



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

EL PAPEL DE LA DESHIDROGENASA  
PERIPLASMICA PARA ETANOL DE  
*Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

Q.F.B. Saúl Gómez Manzo

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Edgardo Escamilla Marván

México, D.F.

Octubre, 2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

Indice de tablas	i
Indice de figuras	ii
Abreviaturas	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Organismo	1
1.2 Aislamiento de <i>Ga. diazotrophicus</i>	2
1.3. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)	3
1.4. Mecanismos de protección de la nitrogenasa	3
II. ANTECEDENTES	5
2.1. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo I	10
2.1.1. Quinoproteína-metanol-deshidrogenasa (QMDH)	10
2.1.2. Quinoproteínas alcohol deshidrogenasas	11
2.2. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo II	12
2.3. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo III	13
III. PREMISA	17
IV. OBJETIVO GENERAL	17
4.1. METAS	18

V. MATERIALES Y METODOS	19
5.1. Cepa, condiciones de cultivo, preparación y obtención de membranas	19
5.2. Purificación de la PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	19
5.2.1. Cromatografía	20
5.2.1.1. Columna QAE - Toyopearl	20
5.2.1.2. Columna DEAE - Toyopearl	20
5.2.1.3. Columna Hidroxiapatita-Ultrogel	20
5.2.1.4. Columna Sephacryl 200.	21
5.3. Caracterización molecular	21
5.3.1. Análisis electroforético	21
5.3.1.1. Electroforesis	21
5.3.1.2. Zimografía de la PQQ-ADH	21
5.3.1.3. Electroforesis (SDS PAGE)	22
5.3.1.4. Zimografía de hemos	22
5.3.1.5. Enfoque isoelectrico	22
5.3.2. Determinación del residuo-amino terminal y masa molecular de las subunidades I y II	23
5.3.2.1. Masa molecular	23
5.3.2.2. Residuo amino terminal y secuencias internas de la subunidad I	23
5.3.3. Medida del contenido de PQQ	24
5.3.3.1 Análisis de Fluorescencia del grupo prostético PQQ	24
5.3.3.2 Análisis de del grupo prostético PQQ por Resonancia Paramagnética del Electrón (EPR)	24
5.3.4. Determinación de citocromos de la enzima PQQ-ADH purificada	24
5.3.4.1. Análisis espectral de citocromos	24
5.3.4.1.1. Espectro diferencial de la enzima PQQ-ADH purificada	24
5.3.4.1.2. Espectro diferencial de monóxido de carbono y su espectro de fotodisociación de la PQQ-ADH purificada	25
5.3.4.2. Determinación de hemos por HPLC	25
5.3.4.3. Titulación potenciométrica de los citocromos <i>c</i> de la PQQ-ADH purificada	26
5.4. Caracterización cinética	26
5.4.1. pH óptimo en membranas y en la fracción purificada	26
5.4.2. Especificidad por sustratos	27

5.4.3. Parámetros cinéticos	27
5.4.4. Termo inactivación de la enzima PQQ-ADH purificada	27
5.4.5. Efecto de mixotiazol y antimicina sobre la actividad de la PQQ-ADH	27
5.5. Determinación de los productos finales de reacción	28
5.5.1. Cromatografía de gases acoplada a masas	28
5.5.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	28
5.5.3. Ensayo de carbazida - carbazona con etanol radioactivo	29
5.5.4. Ensayo acoplado de DCPIP con tiosemicarbazida	29
5.6. Otros métodos	30
5.6.1. Ensayos enzimáticos	30
5.6.1.1. Ensayo de Oxidasas	30
5.6.1.2. Ensayos para deshidrogenasas	30
5.6.1.3. Actividad de quinona reductasa	31
5.6.1.4. Determinación de proteína	31
VI. RESULTADOS	32
6.1. Optimización del medio de cultivo de <i>Ga. diazotrophicus</i>	32
6.2. Purificación de la PQQ-ADH de <i>Ga. diazotrophicus</i>	33
6.2.1. Columna QAE - Toyopearl	34
6.2.2. Columna Hidroxiapatita-Ultrogel	36
6.2.3. Columna Sephacryl 200	36
6.3. Caracterización molecular	37
6.3.1. Análisis electroforético	37
6.3.2. Análisis de la secuencia N-terminal	38
6.3.3. Grupos prostéticos de la enzima PQQ-ADH	40
6.3.3.1. Medida del contenido de PQQ	40
6.3.3.2. Análisis de citocromos presentes en la PQQ-ADH purificada	41
6.3.3.2.1. Espectro diferencial de la enzima PQQ-ADH	41
6.3.3.2.2. Identificación de los citocromos asociados a la PQQ-ADH purificada	42
6.3.3.2.3. Titulación potenciométrica de los citocromos de la PQQ-ADH purificada	44
6.3.3.2.4. Análisis de los hemos C por EPR	46
6.3.3.2.5. Espectro diferencial de monóxido de carbono y su espectro de fotodisociación de la PQQ-ADH purificada	47

6.4. Caracterización cinética	48
6.4.1. Propiedades catalíticas de PQQ-ADH	48
6.4.1.1. pH óptimo y especificidad de sustratos	48
6.4.1.2. Curva de termoinactivación de la enzima PQQ-ADH purificada	51
6.4.1.3. Análogos de UQ10 como aceptores de electrones para la PQQ-ADH	52
6.4.1.4. Reconstitución de la etanol oxidasa en membranas de un mutante deficiente en PQQ-ADH	53
6.4.2. Transferencia intramolecular de electrones PQQ-ADH purificada	57
6.4.2.1. Determinación de la transferencia intramolecular de electrones	62
6.4.2.2. Inhibidores específicos del complejo <i>bc1</i> también inhiben a la PQQ-ADH	63
6.4.3. Determinación de los productos finales de reacción	63
6.4.3.1. Cromatografía de gases acoplado a masas	65
6.4.3.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	66
6.4.3.3. Ensayo de carbazida - carbazona con etanol radioactivo	68
6.4.3.4. Ensayo acoplado de 2,6 diclorofenol indolfenol con carbazida	69
VII. DISCUSIÓN	70
7.1. Caracterización molecular	71
7.2. Propiedades espectroscópicas	72
7.3. Caracterización cinética	74
7.4. pH óptimo, punto isoeléctrico y termoestabilidad de la enzima ADH purificada	76
7.5. Transferencia intramolecular de electrones	77
7.6. Determinación del producto final de a reacción catalizada por la PQQ-ADH	79
VIII. CONCLUSIONES	79
VII. REFERENCIAS	81

## ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
ATP	Adenosina trifosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido
PQQ-GDHm	Pirrolo quinolina quinona-Glucosa deshidrogenasa membranal
PQQ	Pirrolo quinolina quinona
PMS	Metasulfato de fenazina
TMPD	Azul De Wuster's
ADHs	Alcohol deshidrogenasas
MDH	Metanol deshidrogenasa
PQQ-ADH	Pirrolo quinolina quinona-Alcohol deshidrogenasa
PQQ-ALDH	Pirrolo quinolina quinona-Aldehído deshidrogenasa
qEDH	Quinoproteína etanol deshidrogenasa
qhEDH	Quinohemoproteína etanol deshidrogenasa
DCPIP	2,6- Diclorofenol indolfenol
EPR	Resonancia Paramagnética del Electrón
SDS-PAGE	Sodio dodecil sulfato-poliacrilamida gel
PMS-F	Fenil metil sulfonil-fluoruro
QAE	Amino etil cuaternario
DEAE	Diethyl amino etil
NTB	Azul de nitrotetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
CEM	Coficiente de extinction millimolar
TFA	Ácido trifluoroacético
SDS	Sodio dodecil sulfato
DUQ	Decil ubiquinona
BSA	Albumina sérica de bovino
CO	Monóxido de carbono
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

## RESUMEN.

La oxidación de etanol a ácido acético es el proceso más característico en las bacterias ácido acéticas; este sistema de oxidación es localizado en el espacio periplásmico, y es catalizado por dos complejos de enzimas membranales: la PQQ-alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y la PQQ-aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH). *Glucanacetobacter diazotrophicus* es la única especie dentro de las bacterias ácido acéticas que tiene la capacidad de fijar nitrógeno y es endófito dentro de la caña de azúcar, de donde fue aislado por vez primera. A pesar, de este peculiar estilo de vida, *Ga. diazotrophicus* posee de manera constitutiva el sistema membranal de la oxidación de alcoholes. El complejo de la PQQ-ADH y la PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus* fueron separados por cromatografía en columna. La PQQ-ADH fue removida de la fracción membranal con detergente Tritón X-100 al 0.5% (w/v) y purificada por cromatografías de intercambio aniónico y exclusión molecular. Zimografía en PAGE NATIVE al 7.5% revela la presencia de una sola banda con sustrato etanol y acetaldehído. SDS-PAGE al 10% mostró la presencia de dos bandas con  $M_r$ s de 71.4 y 43.5 kDa; la cual fue corroborada por espectrofotometría de masas. La subunidad II presentó una mayor reacción positiva respecto a la subunidad I empleando la tinción de hemo peroxidasa, la cual confirma la presencia de citocromos tipo c en ambas subunidades. Se determinaron péptidos internos de cada una de las subunidades; los cuales se alinean perfectamente con la PQQ-ADH de *Ga. polyoxogenes* en mayor proporción y con las PQQ-ADHs de las bacterias ácido acéticas. La enzima PQQ-ADH fue purificada en su estado reducido, fue oxidada con ferricianuro de potasio y la adición de sustrato etanol o acetaldehído restauraron los mismos niveles de reducción, indicando que el contenido total de los citocromos tipo c presentes en la enzima PQQ-ADH son reducibles por sustratos. El grupo prostético del PQQ fue identificado por espectroscopia de luz visible y por técnicas de fluorescencia; también se observó por Resonancia Paramagnética del Electrón (EPR) la presencia de un grupo orgánico el cual fue asignado al grupo prostético PQQ. Los citocromos tipo c fueron identificados por técnicas espectroscópicas y por EPR, donde se observó que la enzima está constituida en su mayoría por hemos de bajo spin; también se observó la presencia de una señal de un hemo de alto spin, el cual probablemente sea el responsable de unir monóxido de carbono y fotodisociarse. Dentro de su especificidad por sustrato la enzima es capaz de oxidar alcoholes y aldehídos con buena eficiencia. La enzima fue termosensible a 40 °C y se encontró un pH óptimo para etanol y acetaldehído



de 6.0. La especificidad por sustrato de la enzima PQQ-ADH fue única; ya que tanto alcoholes y aldehídos de cadena corta fueron oxidados. Es de llamar la atención que la enzima PQQ-ADH oxidó formaldehído, pero no oxidó metanol. De acuerdo a esta especificidad por sustrato, la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* puede ser cinéticamente competente para catalizar la doble oxidación de etanol a ácido acético. Por medio de quinona reductasa se corroboró que la enzima PQQ-ADH tiene un sitio de unión a la quinona endógena, lo cual nos confirma que nuestra enzima PQQ-ADH participa de manera activa en la cadena respiratoria donando sus electrones y propiciar que se realiza la Fijación Biológica de Nitrógeno. Por diversas técnicas como cromatografía de gases a masas, Resonancia Magnética Nuclear (RMN), ensayos con etanol radioactivo y ensayos acoplados, se determinó que la enzima es capaz de oxidar el etanol y llevarlo hasta acetato sin saltarlo el acetaldehído al medio de reacción; lo cual la hace una enzima bifuncional en base a su capacidad de oxidación de alcoholes y aldehídos no descritas dentro de las bacterias ácido acéticas. El pH óptimo, la Km y el punto isoeléctrico para el sustrato acetaldehído son diferentes a lo reportado para la PQQ-aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) purificada en el mismo organismo; así mismo sus propiedades moleculares y cinéticas de la ALDH son totalmente diferentes a las encontradas en la enzima PQQ-ADH.

## ABSTRACT

The oxidation of ethanol to acetic acid is the most characteristic process in acetic acid bacteria, the system is located in the bacterial periplasmic space, and it is catalyzed by two membrane-bound enzyme complexes. PQQ-alcohol dehydrogenase (ADH) and PQQ-aldehyde dehydrogenase (ALDH). *Glucanacetobacter diazotrophicus* is rather unique among the acetic acid bacteria as it carries out nitrogen fixation and is a true endophyte originally isolated from sugar cane. Aside its peculiar life style, *Ga. diazotrophicus* possesses a constitutive membrane-bound oxidase system for ethanol. To get insight on the alcohol oxidising system of *Ga. diazotrophicus*, the ADH complex was purified from the membrane fraction by solubilization with Triton X-100 and subsequent column chromatography on QAE-Toyopearl, DEAE-Toyopearl, HA-Ultrigel and Sephacryl-200. The purified enzyme was homogeneous showing a band with a molecular mass of 115 kDa on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). In sodium dodecyl sulphate-PAGE (SDS-PAGE) it exhibited two subunits with molecular masses of 71.4 kDa and 43.5 kDa. Positive peroxidase reaction, stronger for the smaller subunit, confirmed the presence of cytochrome c in both subunits. PQQ of ADH was identified by UV visible light, EPR and fluorescence spectroscopy. The enzyme was purified in its full reduced state; potassium ferricyanide induced its oxidation. Ethanol or acetaldehyde restored the full reduction state, thus indicating that the total content of cytochrome c in ADH is reducible by substrates. The enzyme was fairly thermosensitive, showed an isoelectric point (pI) of 6.1 and its optimal pH was 6.0 with either, ethanol or acetaldehyde as electron donors, and alternative redox-dyes as electron acceptors. The substrate specificity of purified ADH was rather unique. Both acetaldehyde and ethanol were oxidised at almost equal rates. Short-chain primary alcohols and their corresponding aldehydes were also good substrates. Formaldehyde, but not methanol was oxidised by the purified ADH. According to its substrate specificity, the purified ADH of *Ga. diazotrophicus* could be kinetically competent to catalyze, at least in vitro, the double oxidation of ethanol to acetic acid.

