مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

فعالیت و پایداری آنزیم الکل دهیدروژناز در حضور نمک های سری کوزموتروپ و کائوتروپ

رسول شریفی[۱]، صالح سلیمانی[۲]، نازیلا امینی[۲]، احمد پناه آذری[۲]، سمیرا شریفی[۳]، سید محمد اطیابی[۴]، مهران میراولیائی[۵*]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران- ایران
[۲]کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران- ایران
[۳]کارشناس پرستاری، گروه علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرند- ایران
[۴]عضو هیئت علمی انستیتو پاستور، پایلوت بیوتکنولوژی تهران- ایران
[۵*]دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان- ایران

چکیده

سابقه و هدف: کاتالیز آنزیمی درمحلول های حاوی غلظت های بالای نمک در برخی حوضه های علوم کاربرد دارد. فعالیت و پایداری آنزیم الکل دهیدروژناز کبد اسب با سری هافمیستر و به اصطلاح ویژگی های کوزموتروپیک و کائوتروپیک که با ضریب ویسکوزیته B معادله جان - دول مشخص می شود رابطه تنگاتنگی دارد (B_+ برای کاتیون ها و B_- برای آنیون ها). در این مطالعه پایداری دمایی و فعالیت آنزیم در حضور این نمک ها مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه اثر غلظت های زیاد (۱-M۴) نمک های$NaAc, NaClO_4, Na_2SO_4, NaNO_3, NaCl$ و غلظت های (۱-M۳) نمک های KCl، NH_4Cl، CsCl بر فعالیت و پایداری آنزیم الکل دهیدروژناز کبد اسب (HLADH) بررسی گردید.

یافته ها: مشخص شد که هم فعالیت و هم پایداری آنزیم با تفاوت در ضرایب ویسکوزیته آنیون با کاتیون ارتباط دارد. در حضور نمک هایی که آنیون و کاتیون های آنها ویژگی های کوزموتروپیک و کائوتروپیک مشابهی دارند (NaAc و NaCl) فعالیت کاتالتیک آنزیم بهترین شرایط را نشان داد. ویژگی کوزموتروپیک – کائوتروپیک هم کاتیون ها و هم آنیون ها، بر فعالیت کاتالتیک آنزیم با اثر بر روی جایگاه فعال و مکانیسم کاتالتیک و pH سطحی آنزیم تاثیر می گذارد. آنیون ها در مقایسه با کاتیون ها نقش غالب تری بر پایداری آنزیم نشان دادند. آنیون استات پایداری دمایی بیشتر را القا نمود (از ۳۰۰ تا ۵۶۰ دقیقه در دمای ۶۰ °C) .

نتیجه گیری: مطالعه حاضر پیچیدگی تأثیر نمک های معدنی و یون ها روی فعالیت و پایداری الکل دهید روژناز کبد اسب را نشان داد. هر دو جنبه بطور مستقیم یا غیر مستقیم از اثرات هافمیستری تاثیر می پذیرد. مطالعه پایداری آنزیم الکل دهیدروژناز مثال دیگری می باشد که نشان داد آنیون های کوزموتروپیک و کاتیون های کائوتروپیک پایداری بالاتری را به آنزیم اعطا می کنند.

کلمات کلیدی: الکل دهیدروژناز کبد اسب، فعالیت و پایداری، سری هافمیستر، کوزموتروپیسیته و کائوتروپیسیته

مقدمه

مطالعات آنزیم شناسی معمولا در محلول های آبی رقیق، با قدرت یونی ۰/۳ M صورت می گیرد. اعتقاد بر این است که آنزیم ها در محلول های غلیظ نمکی ناپایدار می شوند. شاید این امر دلیلی بر مطالعات کمتر آنها در غلظت های بالاتر نمک است. آنزیم های هالوفیل در غلظت های بالای نمک مطالعه شده اند. به هر حال تعدادی از آنزیم های طبیعی در غلظت های بالای نمک کاملا فعال هستند، بطوریکه فعالیت این آنزیم ها در مقایسه با محلول نمکی رقیق بیشتر است (۲۱). کاتالیز آنزیمی درمحلول های حاوی غلظت های بالای نمک در برخی حوضه های علوم کاربرد دارد. در چنین سیستم هایی، فاز آبی

