۱۳۸۰ /۶/ ۶

دانشگـاه تهـران

مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک (IBB)

پایان نامه:

برای دریافت درجهٔ دکتری (Ph.D) در رشته بیوشیمی

عنـــوان:

پایدار سازی آنزیم‌های الکل دهیدروژناز

(Yeast و T. brockii)

توسط پلی‌اُل‌ها و حلال‌های آلی

۱۲۶۳۱
۳۵۹۳۳

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر محسن نعمت گرگانی

تحقیق و نگارش:

مهران میراولیائی

(بهار ۱۳۸۰)

بسم اللّه الرّحمن الرّحیم

سپاس و ستایش مرخدایراکه اوّلین فرمانش به برگزیدهٔ عالم آفرینش و گُل سرسبد اولاد آدم یعنی رسول گرامی اسلام حضرت محمّدبن عبداللّه (ص) با جمله «اِقْرَأ بِأسْمِ رَبّکَ» آغاز و آن رسول بزرگوار و مدینه علم، انسانها را از تولّد تا مرگ به فراگیری دانش توصیه و برتری علماء بر جهّال را از کلام ربّ‌العالمین آنجا که در قرآن مجید می‌فرماید «هَلْ یَسْتَوِی الَّذِینَ یَعلَمؤنَ وَ الَّذِینَ لا یَعْلَمونْ» به نوع بشر تذکر فرمودند.

صلوات و درود خدا بر رسول بشیر و نذیر و اوصیاء گرامیش که بسیاری از علوم بشری مرهون بعثت پر خیر و برکت آن نبیّ گرامی و اولادان بزرگوارش می‌باشد.

به پیشگاه بَقیّة اللّه الاعظم منجی عالم بشریّت نیز با کمال خضوع و خشوع بهترین درود و سلام را تقدیم می‌دارم باین امید که دعای خیر آن بزرگوار پشتوانه همه علماء و دانشمندان و دانش پژوهان این سرزمین که قصد خدمت دارند واقع گردد.

سلام و تحیّت به پیشگاه پدر و مادر ارجمندم و کلیّه اساتیدی که از ابتدا تاکنون مرا بخواندن واداشتند و همچون مشعل فروزانی فراراه من قرارگرفتند و قلبم را با نور معرفت خداوندی و شناختی هر چند ابتدایی از علوم منوّر گردانیدند، تا جائیکه هم اکنون دریافته‌ام که در آغاز راهم و سعی دارم تا هر چه بیشتر از دانش این عزیزان در طریق خیر رسانی به همنوعانم بهره گرفته و در وادی تاریک و بی انتهای هستی همچون خود آن بزرگواران به تکاپو بپردازم.

وظیفه خود می‌دانم که از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر گرگانی که کریمانه دستم راگرفت و تا این مرحله از تحصیلات عالی با بذل بهترین عنایات و توجّهات به راهنمائی و ارشادم پرداخت سپاسگزاری نمایم تا مصداق «مَنْ لَمْ یَشْکُرِالنّاسَ لَمْ یَشْکُرِ الخالِق» نباشم. چه او بود که شعله‌هایی را در فضای تاریک و مبهم ذهن و دلم برافروخت.

از همسرم که با داشتن دو فرزند صبورانه درکنار من بسر آورد و بسیاری از کاستیها را تحمل کرد تا من توانستم تحصیلاتم را با موفقیّت به اتمام برسانم نیز کمال تشکر و امتنان را دارم و برای او در تربیت فرزندانی صالح و سالم و عالِم از خداوند رحمان آرزوی موفقیت می‌نمایم.

از خداوند سبحان مسئلت دارم تا در آینده نیز مرا مدد نماید و در راه خدمت به هموطنانم بویژه جوانان عزیز، سرمایه‌های ارزشمند این سرزمین یاری فرماید.

والسّلام - مهران میراولیائی

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک
۲۵۹۳۳

تقدیم به

همسر فداکارم

و فرزندان عزیزم شمیم و شکیب که با صبر و بردباری خود، مرا در انجام این مهم یاری نمودند.