---

## I. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Organismo.

*Gluconacetobacter diazotrophicus* fue aislada por Cavalcante y Döbereiner en 1988 a partir de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cultivadas en diversas regiones de Brasil. La bacteria fue descrita como "una nueva bacteria fijadora de nitrógeno tolerante al ácido", y recibió el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante y Döbereiner, 1998); poco tiempo después, se le cambió el nombre a *Acetobacter nitrocaptans*. Posteriormente, con base en experimentos de hibridación RNA/DNA y DNA/DNA, recibió el nombre oficial de *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis *et al.*, 1989), nombre con el cual fue reconocida por un tiempo. Sin embargo, Yamada *et al.*, (1997), propusieron un nuevo esquema en la taxonomía de la familia *Acetobacteraceae*, y actualmente el primer fijador de nitrógeno descrito en esta familia, es referido oficialmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

La familia *Acetobacteraceae* pertenece a la subclase  $\alpha$ -Proteobacteria (Young, 1992). Son bacterias aeróbicas estrictas, Gram negativas que se caracterizan fenotípicamente por su capacidad de oxidar etanol a ácido acético en medios de cultivo con pH neutro o ácido (De Ley *et al.*, 1984; Swings, 1992). Las bacterias ácido acéticas son especialmente conocidas por su rápida e incompleta oxidación de una gran variedad de azúcares y alcoholes, para producir los ácidos orgánicos correspondientes, que son depositados en el medio. Estas bacterias catalizan activamente la oxidación de etanol, D-glucosa, D-sorbitol y glicerol, en lo que se ha llamado "fermentación oxidativa"; son conocidas como productoras de vinagre, y lo producen a partir de etanol por dos reacciones en secuencia catalizadas por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH).

Tradicionalmente la familia *Acetobacteraceae* se ha dividido en los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (De ley *et al.*, 1984; Swings, 1992). Sin embargo, la clasificación de las bacterias acéticas ha sido materia de controversia durante largo tiempo (Bulygina *et al.*, 1992; Sievers *et al.*, 1994; Swings 1992; Urakami *et al.*, 1989). Yamada y colaboradores, (1997) propusieron la división de la familia *Acetobacteraceae* en los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Acidomonas*, sobre la

---

base del análisis de secuencias parciales del gen 16S del RNA ribosomal y del tipo de ubiquinona predominante. En el género *Acetobacter* fueron incluidas las especies que tienen el tipo de ubiquinona Q<sub>9</sub>, como son *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, en tanto que otras especies de *Acetobacter* con ubiquinona Q<sub>10</sub>, incluida *A. diazotrophicus*, fueron transferidas al género *Gluconoacetobacter*, junto con la especie de *Gluconoacetobacter liquefaciens*. En este género también fueron incluidas *Ga. xylinus*, *Ga. hansenii*, y *Ga. europaeus*. Recientemente, con base en la regla 61 del código internacional de nomenclatura bacteriana en 1998, el nombre de *Gluconoacetobacter* fue corregido a *Gluconacetobacter* por Yamada *et al.*, (1998). Otras especies de bacterias acéticas han sido descritas, entre ellas *Acetobacter obodiens* y *A. pomorun* (Sokollet *et al.*, 1998), las cuales deben ser reasignadas al género *Gluconacetobacter*. Hace pocos años fueron descritas dos nuevas especies de *Gluconacetobacter*, *Ga. johannae* (en honor de Johanna Döbereiner) y *Ga. azotocaptans* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001).

## 1.2 Aislamiento de *Ga. diazotrophicus*.

Como fue mencionado, *Ga. diazotrophicus* fue aislado por vez primera de raíces lavadas y del interior del tallo de la caña de azúcar (Cavalcante y Döbereiner, 1988). La asociación de *Ga. diazotrophicus* con la caña de azúcar fue confirmada cuando se logró el aislamiento de la bacteria, de los tejidos internos de diferentes variedades de la plantas de caña de azúcar cultivadas en Australia (Li y MacRae, 1991) y México (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993). Se determinó que la bacteria no se encuentra en la rizósfera de las plantas analizadas, lo cual avaló la idea de su carácter endófito; otro hecho que apoya que la bacteria es endófito, es que no pudo ser aislada en el interior de otras plantas, que fueron colectadas entre los surcos del cultivo de la caña (Reis *et al.*, 1994). Recientemente esta idea vino a ser apoyada con el aislamiento de *Ga. diazotrophicus* de los tejidos internos de plantas adultas e hijuelos de piña (*Ananas comosus*), el cafeto (*Coffea arabica*) (Jiménez-Salgado *et al.*, 1997) y del cereal *Eleusine coracana* (Loganathan *et al.*, 1999), las cuales no son tan ricos en sacarosa como la caña de azúcar. Así mismo, *Ga. diazotrophicus* fue aislado del insecto *Saccharococcus sacchari* (Ashbolt y Inkerman, 1990), el cual es una plaga común en todas las regiones donde se cultiva la caña de azúcar.

---

### 1.3. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).

El descubrimiento de *Ga. diazotrophicus*, nos permitió tener un modelo de estudio sobre la fijación de nitrógeno (FN) en bacterias aeróbicas, endófitas de plantas no leguminosas. En los últimos años se ha incrementado el interés por entender los procesos involucrados en el metabolismo aeróbico, el cual debe de coexistir con la naturaleza anaeróbica de otros procesos biológicos, como la fijación biológica de nitrógeno, y el probable potencial agrobiotecnológico de algunas bacterias (Hill, 1998). El interés sobre el potencial agrobiotecnológico de *Ga. diazotrophicus* fue mayor, cuando se demostró que dicha bacteria tenía efectivamente la capacidad de excretar el 50% del nitrógeno fijado (Cojno *et al.*, 1993), así como de producir diversas auxinas, especialmente ácido indol-acético (Bastian *et al.*, 1998; Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993) y citocininas (Jiménez-Salgado *et al.*, 1994), las cuales podrían ejercer efectos directos sobre la fisiología de la planta e influir sobre el crecimiento de la caña de azúcar.

### 1.4. Mecanismos de protección de la nitrogenasa.

La fijación de nitrógeno en todos los diazótrofos es dependiente de la enzima nitrogenasa. La síntesis de la enzima activa requiere de la transcripción y traducción de aproximadamente 20 genes, los cuales han sido identificados y caracterizados en diversas especies de diazótrofos (Rudnick *et al.*, 1997). *Ga. diazotrophicus* puede llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en condiciones microaerófilas a pH ácido, incluso debajo de pH 3.0 y su actividad de nitrogenasa es inhibida solo parcialmente aún a concentraciones de 20 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  o por la presencia de aminoácidos (Stephan *et al.*, 1991). Todas las nitrogenasas examinadas hasta el momento son extremadamente sensibles al oxígeno (Hill, 1998, Ng *et al.*, 1995).

Se ha propuesto que los organismos capaces de fijar nitrógeno aeróbicamente tienen que regular finamente la síntesis y la actividad de la nitrogenasa, en respuesta a factores del medio ambiente tales como el oxígeno y el nitrógeno (Merrick, 1992). En *Azotobacter chroococcum*, se ha estudiado su gran capacidad para adaptarse a los cambios de concentración de oxígeno; los resultados obtenidos han llevado al concepto de la "Protección Respiratoria" (Dalton y postage, 1969), el cual es un mecanismo de adaptación a la presencia de oxígeno en el medio; dicho mecanismo funciona para proteger del oxígeno de manera eficiente y dinámica a la nitrogenasa, y mantenerla en

---

plena actividad y por lo tanto permite que la diazotrofia continúe en medios altamente oxigenados. La alta tasa respiratoria es la responsable de abatir la tensión de oxígeno y mantener un ambiente intracelular microaerofílico. Además la actividad respiratoria acoplada provee el ATP suficiente (entre 16 y 18 ATPs/mol de N<sub>2</sub> fijado) para sostener el alto costo energético que implica la fijación de nitrógeno (Kavanagh *et al.*, 1998; Robson, 1979; Covalcante y Dorebeiner, 1998).

En las bacterias diazótroficas de vida libre, como *Azotobacter vinelandii*, se han descrito mecanismos adicionales para la protección de la nitrogenasa; entre ellos se destaca el llamado mecanismo de *Protección Conformacional* (Moshiri *et al.*, 1994), en el que, proteínas específicas del tipo hierro-azufre, se asocian transitoriamente a la nitrogenasa y producen complejos que mantienen a la enzima protegida del oxígeno; al formarse este complejo, la enzima es inactivada de manera reversible, hasta que la concentración de oxígeno vuelve a bajar, entonces las proteínas hierro-azufre se disocian de la nitrogenasa y vuelve a ser activa. Este mecanismo de protección sería suficiente para resistir incrementos súbitos de oxígeno.

Ha sido reportado por nuestro laboratorio (Flores-Encarnación *et al.*, 1999), que *Ga. diazotrophicus* posee un sistema respiratorio con propiedades únicas, que estarían asociadas a su modo de vida, específicamente, a su capacidad diazotrofica aerotolerante. Se ha observado que el aumentar la aereación tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y la actividad diazotrofica. Las células crecidas en estas condiciones, poseen un sistema de transporte de electrones membranal muy activo; la caracterización de este sistema ha mostrado que está compuesto de deshidrogenasas para NADH (integral de membrana) para glucosa, etanol y acetaldehído (enzimas periplásmicas dependientes de PQQ), como principales donadores de electrones hacia la cadena respiratoria, vía la UQ<sub>10</sub>. Se determinó que la alta tasa respiratoria promovida por estas deshidrogenasas, permite mantener el oxígeno disuelto en el medio en niveles no detectables por electrodos de O<sub>2</sub> convencionales, a pesar de la intensa aereación que se le está suministrando de forma constante al cultivo. Se ha sugerido que la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal (PQQ-GDHm), es un componente del sistema respiratorio clave en la diazotrofia aeróbica de *Ga. diazotrophicus*, en medios de cultivos con glucosa o sacarosa como única fuente de carbono. Aunque *Ga. diazotrophicus* utiliza preferentemente a la glucosa o sacarosa, también puede emplear gluconato (Cavalcante *et al.*, 1988) y etanol como única fuente de carbono (Domínguez-Pérez, 2003).

---

En cuanto a otros componentes del sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*, nuestros estudios realizados en condiciones de no fijación (crecimiento con amonio en exceso), han sugerido una regulación muy peculiar de la expresión de las oxidasas en esta bacteria. La expresión de oxidasas en bacterias es regulada principalmente por la concentración del oxígeno presente en el medio. Sin embargo, en *Ga. diazotrophicus*, en condiciones de no fijación y alta aeración, la regulación de la expresión de las oxidasas parece darse por la presencia de altas concentraciones de amonio: la quinol oxidasa *ba*, que encontramos como la principal oxidasa en bajo amonio y alta aereación, es reemplazada por la quinol oxidasa *bd*. Esto es notable, pues en *Azotobacter vinelandii* la diazotrofia aeróbica depende de la sobreexpresión de una quinol oxidasa *bd* (Drozd y Postage, 1970).

Además, Ureta y Nordlund (2002), encontró fuertes evidencias que sugieren que *Ga. diazotrophicus* realiza la protección conformacional de la nitrogenasa, de forma similar a lo que ocurre en *A. vinelandii*. No obstante, la señal específica para la disociación del complejo entre la nitrogenasa y la proteína FESII no ha sido identificada (Moshiri *et al.*, 1994; Robson, 1979). Este mecanismo de protección en *Ga. diazotrophicus* le permite a la bacteria ajustarse a las nuevas concentraciones de O<sub>2</sub> sin que la nitrogenasa sea inactivada irreversiblemente.

## II. ANTECEDENTES.

Hay dos tipos de sistemas enzimáticos capaces de realizar reacciones de deshidrogenación y que pueden ser funcionales en la misma bacteria (Matsushita *et al.*, 1994). Estos sistemas de enzimas difieren en la localización y función dentro de la célula. El primer sistema, la vía oxidativa directa, involucra la oxidación no fosforilativa de azúcares, polioles, alcoholes alifáticos y cíclicos, en mayor proporción. En el segundo sistema, las reacciones son catalizadas por las PQQ deshidrogenasas localizadas en la membrana, acopladas directamente a la cadena respiratoria; sus sitios activos están orientados al periplasma. Así, los sustratos son oxidados en el periplasma y los productos de oxidación son fácilmente excretados al medio.