آدرس نویسنده مسئول : گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان- ایران
Email :mmiroliaei@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱۱/۱۹
تاریخ پذیرش:۹۱/۱۲/۲۳

معمولا غلظت بالاتری دارد و این غلظت با افزودن مقادیر زیاد نمک های معدنی فراهم می شود (۱۴,۱۸). اولین گزارش در ارتباط با فعالیت آنزیمی در چنین محیطی مربوط به ترمولایزین است که در غلظت۴ M ، NaCl کاملا فعال بود. سیستم های واکنشی دیگر، حاوی غلظت های بالای نمک و سوبسترا می باشند (۱۹). همچنین کاتالیز آنزیمی در غلظت های بالای نمک در صنایع غذایی اهمیت چشمگیری دارد (۱). استفاده از غلظت های بالای نمک مانع از انجماد نمونه های بیولوژیکی می شود. در مواردی دیگر غلظت های بالای نمک سبب رسوب مواد مضر و خارج شدن آنها از سیستم های بیولوژیکی می شود (۱۶). نمک های سری هافمیستر با ویژگی های کوزموتروپیک[1] و کائوتروپیک[2] یون ها مرتبط هستند. یون های شدیداً هیدراته به کوزموتروپ ها معروفند و آن دسته از یون هایی که به صورت ضعیف هیدراته می شوند کائوتروپ خوانده می شوند (۲). یون های حاصل از نمک های سری هافمیستر، به دو گروه salting-out و salting-in تقسیم می شوند (۱۶). یون های salting-out (آنیون های کوزموتروپ مثل فسفات، سولفات و کاتیون های کائوتروپیک مثل کاتیون های آمونیوم) پروتئین ها را پایدار کرده و نیز باعث رسوب آنها می شوند. در مقابل یون های salting-in (آنیون های کائوتروپ مثل آنیون های پرکلرات، برماید و کاتیون های کوزموتروپیک مثل کاتیون لیتیم) پروتئین ها را ناپایدار می کنند (۱۶). درغلظت های پایین نمک (تا سقف۰۱ M/0) یون ها غالبا از طریق برهم کنش های الکترواستاتیک روی آنزیم ها تاثیر می گذارند. هنگامی که در غلظت های زیاد نمک نیروهای انتشار یا پراکندگی یونی بر پتانسیل الکترواستاتیک فائق می آیند، اثر یون های هافمیستری اهمیت پیدا می کنند (۲). الکل دهیدروژنازها بیوکاتالیست های مفیدی برای احیاء کتون ها و آلدهیدها می باشند. نشان داده شده است که آنزیم الکل دهیدروژناز کبد اسب دارای پایداری و فعالیت بالایی است. این آنزیم کاندید مناسبی برای ارزیابی فعالیت کاتالتیک در غلظت های بالای نمک می باشد. الکل دهیدروژناز کبد اسب (EC.1.1.1.1؛HLADH) پروتئینی دایمر با وزن مولکولیkDa ۸۰ است که هر زیر واحد آن شامل ۳۷۴ آمینو اسید و دو دمین است. دمین ها توسط شکاف عمیق جایگاه فعال از هم جدا می شوند. یکی از دمین ها به کوانزیم NAD^+ متصل و دیگری به دو اتم Zn^{2+} متصل شده و مرکزکاتالتیک را تشکیل می دهند. یون Zn^{2+} جایگاه کاتالتیک در زیر پاکت عمیق، ما بین دو دمین واقع گردیده و با دو اتم سولفور Cys^{46} ، Cys^{174} و یک اتم نیتروژن His^{67} متصل است. مکانیسم مناسب برای اکسیداسیون الکل مکانیسم کاتالیز الکتروفیلی است که توسط اتم Zn^{+2} وساطت می شود و مولکول آب متصل به Zn^{+2} نقش حیاتی را در این مورد ایفا می نماید (۱۵). بر این اساس، در مطالعه حاضر تاثیر نمک های مختلف سدیم و کلردار در غلظت های بالاتر از M۱ بر فعالیت کاتالیتیک و پایداری آنزیم مذکور ارزیابی و ارتباط میان ضریب ویسکوزیته B با پارامترهای کاتالتیک آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، چگونگی روند تغییر فعالیت کاتالتیک آنزیم با ترتیب استقرار نمک های بکار رفته در سری هافمیستر نیز مورد بحث و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

