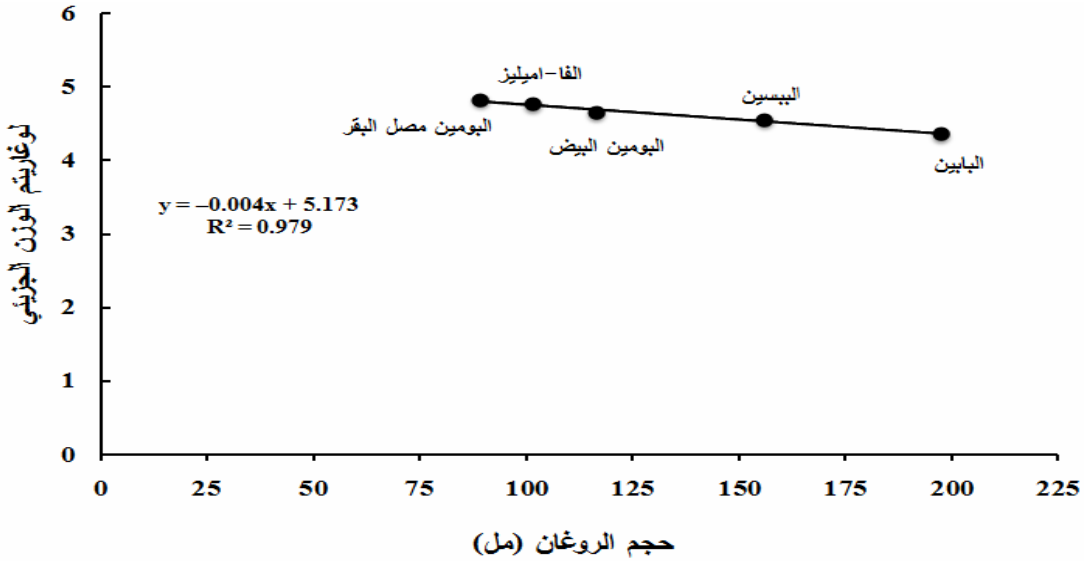
الفعالية النوعية: هي عبارة عن عدد وحدات الأنزيم (أو الفعالية) لكل ملغرام واحد من البروتين وتعد مقياساً لنقاوة الأنزيم وتزداد خلال تنقيته.



الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان انزيم (SDH) المنقى جزئياً من محلول الراسب البروتيني بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (96×1.8 cm) والحـاوي علـى Sephadex G-100 على إرتفاع (86 cm). (II, I) تمثل قمم الحزم البروتينية الأولى والثانية على التـوالي، سـرعة الجريان (60 ml / hr).

الجدول 2: حجم الروغان والأوزان الجزيئية لبعض المركبات بتقنية الترشيح الهلامي

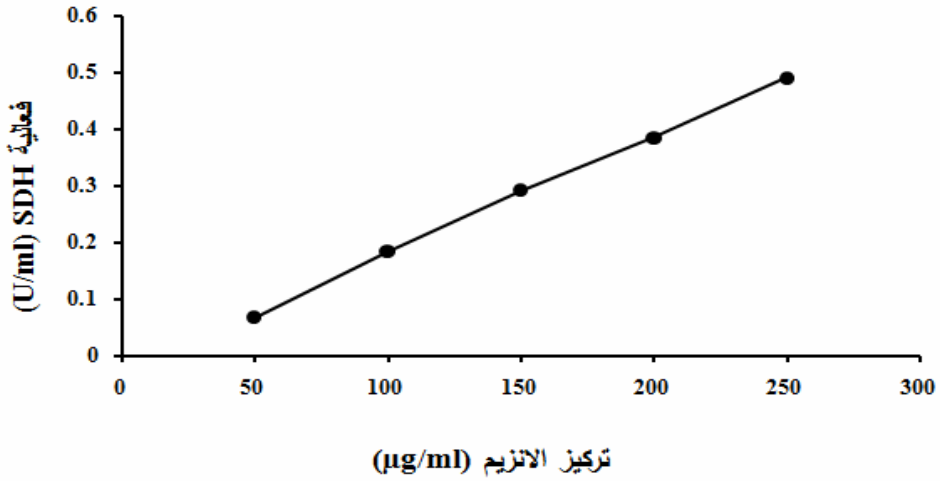
أسم المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان(مل)	لوغاريتم الوزن الجزيئي
الدكستران الأزرق	2000000	71.7	6.301
ألبومين مصل البقر	67000	89.5	4.826
ألفا- اميليز	58000	101.8	4.763
ألبومين البيض	45000	116.7	4.653
الببسين	36000	156.3	4.556
البابين	23000	197.8	4.361
الترينوفان	204	250.7	2.309
المجهول (x)	38672.299	146.4	4.5874