Anthony y Zantman, (1967) describieron por primera vez el grupo prostético pirrolilo quinolina quinona (PQQ) al caracterizar la enzima metanol deshidrogenasa. La enzima resultó ser no dependiente de NAD(P) y poseía un espectro de absorción muy diferente al de las flavoproteínas. Después de desnaturalizar la proteína, se encontró un compuesto de baja masa molecular, que presentó un espectro de emisión de fluorescencia similar al de las pteridinas. Posteriormente, se observó que la estructura del PQQ es una *orto*-quinona (*o*-quinona); los carbonilos en las posiciones C4 y C5 del anillo de la quinona, se reducen a semiquinona y a quinol durante la catálisis (PQQH<sup>+</sup> y PQQH<sub>2</sub>) (Fig. 1). El carbonilo en C5, en estado oxidado es muy reactivo a nucleófilos como alcoholes, aldehídos, amonio, cianuro y aminoácidos. El uso del nombre sistemático (2,7,9-tricarboxi-1H-pirrol(2,3-f)quinolina-4,5-diona) es impráctico y se introdujo el nombre semi-sistemático nombrándola como pirrolo-quinolina-quinona y abreviado como PQQ.

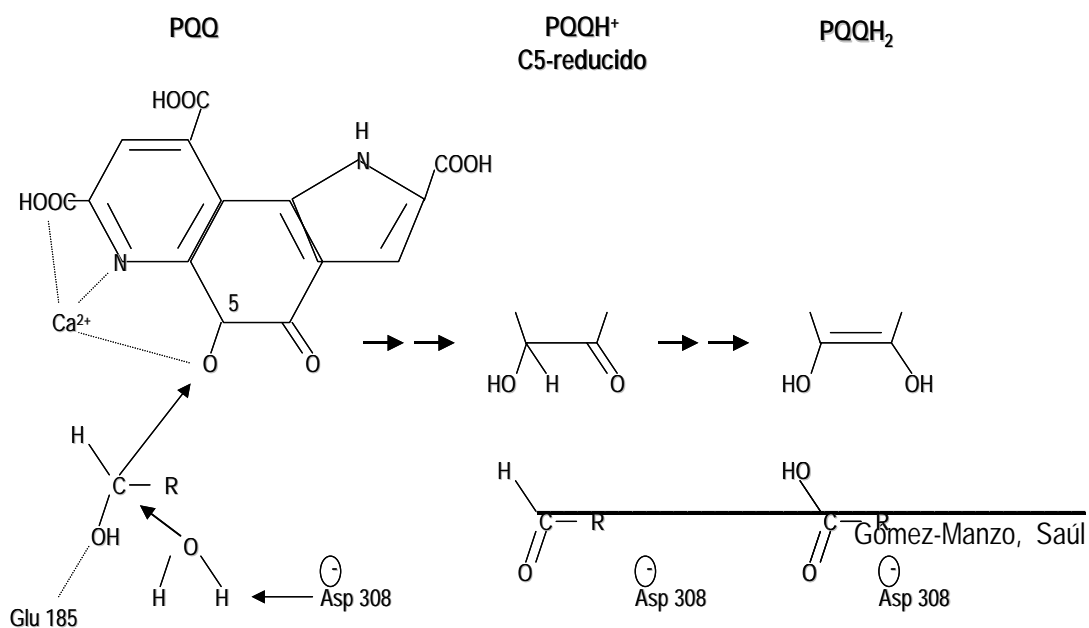




Figura 1. Estructura de PQQ, PQQH<sup>+</sup> y PQQH<sub>2</sub>.

Se han identificado más de 20 enzimas diferentes que presentan PQQ como grupo prostético (Duine y Jongejan, 1989). Estas pueden contener solo PQQ (quinoproteínas) o también hemo, como segundo grupo prostético (quinohemoproteínas); pueden ser monoméricas o multiméricas, libremente solubles en el periplasma o unidas a la membrana. La mayoría de éstas deshidrogenasas se ubican en el lado periplásmico de las bacterias Gram negativas y están involucradas en los primeros pasos de la oxidación de alcoholes, amins y azúcares. Dependiendo de la naturaleza de la deshidrogenasa, la transferencia de electrones ocurre del PQQ hacia un citocromo *c*, citocromo *b*, proteína azul de cobre o a las quinonas bacterianas. Ciertas quinoproteínas están involucradas en la oxidación incompleta (e. g. producción de vinagre y ácido glucónico), mientras otras funcionan en una cadena respiratoria alterna proveyendo al organismo un sistema auxiliar de energía (Duine y Jongejan, 1989). Uno de los trabajos más importantes sobre la estructura del PQQ fue obtenido por Resonancia Magnética Nuclear (NMR); cuando *Hyphomicrobium X* y *Methylobacterium extorquens AM1* se crecieron con sustratos marcados, donde se observó que el PQQ producido se deriva de residuos de glutamato y tirosina; ambos aminoácidos son incorporados de manera intacta en la formación del PQQ (Houck *et al.*, 1988; Houck *et al.*, 1991). La cadena tirosil es la que aporta los seis átomos de carbono del anillo de la *orto*-quinona del PQQ y la consecuente formación de los carboxi-pirroles está dada por la ciclización interna del aminoácido de tirosina; los cinco carbonos restantes son aportados por el glutamato (Fig. 2).

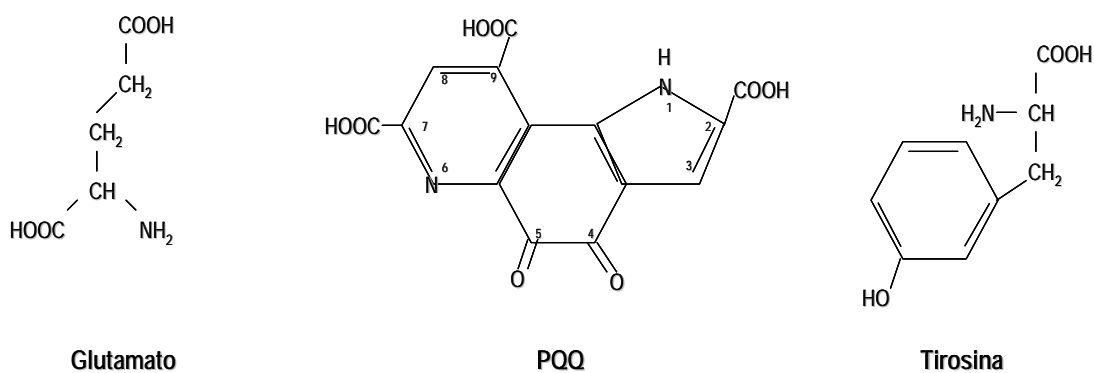


Figura 2. Origen de los átomos de carbono del PQQ.

---

Se han encontrado seis genes asociados a la biosíntesis del grupo prostético PQQ en diversas bacterias, incluyendo *Acinetobacter calcoaceticus*, *Methylobacterium extorquens* AM1 y *Klebsiella pneumoniae*, los cuales han sido designados como *pqqABCDEF* (Meulenberg *et al.*, 1992). Para cada gen se ha propuesto una función; por ejemplo, *pqqA* sirve como precursores de la biosíntesis del PQQ; *pqqB* se le ha asociado una función de transporte; *pqqC* funciona como una oxigenasa; *pqqD*, con función desconocida; *pqqE*, sintetiza el metal que contiene el cofactor y *pqqF* con función de peptidasa (Meulenberg *et al.*, 1992). Una característica importante del PQQ, es la habilidad de formar complejos con  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  en solución. Ésta propiedad fue originalmente reportada por Mutzel y Gorish (1991) y explicada por Itoh y colaboradores., (1997) en su modelo químico sistemático, en el cual el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -PQQ, es capaz de catalizar la oxidación de alcoholes en solventes orgánicos. Todas las deshidrogenasas que contienen PQQ requieren calcio para su actividad, excepto la glucosa deshidrogenasa membranal (mGDH), la cual requiere  $\text{Mg}^{2+}$  (Duine, 1991). Muchas de las bacterias pueden sintetizar su propio PQQ y excretarlo al medio bajo ciertas condiciones (Ameyana *et al.*, 1988; Van Kleef y Duine, 1998).

Las quinoproteínas pueden ser ensayadas usando sus aceptores fisiológicos de electrones; por ejemplo citocromos, proteína azul de cobre y análogos solubles de ubiquinona. Es más usual ensayar estas quinoproteínas usando aceptores artificiales de electrones como metasulfato de fenazina (PMS) o azul de Wurster's (TMPD). Se asume que estos interactúan directamente con el PQQ ó en la superficie de la enzima. En las quino hemoproteínas estos compuestos aceptan electrones de los grupos hemos como fue descrito por Anthony (1986, 1996, 1998).

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs) dependientes de PQQ se encuentran únicamente en la fracción periplásmica de una amplia gama de especies de bacterias como;  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -proteobacterias. Algunas de estas enzimas son solubles en el periplasma y otras se unen a la superficie de la membrana citoplasmática. Las ADHs quinoproteínas y quinohemoproteínas deshidrogenasas forman, por así llamarlo, "El sistema oxidativo de alcoholes en el periplasma". Todas ellas funcionan como deshidrogenasas primarias, las cuales transfieren los equivalentes reducidos directamente a la cadena respiratoria bacteriana aeróbica en el periplasma.

Las ADHs dependientes de PQQ forman el grupo más grande en la familia de las quinoproteínas, con 18 diferentes enzimas (Tabla 1) (Anthony, 1993) y se clasifican en tres tipos. Las ADHs tipo I se han encontrado en un limitado número de proteobacterias y son muy similares a la quinoproteína metanol deshidrogenasa (MDH) que contienen solo PQQ. Las ADHs tipo II; son enzimas solubles en el periplasma y se distribuyen ampliamente entre diversas proteobacterias. Las ADHs tipo III están unidas a membrana y trabajan en la superficie periplásmica y son características de las bacterias del ácido acético (Toyama *et al.*, 2004)

Para el caso de *Ga. diazotrophicus*, nuestro laboratorio demostró recientemente la presencia de las PQQ-deshidrogenasas periplásmicas para glucosa, etanol y acetaldehído deshidrogenasa; su sitio activo está orientado hacia el espacio periplásmico y así su pH óptimo para la reacción que catalizan es ácido (pH < 5), lo cual está de acuerdo con el pH ácido del medio de cultivo durante el crecimiento (Flores-Encarnación *et al.*, 1999). Estas enzimas, especialmente la PQQ-ADH y PQQ-ALDH son significativamente sobre-expresadas cuando se le adiciona etanol (0.5 %) al medio de cultivo (Gómez-Manzo *et al.*, 2007). De la misma manera, nuestro laboratorio en fechas recientes ha demostrado que *Ga. diazotrophicus* puede crecer en etanol como única fuente de carbono, aunque no sabemos si en esta condición la bacteria es capaz de fijar nitrógeno (Domínguez-Pérez, 2003).

Tabla 1. Quinoproteínas y quinohemoproteínas alcohol deshidrogenasas.

Enzima	Localización	Organismo
<b>Quinoproteínas</b>		
Metanol deshidrogenasa (MDH)	S	<i>Methylotrrops</i> <sup>1</sup>
<b>ADH tipo I (PQQ)</b>		
Etanol deshidrogenasa (qEDH)	S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>2</sup>
Alcohol deshidrogenasa	S	<i>Pseudomonas putida</i> <sup>3</sup>
1-butanol deshidrogenasa (BDH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i> <sup>4</sup>
Polipropilén glicol deshidrogenasa (PPGDH)	S	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <sup>5</sup>
<b>Otras quinoproteínas</b>		
Sorbosa/Sorbosona deshidrogenasa	S	<i>Especies de Gluconobacter</i> <sup>6</sup> <i>Pseudogluconobacter saccharoketogenes</i> <sup>7</sup>
Glicerol deshidrogenasa (GLDH)	M	<i>Especies de Gluconobacter</i> <sup>8</sup>

Quinohemoproteínas		
<i>ADH Tipo II (PQQ/Hemo C)</i>		
Polietilen glicol deshidrogenasa (PEGDH)	S	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i> <sup>9</sup>
Etanol deshidrogenasa (qhEDH)	S	<i>Comamonas testosteroni</i> <sup>10</sup>
Alcohol deshidrogenasa (ADH IIB)	S	<i>Pseudomonas putida</i> <sup>3</sup>
Alcohol deshidrogenasa (ADH IIG)	S	<i>Pseudomonas putida</i> <sup>3</sup>
Polivinil alcohol deshidrogenasa (PVADH)	S	<i>Pseudomonas sp</i> <sup>11</sup>
Tetrahidrofurfuril alcohol deshidrogenasa (THFADH)	S	<i>Ralstonia eutropha</i> <sup>12</sup>
1-butanol deshidrogenasa (BDH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i> <sup>4</sup>
<i>ADH Tipo III (PQQ/3Hemo C)</i>		
Alcohol deshidrogenasa (ADH)	M	<i>Acetobacter aceti</i> <sup>13</sup>
Alcohol deshidrogenasa (ADH)	M	<i>Acetobacter pasteurianus</i> <sup>14</sup>
Alcohol deshidrogenasa (ADH)	M	<i>Gluconacetobacter polyoxogenes</i> <sup>15</sup>
Alcohol deshidrogenasa (ADH)	M	<i>Acidomonas methanolicus</i> <sup>16</sup>
Alcohol deshidrogenasa (ADH)	M	<i>Gluconobacter suboxydans</i> <sup>17</sup>
<i>Otras quinohemoproteínas</i>		
Lupamina hidroxilasa (PQQ/Hemo C)	S	<i>Pseudomonas sp</i> <sup>18</sup>
Amina deshidrogenasa (PQQ/Hemo C)	S	<i>Pseudomonas putida</i> <sup>19</sup> ; <i>Paracoccus denitrificans</i> <sup>20</sup>

S: soluble; M: membranal.