تشکر و قدردانی

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر محسن نعمت گرگانی که در طی سال‌های اجرای این پایان‌نامه، همواره مشوّق و راهنمای من بودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

همچنین از اعضاء هیأت محترم داوران؛
سرکار خانم دکتر ربانی
جناب آقای دکتر موسوی موحدی
جناب آقای دکتر فرزامی
جناب آقای دکتر قائمی
جناب آقای دکتر علاّمه
جناب آقای دکتر کیهانی
که زحمت مطالعه، ارزیابی و داوری رساله را تقبل فرمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از دوست و برادر ارجمندم جناب آقای دکتر بیژن رنجبر بخاطر همکاری صمیمانه و بی‌دریغشان و زحمتی که در تهیه طیف‌های CD متحمل شدند، صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر شاهرخ صفریان به خاطر زحماتی که در تهیه طیف‌های فلورسانس متحمل شدند، بسیار متشکرم.

از جناب آقای مصطفی رضائی طاویرانی که در بخش DSC با من همکاری نمودند، بسیار سپاسگزاری و قدردانی می‌نمایم.

از همکاران و دانشجویان عزیز آزمایشگاه مواد حیاتی که محیطی صمیمی و دوستانه را در آزمایشگاه به وجود آوردند و به ویژه سرکار خانم عطیه قاسمی که در انجام امور تحقیقات مرا یاری نمودند کمال سپاسگزاری و امتنان را دارم و توفیق روزافزون آنها را از درگاه خداوند متعال مسئلت می‌نمایم.

از همکاری و همراهی کلیه کارمندان و پرسنل صمیمی مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

چکیده:

دستیابی به آنزیم‌های مقاوم یکی از اهداف مهم صنایع بیوتکنولوژی است. استراتژی‌های متنوعی برای پایدار نمودن آنزیم‌ها در ادبیات بیوشیمی گزارش شده است. اصلاح محیط نگهداری آنزیم‌ها توسط مواد بیولوژیکی و شیمیائی و استفاده از حلال‌های آلی بجای آب، از جمله این روش‌ها است. در تحقیق حاضر، چگونگی پایدار سازی آنزیم‌های مزوفیلیک و ترموفیلیک الکل دهیدروژنازهای استخراج شده از *yeast* (YADH) و *T.brockii* (TBADH) توسط پلی‌اُل‌ها و حلال‌های آلی مختلف بررسی شده است. فرآیندهای شناخته شده اکسیداسیون گروههای تیول، توده شدن و دآمیداسیون، در جریان غیر فعال شدن بازگشت ناپذیر حرارتی فرم‌های - holo و apo-YADH و نیز TBADH در حضور چهار قند تری‌هالوز، سوکروز، مانیتول و سوربیتول مطالعه گردید. با خارج کردن انتخابی Zn^{2+} ساختمانی و حفظ Zn^{2+} کاتالتیک در آنزیم YADH فرم apo آن تهیه شد. نتایج مشخص نمود که تقریباً همه قندهای نامبرده توانسته‌اند هر دو آنزیم را در مقابل فرآیندهای مخرب ذکر شده حفاظت نمایند. بررسی تغییرات ساختارهای دوم و سوم آنزیم‌های مورد مطالعه به روش CD ، نقش حفاظتی قندها را تأیید نمود. بر این اساس پیشنهاد گردید که احتمالاً قندها دارای خصوصیات مشابه Chaperone ها هستند و در عین حال می‌توانند ترکیبات مناسبی برای به دام انداختن حالت molten-globule برخی پروتئین‌ها محسوب شوند.

مطالعه رفتار آنزیم‌ها در محیطهای غیر آبی نیز از جمله روش‌های نیل به آنزیم‌های پایدار محسوب می‌شود. رفتار هر دو آنزیم الکل دهیدروژناز ترموفیلیک و مزوفیلیک، با ارزیابی فعالیت و پایداری آنها، در حلال‌های مختلف، مورد بررسی قرارگرفت. مشخص گردید که حلال‌های آلی غیر قطبی، استفاده شده در ارتقاء مقاومت هر دو آنزیم نسبت به گرما، کاندیدهای بهتری هستند. در این زمینه از معیار شناخته شده $\log P$ ، در انتخاب حلال مناسب‌تر استفاده گردید. مطالعات تغییر کنفورماسیون به روش فلورسانس و نیز بررسی رفتار سینتیکی آنزیم‌های مورد مطالعه، تأیید نمود که دی‌متیل‌فرم‌آمید و دی‌اکسان به عنوان حلال‌های قابل امتزاج با آب، می‌توانند باعث مهار و یا اعمال تغییرات ساختمانی در آنها شوند. براساس یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که روش «مهندسی حلال یا محیط نگهداری» می‌تواند نوعی استراتژی کارآ و مکمل درکنار روش‌های «مهندسی ژنتیک» و سایر روش‌های پایدار سازی آنزیم‌ها محسوب شود.