الشكل 2: المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم (SDH) بتقنية الترشيح الهلامي

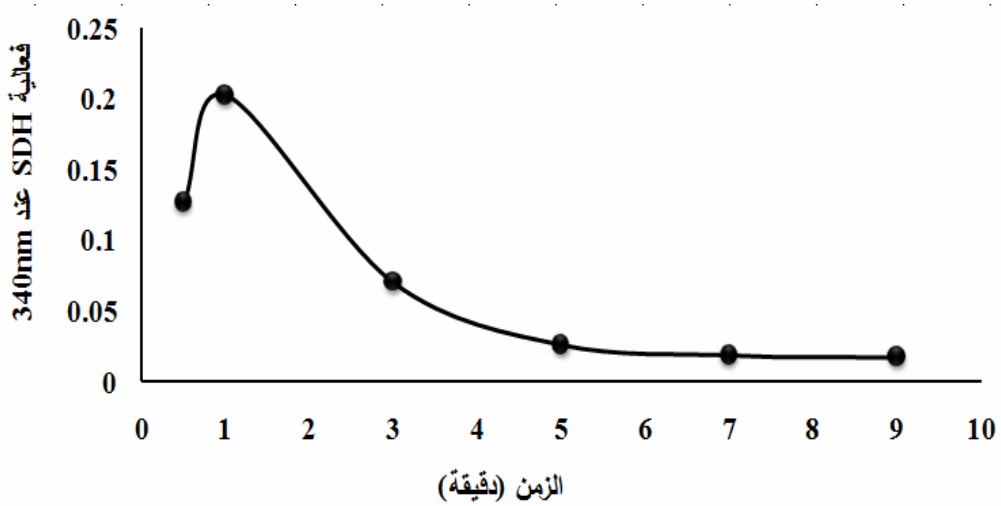
تحديد الظروف المثلى لعمل أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز (SDH): لغرض تحديد الظروف المثلى لعمل أنزيم (SDH) المنقى جزئياً من بلازما الدم أجريت التجارب الآتية:

تأثير تركيز الأنزيم: يبين الشكل (3) العلاقة بين فعالية الأنزيم وتركيز الأنزيم بثبوت العوامل الأخرى، حيث نلاحظ أن سرعة التفاعل الأنزيمي تزداد بزيادة تركيز الأنزيم. واستخدم تركيز (100 µg/ml) من الأنزيم تركيزاً ثابتاً في جميع التجارب اللاحقة وهذه النتائج تتفق مع تجارب الباحثين (Bravi *et al*., 1997).



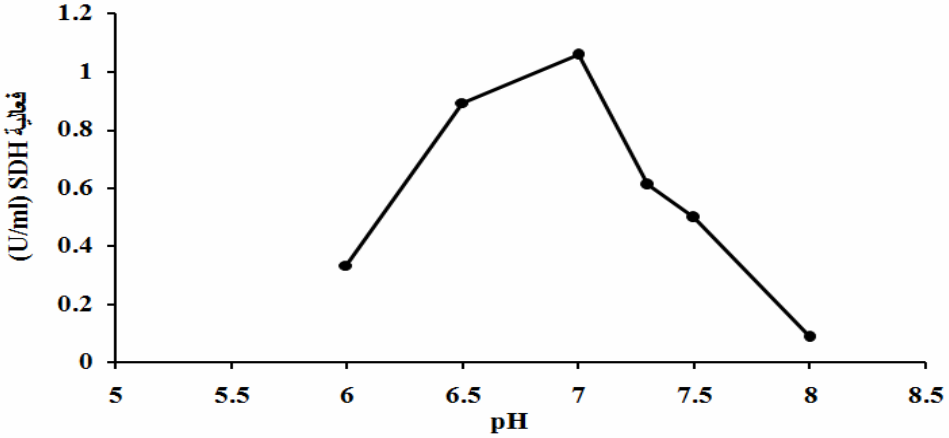
الشكل 3: تأثير التراكيز المختلفة من أنزيم (SDH) على الفعالية الأنزيمية