1) Anthony, (1993). 2) Gorisch y Rupp, (1989). 3) Toyama *et al.*, (1995). 4) Vagnani y Arp, (2001). 5) Tachinaba *et al.*, (2003). 6) Asakura y Hoshino, (1999). 7) Shibata *et al.*, (2001). 8) Sugisawa y Hoshino, (2002). 9) Yamanaka y Tsuyuki, (1983). 10) De Jong *et al.*, (1995). 11) Shimao *et al.*, (1986). 12) Zanrt *et al.*, (2001). 13) Adachi *et al.*, (1978). 14) Kondo *et al.*, (1995). 15) Tayama *et al.*, (1989). 16) Matsushita *et al.*, (1992). 17) Matsushita *et al.*, (1996). 18) Hooper y Rogozinski, (1998). 19) Adachi *et al.*, (1998). Takagi *et al.*, (1999).

## 2.1. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo I:

### 2.1.1. Quinoproteína-metanol-deshidrogenasa (QMDH).

La alcohol deshidrogenasa mejor caracterizada es la metanol deshidrogenasa de bacterias metilotrópicas. Se ha descrito una enzima metanol deshidrogenasa en *Methylobacterium extorquens* y es una enzima periplásmica soluble que tiene una estructura tetramérica  $\alpha_2\beta_2$ ; cada subunidad  $\alpha$  (66 kDa) contiene una molécula de PQQ y un ión  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales están coordinados. La subunidad  $\beta$  es muy pequeña (8.5 kDa) y su función se desconoce. La estructura de esta enzima tiene características

---

importantes, incluyendo ocho triptofanos en forma de muelle que mantienen la estructura de la subunidad  $\alpha$ . Los genes que codifican para la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  (*mxoF* y *mxoA*) se encuentran localizados en un operon de 12 genes que codifican a las proteínas responsables de la oxidación del metanol (*mxoFJGIR(S)ACKLDB*) (Amaratunga *et al.*, 1997a). *MxoG* es un citocromo  $c_L$ , que es el aceptor de electrones para la deshidrogenasa.

La metanol deshidrogenasa oxida metanol a formaldehído cuando el metanol es la única fuente de carbono (Anthony, 1986). También tiene capacidad de oxidar una amplia variedad de alcoholes primarios, presentando una alta afinidad para estos sustratos ( $K_m$  para metanol es de 5-20  $\mu\text{M}$ ). En contraste los alcoholes secundarios son raramente oxidados. Esta enzima requiere amonio como activador, y su actividad puede medirse espectroscópicamente con metasulfato de fenazina o azul de Wurster, pero no con ferricianuro.

### 2.1.2. Quinoproteínas alcohol deshidrogenasas

Como se presenta en la [tabla 1](#), cuatro diferentes quinoproteínas alcohol deshidrogenasas tipo I han sido identificadas en dos especies, tres de ellas en *Pseudomonas* y una en *Stenotrophomonas*. Una etanol deshidrogenasa (qEDH) similar a la metanol deshidrogenasa descrita arriba (QMDH) ha sido encontrada en *Pseudomonas aureginosa* y *Pseudomonas putida* (Gorisch y Rupp, 1989; Toyama *et al.*, 1995). Al igual que la metanol deshidrogenasa, estas enzimas tienen un pH óptimo relativamente alto (pH 7.7), requieren amonio como activador, y el ferricianuro no funciona como aceptor artificial de electrones; son capaces de oxidar una gran variedad de alcoholes, incluyendo alcoholes secundarios. Sus espectros de absorción son muy similares al de la metanol deshidrogenasa, pero presentan una baja afinidad por el metanol; la  $K_m$  para etanol es de 15  $\mu\text{M}$  y para el metanol es casi 1000 veces más alta. La enzima alcohol deshidrogenasa tipo I de *P. aeruginosa* se caracterizó inicialmente como un dímero, con dos moléculas de PQQ (101 kDa cada una) (Gorisch y Rupp, 1989); sin embargo, se ha visto que ésta enzima presenta la misma estructura que la metanol deshidrogenasa (tetrámero  $\alpha_2\beta_2$ ). La enzima es inhibida por EDTA, el cual induce la salida de PQQ, dando lugar a la formación de una apoenzima. Todas las enzimas antes mencionadas son solubles y trabajan en el espacio periplásmico. De todas ellas, la polipropilén glicol deshidrogenasa (PPGDH) (Tachinaba *et al.*, 2003) es excepcional en términos de su especificidad por sustratos debido a que no oxida alcoholes. Otras dos enzimas solubles

---

como sorbosa/sorbosona deshidrogenasa (Asakura y Hoshino, 1999) y la glicerol deshidrogenasa membranal (GLDH) (Sugisawa y Hoshino, 2002) también son clasificadas como deshidrogenasas tipo I.

## 2.2. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo II:

Este grupo está formado por enzimas solubles como la quinohemoproteína etanol deshidrogenasa (qhEDH). Se han identificado y caracterizado un total de siete diferentes quinohemoproteínas en diversas proteobacterias como *Rhodopseudomonas acidophila*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha* y *Comamonas testosteroni* (Tabla 1). Dos tipos de ADH (ADH IIB y ADH IIG) son producidas en la misma cepa de *Pseudomonas putida* HK5, junto con otra alcohol deshidrogenasa tipo I, y la expresión de cada una de las enzimas depende de la naturaleza del sustrato adicionado al medio de cultivo como fuente de carbono y energía (Toyama *et al.*, 1995).

En la tabla 1, también se encuentran incluidas dos quinohemoproteínas adicionales, la lupamina hidroxilasa y la amina deshidrogenasa, encontradas en las especies de *Pseudomonas* y *Paracoccus*; ninguna de las dos tiene la capacidad de oxidar alcoholes. Lupamina hidroxilasa contiene una molécula de PQQ y un hemo C; y su secuencia de aminoácidos presenta un alto grado de similitud con las ADHs tipo II.

Una quinohemoproteína etanol deshidrogenasa periplásmica (qhEDH) ha sido descrita en *Comamonas testosteroni*. La enzima es un monómero (71 kDa), que contiene dos grupos prostéticos; una molécula de PQQ y un solo hemo C (De Jong *et al.*, 1995) (Fig. 3a). En ensayos de diaforasa donde se sigue la reducción del diclorofenol indolfenol (DCPIP) el pH óptimo es de 7.7 y no requiere de amonio como activador. Se ha postulado que la transferencia de electrones es del PQQ al hemo C de la misma subunidad. Dicha actividad puede seguirse espectroscópicamente por la reducción de ferricianuro. La enzima oxida un amplio rango de alcoholes primarios, secundarios y aldehídos, pero no oxida metanol. La reconstitución de la holoenzima activa requiere una molécula de PQQ e iones calcio, indicando que la estructura y función del sitio activo debe de ser muy similar al de metanol deshidrogenasa. Por estudios de espectroscopía de resonancia paramagnética del electrón (EPR) se ha demostrado la presencia de una semiquinona formada por el PQQ en el sitio activo. El hemo tipo C

---

también ha sido detectado por EPR y por espectroscopía visible, estos estudios indican que el hierro hémico es similar a los otros citocromos de tipo *c* de bajo potencial, los cuales están coordinados por histidina y metionina (Toyama *et al.*, 1995).

### 2.3. PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo III.

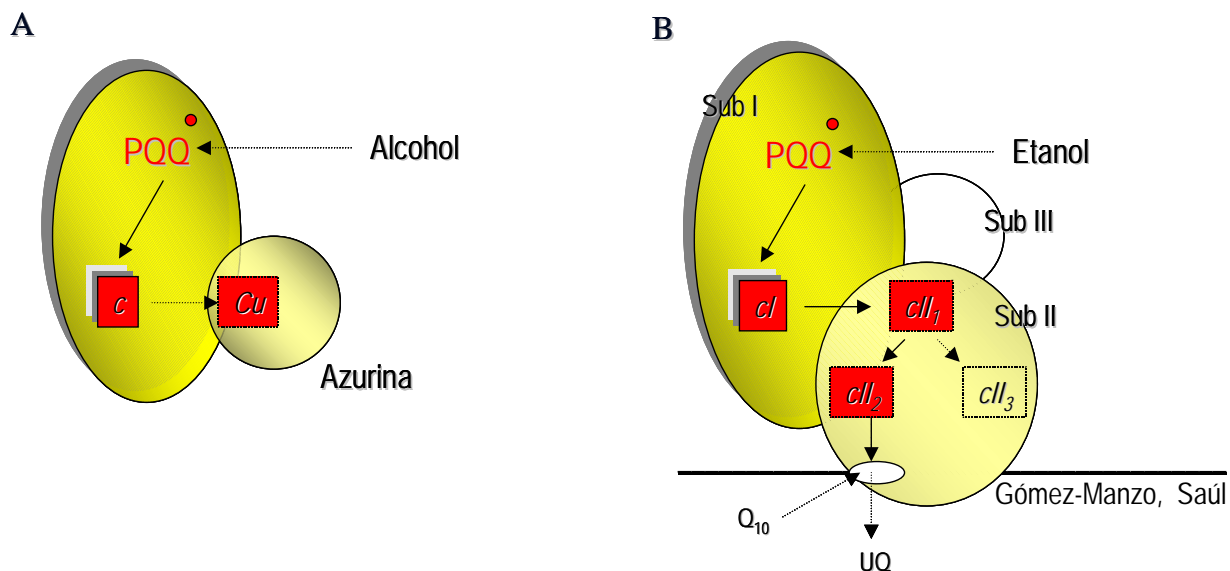
Las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas tipo III se encuentran asociadas a la membrana. Cinco ADHs tipo III han sido descritas y caracterizadas en bacterias ácido acéticas en especies de *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Acidomonas* y *Gluconobacter* (Tabla 1) (Adachi *et al.*, 1978; Kondo *et al.*, 1995; Tayama *et al.*, 1989; Matsushita *et al.*, 1992). Junto con la PQQ-aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) que también se encuentra unida a la membrana, la ADH tipo III es responsable de la oxidación de alcoholes. No requieren amonio como activador y tiene un pH óptimo entre 4.0 y 6.0. La especificidad por sustratos es relativamente restringida comparada con otras quinoproteínas alcohol deshidrogenasas, ya que oxidan preferentemente alcoholes primarios (cadenas de C2 a C6), pero no oxidan metanol ni alcoholes secundarios y presentan actividad con formaldehído y acetaldehído.

El aceptor natural de electrones de las ADHs tipo III es la ubiquinona endógena de la membrana. Estas quinoproteínas están generalmente formadas por tres subunidades. La subunidad I (72 - 80 kDa) es una quinohemoproteína similar a la quinohemoproteína soluble tipo II; en donde se encuentra una sola molécula de PQQ y un solo hemo tipo *C* (Fig. 3b). Los genes estructurales de diversas bacterias del ácido acético han sido secuenciados. Se observó que los genes que codifican para las subunidades I y II están adyacentes en el genoma, con la misma dirección y en el mismo marco de lectura formando un operón (Kondo y Horinouchi, 1997). Las dos subunidades tiene en el amino terminal un péptido señal típico de proteínas de membrana, el cual es probablemente procesado para dar lugar a las subunidades maduras. La secuencia de aminoácidos de la subunidad I indica que es una proteína soluble, la primera parte tiene similitud con la secuencia de la metanol deshidrogenasa soluble; pero en el extremo carboxilo terminal tiene un sitio de unión para el hemo *C* (Inoue *et al.*, 1989). La secuencia de aminoácidos de la subunidad II (48 - 43 kDa) (Inoue *et al.*, 1992) indica que ésta subunidad une a tres hemos *C*, los cuales están presentes en la proteína pura (Matsushita

*et al.*, 1996) (Fig. 3b). En total, la enzima tiene cuatro hemo *C* (unidos a las subunidades I y II). La mayoría de las ADHs de las bacterias del ácido acético tienen una tercera subunidad (subunidad III, 14 - 17 kDa), la cual está ausente en *Gluconacetobacter polyoxogenes* (Tayama *et al.*, 1989). Los genes que codifican esta pequeña subunidad no están localizados con los genes que codifican las otras dos subunidades. La secuencia de aminoácidos deducida para la subunidad III indica que el tamaño del péptido señal es grande (alrededor de 20 kDa); y que la subunidad madura tiene una masa molecular aparente de 14 kDa en SDS-PAGE.

Así como para otras quinoproteínas alcohol deshidrogenasas, la actividad de estas enzimas puede seguirse con metasulfato de fenazina, el cual presumiblemente reacciona a nivel de PQQ. También puede usarse ferricianuro de potasio, el cual recibe los electrones de uno o más de los hemo tipo *C* de la subunidad I y II. La velocidad de reacción con ferricianuro es aproximadamente 10 veces más alta que lo observado con quinohemoproteínas solubles. Con base en esto se ha sugerido que los citocromos de la subunidad II son necesarios para que la enzima presente la alta velocidad que le caracteriza como donador de electrones para cadena respiratoria. Las quinoproteínas de las bacterias del ácido acético difieren de todas las otras alcohol deshidrogenasas en que pueden usar ubiquinonas de cadena corta ( $Q_1$  y  $Q_2$ ) como aceptores de electrones, además de las ubiquinonas endógenas ( $Q_9$  y  $Q_{10}$ ) cuando éstas son reconstituidas en vesículas membranales (Matsushita *et al.*, 1992b).

