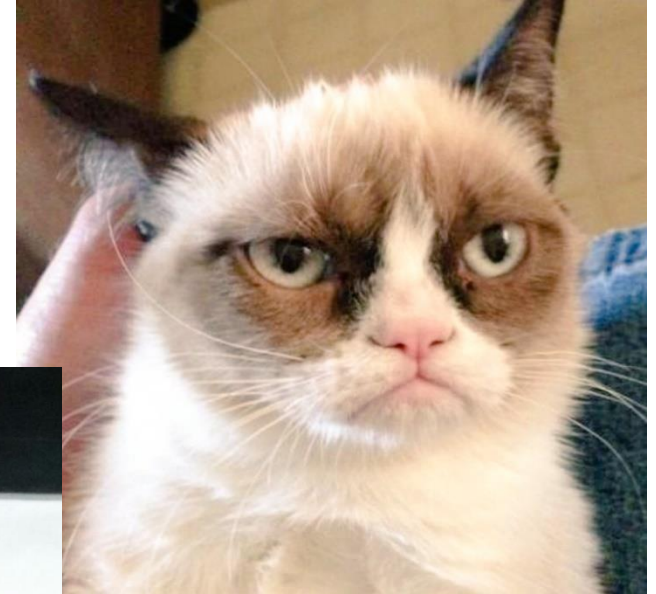


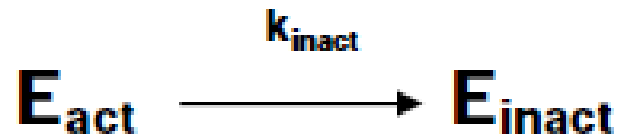
ENZIMAS Y TEMPERATURA



Fig. 1 Himalayan and Black mink littermates



MODELO CLÁSICO

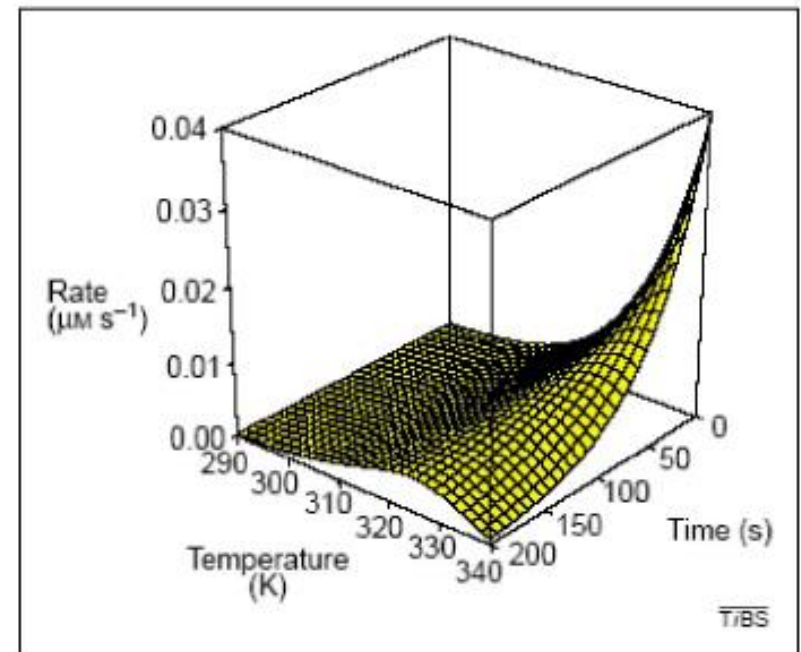


$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \cdot [E_0] \cdot e^{-k_{\text{inact}} \cdot t}$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta G_{\text{cat}}^*}{RT}\right)}$$

$$k_{\text{inact}} = \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\frac{\Delta G_{\text{inact}}^*}{RT}\right)}$$

Fig. 1. Temperature dependence of enzyme activity: the classical model. The variation of enzyme activity with temperature (290–340 K) and time (0–200 s) during the assay was simulated using Eqns 1–3 with the following parameter values: $\Delta G_{\text{cat}}^* = 80 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta G_{\text{inact}}^* = 95 \text{ kJ mol}^{-1}$; total enzyme concentration = 100 nM.

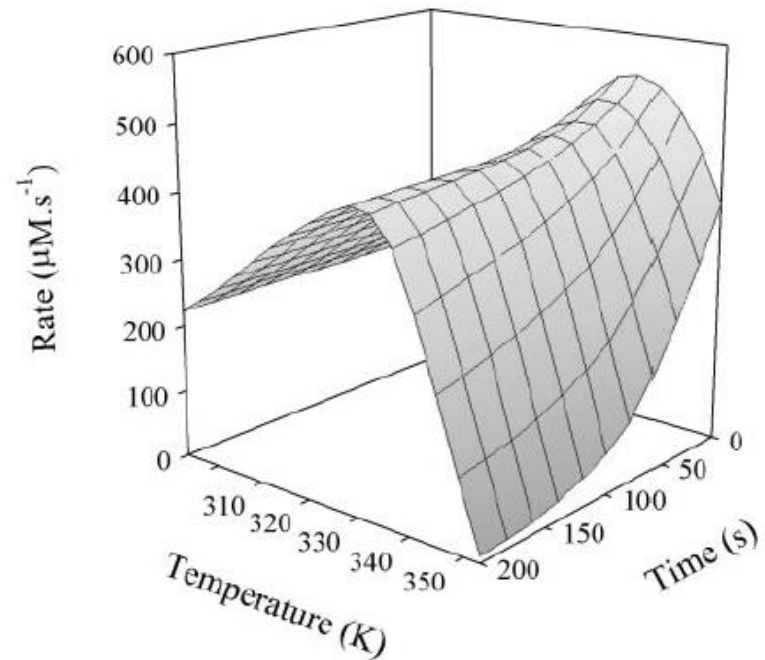
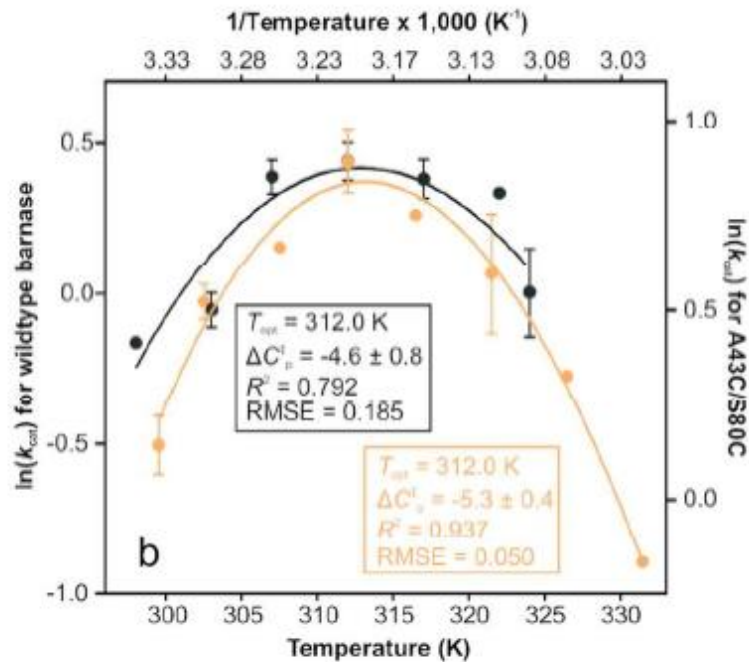


Tomado de (1)

ADENOSINA DEAMINASA

Experimental data
for adenosine deaminase. The enzyme
was assayed spectrophotometrically at
265 nm

1-Ajusta al modelo clásico?



BARNASA

$\ln(k_{cat})$ versus T plot

WT

Arrhenius-like behavior at temperatures below 312 K (T_{opt}) and denaturation above 312 K (the temperature midpoint of thermal unfolding, T_m , for barnase is 326 K)

Mutant A43C/S80C

contains a stabilizing disulphide bond and has an increased T_m (331 K)

1-Ajusta al modelo clásico?