زمن التفاعل: تشير النتائج في الشكل (4) إلى أن أعلى فعالية لأنزيم (SDH) كانت عند الدقيقة الأولى من زمن التفاعل، وبمرور الزمن تنخفض الفعالية وقد يعزى ذلك إلى تشبع الموقع الفعال للأنزيم بالمادة الأساس، وقد تم اعتماد الدقيقة الواحدة في جميع التجارب اللاحقة.



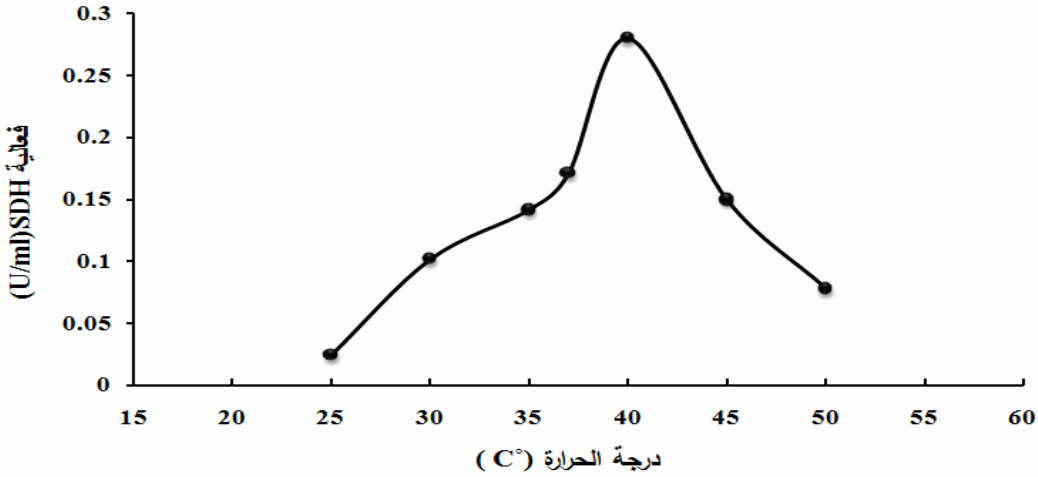
الشكل 4: تأثير زمن التفاعل على فعالية انزيم (SDH)

تأثير تركيز المحلول المنظم والاس الهيدروجيني: تشير النتائج في الشكل (5) إلى أن أعلى فعاليـة للأنـزيم كانت عند الأس الهيدروجيني (7) في المحلول المنظم (Triethanolamin -100 mM) وهذه النتائج تتفـق مـع الباحثين (Berg *et al*., 2007).