Las quinohemoproteínas alcohol deshidrogenasas tipo III requieren detergente para su extracción de la membrana. Se ha observado que son proteínas extrínsecas de membrana; debido a que ninguna de sus subunidades parece tener cruces transmembranales claramente definidos.





---

**Figura 3.** Modelo hipotético de la transferencia intramolecular de electrones en las ADHs tipo II y tipo III. (A) Ruta propuesta para la transferencia intramolecular de electrones en las ADHs tipo II. Azurina es el aceptor fisiológico de electrones de la PQQ-ADH de *Comamonas testosteroni*. (B) En las ADHs tipo III los *C1*, *CII<sub>1</sub>*, *CII<sub>2</sub>*, y *CII<sub>3</sub>* corresponden a los 4 sitios de hemo *C* en cada una de las subunidades I y II. Q<sub>10</sub> es representado como el sitio de unión de quinona *in vivo*. En ambos casos inicialmente el PQQ está presente en la forma de semiquinona (PQQ\*) y los hemo *C* están en su forma reducida.

Recientemente se ha realizado la separación de la subunidad II (con tres citocromos *c*) y de un sub-complejo que contiene las subunidades I y III en *Gluconobacter suboxydans* (Matsushita *et al.*, 1996). El sub-complejo I + III presenta actividad en ensayos con DCPIP y PMS; y poca actividad con ferricianuro (sólo a pH bajos), presumiblemente por la vía del hemo *C* de la subunidad I. Sin embargo, el sub-complejo no presentó actividad con la quinona análoga Q<sub>1</sub>; dicha actividad de quinona reductasa fue restaurada con la adición de la subunidad II, concluyéndose que la transferencia de electrones hacia la quinona se lleva a cabo a través de los hemos *C* de las subunidades I y II. Como se esperaba, la subunidad II no presenta actividad catalítica por sí sola. Análisis cinéticos de la reducción del ferricianuro a varios pHs indica que sólo dos de los tres hemos en la subunidad II pueden estar involucrados en la transferencia de electrones del PQQ reducido a la ubiquinona.

Análisis de localización de las subunidades en *G. suboxydans* y *A. pasteurianus* sugieren que los citocromos de la subunidad II están embebidos en la membrana, que las subunidades I y III están fuertemente unidas a la subunidad II, y que esta unión ayuda a la subunidad I de la deshidrogenasa a acoplarse adecuadamente con los citocromos *c* de la subunidad II y guardar una conformación correcta (Inoue *et al.*, 1989). En algunas condiciones de crecimiento (alta aeración y bajo pH), la conformación de las subunidades parece estar alterada, dando lugar a una proteína inactiva; sin embargo la restauración de las condiciones adecuadas de crecimiento (baja aeración y pH neutro) permiten que se produzca de nuevo la forma activa (Matsushita *et al.*, 1995a).

La presente propuesta concierne a la bacteria *Ga. diazotrophicus*, su metabolismo aerobio ha sido reconocido y sin embargo no había descripción previa de su sistema respiratorio hasta la reciente contribución de nuestro grupo (Flores-Encarnación *et al.*, 1999). Tampoco se ha abordado el estudio de las PQQ deshidrogenasas periplásmicas que pertenecen al sistema oxidativo de alcoholes y que probablemente

---

participen de manera muy activa donando electrones a la cadena respiratoria para mantener el alto costo energético que implica la fijación biológica de nitrógeno.

Como ha sido expuesto, las PQQ-deshidrogenasas periplásmicas son un grupo muy importante y poco estudiado; particularmente la PQQ-alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*, por lo cual es necesario tener un conocimiento más completo sobre las características moleculares de esta enzima, sus propiedades cinéticas y particularmente sobre aceptores fisiológicos de electrones y también, sobre su relación con el sistema de transporte de electrones y la producción de ATP.

---

### III. PREMISA.

Las PQQ - deshidrogenasas periplásmicas son un grupo diverso de enzimas que oxidan azúcares, alcoholes y aldehídos, y que están acopladas directamente al sistema respiratorio. Entre ellas, las PQQ-alcohol deshidrogenasas tipo III, solo presentes en bacterias del ácido acético, son un grupo de enzimas asociadas a la membrana, de estructura variable y compleja. Debido a su contenido de grupos prostéticos-redox (un PQQ y cuatro citocromos *c*) constituyen sistemas atractivos para el estudio del transporte de electrones intramolecular. Consideramos importante contribuir al conocimiento sobre la enzimología y propiedades moleculares de estas enzimas, específicamente de la PQQ-ADH tipo III de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

### IV. OBJETIVO GENERAL.

Profundizar nuestro conocimiento acerca de las propiedades de la PQQ alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH): sus propiedades moleculares y catalíticas dentro del contexto de la respiración aeróbica y la fijación de nitrógeno.

---

#### 4.1. METAS.

- Optimizar las condiciones de cultivo para obtener la más alta expresión de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.
  
- Establecer un protocolo para la solubilización y purificación de la PQQ-alcohol deshidrogenasa de la membrana de *Ga. diazotrophicus*.
  
- Determinar las propiedades moleculares y físico-químicas de la PQQ-alcohol deshidrogenasa purificada: su estructura oligomérica y grupos prostéticos asociados, como el PQQ y citocromos tipo *c*. Punto isoeléctrico y termo-estabilidad.
  
- Determinar las propiedades redox de los citocromos tipo *c*: Potenciales de oxidoreducción ( $E^\circ$ ) y tipo de spin.
  
- Determinar las propiedades cinéticas de la PQQ-alcohol deshidrogenasa purificada: Rango de especificidad por sustrato alcoholes, aldehídos y azúcares, pH óptimo, parámetros de catálisis, inhibición por antibióticos e inactivación térmica.
  
- Determinar el mecanismo de transferencia intramolecular de electrones de la enzima PQQ-alcohol deshidrogenasa purificada mediante técnicas espectroscópicas y la aplicación de inhibidores típicos para complejo *bc<sub>1</sub>* mitocondrial.
  
- Definir un mecanismo de reacción en la catálisis de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* para la oxidación de alcoholes y aldehídos.

---

## V. MATERIALES Y METODOS.

### 5.1. Cepa, condiciones de cultivo, preparación y obtención de membranas:

*Gluconacetobacter diazotrophicus* ATCC49037, que es una bacteria Gram negativa, aislado de raíces, tallos y hojas de la caña de azúcar, fue proporcionada por G. Martínez-Drets (Alvarez y Martínez-Drets, 1995) y crecida bajo condiciones descritas por Reis *et al.*, (1994) en el medio LGIP complementado con 2 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Los cultivos activos (1.0 litro) fueron obtenidos después de 24 horas de crecimiento en matraces Ferenbach de 2.8 litros, agitados a 250 rpm, los cuales fueron utilizados para inocular 60 litros de medio LGIP también complementado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 5% de sacarosa en un fermentador de tipo Mobile Pilot Plant (Fermentor BIOFLO 5000, New Brunswick Scientific). El cultivo fue crecido con agitación constante de 320 rpm, temperatura de 30°C y aireación de 32 litros de aire por minuto. A las 36 horas de crecimiento (fase exponencial tardía), se adicionó alcohol etílico 0.5% (v/v) para inducir la sobreexpresión de las enzimas del sistema oxidativo de alcoholes (PQQ-ADH y PQQ-ALDH) (Takemura *et al.*, 1993). Las células fueron obtenidas al final de la fase exponencial (48 horas) por medio de una centrífuga de flujo continuo marca Sharpflex y lavadas dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 6.0, 0.05 M de  $\text{CaCl}_2$  y 0.05 M de  $\text{MgCl}_2$  (solución amortiguadora PCM).

Para la obtención de las membranas, las células fueron resuspendidas en solución amortiguadora de PCM a una temperatura de 4°C para ser rotas con perlas de vidrio (diámetro de 150 a 212 micrones) en un Beadbeater como fue descrito por Escamilla *et al.*, (1987). Se adicionó fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMS-F) ( $15 \mu\text{g. ml}^{-1}$ ) como inhibidor de proteasas. Las células no rotas fueron separadas por centrifugación a 10,000 X *g* por 10 min. Las membranas fueron obtenidas por centrifugación a 44,000 X *g* por 60 min y, posteriormente, lavadas dos veces con la solución amortiguadora de PCM. Las membranas obtenidas fueron utilizadas como fuente de la enzima PQQ-ADH para el proceso de purificación.

### 5.2. Purificación de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

La PQQ-ADH de la fracción membranal se purificó por un proceso parecido al descrito por Adachi *et al.*, (1978) y Matsushita *et al.*, (1992). La fracción membranal se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0 a una concentración final de proteína de  $10 \text{ mg. ml}^{-1}$ . Se ensayaron diferentes concentraciones de

---

detergente de Tritón X-100 (0.1 - 1.1%), con la finalidad de encontrar la concentración adecuada para obtener la mayor actividad de la proteína de interés (PQQ-ADH) en la fracción solubilizada. Rutinariamente el detergente Tritón X-100 se adicionó a una concentración final de 0.5% (v/v); la suspensión membranal se incubó a 4°C por 120 minutos con agitación constante. La PQQ-ADH fue recuperada por ultra centrifugación.

### 5.2.1. Cromatografía.

Todos los pasos de purificación se realizaron con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.0, conteniendo Tritón X-100 al 0.1%.

#### 5.2.1.1. Columna QAE - Toyopearl.

El dializado se aplicó a la columna QAE-Toyopearl (aproximadamente 4 mg. proteína ml<sup>-1</sup>), previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6.0 que contiene Tritón X-100 al 0.1%. La PQQ-ADH fue eluída de la columna con un gradiente lineal de 0 a 0.25 M de NaCl contenido en la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0 que contiene Tritón X-100 al 0.1 %. Las fracciones activas fueron colectadas y dializadas toda la noche con la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0. y aplicada a la columna de DEAE-Toyopearl.

#### 5.2.1.2. Columna DEAE - Toyopearl.

La columna se equilibró con el mismo amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.0, la fracción activa obtenida en la columna de QAE-Toyopearl se aplicó a la columna DEAE-Toyopearl; posteriormente la columna se lavó con dos volúmenes de cama con la misma solución amortiguadora. La enzima se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 250 mM NaCl, en un amortiguador de fosfatos pH 6.0 con Tritón X-100 al 0.1%.

#### 5.2.1.3. Columna Hidroxiapatita-Ultrogel.

La fracción activa obtenida en la columna de DEAE-Toyopearl se aplicó a la columna de hidroxiapatita-Ultrogel (Ha-Ultrogel) (aproximadamente 3 mg. ml<sup>-1</sup>), la cual fue equilibrada y lavada con la misma solución amortiguadora de fosfatos. La PQQ-ADH se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0.25 M de fosfatos pH 6.0. Las fracciones activas se colectaron y concentraron con Amicon YM30 MW (Amicon corporation, Danvers, Mass, USA), y se aplicaron a la columna de exclusión molecular Sephacryl 200,

---

#### 5.2.1.4. Columna Sephacryl 200.

La fracción obtenida en la columna de Ha-Ultrogel se aplicó a la columna de exclusión molecular Sephacryl 200 previamente equilibrada con la solución amortiguadora de fosfatos. Las fracciones activas para ADH se colectaron y concentraron.

### 5.3. Caracterización molecular

#### 5.3.1. Análisis electroforético

##### 5.3.1.1. Electroforesis:

La pureza de la PQQ-ADH purificada de la fracción membranal de *Ga. diazotrophicus* fue analizada por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (PAGE) al 7.5 %. La electroforesis nativa se realizó a las mismas concentraciones que se utilizaron para el gel bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como es descrito posteriormente; únicamente se cambió la concentración de acrilamida en el gel resolvidor y el SDS fue sustituido por Tritón X-100 al 0.1% en el gel de concentración, en el gel de resolución y en la solución amortiguadora de corrida. La enzima PQQ-ADH purificada contenida en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0 se diluyó con el amortiguador de carga en una relación 1:4 (muestra / amortiguador de carga). El amortiguador de carga estuvo constituido por Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 conteniendo glicerol (15%) y Tritón X-100 al 0.1%. La electroforesis se realizó a 25 mA de corriente y a 4 °C. La tinción se realizó con azul de coomassie R250 en solución de metanol (20% v/v), ácido acético (7% v/v) y agua.

##### 5.3.1.2. Zimografía de la PQQ-ADH:

Bajo las mismas condiciones de electroforesis, se realizó la zimografía con azul de nitro tetrazolium (NTB), metasulfato de fenazina (PMS) y sustrato etanol ó acetaldehído a una concentración final de 20 mM, como fue descrito previamente por [Adachi \*et al.\*, \(1978\)](#). El gel, después de haber sido corrido a 25 mA, fue sumergido en 200 ml de amortiguador de McIlvane (Fosfatos y Citratos), pH 6.0, que contenía 28 mg de metasulfato de fenazina (PMS) y 8 mg de azul de nitrotetrazolio (NTB). El gel fue incubado en oscuridad por 20 minutos a 4 °C con agitación constante. La reacción fue iniciada por la adición del sustrato etanol ó acetaldehído a una concentración final del

---

100 mM. Después de la aparición de bandas azules (reacción positiva), la reacción fue detenida por medio de la adición de ácido acético al 7%.