Abbreviations:

ADH	Alcohol dehydrogenase
YADH	*Yeast* alcohol dehydrogenase
TBADH	*Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase
CBADH	*Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase
HLADH	*Horse liver* alcohol dehydrogenase
GDH	Glutamate dehydrogenase
PAR	4-(2-pyridylazo)resorcinol
E. Coli	*Escherichia Coli*
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADV	Nicotinamide adenine dinucleotide vanadate
DTT	Dithiothreitol
DMF	Dimethylformamide
Gdn-HCl	Guanidin Hydrochloride
ANS	8-Anilino-1-Naphthalene Sulfonic acid
KPB	Kaliumphosphate buffer
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
CD	Circular dichroism
DSC	Differential scanning calorimeter

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول - مقدمه

- پایداری، فولدینگ و دناتوراسیون پروتئین‌ها ۲

۱-۱- پیش‌گفتار ۱

۱-۲- روش‌های مطالعه پایداری پروتئین‌ها ۴

۱-۳- پایداری ترمودینامیکی و پایداری سینتیکی ۷

۱-۳-۱- پایداری ترمودینامیکی ۱۱

۱-۳-۲- پایداری سینتیکی ۱۲

۱-۴- بررسی مکانیسم‌های غیر فعال شدن -گرمائی پروتئین‌ها ۱۳

۱-۴-۱- توده شدن و راسب شدن ۱۶

۱-۴-۲- تخریب شیمیایی ۱۷

۱-۴-۳- بازتاخوردگی ناقص ۲۰

۱-۵- روش‌های پایدار سازی پروتئین‌ها ۲۱

۱-۵-۱- پایدار سازی حالت (N) ۲۱

۱-۵-۲- رهاسازی از فشار ۲۳

۱-۵-۳- ناپایدار سازی حالت (U) ۲۵

۱-۵-۴- تغییر شیمیائی ۲۷

۱-۵-۵- مواد حل شونده و افزودنی‌ها ۲۸

۱-۵-۶- مکانیسم پایدارکنندگی مواد افزودنی ۳۴

۱-۵-۷- پایدار سازی توسط محیط‌های غیر آبی ۳۵

- الکل دهیدروژناز *Saccharomyces Cerevisiae* ۳۸

۱-۶- کلیات ۳۸

عنوان | صفحه

۷-۱- نقش اتم‌های روی در آنزیم‌های الکل دهیدروژناز ۴۰
۸-۱- مشخصات ساختمان الکل دهیدروژناز مخمر (YADH) ۴۳
- الکل دهیدروژناز *Thermoanaerobacter brockii* ۴۹
۹-۱- مشخصات الکل دهیدروژناز ترموفیلیک TBADH ۴۹
۱۰-۱- مقایسه TBADH با سایر آنزیم‌های الکل دهیدروژناز ۵۱
۱۱-۱- تشریح ساختمان TBADH ۵۵
۱۲-۱- عوامل ساختاری پایدارکننده TBADH ۶۰
۱-۱۲-۱- آلفاهلیکس‌ها ۶۰
۲-۱۲-۱- بررسی سطح و نواحی سطح بین زیرواحدها ۶۲
۳-۱۲-۱- پیوندهای هیدروژنی ۶۴
۴-۱۲-۱- اسیدهای آمینه پرولین در TBADH ۶۵
۵-۱۲-۱- استقرار عناصر پایدار سازنده ۶۷
۶-۱۲-۱- شبکه مزدوج یون‌ها ۷۰
۷-۱۲-۱- جمع‌بندی ۷۱
۸-۱۲-۱- چشم‌انداز جنبه‌های کاربردی آنزیم‌های الکل دهیدروژناز ۷۲