MODELO DE "EQUILIBRIO"

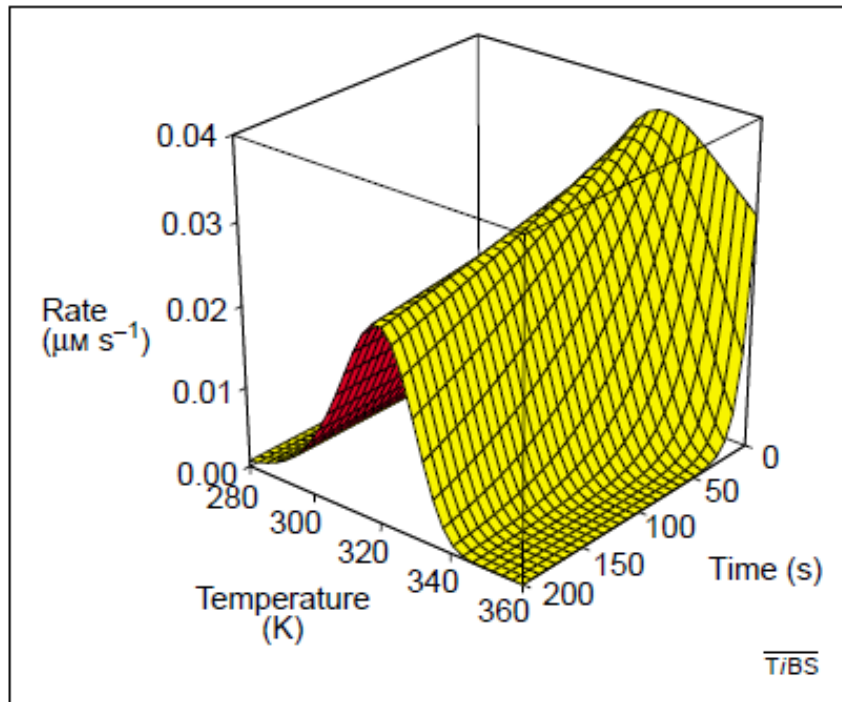


Fig. 2. Temperature dependence of enzyme activity: the equilibrium model. The variation of enzyme activity with temperature (280–360 K) and time (0–200 s) during the assay was simulated using Eqns 4–7 with the following parameter values: $\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger} = 80 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta G_{\text{inact}}^{\ddagger} = 95 \text{ kJ mol}^{-1}$; total enzyme concentration = 100 nM; $\Delta H_{\text{eq}} = 100 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T_m = 320 \text{ K}$.



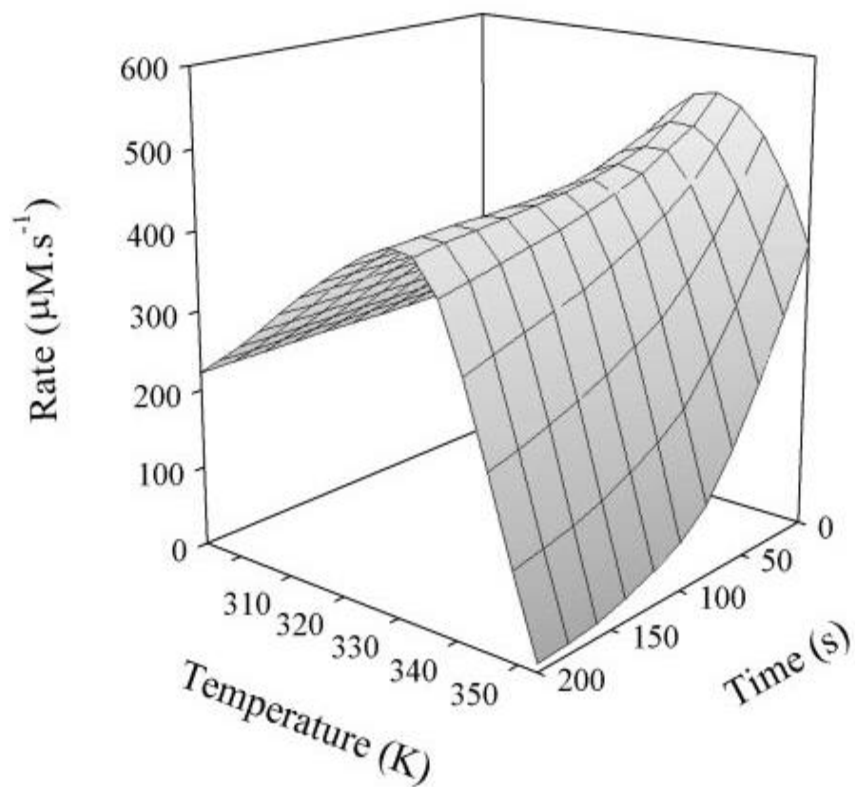
$$[E_o] = [E_{\text{act}}] + [E_{\text{inact}}] + [X]$$

$$K_{\text{eq}} = \frac{[E_{\text{inact}}]}{[E_{\text{act}}]}$$

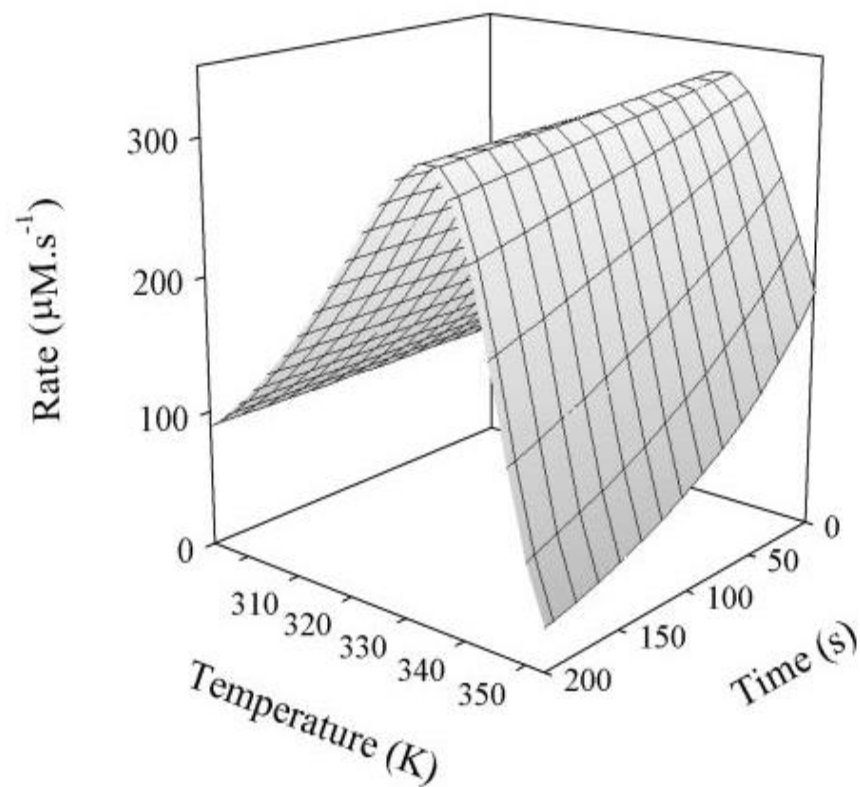
$$\frac{d[X]}{d[t]} = k_{\text{inact}} \cdot [E_{\text{inact}}]$$