#### 5.3.1.3. Electroforesis (SDS PAGE):

La estructura oligomérica de la PQQ-ADH purificada fue analizada en geles discontinuos de poliacrilamida y condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 10%) utilizando la técnica de Laemli modificada (Del Arenal *et al.*, 1997). El gel resolvidor se preparó a una concentración final de acrilamida del 10%, glicerol 6.0%, SDS 1%, persulfato de amonio 0.028%, N,N,N',N'-tetramethylrthylenediamine (TEMED) 0.074% y Tris-HCl 375 mM, pH 8.9. El gel concentrador se preparó con acrilamida 4%, conteniendo glicerol 8%, SDS 1%, persulfato de amonio 0.066%, TEMED 0.05% y Tris-HCl 125 mM, pH 6.8. La enzima purificada fue precipitada y desnaturalizada por adición de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 5% y lavada tres veces con agua desionizada. Posteriormente, la muestra fue diluída en la mezcla de digestión que contenía: SDS al 5%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 3%, glicerol al 15% y Tris-HCl 125 mM, pH 6.8. La muestra con la mezcla de digestión fue puesta a ebullición por 3 minutos. El amortiguador de corrida estuvo compuesto por: glicina al 1.44%, Tris-HCl al 10.3% y SDS al 1.0%. La electroforesis se realizó a 25 mA de corriente constante y a 4 °C. Se utilizó Mark VII como referencia (obtenido de Bio-Rad). El gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 al 0.1%.

#### 5.3.1.4. Zimografía de hemos:

Se realizó la reacción de actividad de peroxidasa para la tinción específica de hemo C de acuerdo a lo establecido por Thomas *et al.*, (1976). El gel fue sumergido en una mezcla de reacción que contenía acetato de sodio 250 mM, pH 5.0 (120 ml) y 18 mg de tetrametilbencidina disueltos en 80 ml de metanol. La mezcla fue incubada por 2 horas en oscuridad y con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración final de 30 mM como agente revelador de la presencia de citocromos tipo c. La reacción fue detenida sumergiendo al gel en acetato de sodio 250 mM, pH 5.0 más isopropanol al 30%.

#### 5.3.1.5. Enfoque isoelectrico:

El enfoque isoelectrico fue realizado en el equipo Rotofor (BioRad) conteniendo anfólinas (obtenidas de Pharmacia) en un rango de pH de 3.4 a 9.0.



---

### 5.3.2. Determinación del residuo-amino terminal y masa molecular de la subunidades I y II.

#### 5.3.2.1. Masa molecular.

La masa molecular de la enzima PQQ-ADH purificada se calculó en SDS-PAGE al 12.5%, utilizando solución amortiguadora de Tris-HCl 0.2 M (pH 8.5) conteniendo glicina. El gel se fijó con una solución de metanol-ácido acético al 5%, se incubó en solución de de Tris HCl 0.125 M, pH 6.8; por 20 minutos. Posteriormente, se incubó toda la noche en solución de Tris HCl 0.025 M, de glicina y SDS al 0.1%. Las bandas visibles (teñidas con azul de Coomassie) se cortaron y se electroeluyeron en el equipo Gel ELUTER (Biorad). A las proteínas electroeluidas se le determinó la masa molecular por la técnica de Ettan MALDI-Tof Pro.

#### 5.3.2.2. Residuo amino terminal y secuencias internas de la subunidad I.

Las bandas fueron cuidadosamente cortadas del gel teñido con azul de coomassie, fueron desteñidas, reducidas, carbaminometiladas, lavadas, digeridas con tripsina y extraídas de acuerdo a lo reportado por [Kinter y Sherman \(2000\)](#). El volumen del extracto fue reducido por evaporación por medio de una centrifuga al vacio a temperatura ambiente y el volumen se ajustó a 20  $\mu$ l con ácido fórmico. El análisis peptídico por espectrometría de masas fue realizado en el sistema 3200 QTRAP ([Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada](#)), el cual está equipado con un nano electrospray y un sistema de nanoflujo ([agilent 1100 nano pump, Waldbronn, Germany](#)). Las muestras digeridas fueron desaladas en una punta ZipTic-C 18 y separada en una columna Zorbax 300SB C-18 (3.5  $\mu$ m, 50 X 0.075 mm, Agilent, Germany) equilibrada con acetonitrilo al 2% y ácido fórmico 0.1%, por un periodo de 80 minutos. Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 2 a 70% de acetonitrilo. El calor de interfase para desolvatar fue mantenido a 150°C. El espectro fue registrado en modo automático usando el programa Information Dependent Acquisition (IDA). Los iones precursores fueron seleccionados en Q1 utilizando el modo Enhanced Ms mode. El intervalo de exploracion por EMS fue fijado a t m/z 400-1500 y 4000 amu/s. Los iones seleccionados fueron sujetos a exploracion por Enhanced Resolution a una velocidad baja de 250 amu/sec sobre un intervalo de masas estrecho (30 amu), y después sometidos a exploración Enhanced Product Ion Scan (Ms/MS). Los iones precursores fueron fragmentados por disociación activada de colision (CAD). Los fragmentos de iones generados fueron capturados y analizados en una trampa de iones lineal Q3. La base de datos (NCBIInr) del National

---

Center for Biotechnology Information (NCBI) y la identificación proteica fue realizada con el programa Mascot Software (<http://www.matrixscience.com>).

### 5.3.3. Medida del contenido de PQQ.

#### 5.3.3.1 Análisis de Fluorescencia del grupo prostético PQQ.

Una fracción de la enzima purificada fue mezclada con SDS (0.2% w/v), calentada a 60 °C por dos minutos, y centrifugada a 12,000 X *g* por 10 minutos. El sobrenadante fue directamente analizado por la técnica de fluorescencia en el espectrofluorómetro MPF-4 (*d*= 1 cm) a 25 °C; las longitudes de excitación y emisión fueron a 270 y 480 nm, respectivamente (Hommel y Kleber, 1990; Ameyana *et al.*, 1981).

#### 5.3.3.2 Análisis de del grupo prostético PQQ por Resonancia Paramagnética del Electrón (EPR).

La enzima purificada (0.9163 mg) fue resuspendida en solución amortiguadora de fosfato pH 6.0, y fue transferida a tubos de cuarzo (3 mm) de EPR para su análisis utilizando la banda-X a 9-10 GHz) y cuidadosamente fueron congelados en nitrógeno líquido. El espectro de EPR fue realizado con un espectrofotómetro Broker Elexsys E500 usando la banda-X (9.45 GHz), con un campo de frecuencia operando a 100 kHz. La banda-X de EPR fue registrada a 10 K usando un crióstato de flujo continuo de Helio Oxford. Los valores de *g* fueron determinados midiendo el campo magnético y la intensidad de la frecuencia.

### 5.3.4. Determinación de citocromos de la enzima PQQ-ADH purificada.

#### 5.3.4.1. Análisis espectral de citocromos.

##### 5.3.4.1.1. Espectro diferencial de la enzima PQQ-ADH purificada.

Para el análisis espectral de la enzima purificada contenida en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0. Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC con celdas de 1 cm de paso de luz. La muestra fue oxidada con ferricianuro de potasio y reducida con ditionita de sodio ó etanol 10 mM o acetaldehído, respectivamente. Los espectros diferenciales reducido menos oxidado para ambos sustratos se obtuvieron por resta matemática de los archivos electrónicos. El contenido de hemo *C* se determinó por medio del Coeficiente de Extinción Milimolar (CEM) de 19.1 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (553-540 nm).

---

#### 5.3.4.1.2. Espectro diferencial de monóxido de carbono y su espectro de fotodisociación de la PQQ-ADH purificada.

El espectro diferencial de monóxido de carbono se obtuvo por reducción de la enzima PQQ-ADH purificada con ditionita o empleando sustratos etanol o acetaldehído, y posteriormente burbujeada con monóxido de carbono por 5 min antes de su congelación a 77 °K (espectro pre-fotólisis) (Flores-Encarnación *et al.*, 1999). El espectro diferencial de monóxido de carbono se obtuvo por sustracción matemática del espectro obtenido con monóxido de carbono menos el espectro reducido con ditionita o sustrato etanol, o acetaldehído.

El espectro de fotodisociación se obtuvo a partir de la muestra reducida y burbujeada con monóxido (espectro pre-fotólisis), y posteriormente incubada 10 min en oscuridad, la muestra fue sometida a fotólisis por medio de tres disparos de un flash fotográfico y se obtuvo el espectro post-fotólisis. El diferencial de fotodisociación se obtuvo restando el espectro pre-fotólisis al espectro post-fotólisis (Kelly *et al.*, 1993).

#### 5.3.4.2. Determinación de hemos por HPLC

La composición de hemos presentes en la enzima PQQ-ADH purificada fue determinado mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa (HPLC). Los hemos fueron extraídos mediante el procedimiento de acetona ácida como es descrito a continuación: La enzima PQQ-ADH (600 µg) de proteína fue liofilizada y resuspendida en 1.5 ml de acetona ácida (acetona 90%, HCl 5%, H<sub>2</sub>O 5%), se agitó suavemente y se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min. El procedimiento se repitió por tres ocasiones (volúmenes 5 ml, respectivamente) bajo el siguiente protocolo: el sedimento se resuspendió en acetona ácida y se incubó por 10 minutos en hielo a 4°C y posteriormente 10 minutos a temperatura ambiente bajo oscuridad total; posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min. Los volúmenes de extracción se colectaron en un frasco ámbar los cuales se mezclaron con 3.5 ml de éter y 5 ml de agua MiliQ. Se homogenizó y la fase etérea se puso en un frasco ámbar; este procedimiento se repitió por 3 veces. La fase etérea se evaporó bajo flujo de N<sub>2</sub>-gas y se resuspendió en acetonitrilo conteniendo ácido trifluoroacético al 0.5%. La solución fue aplicada a una columna de fase reversa C<sub>18</sub> (Deltapak, Waters) usando un cromatógrafo de líquidos (Waters Chromatography System) previamente equilibrada con una solución de agua 75%, acetonitrilo 25% y ácido trifluoroacético (TFA) 0.5%. Los grupos hemo, se eluyeron en gradiente de acetonitrilo-

---

agua como es reportado por [Lubben y Morand, \(1994\)](#). Se utilizó protoporfirina IX comercial (protohemo B, Sigma) como estándar.

#### 5.3.4.3. Titulación potenciométrica de los citocromos *c* de la PQQ-ADH purificada.

La titulación potenciométrica de la enzima (300  $\mu$ g) se realizó a temperatura ambiente y anaerobiosis mediante flujo continuo de nitrógeno en la celda de reacción. La enzima se oxidó con ferricianuro de potasio, para alcanzar diferentes niveles de reducción se adicionaron cantidades crecientes de una solución anaeróbica de ditionita de sodio ([Hagerhall \*et al.\*, 1999](#)). El ensayo se realizó en amortiguador de fosfatos 0.01 M (pH 6.0), conteniendo Tritón X-100 al 0.1%. Los siguientes mediadores redox se adicionaron a una concentración final de 50 mM: antraquinona-2 sulfonato ( $E_{m7} = -225$  mV); 2-hidroxi 1,4 naftoquinona ( $E_{m7} = -145$  mV); menadiona ( $E_{m7} = 0$  mV); duroquinona ( $E_{m7} = +50$  mV); 1,4 naftoquinona ( $E_{m7} = +69$  mV); fenazina metasulfato ( $E_{m7} = +80$  mV); 1,2 naftoquinona ( $E_{m7} = +134$  mV); 1,4 benzoquinona ( $E_{m7} = +285$  mV). El potencial fue medido mediante un electrodo de combinación Ag/AgCl platino, el cual fue calibrado por medición del potencial de una solución saturada de quinhidrona ( $E_{m7} = +285$  mV). Para cada 5 mV se graficó el espectro de absorbencia de la reducción de citocromo *c* y se determinó mediante el diferencial de absorbencia ( $A_{554} - A_{540}$ ). La reducción de citocromos tipo *c* de la PQQ-ADH purificada de *Ga. diazotrophicus* fue registrada a una longitud máxima de 553 nm y la longitud de onda de referencia a 540 nm usando un espectrofotómetro OLIS-SLM DW2000. Todos los potenciales determinados son potenciales relativos al estándar que es el electrodo de hidrógeno. Los datos experimentales fueron graficados usando la ecuación de Nerst para 1, 3 o 4 componentes con un solo electrón con potenciales redox desconocidos.

### 5.4. Caracterización cinética.

#### 5.4.1. pH óptimo en membranas y en la fracción purificada.

El pH óptimo de la actividad de la PQQ-ADH tanto en membranas como en la enzima purificada fue obtenido utilizando el sistema de amortiguador de McIlvaine (amortiguador de citratos y fosfatos) en un rango de pH de 3.5 a 9.0. Las actividades fueron medidas empleando el método cinético de DCPIP + PMS y el de ferricianuro reductasa como aceptor de electrones. Ambos métodos, son descritos en el apartado de ensayo enzimático.

---

#### 5.4.2. Especificidad por sustratos.

A la preparación purificada se le determinó el rango de especificidad por sustratos alcoholes, aldehídos y otros compuestos orgánicos. Se utilizaron los siguientes sustratos a una concentración final de 20 mM: metanol, etanol, iso-propanol, butanol, alcohol alílico glicerol, acetona, fenol, formaldehído, acetaldehído, glutaraldehído y otros compuestos orgánicos (Adachi *et al.*, 1978 a,b).