آنزیم الکل دهیدروژناز کبد اسب، NAD^+ ۹۵٪، اتانول ۹۹٪ و نمک های استفاده شده از شرکت سیگما تهیه شدند. محلول آنزیمی با حل کردن mg۱ پودر آنزیم در حجم mL۱ بافرفسفات سدیم (M۱و۶ pH / ۸) تهیه گردید. محلول NADH در بافر Tris-HCl (mM۵و۶ pH /) ۸ تهیه شد. محلول های بافر/ نمک با حل کردن نمک های معدنی مختلف در بافر فسفات سدیم (M۱/۰ و ۶ /pH۸) تهیه گردیدند. پس از حل کردن نمک، pH محلول مجددا با استفاده از NaOH یا HCl در ۸/۶ تنظیم گردید.

ارزیابی فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم با تعقیب تشکیل NADH در دمای °C ۳۷ تعیین گردید. مخلوط واکنش حاوی Lμ ۹۴۰ اتانول و Lμ ۱۰ NAD^+ و Lμ ۵۰ آنزیم بود. افزایش در جذب nm ۳۴۰ (تشکیل NADH را نشان می دهد) با استفاده از Varian Cary 100 Spectrophptometer ثبت گردید. به منظور تعیین فعالیت آنزیم در حضور هر یک از نمک ها، سوبسترای آنزیم در غلظت های یاد شده از هر یک از نمک ها حل گردید. سرعت اوّلیه (V برحسب $molL^{-1}S^{-1}$) واکنش آنزیمی، از شیب نمودار جذب نور (OD) در مقابل زمان محاسبه گردید.

ارزیابی پایداری دمایی آنزیم

محلول آنزیمی به صورت جداگانه در بافر و نمک حل گردید. محلول رقیق شده این آنزیم فعالیت نداشت و از محلول استوک

۱- kosmotropic
۲ - chaotropic

آن استفاده گردید. محلول های آنزیمی تهیه شده در دماهای ۵۰ و ۶۰ °C انکوبه شدند. سپس ۵۰µL از محلول آنزیمی برای سنجش فعالیت در دمای ۳۷ °C استفاده شد. کاهش فعالیت وابسته به زمان، برای تعیین نیمه عمر محلول های آنزیمی استفاده شد.

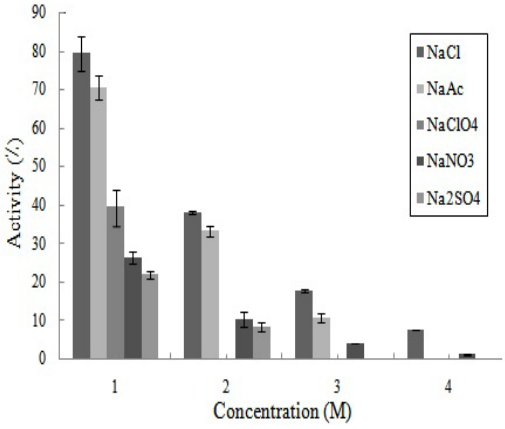
آنالیز آماری

آزمایش ها سه بار تکرار شدند. داده ها به صورت mean ± SD می باشند. آنالیز آماری با استفاده از واریانس یک طرفه آنوا به روش Tukey انجام گرفت. سطح معنی داری در حد $P<0.01$ می باشد.

نتایج

تاثیر نمک های سدیم بر روی فعالیت آنزیم

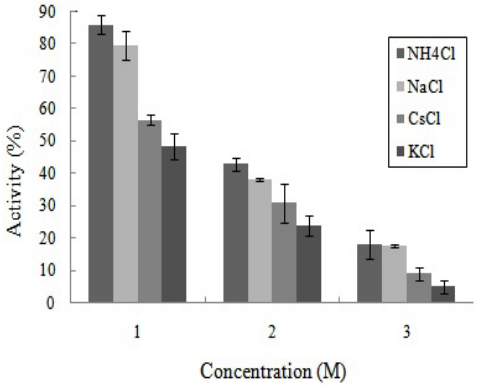
تاثیر نمک های سدیم با غلظت بالا (M۴ -۱)، بر روی فعالیت کاتالتیک آنزیم بررسی گردید، فعالیت آنزیم در محیط کنترل عاری از نمک به صورت صد در صد در نظر گرفته شد و در حضور نمک ها ی مختلف نسبت به محیط کنترل مقایسه گردید. آنزیم در غلظت M ۴ نمک های کلرید سدیم و استات سدیم فعالیت خود را حفظ کرده و در حضور نیترات سدیم بیشترین مقدار کاهش را نشان می دهد (شکل۱).