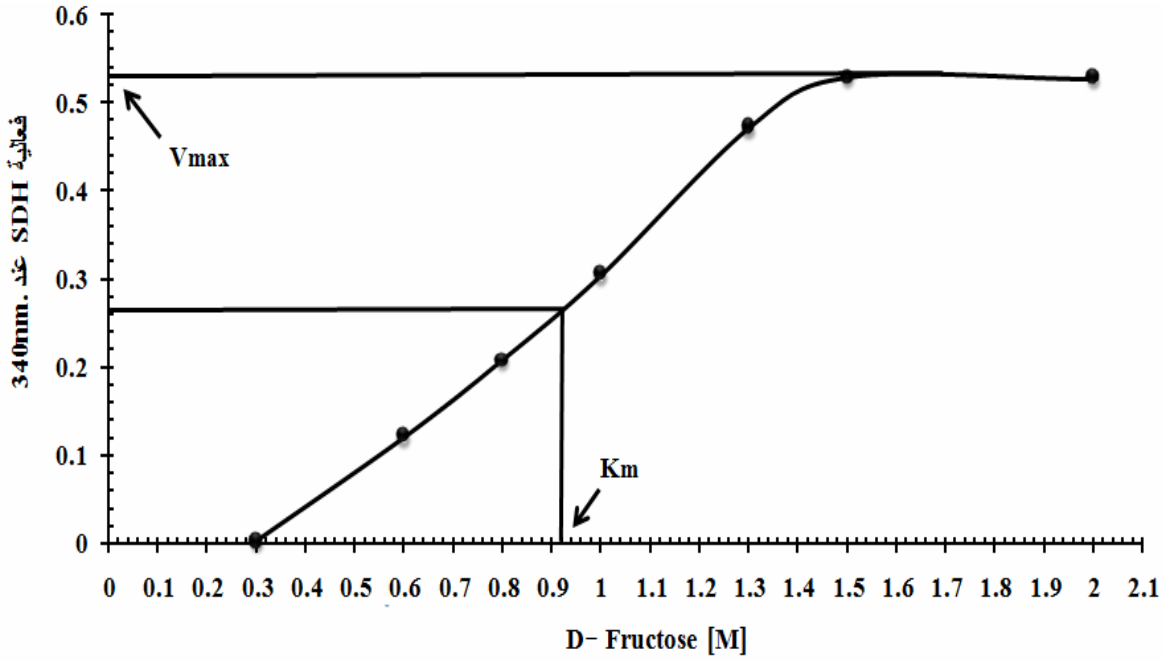
الشكل 5: تأثير الأس الهيدروجيني pH على فعالية انزيم (SDH)

4. تأثير درجة الحرارة: وجد أن درجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم هي (40°C)، وهذه النتائج تتفق مع النتائج التي حصل عليها الباحث (Jonathan, 1995) وكما هو موضح في الشكل (6).



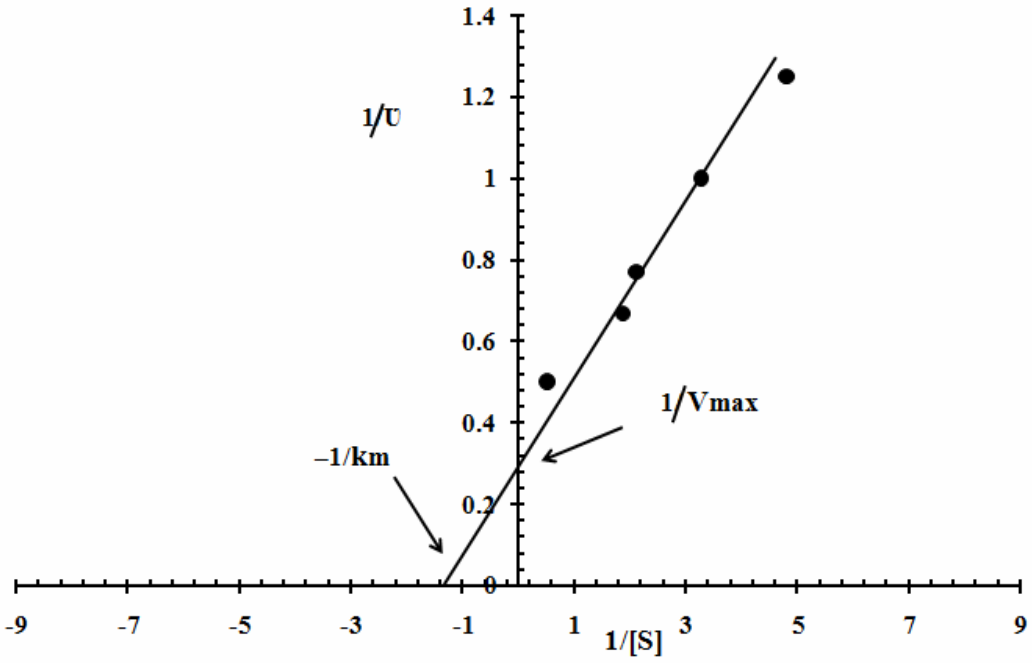
الشكل 6: تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم (SDH)

5. تأثير تركيز مادة الأساس: درس تأثير تركيز مادة الأساس على فعالية الأنزيم. ويوضح الشكل (7) إن تشبع الأنزيم بمادة الأساس (D -Fructose) حدث عند استخدام تركيز(1.5M) من مادة الأساس.