فصل دوم - مواد و روش‌ها

۱-۲- مواد ۷۶
۲-۲- روش‌ها ۷۶
۱-۲-۲- تهیه apo - YADH ۷۹
۳-۲-۲- تعیین محتوی روی ۸۰
۴-۲-۲- القاء خروج یون‌های روی توسط HOCl ۸۰

عنوان | صفحه

۵-۲-۲- تعیین مقادیر T_m ۸۱
۶-۲-۲- بررسی توده شدن (aggregation) حرارتی ۸۱
۷-۲-۲- تعیین مقدار آمونیاک ۸۲
۳-۲- تعیین ساختمان دوم و سوم به روش CD ۸۳
۴-۲- بررسی پایداری به روش میکروکالریمتری ایزوترمال ۸۴
۵-۲- مطالعات کالریمتری DSC ۸۴
۶-۲- طیف سنجی فلورسانس در بررسی کنفورماسیون ۸۵
۷-۲- مطالعه اثر پروتئازها ۸۶
۸-۲- الکتروفورز ۸۷
۹-۲- مطالعه اثر حلال‌های آلی ۸۷

فصل سوم - نتایج

۱-۳- پیش‌گفتار ۹۱
۲-۳- پایداری YADH و اثر قندها ۹۲
۳-۳- اکسیداسیون حرارتی YADH ۹۷
۴-۳- توده شدن (aggregation) حرارتی YADH ۱۰۲
۵-۳- دآمیداسیون YADH ۱۰۴
۶-۳- تأثیر دما بر فعالیت YADH ۱۰۸
۷-۳- مطالعات میکروکالریمتری ۱۱۱
۸-۳- پایداری حرارتی TBADH و تأثیر قندها ۱۱۶
۹-۳- فرآیندهای غیر فعال کننده حرارتی و اثر قندها بر TBADH ۱۲۱
۱۰-۳- تأثیر دما بر فعالیت TBADH ۱۲۵
۱۱-۳- بررسی اثر قندها بر پایدارسازی آنزیم‌های ترموفیلیک و مزوفیلیک الکل دهیدروژناز در مقابل تریپسین ۱۲۷

عنوان	صفحه

۱۲-۳- بررسی ساختار دوم الکل دهیدروژناز و اثر قندها ۱۳۲

۱۳-۳- بررسی ساختار سوم الکل دهیدروژناز و اثر قندها ۱۴۰

۱۴-۳- رفتار آنزیم‌های TBADH و YADH در حلال‌های آلی ۱۴۴

۱۵-۳- اثر حلال‌های قابل امتزاج با آب ۱۴۷

۱۶-۳- فعالیت کاتالتیک آنزیم‌های ADH در محلول‌های مائی - آلی ۱۵۲

فصل چهارم - بحث و نتیجه‌گیری ۱۵۷

فصل پنجم - منابع و مآخذ ۱۶۶

فصل اول

مقدمه

«پایداری، فولدینگ و دناتوراسیون پروتئین‌ها»

۱-۱- پیش‌گفتار

در آینده‌ای نه چندان دور شاهد کاربرد هر چه گسترده تر آنزیم‌ها و بیوکاتالیزورها در توسعه فرآیندهای نوین صنعتی خواهیم بود. این امر مرهون شناخت روزافزون و دقیق تر علل و عوامل ناپایدارکننده و شیوه‌های مقاوم سازی آنزیم‌ها است. بر این اساس امروزه شاهد توجه روزافزون پژوهشگران به چگونگی بهره‌برداری از آنزیم‌ها در صنایع متعدد از قبیل صنایع داروسازی، کشاورزی، مواد غذائی، نساجی، چرم، مواد آرایشی و ... هستیم. موانع گوناگون سرعت پیشرفت بهره‌برداری از آنزیم‌ها را در صنعت محدود نموده است. لذا محققین علاقمند به این بخش از دانش آنزیمولوژی، در صدد ارائه شیوه‌های مناسب و کارآمد در این زمینه هستند. روش‌های گوناگونی برای فائق آمدن بر موانع کاربردی آنزیم ها پیشنهاد شده است. استفاده از روش‌های شناخته شده از قبیل تثبیت آنزیم‌ها و روش‌های نوین دستورزی محیط نگهداری آنزیم توسط مواد افزودنی و حلال های آلی و همچنین بهره‌گیری از آنزیم‌هائی که به طور طبیعی پایدار هستند به عنوان شیوه‌های مناسب پایدار سازی آنزیم‌ها گزارش شده‌اند. از طرفی دستیابی به منابع جدیدی از آنزیم‌ها که از میکروارگانیسم‌های افراط گرا (Extremophile) و یا فوق افراط گرا (Hyperextremophile) استخراج می‌شوند، افق‌های روشنی را در زمینه بهره‌برداری‌های کاربردی آنزیم‌ها نمایان ساخته است. ساختمان این گونه آنزیم‌ها به طور طبیعی برای زیست در شرایط غیر عادی طراحی و سازش پیدا کرده است. در این خصوص مقایسه ساختمان و عمل آنزیم‌های ترموفیلیک (Thermophilic) یا سایکروفیلیک (Psychrophilic) با همتای مزوفیل