ADENOSINA DEAMINASA

EXPERIMENTAL



SIMULADO



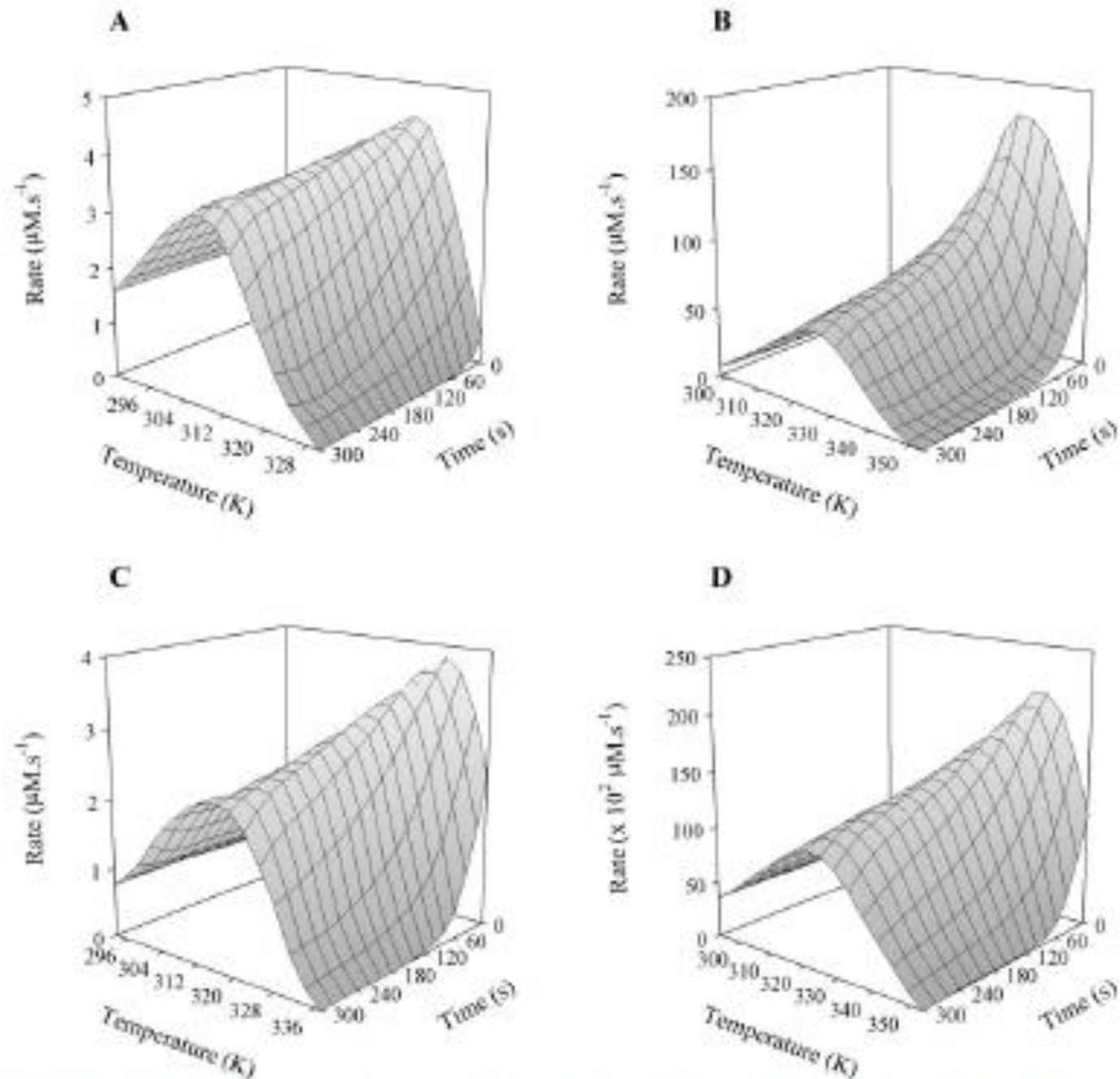


FIG. 2. Experimentally determined temperature dependence of enzymic activity. Enzymes were assayed spectrophotometrically as described under "Experimental Procedures," and the data are plotted as rate ($\mu\text{M.s}^{-1}$) versus temperature (K) versus time during assay (s). A, aryl-acylamidase; B, acid phosphatase; C, β -lactamase; D, alkaline phosphatase.

MODELO DE "EQUILIBRIO"



$$K_{\text{eq}} = \frac{[E_{\text{inact}}]}{[E_{\text{act}}]} \quad [E_0] = [E_{\text{act}}] + [E_{\text{inact}}] + [X]$$

$$\frac{d[X]}{d[t]} = k_{\text{inact}} \cdot [E_{\text{inact}}]$$

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \cdot [E_{\text{act}}]$$

$$[E_{\text{act}}] = \frac{[E_0] - [X]}{1 + K_{\text{eq}}}$$

$$V_{\text{max}} = \frac{k_{\text{cat}} E_0 e^{-\frac{k_{\text{inact}} K_{\text{eq}} t}{1 + K_{\text{eq}}}}}{1 + K_{\text{eq}}}$$

$$[E_0] - [X] = [E_{\text{act}}] + [E_{\text{inact}}]$$

$$[E_0] - [X] = \frac{[E_{\text{inact}}]}{K_{\text{eq}}} + [E_{\text{inact}}]$$

$$[E_0] - [X] = [E_{\text{inact}}] \cdot \left(\frac{1 + K_{\text{eq}}}{K_{\text{eq}}} \right)$$

$$[E_{\text{inact}}] = \frac{([E_0] - [X])}{1 + K_{\text{eq}}} \cdot K_{\text{eq}}$$

$$\begin{aligned} d \frac{[X]}{d[t]} &= k_{\text{inact}} \cdot \frac{([E_0] - [X])}{1 + K_{\text{eq}}} \cdot K_{\text{eq}} \\ &= \frac{k_{\text{inact}}}{1 + K_{\text{eq}}} \cdot K_{\text{eq}} \cdot ([E_0] - [X]) \end{aligned}$$

$$d \frac{[X]}{d[t]} = \frac{k_{\text{inact}}}{1 + K_{\text{eq}}} \cdot K_{\text{eq}} \cdot ([E_0] - [X])$$

MODELO DE "EQUILIBRIO"

$$V_{\max} = \frac{k_{\text{cat}} E_0 e^{\frac{k_{\text{inact}} K_{\text{eq}} t}{1 + K_{\text{eq}}}}}{1 + K_{\text{eq}}}$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger} / RT\right)}$$

$$k_{\text{inact}} = \frac{k_B T}{h} e^{-\left(\Delta G_{\text{inact}}^{\ddagger} / RT\right)}$$

$$\ln(K_{\text{eq}}) = \frac{\Delta H_{\text{eq}}}{R} \left[\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right]$$

$$K_{\text{eq}} = e^{\frac{\Delta H_{\text{eq}}}{R} \left(\frac{1}{T_{\text{eq}}} - \frac{1}{T} \right)}$$

$$V_{\max} = \frac{k_B T \cdot e^{-\left(\frac{\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger}}{RT}\right)} \cdot E_0 \cdot e^{\left(\frac{k_B T \cdot e^{-\left(\frac{\Delta G_{\text{inact}}^{\ddagger}}{RT}\right)} \cdot e^{\left(\frac{\Delta H_{\text{eq}} \left(\frac{1}{T_{\text{eq}}} - \frac{1}{T} \right)}{R} \right)} \cdot t}{h \left(1 + e^{\left(\frac{\Delta H_{\text{eq}} \left(\frac{1}{T_{\text{eq}}} - \frac{1}{T} \right)}{R} \right)} \right)} \right)}{h \left(1 + e^{\left(\frac{\Delta H_{\text{eq}} \left(\frac{1}{T_{\text{eq}}} - \frac{1}{T} \right)}{R} \right)} \right)} \quad (\text{Eq. 4})$$

MODELO DE "EQUILIBRIO"

Como buscamos la T_{opt} ?