الشكل 7: تأثير تركيز المادة الاساس (D -Fructose) على فعالية انزيم (SDH)

وباستخدام رسم لاينويفر- بيرك (Lineweaver-Burk plot) وجد أن قيمة السرعة القصوى (Vmax) وثابت ميكيلس (Km) لانزيم (SDH) هي (0.53 مايكرومول/دقيقة) و (0.92 مولاري) على التوالي.

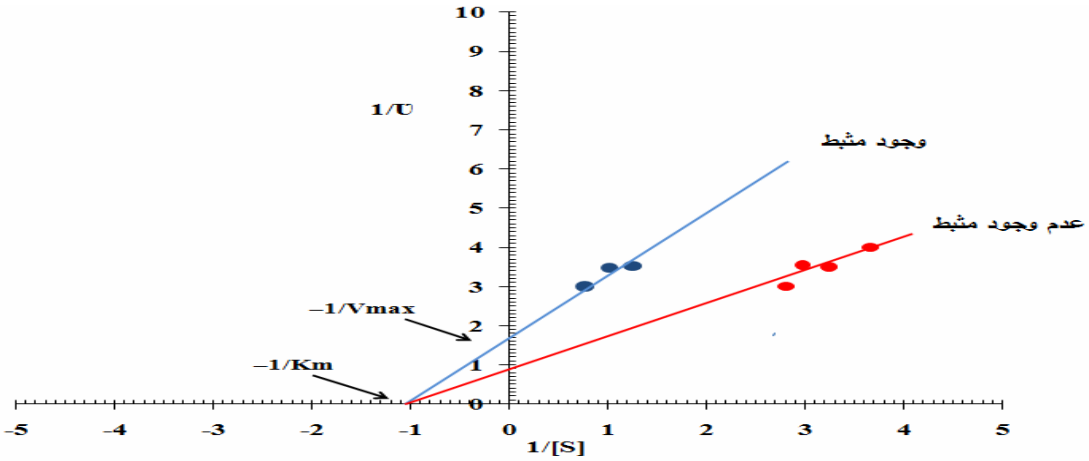


الشكل 8 : رسم لاينويفر- بيرك يوضح قيم K_m و V_{max}

تأثير بعض المركبات الكيميائية على فعالية الانزيم: تمت دراسة تأثير بعض المركبات الكيميائية على فعالية أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز (SDH)، وقد لوحظ مـن الجدول (3) انخفاض فعالية أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز (SDH) عند إضافة مادة فلوريد الصوديوم NaF بتركيز(3mM) بشكل كبير، لذلك أعتمد هذا التركيز لمعرفة نوع التثبيط، ويوضح الشكل (9) أن التثبيط كان من النوع غير التنافسي (Uncompetitive inhibition) (Dooley *et al*., 1979).

الجدول 3: تأثير بعض المواد الكيمياوية على فعالية أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز(SDH)

المركبات الكيميائية (المنشطة)	التركيز(L)	فعالية الأنزيم (U/ml)	الفعالية %
Zn metal	0.1	0.25562	25.562
	0.3	0.30868	30.868
	1	0.47749	47.749
	5	0.97611	97.611
	10	1.81350	181.350
Mg metal	0.1	0.29456	29.456
	0.3	0.39549	39.549
	1	0.98874	98.874
	5	1.01768	101.768
	10	1.18987	118.987
EDTA	1	2.68167	268.167
	3	3.77170	377.170
	5	5.54180	554.180
	7	6.61254	661.254
المركبات الكيميائية (المثبطة)	**التركيز(L)**	**فعالية الأنزيم (U/ml)**	**الفعالية %**
NaF	1	280.2	77.260
	3	0.242	66.301
	5	0.250	68.493
	7	0.262	71.780



الشكل 9: رسم لاينويفر- بيرك، يوضح تأثير المثبط (NaF) بتركيز (3 mM) على فعالية الأنزيم

والقيم أدناه في الجدول (4) تمثل الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم السوربيتول ديهيـدروجينيز(SDH) المنقـى جزئياً من بلازما شخص سليم.