شکل ۱ – تاثیر نمک های سدیم در غلظت های مختلف بر روی فعالیت آنزیم (درصدها در مقایسه با کنترل می باشند)

تاثیر نمک های کلر بر روی فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم در حضور نمک های کلر ارزیابی گردید. محدوده غلظت برای این نمک ها M۳ -۱ بود. آنزیم در حضور دو نمک کلرید سدیم و کلرید آمونیوم نسبت به کلرید سزیم و کلرید پتاسیم بیشترین فعالیت را داشته (شکل ۲) و در غلظت های بالا نیز فعالیت حفظ گردید.



شکل ۲ – تاثیر نمک های کلر در غلظت های مختلف بر روی فعالیت آنزیم

بررسی پایداری آنزیم

فعالیت آنزیم در حضور غلظت های M۱ نمک های سدیم و کلر و در دو دمای ۵۰ و ۶۰°C تعقیب و نیمه عمر آن تعیین گردید. تاثیر حفاظت کنندگی نمک ها در حفاظت آنزیم در دماهای بالاتر محسوس تر است. نتایج حاصل از پایداری آنزیم در حضور نمک ها و نیمه عمر آنزیم در دو دمای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.

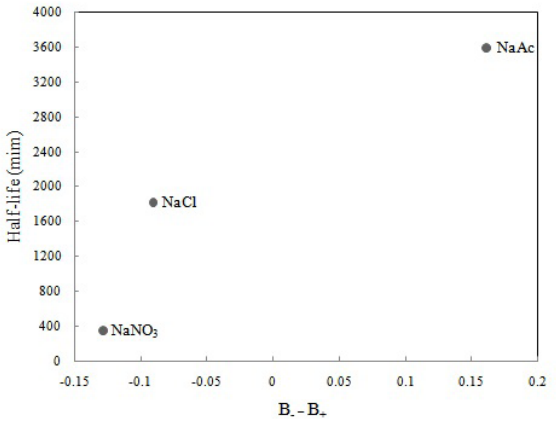
جدول ۱ – نیمه عمر آنزیم در حضور غلظت یک مولار نمک ها و در دو دمای مختلف

نمک	نیمه عمر در دمای °C ۵۰ (دقیقه)	نیمه عمر در دمای °C ۶۰ (دقیقه)
کنترل*	۱۳۵۰	۳۰۰
$NaNO_3$	۳۵۰	۷۰
NaCl	۱۸۲۰	۴۰۰
NaAc	۳۶۰۰	۵۶۰

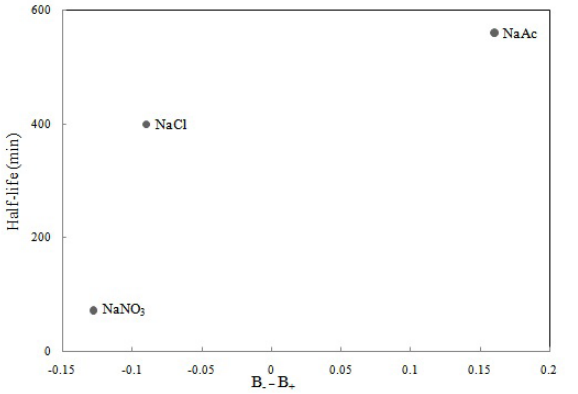
* کنترل محیط عاری از نمک می باشد

ارتباط بین اختلاف ضریب ویسکوزیته آنیون با کاتیون و نیمه عمر آنزیم

ویژگی کائوتروپیک و کوزموتروپیک نمک ها با ضریب ویسکوزیته B معادله جان - دول مشخص می گردد. آنزیم در حضور آنیون ها در مقایسه با کاتیون ها پایداری بیشتری را نشان می دهد. بین اختلاف ضریب ویسکوزیته آنیون با کاتیون و نیمه عمر آنزیم ارتباط تنگاتنگی وجود دارد (شکل ۳ و۴).