Derivando a $t = 0...$

$$\frac{dV_{max}}{dT} = 0 \quad \mathbf{a} \quad T = T_{opt}$$

$$\frac{dV_{max}}{dT} = \frac{T + \frac{\Delta G_{cat}^*}{T}}{\frac{\Delta H_{eq}}{R} - \frac{\Delta G_{cat}^*}{R} - T} - e^{\left[\frac{\Delta H_{eq} \left(\frac{1}{T_{eq}} - \frac{1}{T} \right)}{R} \right]}$$

Para el rango de valores típicos mostrados por las enzimas... se puede simplificar!!

$$\frac{1}{T_{eq}} - \frac{1}{T_{opt}} \approx -\frac{R}{\Delta H_{eq}} \ln \left(\frac{\Delta H_{eq} - \Delta G_{cat}^*}{\Delta G_{cat}^*} \right)$$

MODELO DE "EQUILIBRIO"

Si definimos α

$$\alpha \approx \frac{R}{\Delta H_{eq}} \ln \left(\frac{\Delta H_{eq} - \Delta G_{cat}^*}{\Delta G_{cat}^*} \right)$$

Para el rango de valores típicos mostrados por las enzimas... α es pequeño !!

$$\frac{1}{T_{eq}} - \frac{1}{T_{opt}} = -\alpha$$

$$\frac{T_{opt}}{T_{eq}} - \frac{T_{opt}}{T_{opt}} = -\alpha T_{opt}$$

$$\frac{T_{opt}}{T_{eq}} - 1 = -\alpha T_{opt}$$

$$\frac{T_{opt}}{T_{eq}} = 1 - \alpha T_{opt}$$

$$T_{opt} = T_{eq} (1 - \alpha T_{opt})$$

...Y entonces $\alpha T_{opt} \ll 1$.

En general para las enzimas cuya dependencia de la actividad con la T sigue el modelo de Equilibrio

$$T_{opt} \approx T_{eq}$$

Y siempre un poquito menor...

Con los valores disponibles de $\Delta G_{cat}^\ddagger$ y ΔH_{eq} ,

T_{opt} y T_{eq} tienen una relación lineal....

MODELO DE "EQUILIBRIO"

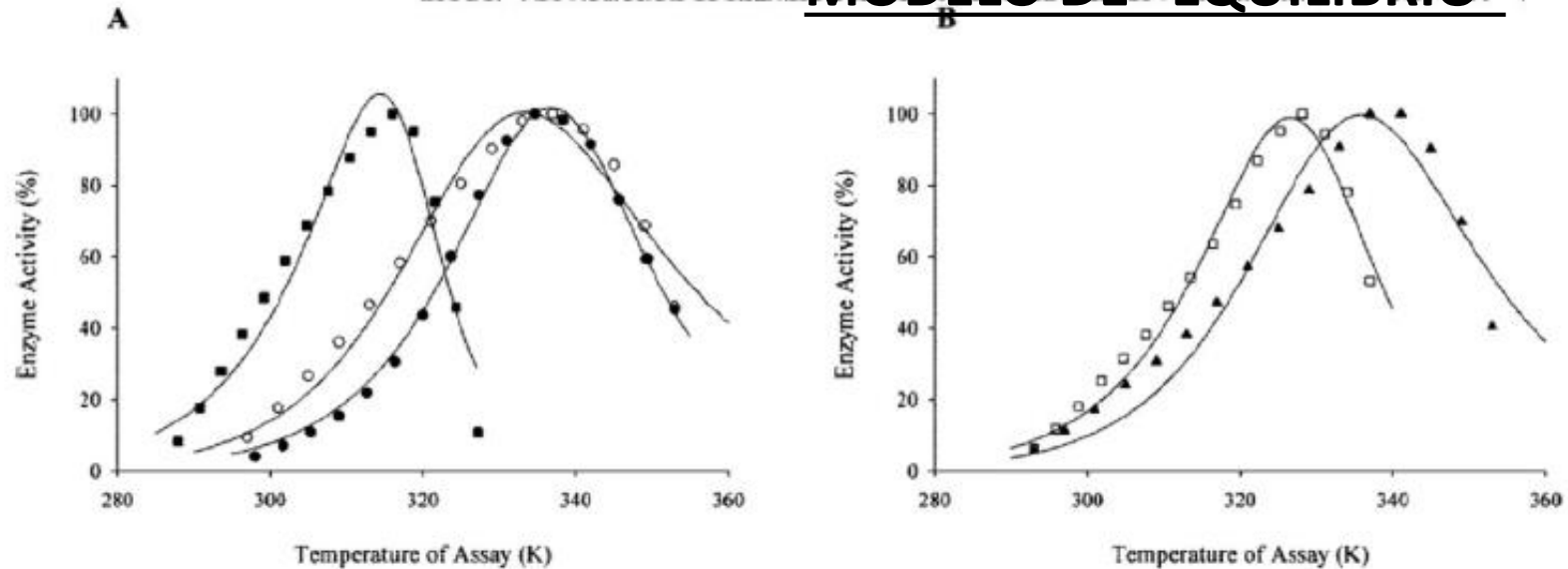


FIG. 3. Temperature dependence of enzymic activity at time zero. From the experimental data in Figs. 1 and 2, the enzymic activities at time zero were plotted against temperature to demonstrate the dependence of enzymic activity on temperature in the absence of thermal inactivation. For clarity, the data have been divided into two graphs. The activity data for each enzyme are scaled from 5–100% relative to the maximum activity for that enzyme. A, acid phosphatase (●), adenosine deaminase (○), and aryl-acylamidase (■). B, β-lactamase (□) and alkaline phosphatase (▲). The solid curves through the points are fits to the data using Equation 4 with time (t) set to zero.

TABLE I
Summary of experimentally determined thermodynamic parameters

T_{opt} values were determined from the data in Fig. 3 using the peaks of the fitted curves. Values of T_{eq} , $\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger}$, $\Delta G_{\text{inact}}^{\ddagger}$, and ΔH_{eq} were determined as described under "Experimental Procedures."

Enzyme	Origin	Growth temp.	T_{opt}	T_{eq}	$\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger}$	$\Delta G_{\text{inact}}^{\ddagger}$	ΔH_{eq}
		°C	°C	°C	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Aryl-acylamidase	<i>P. fluorescens</i>	25	41	44	37	93	165
β-lactamase	<i>B. cereus</i>	30	53	75	38	91	103
Acid phosphatase	wheat germ	15–25 ^a	64	65	31	138	183
Adenosine deaminase	bovine spleen	39	59	73	26	100	146
Alkaline phosphatase	bovine intestine	39	63	70	18	108	220

^a Spring germination temperatures.

$$T_{\text{opt}} \approx T_{\text{eq}}$$

LA NATURALEZA.... Que nos dice?

El MODELO DE "EQUILIBRIO" es coherente con las condiciones de temperatura que soportan los organismos?

Recordemos....la T_{opt} es un poquito menor que la T_{eq} ...

Table 1
Thermodynamic parameters for eight enzymes fitted to the Equilibrium Model.

Organism	Enzyme	T_{growth} (°C)	$\Delta G_{cat}^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{inact}^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	ΔH_{eq} (kJ mol ⁻¹)	T_{eq} (°C)	Number of subunits	Relative molecular mass	Reaction class and EC number
<i>Thermus</i> sp. RT41a	Alkaline phosphatase	75	72	99	305	90	2	97 000	Hydrolase EC 3.1.3.1
<i>Caldocellulosiruptor</i> <i>saccharolyticus</i>	β -Glucosidase	70	88	103	149	74	1	54 000	Hydrolase EC 3.2.1.21
<i>Thermoplasma</i> <i>acidophilum</i>	Citrate synthase	60	77	103	164	88	2	86 000	Transferase EC 2.3.3.1
<i>Bos taurus</i>	Glutamate dehydrogenase	39	63	93	264	53	6	330 000	Oxidoreductase EC 1.4.1.2
<i>Bos taurus</i>	γ -Glutamyl transferase	39	63	98	109	52	2	88 000	Transferase EC 2.3.2.2
<i>Sus scrofa</i>	Fumarase	39	60	92	378	59	4	194 000	Lyase EC 4.2.1.2
Wheat germ	Acid phosphatase	20	79	95	142	64	1	55 000	Hydrolase EC 3.1.3.2
<i>Moritella profunda</i>	Dihydrofolate reductase	2	67	93	104	55	1	18 000	Oxidoreductase EC 1.5.1.3

The parameters of all enzymes were derived by fitting assay data to the Equilibrium Model (<http://hdl.handle.net/10289/3791>) and thus relate to active enzymes in the presence of substrate and cofactor [8,9]. The exceptions are the growth temperature optima (T_{growth}) of the source organism, which are cited from various sources.

T_{eq} correlaciona positivamente (y mucho mejor) con la temperatura de crecimiento optimo del organismo Fuente que lo que lo hace $\Delta G_{inact}^\ddagger$, indicando un significado evolutivo para el modelo de Equilibrio.