#### 5.4.3. Parámetros cinéticos.

A la preparación purificada se le determinaron los parámetros cinéticos para etanol, alcohol alílico, butanol y acetaldehído como:  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$ ,  $K_{cat}/V_{max}$ . Los parámetros cinéticos fueron obtenidos a partir de los gráficos de dobles recíprocas de Line Weaver utilizando el programa sigma plot 2000. A su vez se utilizó la gráfica de Eadie Hofstee plot para determinar la  $K_m$  y la  $V_{max}$ .

#### 5.4.4. Termo inactivación de la enzima PQQ-ADH purificada.

Se realizaron curvas de inactivación térmica de la enzima PQQ-ADH purificada, el método que se empleó fue el de PMD y DCPIP como acarreador y aceptor final de electrones respectivamente. La enzima fue incubada a temperatura constante de 40 °C en baño María. Cada minuto se fue tomando muestra y se midió la actividad enzimática con etanol y acetaldehído hasta inactivación total.

#### 5.4.5. Efecto de mixotiazol y antimicina sobre la actividad de la PQQ-ADH.

A la fracción purificada se le realizaron curvas de dosis-respuesta con antibióticos específicos del complejo *bc1* como mixotiazol y antimicina. La actividad de la enzima PQQ-ADH fue medida después de ser incubada con mixotiazol o antimicina en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 6.0 por 10 minutos. Se determinó la  $K_i$  tanto para el mixotiazol como para la antimicina.

El sitio de acción del inhibidor en la enzima PQQ-ADH fue determinado a partir de su impacto sobre la cinética de reducción de los citocromos *c* presentes en la enzima, usando los sustratos etanol o acetaldehído y usando a la ditionita como referencia de reducción máxima. Dicho ensayo, consistió en poner 200  $\mu$ g de enzima en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0 en una celda de 1 ml de reacción. Se trazó el espectro de la enzima nativa "como se purifica" (reducido); posteriormente, se

---

adicionaron alícuotas de ferricianuro de potasio 0.05 M hasta tener a la enzima en su estado oxidado y se obtuvo el espectro de la forma oxidada. Se adicionó mixotiazol o antimicina a una concentración saturante (100  $\mu$ M) y la mezcla de reacción fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se adicionó etanol o acetaldehído 0.02 M y se trazaron espectros sucesivos hasta máxima reducción. Posteriormente se adicionaron unos gránulos de ditionita para obtener el espectro de máxima reducción con ditionita. Como control, la enzima se oxidó con ferricianuro de potasio y se realizó una cinética de reducción con etanol o acetaldehído en ausencia de inhibidores; en cada uno de los ensayos se calculó el porcentaje de reducción de citocromos tipo *c* con respecto a la reducción total obtenida con ditionita (100%). Alternativamente, la cinética de reducción de los citocromos *c* fue seguida a longitudes de onda fijas (554 nm - 540 nm), en presencia y en ausencia de los inhibidores.

## 5.5. Determinación de los productos finales de reacción:

### 5.5.1. Cromatografía de gases acoplada a masas.

La enzima PQQ-ADH purificada (300  $\mu$ g) se suspendió en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, ferricianuro de potasio como aceptor de electrones a una concentración final de 0.1 M y etanol 0.1 M como único sustrato inicial, en un volumen final de 1 ml de reacción y en una celda herméticamente sellada. Después de la reducción total del ferricianuro de potasio se inyectó una alícuota de la mezcla final de reacción al equipo de cromatografía de gases acoplado a masas (JEOL/JM-AXSOSHA) previamente equilibrado. Se utilizaron etanol, acetaldehído y acetato (10 mM) como estándares.

### 5.5.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Bajo las mismas condiciones de ensayo descritas para la cromatografía de gases acoplada a masas, la mezcla final de reacción (1 ml) se sometió al resonador de RMN (Oxford), a una frecuencia de 500 HGZ para la determinación de Carbono y de 250 HGZ para la determinación de Hidrógeno para cada uno de los productos finales presentes en la mezcla de reacción.

---

### 5.5.3. Ensayo de carbazida - carbazona con etanol radioactivo.

El ensayo fue realizado en matraces de 50 ml que tienen un soporte para fijar un tubo Eppendorf de 1 ml, el cual contenía carbazida 0.05 M y que no está en contacto con la mezcla de reacción. La enzima PQQ-ADH (300  $\mu$ g) fue resuspendida en solución amortiguadora de fosfatos, ferricianuro de potasio como aceptor de electrones y etanol radioactivo ( $^{14}\text{C}$ ) como único sustrato inicial. Después de la reducción total del ferricianuro de potasio (cambio de color de amarillo a leuco) se midió la marca de  $^{14}\text{C}$  en la mezcla de reacción y en la solución de carbazida contenida en el tubo Eppendorf. Como control negativo se utilizó solución amortiguadora de fosfatos, ferricianuro de potasio como aceptor de electrones y etanol radioactivo ( $^{14}\text{C}$ ) como único sustrato inicial. Como control positivo se utilizó la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH (obtenida de Sigma. Co.) y etanol radioactivo ( $^{14}\text{C}$ ) como único sustrato inicial.

### 5.5.4. Ensayo acoplado de DCPIP con tiosemicarbazida.

Se diseñó un ensayo acoplado de dos celdas de reacción que permitió seguir, de manera continua, la reducción del DCPIP y al mismo tiempo, el cambio de absorbencia a 260 nm del reactivo tiosemicarbazida, cuando este compuesto reacciona con el aldehído formando una tiosemicarbazona (Djurdjic y Stojanovic, 1998). El ensayo se realizó en celdas de cuarzo (1000  $\mu$ L de volumen) herméticamente selladas y unidas mediante una manguera de látex. La primera celda contenía 0.01 M de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0, DCPIP 3 mM como aceptor de electrones, PMS 0.06 mM como mediador de electrones, 300  $\mu$ g de PQQ-ADH purificada y etanol 0.02 M como único sustrato. La segunda celda contenía 300  $\mu$ L de solución de tiosemicarbazida a una concentración final de 0.05 M en amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.0, donde la tiosemicarbazida reaccionó con el acetaldehído formando una carbazona con absorbencia específica a 260 nm. La actividad de alcohol deshidrogenasa se midió en la primera celda, mediante la cinética de reducción del DCPIP ( $A_{600}$ ) para este ensayo se añadió un exceso de DCPIP (3 mM) con la finalidad de aumentar el tiempo de oxidación del etanol.; la formación de la tiosemicarbazona (segunda celda) fue verificada a 260 nm. Se realizó un control negativo sin enzima y un control positivo con acetaldehído grado reactivo por medio de una curva de calibración de tiosemicarbazida-acetaldehído con concentraciones conocidas de acetaldehído; ésto debido a que no se contaba con el valor del coeficiente de extinción molar para la tiosemicarbazona. De esta manera se cuantificó la concentración de acetaldehído liberado durante la reacción. La sensibilidad del método

---

de tiosemicarbazida es de  $2.2 \times 10^{-6}$  M para el acetaldehído de acuerdo a lo reportado por Djurdjic y Stojanovic (1998).

## 5.6. Otros métodos:

### 5.6.1. Ensayos enzimáticos.

#### 5.6.1.1. Ensayo de Oxidasas.

Las actividades de oxidasas en membranas fueron determinadas usando un electrodo de oxígeno tipo Clark. Las muestras (0.1 mg de proteína de membrana) se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 0.1 M, (pH 6.0) en un volumen final de 2 ml de mezcla de reacción. La reacción fue iniciada mediante la adición del sustrato: glucosa, etanol o acetaldehído a una concentración final de 20 mM (Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

#### 5.6.1.2. Ensayos para deshidrogenasas.

La actividad de deshidrogenasa fue ensayada utilizando el método de reductasa de DCPIP y el de ferricianuro reductasa. 1) En el método de DCPIP y PMS como aceptor y mediador de electrones, respectivamente; la mezcla de reacción contenía DCPIP 80  $\mu$ M, PMS 0.6 mM y 0.03 mg de la enzima purificada, en un volumen total de 1 ml de solución amortiguadora PCM, pH 6.0. La reacción fue leída a temperatura ambiente en el espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC y se midió por un cambio de absorbencia a 600 nm con celdas de 1 cm de paso de luz y por un tiempo de 1 min. 2) Empleando el método de ferricianuro reductasa; la mezcla de reacción se ajustó a 1 ml conteniendo: amortiguador de McIlvaine (fosfatos y citratos) pH 6.0; KCN 1.5 mM; ferricianuro de potasio 0.1 M, y etanol 20 mM. La reacción se inició por adición de 0.03 mg de muestra (enzima) y se incubó por 20 min. a 30 °C en la oscuridad. La reacción fue parada por la adición de 0.5 ml de reactivo dupanol ( $\text{FeCl}_3$ , dodecil sulfato de sodio (SDS) y 95 ml de ácido fosfórico al 85%; y aforado a un volumen final de 1 L con agua desionizada). Después de 10 minutos de haber adicionado el reactivo de paro, se adicionó 3.5 ml de agua desionizada. Se determinó la absorbencia de la solución final a 660 nm (Ameyama y Adachi, 1982).



---

Bajo las dos condiciones de determinación de la actividad enzimática, una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de etanol por minuto bajo estas condiciones de ensayo (Adachi *et al.*, 1978).

#### 5.6.1.3. Actividad de quinona reductasa.

La actividad de quinona reductasa de la PQQ-ADH fue medida espectrofotométricamente siguiendo la disminución de absorbencia a 275 nm y 25°C, como fue descrito por Matsushita *et al.*, (1992). Se utilizaron quinonas análogas de la UQ<sub>10</sub> como la Decil Ubiquinona (DUQ), quinona con un isopreno (Q<sub>1</sub>) y quinona con dos isoprenos (Q<sub>2</sub>) obtenidas de Sigma. Una unidad de quinona reductasa es definida como la cantidad de enzima que tiene la capacidad de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de etanol por minuto.

#### 5.6.1.4. Determinación de proteína.

El contenido de proteína fue determinado por el método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951) usando albúmina sérica bovina como estándar (BSA).



## VI. RESULTADOS.

### 6.1. Optimización del medio de cultivo de *Ga. diazotrophicus*

Flores-Encarnación *et al.*, (1999) demostraron que *Ga. diazotrophicus* presenta niveles elevados de expresión para las actividades de deshidrogenasas periplásmicas durante el crecimiento en cultivos en batch y bajo la condición de fijación biológica de nitrógeno (FBN). En éste trabajo se optimizaron las condiciones de cultivo que nos permitieron incrementar los niveles de expresión de las actividades de las enzimas membranales del sistema oxidativo de alcoholes: PQQ-ADH y PQQ-ALDH de *Ga. diazotrophicus*. El incremento de la actividad de ambas enzimas fue de tres veces cuando se adicionó alcohol etílico (0.5% v/v) a las 36 horas de cultivo respecto al cultivo no inducido (Tabla 2). La actividad de la PQQ-ADH pasó de 2.0 a 7.6 unidades / mg de proteína membranal y la actividad de la PQQ-ALDH fue de 6.0 a 22.8 unidades / mg. La actividad de otras enzimas como la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal (PQQ-GDH) no fue modificada como se muestra en la tabla 2.

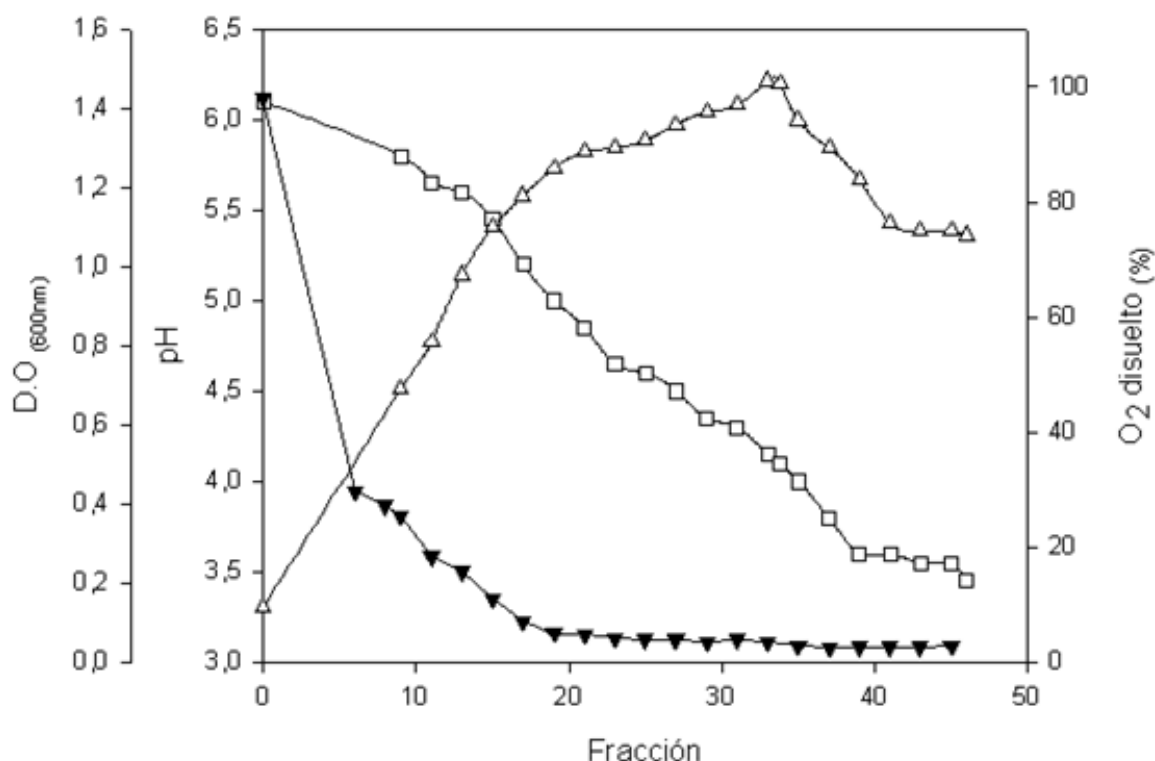
Tabla 2. Efecto del etanol y la sacarosa como fuentes de carbono<sup>a</sup> en el crecimiento y la expresión de las PQQ-deshidrogenasas<sup>b</sup> membranales de *Ga. diazotrophicus*.