شکل ۳ - ارتباط بین اختلاف ضرایب ویسکوزیته آنیون با کاتیون و نیمه عمر آنزیم در دمای ۵۰ °C



شکل ۴ - ارتباط بین اختلاف ضرایب ویسکوزیته آنیون با کاتیون و نیمه عمر آنزیم در دمای ۶۰ °C

بحث

اثر و مکانیسم نمک روی فعالیت آنزیم

آنزیم کبد اسب حاوی دو اتم روی در هر زیرواحد است. از آنجائیکه یونهای Zn^{2+} در زمره کاتیون های شدیداً کوزموتروپ می باشند طبق قانون آبخواهی تمایل بالایی برای اتصال با آنیون های شدیداً کوزموتروپیک دارد (۱۵). آنیون های شدیداً کوزموتروپ مثل استات و سولفات بطور قابل ملاحظه ای بر عملکرد Zn^{2+} کاتالتیک موجود در جایگاه فعال، برای کاستن از فعالیت آنزیم تأثیر می گذارند. مخصوصاً برهم کنش های قوی میان این یون فلزی و آنیون های کوزموتروپیک ممکنست منجر به کاهش در نوکلئوفیلیسیته یون هیدروکسیل متصل به Zn^{2+} شود. یک آنیون کائوتروپیک با قطبیت بالا و تمایل بیشتری برای اتصال به فصل مشترک آب - پروتئین داشته و تمایل قوی برای برهم کنش با بنیان های کاتیونی کائوتروپیک برروی سطح آنزیم (مثل گروههای آمینو) دارد که یون های H^+ زیادی را برروی سطح آنزیم انباشته می کند و منجر به کاهش pH سطحی می شود (۱۷). pH سطحی پروتئین ها وابسته به غلظت نمک و نوع یون موجود در سری هافمیستر می باشد. کاتیون ها همچنین می توانند نقش مهمی در تأثیر بر فعالیت آنزیم بازی کنند. یک کاتیون کوزموتروپیک تمایل دارد که قویاً به گروههای کربوکسیلیک کوزموتروپیک اسید گلوتامیک و اسید آسپارتیک واقع در سطح آنزیم بویژه آنهایی که با Zn^{2+} جایگاه فعال کئوردینه شده اند متصل شود و عملکرد کوئوردیناسون یون فلزی را تغییر داده و سبب تعدیل فعالیت آنزیم شود (۹). یک کاتیون کائوتروپیک توان قطبیت بالایی برای خنثی کردن بار منفی خالص آنزیم دارد همچنین می تواند جفت یونی با آنیون کائوتروپیک با بار مخالف در محلول تشکیل دهد، مطالعات نشان داده اند که نمک های سری هافمیستر، تریپسین، لاکتات دهیدروژناز، فوماراز، استرادیول-۱۷-دهیدروژناز را مهار و NADH – اکسیداز، اسید سیالیداز، را فعال می کنند (۲۰). نمک های مورد مطالعه اثر مهارکنندگی روی آنزیم الکل دهیدروژناز کبد اسب دارند و کاهش فعالیت در مقایسه با کنترل بصورت معنادار می باشد. آنزیم در حضور نمک کلرید سدیم در مقایسه با سایر نمک ها بیشترین فعالیت را نشان داد، با اینکه آنیون کلر در مرز ویژگی کائوتروپ – کوزموتروپ می باشد، چون این دو یون خواص کوزموتروپیک و کائوتروپیک مشابه و همچنین خاصیت آبخواهی یکسانی دارند آنزیم فعالیت بیشتری را از خود در مقایسه با دو نمک دیگر نشان می دهد. چون آنیون نیترات یک کائوتروپ می باشد باعث کاهش هر چه بیشتر فعالیت آنزیم می گردد (۱۲).

اثر نمک در پایداری آنزیم

کاهش فعالیت آنزیم در دو دمای ۵۰ و ۶۰ °C با گذشت زمان مشاهده گردید. نیمه عمر آنزیم انکوبه شده در بافر عاری از نمک در دمای ۵۰ و ۶۰ °C به ترتیب ۱۳۵۰ و ۳۰۰ دقیقه بدست آمد. بنابراین نمک ها اثر پایدار کنندگی بیشتری روی آنزیم در دمای بالا نشان می دهند که احتمالا اثر الکترواستاتیک عمومی در این امر سهم دارد. شکل۳ و ۴ نشان می دهند که نیمه عمر آنزیم تدریجاً تنها با افزایش B_- یا مقدار $(B_- - B_+)$ نمک افزوده شده افزایش می یابد. حالت شدیدتر زمانی است که مقدار$(B_- - B_+)$ مثبت شود در نتیجه آنیون ها نقش غالب تری در تأثیر بر روی پایداری آنزیم ایفا می کنند. در حقیقت نمک ناپایدار کننده، نمک با مقدار $(B_- - B_+)$ گزارشات علمی زیادی