El modelo de equilibrio implica:



1-la existencia de una Temperatura óptima real (independiente de la duración del ensayo):

UN PARAMETRO A INFORMAR!!

2-que la T_{opt} es casi igual a la T_{eq} entre las especies activas e inactivas reversible de la enzima

3-la temperatura de crecimiento óptima de la especie de origen de la enzima es congruente con el modelo de equilibrio (T_{eq} mayor que la T de crecimiento). EVOLUCION.

4-consecuencias para los desarrollos biotecnológicos..... Ahora lo vemos!

Sin embargo:

...the Equilibrium Model does not of itself offer an explanation of the molecular basis of the E_{act}/E_{inact} transition, this interconversion can be clearly differentiated from denaturation...

..... E_{act}/E_{inact} transition involves only a small conformational change...

Veamos algo de esto también.....

IMPLICANCIAS BIOTECNOLÓGICAS

SIMULACIONES

Temp de Ensayos:

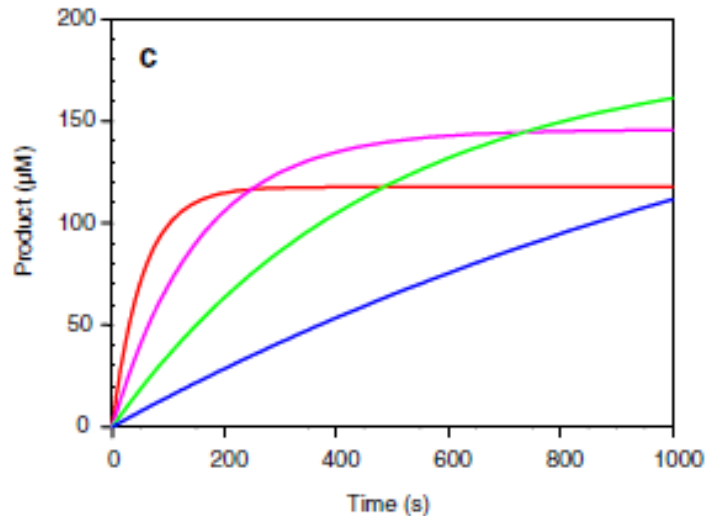
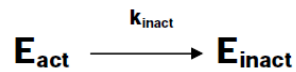
Azul= 310

Verde=320

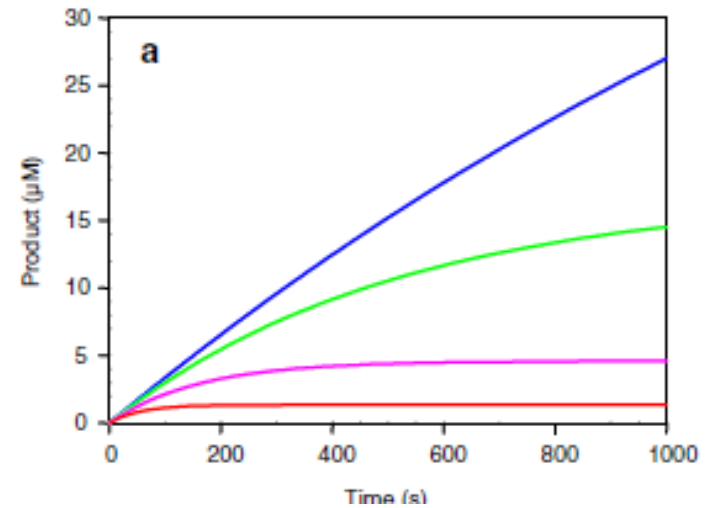
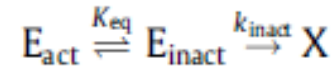
Rosa=330

Rojo=340

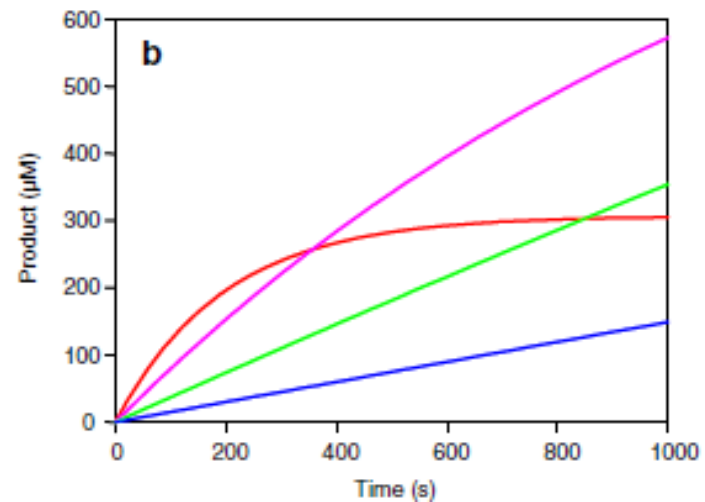
Modelo Clásico



Modelo de Equilibrio

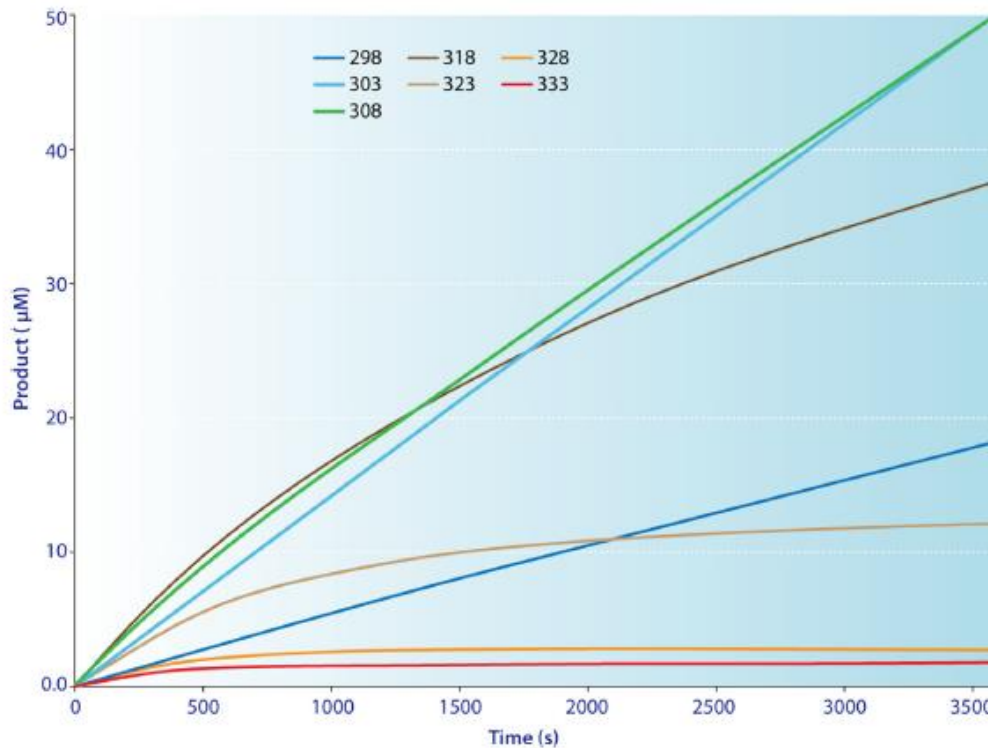


Teq=350K



Teq=300K

IMPLICANCIAS BIOTECNOLOGICAS



FOSFATASA ALCALINA
T_{eq} 319 K

Fig. 6. Bioreactor progress curves for the alkaline phosphatase-catalysed hydrolysis of *p*-nitrophenyl as a function of temperature. Reproduced from [5] with permission.