آنها می‌تواند به شناخت اصولی که طبیعت برای مقاوم سازی پروتئین‌ها به کار برده است کمک نماید. بدین ترتیب زمینه برای حصول شیوه‌های جدید مقاومت بخشیدن به آنزیم‌های نرمال فراهم گردیده و اهمیت موضوع از جنبه آکادمیک روشن می‌شود. لذا مقوله پایداری و نیز مقاوم‌سازی پروتئین‌ها هدف اصلی دانش مهندسی پروتئین و از هر دو نقطه نظر آکادمیک و کاربردی در نزد محققین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [5-1].

اصطلاح "مقاومت" یا "پایداری" پروتئین‌ها به ثبات آنها در برابر تنش‌های فیزیکی یا شیمیائی از قبیل گرمای زیاد، دناتوره کننده‌ها، دترژانت ها و ... اشاره دارد، این بدان معناست که پروتئین‌ها (آنزیم‌ها) در مواجه با شرایط و عوامل مخرب بر حفظ تمامیت مولکولی و عملکرد بیولوژیکی خود بتوانند وفادار باقی بمانند. در مواردی که احتیاج به حفظ عملکرد یک پروتئین در کوتاه مدت است، مثل فاکتورهای انعقاد خون یا انسولین، حساسیت موضوع روشن‌تر می‌شود. حتی پایداری بسیار بیشتری برای پروتئین‌هایی که به عنوان محصولات بیوتکنولوژی و یا در فرآیندهای مهم از قبیل داروسازی، تشخیص طبی، راکتورهای بیولوژیکی، مواد شیمیائی حساس و یا بیوسنسورها (Biosensors) تولید می‌شوند، مورد نیاز است. در بسیاری از این موارد طول عمر مفید محصول بر حسب ضرورت باید چندین ماه و یا حتی چندین سال در نظرگرفته شود.

پروتئین‌ها به دلیل ملزومات فیزیولوژیکی، مولکول‌هایی ناپایدار هستند. آنها حداکثر تکامل را به منظور هماهنگ شدن با شرایط ویژه فیزیولوژیکی محیط خود پیدا نموده‌اند. از طرفی این امکان وجود دارد که آنها را برای مدت زمان طولانی پایدار نمود. به علاوه پروتئین‌های پایدار، قابلیت استفاده در دماهای بالاتر را دارند. لذا پایدار سازی یکی از متداول‌ترین روش‌های مرسوم در جهت ارتقاء عملکرد پروتئین‌ها (آنزیم‌ها) محسوب می‌شود. در این خصوص لازم است شیمی فیزیک پروتئین‌ها و به ویژه نیروهای شرکت کننده در استحکام بخشیدن به آنها را مطالعه

نمود. همچنین باید درباره ساختمان طبیعی (Native) و نیز دناتوره (Denatured) شده آنها شناخت کامل بدست آورد. به دلیل پیشرفت‌هایی که اخیراً در زمینه بیولوژی ساختمانی بدست آمده است، اطلاعات بیشتری در خصوص ساختار طبیعی پروتئین در دسترس می‌باشد، در حالی که دانش کمتری درباره حالت دناتوره شده آنها وجود دارد. مشخص شده است که حتی در حالت دناتوره، برخی کنفورماسیون‌های پروتئین تا حدی حفظ می‌شوند [6] . در ادبیات بیوشیمی گزارشهای ضد و نقیضی در خصوص پایدار نمودن پروتئین‌ها وجود دارد، که علت آن مربوط به گوناگونی روش‌های ارزیابی پایداری آنها است.