نشان می دهند که پایداری آنزیم عموماً در حضور آنیون های کوزموتروپیک و کاتیون های کائوتروپیک حاصل می شود. یک آنیون کوزموتروپیک مثل یون استات، بعلت برهم کنش قوی با آب، بطور مؤثری با مولکول های آبی که در اصل با مولکول آنزیم در ارتباط هستند رقابت می کند و در نتیجه از سطح آنزیم دفع می شود این مولکول آنزیم را وادار می کند که ناحیه منفی تر یعنی نیترات سدیم می باشد. پایداری بالای آنزیم توسط نمک هایی با آنیون های کوزموتروپیک تر (نیمه عمر آنزیم از ۱۳۵۰ تا ۳۶۰۰ دقیقه دردمای ۵۰ °C در حضور ۱ M استات سدیم) القاء می شود (۱۷). نتایج پایداری آنزیم در جدول ۱ نشان داده شده است. هنگامی که آنزیم در معرض دمای بالاتر قرار می گیرد فعالیت خود را با پیروی از ترتیب زیر حفظ می کند:

$$NaNO_3 < NaCl < CH_3COONa$$

این توالی نمک با ترتیب متنوع $(B_- - B_+)$ نمک یا با ترتیب متنوع مقادیر B_- و B_+ آنیون های مذکور ارتباط دارد (شکل های شماره ۳ و ۴) چون که همه نمک های استفاده شده در این آزمایش نمک های Na بودند. ثابت گردید که افزودن نمک با مقادیر B_- بالاتر (مثل استات سدیم) مقاومت آنزیم را در برابر تخریب ناشی از دماهای بالاتر بهبود می بخشد.

مکانیسم تأثیر بر پایداری آنزیم

سطحی در معرض حلال را به حداقل رساند و بنابراین حالت فشرده طبیعی اش را بعلت نیروی رانشی ناشی از اثرات هیدروفوبیک حفظ کند (۲۰). برخلاف همتای کوزموتروپیک، یک آنیون کائوتروپیک مثل یون نیترات، تمایل آبی پایین و توان قطبیت بالایی دارد. بنابراین به سطح مشترک پروتئین - آب متصل شده و با گروههای کاتیونی کائوتروپیک آنزیم (مثل گروههای آمینو) و با بنیان های آمیدی بویژه دراسکلت پپتیدی برهم کنش دهد و تغییر کنفورماسیونی آنزیم را القاء کرده و در نتیجه آن را براحتی دناچوره می کند (۲). در این مطالعه، همه نتایج حاصل از پایداری، با مقادیر - B و $(B_- - B_+)$ نمک های مطالعه شده رابطه مطلوبی داشت. از زاویه تأثیر بر پایداری آنزیم، آنیون نمک نقش غالب تری را نسبت به کاتیون بازی می کند. چون کاتیون ها توان قطبیّت پایین تری دارند و با شدت کمتری هیدراته می شوند. تأثیر پایدار کنندگی آنیون کوزموتروپیک می تواند در حضور کاتیون کوزموتروپیک کاهش یابد، زیرا هردوی آنها تمایل آبی برابری داشته و تمایل دارند با هم جفت یونی تشکیل دهند و بهمین علّت تأثیر ناپایدار کنندگی آنیون کائوتروپ می تواند در حضوریک کاتیون کائوتروپ کمتر شود (۲۰). مطالعه حاضر پیچیدگی تأثیر نمک های معدنی و یون ها را بر روی فعالیت و پایداری الکل دهیدروژناز کبد اسب را نشان داد. هر دو جنبه بطور مستقیم یا غیر مستقیم از اثرات هافمیستری تاثیر می پذیرد. مطالعه پایداری آنزیم الکل دهیدروژناز مثال دیگری می باشد که نشان داد آنیون های کوزموتروپیک وکاتیونهای کائوتروپیک پایداری بالاتری رابه آنزیم اعطا می کنند.