A TENER EN CUENTA

Reactores enzimáticos: La productividad aumenta con la temperatura a valores menores que T_{eq}

IMPLICANCIAS BIOTECNOLÓGICAS

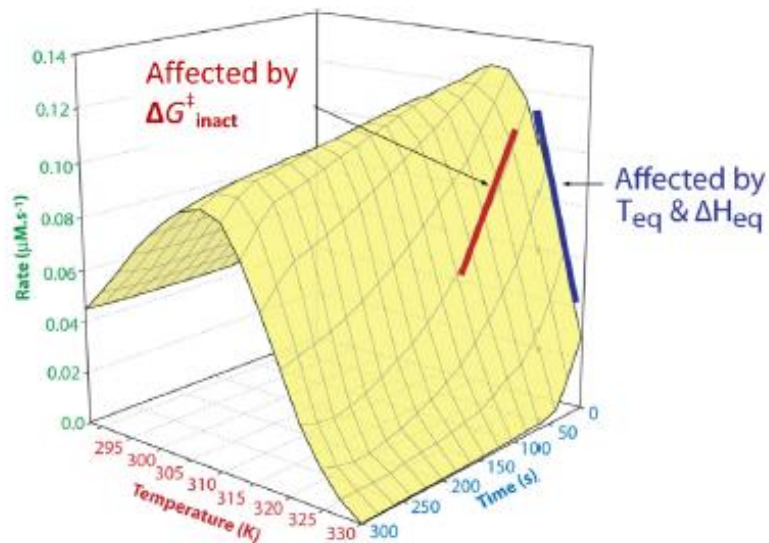
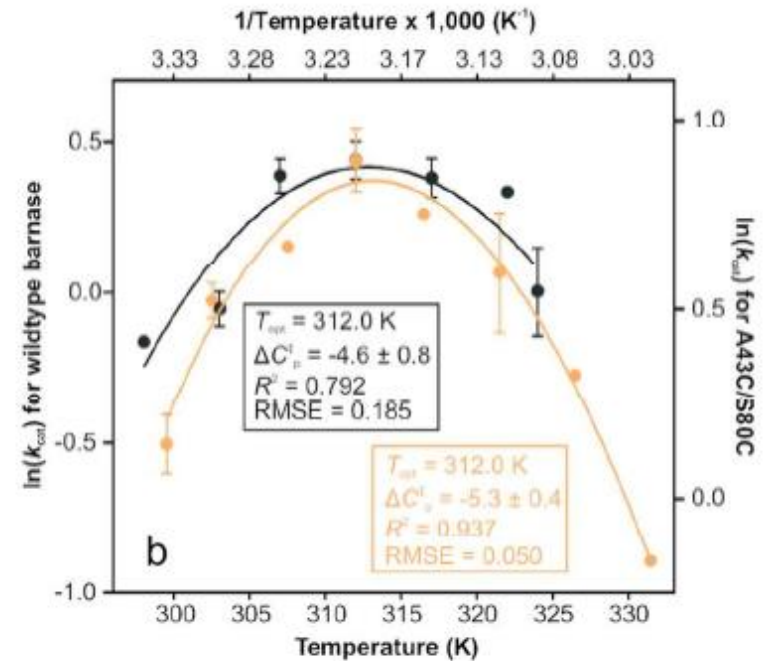


Fig. 4. A plot showing the effect of the Equilibrium Model parameters on the temperature-dependent activity of enzymes. The value of $\Delta G^{\ddagger}_{\text{inact}}$ determines the time-dependent loss of activity at any temperature due to thermal denaturation. When measuring initial (zero time) rates, the rapid reduction in activity at high temperatures arises from the conversion of E_{act} to E_{inact} and is governed by T_{eq} and ΔH_{eq} . At any point along the time axis, the activity of the enzyme is thus determined by all three thermodynamic parameters. Reproduced from with permission [5].



A TENER EN CUENTA

Ingeniería de Enzimas: Aumentar no sólo termoestabilidad sino también T_{eq}

Nos queda algo...

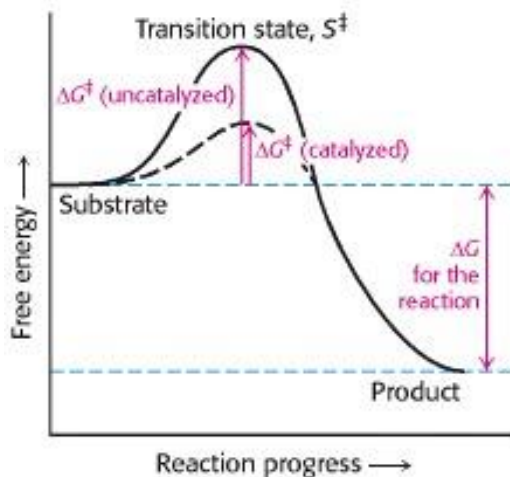
...the Equilibrium Model does not of itself offer an explanation of the molecular basis of the E_{act}/E_{inact} transition, this interconversion can be clearly differentiated from denaturation...

..... E_{act}/E_{inact} transition involves only a small conformational change...

Volvamos al principio. La velocidad de una reacción viene dada por

$k = A \exp(-E_a/RT)$, según Arrhenius E_a es la energía de activación, R es la constante de los gases y k es la constante de velocidad

$$k = \frac{\kappa k_B T}{h} e^{(-\Delta G^\ddagger/RT)}$$



Luego vinieron Eyring, Polanyi y otros y el desarrollo la Teoría del estado de transición

κ coeficiente de transmisión .. posibilidad de que la reacción retroceda...gralmente es 1

k_B cte de Boltzman

h cte de Plank

$\Delta G^\ddagger$ es el cambio en la energía libre de Gibbs entre rvos y el estado de transición, reacción de orden 1

En general se asume que $\Delta H^\ddagger$ and $\Delta S^\ddagger$ son independientes de la T y por lo tanto $\Delta G^\ddagger$ varia con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Gibbs:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger.$$

$$k = \frac{\kappa k_B T}{h} e^{(-\Delta G^\ddagger / RT)} = \frac{\kappa k_B T}{h} e^{(\Delta S^\ddagger / R)} e^{(-\Delta H^\ddagger / RT)}$$

Pero ¿es esto cierto para las enzimas (macromoléculas grandes y flexibles de alto peso molecular y por lo tanto con altas capacidades caloríficas, Cp)?.

Por ej. La Cp de las proteínas plegadas se estiman en $\sim 45 \text{ J mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ por aminoácido
Para una enzima de 65 kDa $\sim 2500 \text{ J mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ (el agua líquida Cp = $76 \text{ J mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ at 25 °C).

La respuesta es NO

$\Delta C_p^\ddagger$ (es la diferencia en la capacidad calorífica entre el estado basal y el estado de transición a P cte.)

⇒ cuantifica la dependencia de $\Delta G^\ddagger$ respecto de la T

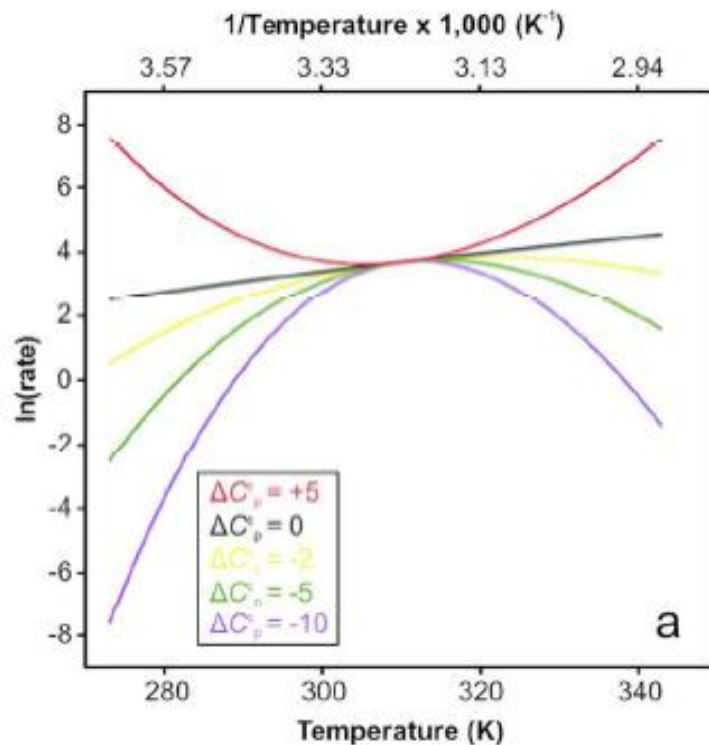
⇒ describe la dependencia de la velocidad de reacción con la T