۲-۱- روش‌های مطالعه پایداری پروتئین‌ها

استراتژی‌های متعددی به منظور ارزیابی و تحقیق در زمینه پایداری پروتئین‌ها وجود دارد. بررسی این استراتژی‌ها در تصریح وقایع مولکولی و شیمیائی که طی فرآیند دناتوراسیون رخ می‌دهند، بسیار مؤثر است. شیوه‌های مبتنی بر مطالعه آنزیم‌های ترموفیلیک با ویژگی‌های غیر عادی (مانند مقاومت زیاد آنها در برابر تنش‌های فیزیکی و شیمیائی)، همچنین مطالعات در زمینه فرآیند دناتوراسیون پروتئین‌ها و ارزیابی رفتار آنزیم‌ها در محیطهای غیر آبی، از جمله استراتژی‌های تحقیق در زمینه پایدار سازی پروتئین‌ها محسوب می‌شوند. معیارهایی که برای اندازه‌گیری یا مقایسه پایداری استفاده می‌شوند عبارتند از: اندازه‌گیری دمای ذوب (T_m) ، اندازه‌گیری مقادیر انرژی آزاد بین اشکال طبیعی و دناتوره شده، تخمین دمای حداکثر پایداری (T_s) و ارزیابی فعالیت فونکسیونل در یک دمای معین. مشخصات مربوط به هر کدام از پارامترهای مذکور در جدول (۱) آمده است.

Pace روش‌های تعیین پایداری کنفورماسیون پروتئین‌های کروی را توضیح داده است [7].

جدول (۱) : مشخصات پارامترهای اندازه‌گیری و ارزیابی پایداری پروتئین‌ها

پارامتر	کمیت اندازه‌گیری	تبعیت از فرآیند ۲ مرحله‌ای	نحوه تخمین پارامتر
T_m	دمای ذوب	خیر	انجام آزمایش
غلظت دناتورانت	غلظتی ازدناتورانت‌که ۵۰٪ بازشدگی را باعث می‌شود	خیر	انجام آزمایش
$\Delta G(H_2O)$	پایداری کنفورماسیون	آری	منحنی دناتوراسیون‌بازشدن
$\Delta G(25°C)$	پایداری کنفورماسیون	آری	منحنی‌دناتوراسیون‌حرارتی
T_s	دمای حداکثر پایداری	آری	منحنی پایداری
فعالیت نسبی (٪)	درصد فعالیت باقیمانده در زمان t	خیر	انجام آزمایش
اضمحلال تحریک شده	پیش بینی طول عمر فعال در دمای T	آری	منحنی آرنیوس

وی پایداری کنفورماسیون را به تغییر انرژی آزاد تحت شرایط معین برای واکنش N (پروتئین طبیعی تاخورده) به U (پروتئین دناتوره باز شده) یعنی یک سیستم دو مرحله‌ای مرتبط ساخته است. چگونگی محاسبه مقادیر انرژی آزاد از طریق آنالیز محلول‌های دناتورانت در غلظت‌های متفاوت [که با $\Delta G(H_2O)$ نشان داده می‌شود] و یا به کمک منحنی‌های دناتوراسیون به دست آمده در دماهای متعدد [که با $\Delta G(25°C)$ معرفی می‌شود] نیز شرح داده شده است [8]. در جریان این محاسبات باید به نحوهٔ کیفی و کمّی آزمایشات توجه دقیق نمود. زیرا انتقال داده‌های به دست آمده جهت تخمین انرژی‌های آزاد می‌تواند به مقادیر غیر قابل قبول با خطای زیاد منجر شود. منحنی‌های دناتوراسیون حرارتی، امکان تعیین دمای ذوب، T_m، همچنین تغییرات آنتالپی و آنتروپی در T_m را فراهم می‌کنند. دمای حداکثر پایداری، T_s (دمائی که در آن $S=0$ است) از