منابع:

(1) Ahmed I.A.M, Babiker E. E, Mori N. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from Solanum dubium seeds and its enzymatic action on bovine caseins. LWT-Food Science Technol, 2010; 43: 759-764.
(2) Baglioni P, Fratoni L, Lo Nostro P, Lo Nostro A, Ninham BW, Pesavento G. Specific ion effects on the growth rates of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Phys Biol, 2005; 2:1-7.
(3) Baldwin R.L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. Biophys. J, 1996; 71: 2056–2063.
(4) Barreca D, Belloco E, Galli G, Laganà G, Leuzzi U, Magazù S, Migliardo F, Galtieri A, T.F.Telling M. Stabilization effect of kosmotrope systems on ornitin carbamoyltransferase. International Journal of Biological Macromolecules. 2009; 45: 120-128.
(5) Baudium P, Kunz W, Ninham B.W, Renoncourt A, Touraud D. Hofmeister effect on enzymatic catalysis and colloidal structures. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2004; 9: 43-47.
(6) Bilaničová D, Monduzzi M, Ninham B.W, Salis A. Hofmeister effects in enzymatic activity: weak and strong electrolyte influences on the activity of Candida rugosa lipase. J. Phys. Chem. B, 2007; 111: 1149–1156.
(7) B. Jenkins H.D, Marcus Y. Viscosity B-coefficients of ions in solution. Chem. Rev. 1995; 95 : 2695–2724.
(8) Boström M, Finet S, Ninham B.W, Skouri-Panet F, Tavares f.w, Tardieu A. Why force between proteins folow different Hofmeister series for pH above and below pI. Biophys Chem, 2005; 117:217-224.
(9) Boström M, Williams D.R.M, Ninham B.W. Specific ion effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series. Biophys. J, 2003; 85: 686–694.
(10) Bowlus R.D, Clark M.E, Hand S.C, Somero G.N. Living with water stress : evolution of osmolytes systems. Science, 1982; 217: 1214-1222.
(11) Branden C-L, Boiwe T, Eklund H, Nordstrom B, Zeppezauer E, Ohlsson L, Soderlund G. The Structur of Horse Liver alcohol dehydrogenase.Febs Letters, 1974; 44:200-204.
(12) Chen C, J. Halling P, Liu X-J, Yang Z. Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase . Biochimica et Biophysica Acta, 2010; 1804: 821–8281.
(13) Collins KD. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the cryst64. Cowan, DA., Thermophilic proteins: stability and function in aqueous and organic solvents. Comp Biochem Physiol A Physiol,1997 ; 118:429-438.
(14) Eisele N, Linke D, Nimtz M, G. Berger R. Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from Pleurotus ostreatus. Process Biochem, 2011; 46: 1840-1846.
(15) Kovaleva E.G, Plapp B.V. Deprotonation of the horse liver alcohol dehydrogenase-NAD^+ complex controls formation of the ternary complexes. Bioche, 2005; 44: 12797–1280.
(16) Kunz W, Lo Nostro P, Ninham B.W. The present state of affairs with Hofmeister effects. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2004; 9:1-18.
(17) M.Vanderkooi J, V.Nucci N. Effect of salts of Hofmeister series on the hydrogen bond network of water. Journal of Molecular Liquids, 2008; 143: 160-170.
(18) Okamoto D.N, Kondo M.Y, Santos J.A.N, Nakajima S, Hiraga K, Oda K, Juliano L. Juliano, Gouvea I. E. Kinetic analysis of salting activation of a subtilisin-like halophilic protease. Biochim. Biophys. Acta, 2009; 1794: 367-373.
(19) Oneda H, Muta Y, Inouye K. Substrate-dependent activation of thermolysin by salt. Biosci. Biotechnol. Biochem, 2004; 68: 1811-1813 .
(20) Yang Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. Journal of Biotech, 2009; 144: 12–22.
(21) Zhang T, Datta S, Eichler J, Ivanova N, Axen S.D, Kerfeld C.A , Chen F, Kyrpides N, Hugenholtz P. J.F, Cheng K.L, B. Simmons S, Rubin E. Identification of a haloalkaliphilic and thermostable cellulase with improved ionic liquid tolerance. Green Chem, 2011; 13: 2083-2090.