Pero como varia Cp durante la reacción...?

$$\Delta G^\ddagger = [\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger(T - T_0)] - T[\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger(\ln T - \ln T_0)]$$

Desarrollemos la ecuación y simulemos

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\left[\frac{-\Delta H_{T_0}^\ddagger - \Delta C_p^\ddagger(T - T_0)}{RT} + \frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger(\ln T - \ln T_0)}{R} \right]}$$



$$\ln k = \ln \frac{k_B T}{h} - \left[\frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger(T - T_0)}{RT} \right] + \left[\frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger(\ln T - \ln T_0)}{R} \right]$$

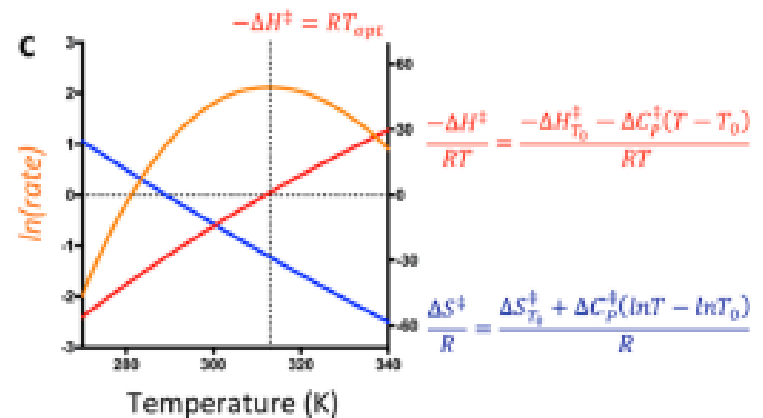
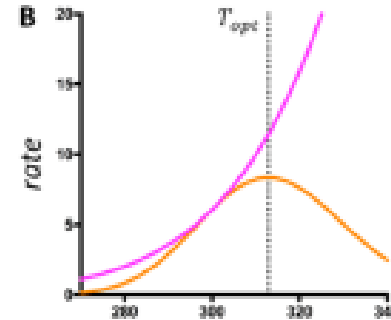
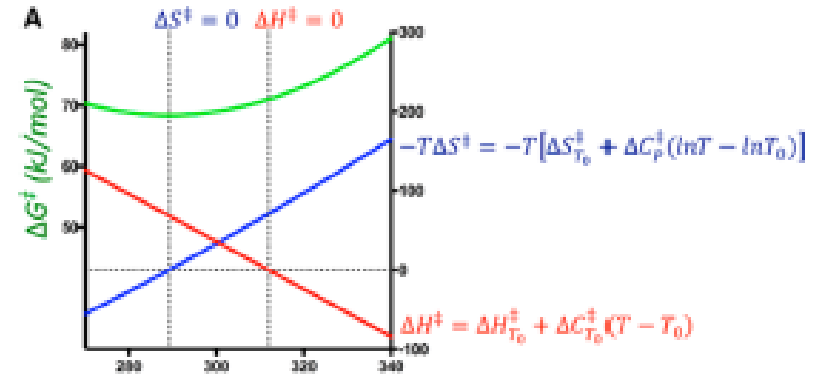
Para distintos valores de $\Delta C_p^\ddagger$ simulamos el comportamiento de $(\ln k)$ usando la ecuación de arriba y valores típicos .

Como son las curvaturas de actividad vs. T?
Entonces.... ΔC_p es....NEGATIVO

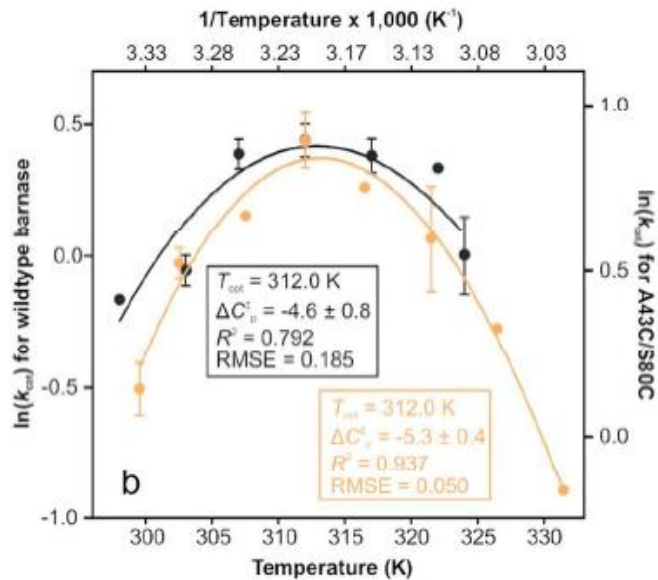
$$\ln k = \ln \frac{k_B T}{h} - \left[\frac{\Delta H_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (T - T_0)}{RT} \right] + \left[\frac{\Delta S_{T_0}^\ddagger + \Delta C_p^\ddagger (\ln T - \ln T_0)}{R} \right]$$

La curvatura es consecuencia natural de la ecuacióny si $\Delta C_p^\ddagger$ es negativo durante la catálisis ya sabemos para que lado.

$\Delta C_p^\ddagger$ ES UN PARAMETRO CRITICO.



Aquí podemos ver la Barnasa de vuelta....



IPMDH

Rojo Basilus termofilo

Verde Basilus mesofilo

Azul Basilus psycrofilo

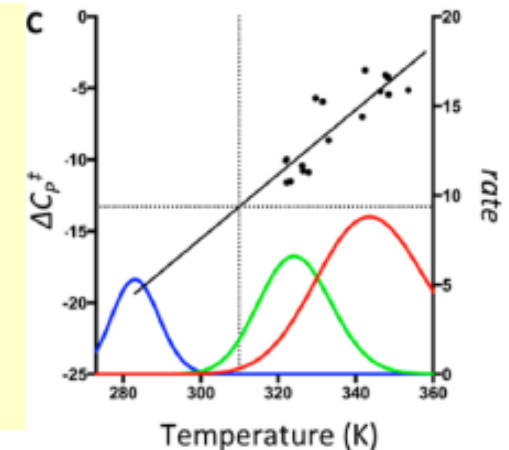
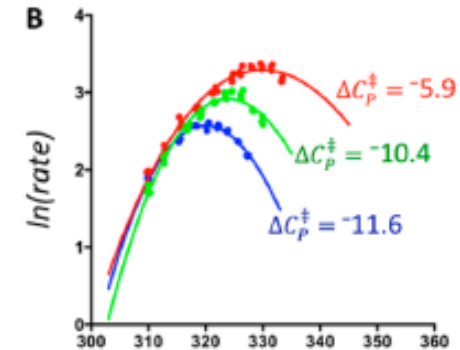
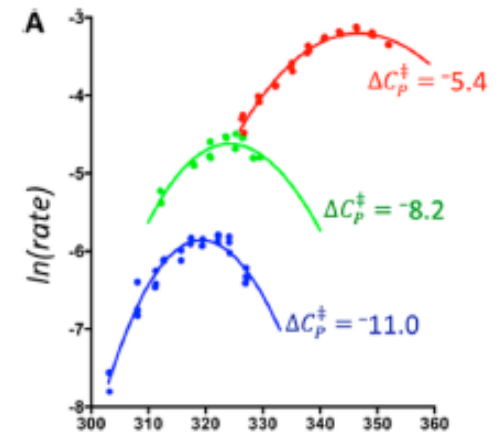
MaIL (glicosidasa)