الجدول 4: الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم (SDH) المنقى جزئياً من بلازما شخص سليم

تركيز الأنزيم (µgm/ml)	زمن التفاعل (min)	الأس الهيدروجيني (pH)	درجة الحرارة (˚C)	تركيز المادة الأساس (M)
100	1	7	40	1.5

المصادر

Berg, J.M.; Tymoczko, J.L. ; Stryer, L. (2007). "Biochemistry". W. H. Freeman and Company. New York, USA. pp.138, 139, 145, 146.

Bravi, M.C.; Pietrangeli, P.; Laurenti, O.; Basili, S.; Cassone-Faldetta, M.; Ferri, C.; De Mattia, G. (1997). Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, **46**, 1194–1198.

Bron, A.J.; Sparrow, J.; Brown, N.A.; Harding J.J.; Blakytny, R. (1993). The lens in diabetes. Eye lond. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health.* **7**(2), 260-75.

Burtis, N.R.J.; Ashwood, E.R. (1999). "Tietz Textbook of Clinical Chemistry". 3rd ed. W.B. Saunders Company, USA. pp. 490-491, 1000-1025.

Casslen, B.; Nilsson, B. (1984). Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am J. Obstet Gynecol*, **150**, 877–88.

Dooley, J.F.; Turnquist, L.J.; Racich, L. (1979). "Kinetic Determination of Serum Sorbitol Dehydrogenase Activity with a Centrifugal Analyzer". American Association of Clin. Chem. **25** ed., 2026 p.

Dunlop, M. (2000). Aldose reeducates and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidnery International*, **77**, S3**.**

Finn, G.; Hanne, B.M.; Birgitte, A.; Lars, Th.; Soren, N.; Lars, J.J.; Niels-Henrik ; Holstein-Rathlou (2003). Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. *Histochem. Cell Biol*., **119**,139–148

Gerlach, U.; Hiby, W. (1974). "Sorbitol Dehydrogenize, In: Methods of Enzymatic Analysis". 2nd ed., pp. 569-573 (Bergmeyer, H.U.,VCH, Weinheim, FRG.

Jeffery, L.; Jornvall, H. (1988). Sorbitol dehydrogenize. *Adv. Enron of Relate Areas Mol. Biol.*, **61**, 47-106.

Jonathan, J.; John C.; Colin, M.P.; Sadler, J.; Hans J. (1995). "Microbiology". Printed in Great Britain. Polyol Metabolism of Rhodobacter Sphaeroides. pp.141, 1857-1 863.

Kenneth, N.G.; Ruiqiong, Y.E.; Xu-Chu, W.U.; Sui-Lam; Wong, S. (1992). Sorbitol dehydrogenase from bacillus subtilis purification, characterization, and gene cloning. *J. Biol. Chem*. By The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. **175**, 1073-1080

Mikkelsen, S.R. (2004). "Bioanalytical Chemistry". John Wiley and Sons Inc. Hoboken, New Jersey in the United states of America.

Ohta, K.R.; Moriguchi, K.; Kanahama, S.; Yamaki, Y. (2005). Kanayama Molecular evidence of sorbitol dehydrogenize in tomato, a non-Rosaceae. *Plant Phytochem.*, **66** , 2822−2828.

Pakuts, A.P.; Whitehouse, L.W.; Paul, C.J. (1988). "Health Protection Branch, Bureau of Drug Research, Drug Toxicology Division". Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario, Canada.

Plummer, T.D. (1978). An introduction to practical biochemistry. 2nd ed., McGraw-Hill Book Comp., U. K.

Rellos , M.P.; Cox, T.M. (1998). Hereditary, fructose intolerance. *J. Medical Genetics*. **35**, 353.

Robert, F.J.; White, J.B. (1987). "Biochemical Techniques Theory and Practice". Books / Cole Publishing Com., USA.

Schacterle, G.R.; Pollack, R.L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. *Anal. Biochem.*, **51**, 654-655.

Wiley, J.; Ltd, S. (2005). "Protein Expression, Purification and Characterization. Proteins". Structure and Function. Chapter **9**. pp. 1160–1167.

Verbeuren, T.J.; Vanhoutte, P.M. (1976). Acetylcholine inhibits potassium evoked release of 3H-norepinephrine in different blood vessels of the dog. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther*. **221**, 347-350.