B. Subtilis

Azul WT

Verde V200T

Rojo V200S



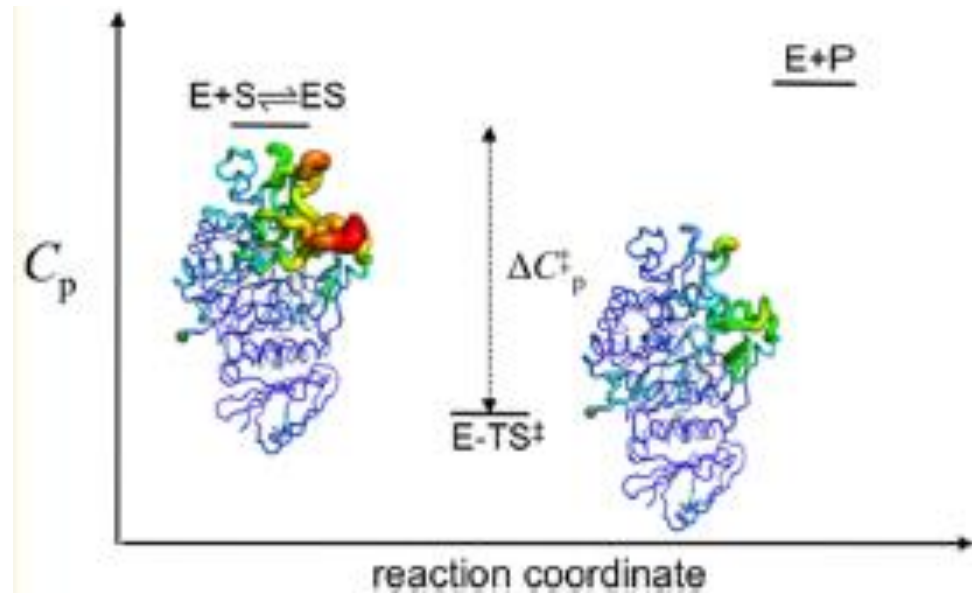
Correlación entre $C_p^\ddagger$ y T_{opt} (datos de las enzimas anteriores)

En color: plots de la velocidad vs T con valores de $C_p^\ddagger$ indicativos

ESTO ILUSTR LA CURVATURA EXTREMA PARA UNA ENZIMA CUYA T_{opt} ESTE A 10°C Y TENDRIA UN $C_p^\ddagger$ DE -18 KJ/MOL K

TRAMPA PSICROFILA

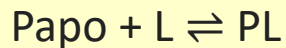
Las velocidades de reacciones catalizadas enzimáticamente proceden con $\Delta C_p^\ddagger$ en el rango de -1 a $-12 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (independiente de la desnaturalización), MMRT (macromolecular rate theory) propiedad termodinámica inusual de reacciones bioquímicas



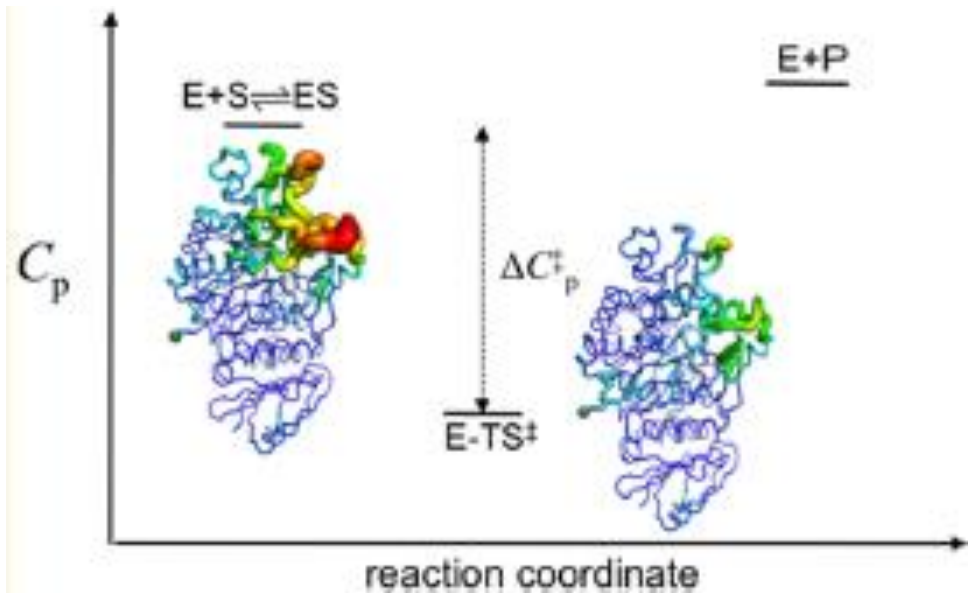
La energía interna de un sistema se divide entre modos traslacional, rotacional, vibracional y electrónico. La capacidad calorífica C es formalmente el cambio en la energía interna con un cambio de temperatura y es una medida de la capacidad para la traslación, rotación, vibración y electrónica modos para absorber energía. Para sistemas en agua a nivel biológico temperaturas relevantes ($-20 < T < 100^\circ \text{C}$), modos electrónicos por encima del suelo son generalmente inaccesibles, y por lo tanto no contribuyen a la capacidad calorífica en este contexto.

Los cambio en la capacidad calorífica, ΔC_p , para un sistema macromolecular en equilibrio entre dos estados se debe entonces más significativamente a el cambio en las frecuencias de los modos vibracionales del molécula entre los dos estados.

El ejemplo más simple de ΔC_p macromolecular se puede ver en la unión proteína-ligando:



La forma apo de la proteína (Papo) suele ser más flexible (es decir, más modos vibracionales de baja frecuencia) que el ligando unido forma (que tiene mayor rigidez y menos baja frecuencia modos). También hay un término de desolvatación que contribuye a ΔC_p y es el resultado del desplazamiento de moléculas de agua unidas por el ligando. Si consideramos las contribuciones del proteína sola, ΔC_p para tal interacción es generalmente negativa.



Los cristalógrafos de proteínas se han aprovechado de este fenómeno durante décadas: es más probable que las proteínas cristalicen en el presencia de un ligando unido porque la proteína se vuelve más "Ordenado" o más rígido en el estado unido a ligando. En general, cualquier proceso que limite el número de vibraciones de baja frecuencia modos para macromoléculas irán acompañadas de un correspondiente ΔC_p negativo

Mensaje/Conclusiones:

1-la existencia de una Temperatura óptima real (independiente de la duración del ensayo):

UN PARAMETRO A INFORMAR!!

2-la T_{opt} correlaciona con la temperatura de crecimiento óptima de la especie de origen de la enzima. Mucho mas que la estabilidad.....EVOLUCION.

3-El ΔC_p entre el complejo enzima-rvos y estado de transición es negativo y es determinante de la T_{opt} . Se explica por la restricción de modos vibratorios en el Complejo de transición.

4-el sustento de este comportamiento lo da la interpretación de la mecánica estadística...el estado de transición posee menos modos alternativos (vibratorios, rotatorios, etc.) esto disminuye su C_p .

4-consecuencias para los desarrollos biotecnológicos:

Mutaciones que mejoren no solo estabilidad

Conocer la T_{opt} para regular correctamente la T de biorreactores enzimaticos

BONUS TRACK TECNICO
EVITANDO LA INACTIVACION DE ENZIMAS:
CONSEJOS PARA EL QUE HA LOGRADO PURIFICAR SU PROTEÍNA

- LA MAYORÍA DE LAS ENZIMAS SON ESTABLES POR MESES REFRIGERADAS (4°C)
- LA PRESENCIA DE ADITIVOS (GLICEROL, TREALOSA, SACAROSA, DMSO) PERMITEN TENER ENZIMAS A MENOS DE 4°C SIN CONGELARSE
- EL CONGELADO DEBE EVITARSE (HAY CAMBIOS EN LA TENSION SUPERFICIAL Y EL pH QUE ACOMPAÑAN LA FORMACION DE CRISTALES)
- SI INEVITABLEMENTE TIENE QUE CONGELAR USE NITRÓGENO LIQUIDO.

Bibliografía

- 1-Peterson et al DOI 10.1074/jbc.M309143200 JBC 2004, 279, 20717–20722.
- 2- Daniel & Danson DOI 10.1016/j.febslet.2013.06.027 FEBS Letters 2013, 587, 2738–2743
- 3-Arcus et al DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01094 Biochemistry 2016, 55, 1681–1688