Sustrato	Fuente de Carbono		
	Unidades / mg		
	Sacarosa	Etanol	Sacarosa + Etanol
Glucosa	0.48	0.55	0.5
Acetaldehído	6.0	31.0	22.8
Etanol	2.0	10.8	7.6
Crecimiento (D.O)	2.0	0.7	2.2

<sup>a</sup>Las células fueron crecidas en el medio LGIP que contiene sacarosa 5% o etanol 0.75% como única fuente de carbono o fuentes de carbono combinadas. Después de las 48 horas fue medido el crecimiento a 600 nm y las células fueron procesadas para la obtención de la fracción membranal.

<sup>b</sup>Las actividades de etanol y acetaldehído deshidrogenasa fueron determinadas en la fracción membranal por medio del ensayo espectroscópico de ferricianuro de potasio, mientras que la actividad de glucosa deshidrogenasa fue determinada por el ensayo de DCPIP + PMS como es descrito en materiales y métodos.

La curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* es presentada en la figura 4, conforme fue aumentando la densidad celular, el pH del medio de cultivo y la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo fueron bajando con respecto al tiempo; propiciando un ambiente cuasi anaeróbico para que se realizara la FBN a pesar de la alta aereación suministrada al medio de cultivo. También se observó que hay una disminución de la densidad óptica después de las 36 horas de cultivo, esto se debió a la aglomeración de las células como respuesta al etanol adicionado al medio de cultivo.

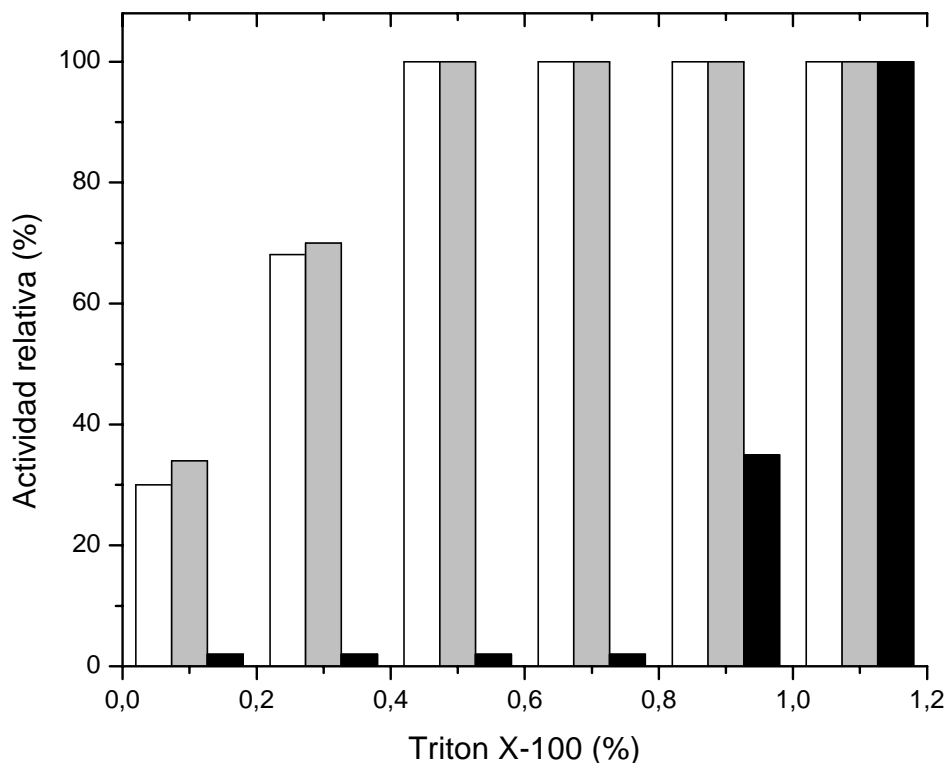


**Figura 4.** Cinética de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medio LGIP en un fermentador de tipo Mobile Pilot Plant (Fermentor BIOFLO 5000, New Brunswick Scientific). A las 36 horas se adicionó etanol al 0.5% como segunda fuente de carbono. (Δ) Crecimiento del cultivo:  $A_{560nm}$ . (▼) Oxígeno disuelto en el medio. (□) pH.

## 6.2. Purificación de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

Se probó la solubilización de la enzima PQQ-ADH como respuesta a la concentración del detergente Tritón X-100. Las actividades de las enzimas PQQ-ADH y PQQ-ALDH fueron detectadas en la fracción soluble. La concentración óptima para solubilizar a la enzima PQQ-ADH de la fracción membranal de *Ga. diazotrophicus* fue de

0.5% (v/v). A esta misma concentración, el detergente, también solubilizó el 90% de la enzima PQQ-ALDH (Fig. 5). La actividad de la PQQ-GDH permanece en su totalidad, en la fracción membranal después que las membranas han sido tratadas con el detergente al 0.5%.



**Figura 5.** Solubilización diferencial de las enzimas membranales de *Ga. diazotrophicus* con detergente Tritón X-100. Las membranas ( $\sim 10$  mg de proteína  $\text{ml}^{-1}$ ) fueron resuspendidas en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6.0 y tratadas con diferentes concentraciones de detergente Tritón X-100 como es indicado en la figura. La actividad de ADH (Blanco), ALDH (gris) fueron determinadas con ferricianuro de potasio como aceptor de electrones. La actividad de GDH (negro) fue ensayada con DCPIP + PMS como aceptor y mediador de electrones, respectivamente. Las actividades son expresadas como porcentaje relativo respecto a la actividad inicial en la fracción membranal antes de la solubilización.

### 6.2.1. Columna QAE - Toyopearl.

El sobrenadante que contenía ambas enzimas (PQQ-ADH y PQQ-ALDH) fue aplicado a la columna de QAE-Toyopearl previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0. La PQQ-ADH fue eluída con un gradiente lineal de 0 - 0.25 M de NaCl. El perfil de elución para esta columna reveló la presencia de dos frentes de proteína ( $A_{280\text{nm}}$ ) que presentan color naranja ( $A_{405\text{nm}}$ ) (Fig. 6A). El primer pico eluyó a una molaridad de 0.04 - 0.06 M de NaCl; presentó actividad con el sustrato etanol y con el sustrato acetaldehído. El segundo pico coloreado eluyó a una molaridad de 0.9 - 0.12

M de NaCl. Este pico presentó actividad sólo con el sustrato acetaldehído (Fig. 6B). El segundo pico se utilizó posteriormente para purificar a la PQQ-ALDH membranaral del mismo organismo (Gomez-Manzo *et al.*, 2007. Datos en prensa).

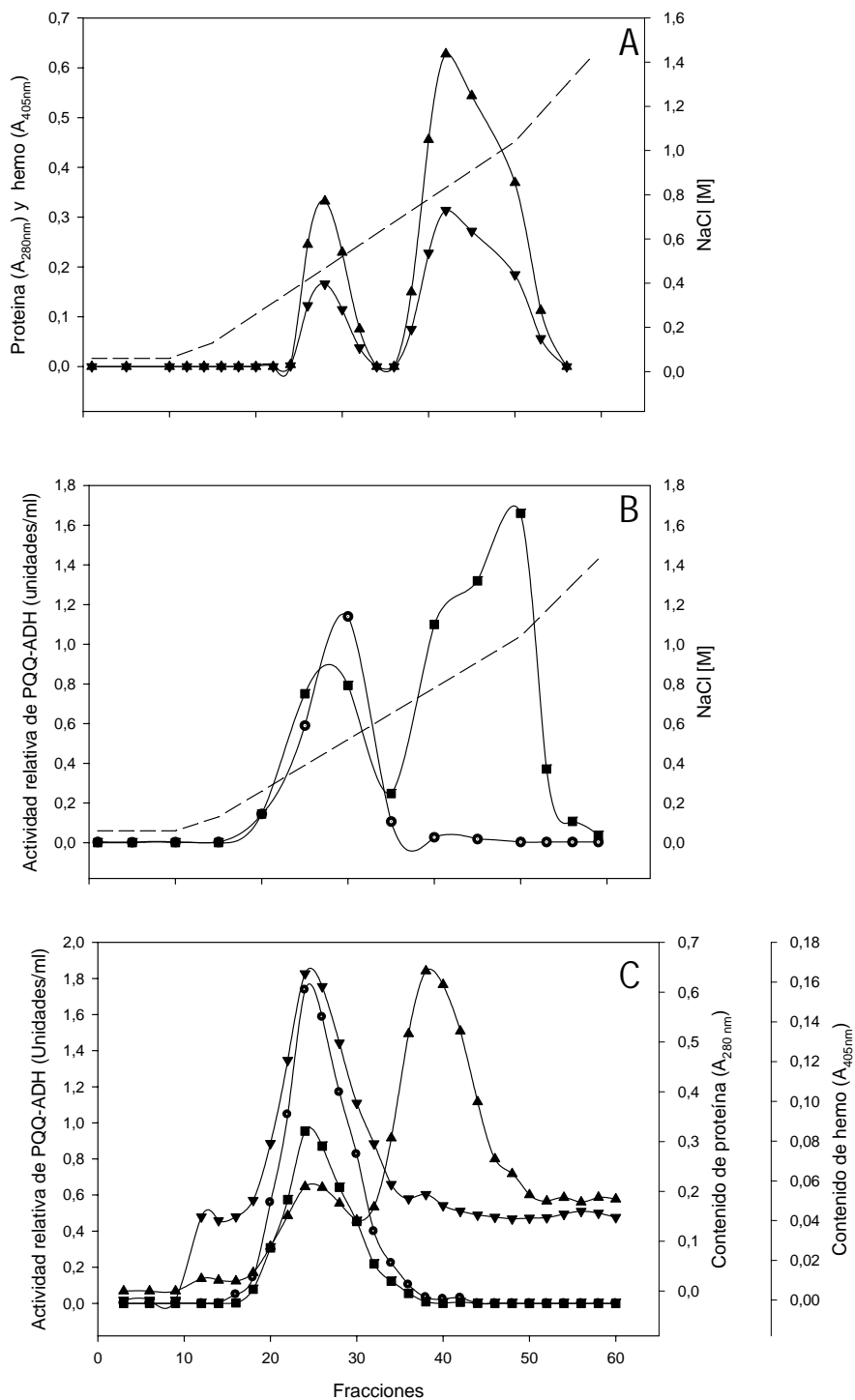


Figura 6. Separación cromatográfica de los complejos de ADH y ALDH. A) 2.5 g de proteína solubilizada a una concentración final de 0.5% de Tritón X-100 fue aplicado a la columna de QAE-Toyopearl (3 X 18 cm) previamente equilibrada con 0.01 M de solución

---

amortiguadora de fosfatos pH 6.0, conteniendo 0.1% de Tritón X-100. La enzima fue eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.25 M. Perfil de elución de proteína ( $A_{280\text{nm}}$  ▲) y hemo ( $A_{405\text{nm}}$  ▼). **B)** Perfil de elución para las actividades de etanol (●) o acetaldehído (■) deshidrogenasa empleando el método de ferricianuro de potasio como aceptor de electrones. **C)** Perfil de elución de la columna Sephacryl 200. Líneas punteadas en paneles A representan el perfil molar del gradiente de NaCl y en el panel B el gradiente molar de fosfatos utilizado.

### 6.2.2. Columna Hidroxiapatita-Ultrogel.

Las fracciones del primer pico, activas sobre etanol y acetaldehído fueron mezcladas y dializadas contra amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 6.0. El dializado se aplicó a la columna Hidroxiapatita-Ultrogel previamente equilibrada. Después de lavar la proteína no adsorbida, la proteína retenida fue eluída con un gradiente lineal de 0 a 0.25 M de fosfatos, pH 6.0 que contenía Tritón X-100. El perfil de elución para ésta columna mostró un solo pico coloreado (naranja) que eluyó a 0.06 M de fosfatos y que presenta un perfil paralelo de actividad para los sustratos etanol y acetaldehído ([Datos no mostrados](#)).

### 6.2.3. Columna Sephacryl 200.

Las fracciones activas obtenidas en la columna de Ha-ultrogel fueron concentradas a 8 ml y aplicadas a la columna de Sephacryl 200 (exclusión molecular); donde se observó dos frentes de elución de proteína ( $A_{280\text{nm}}$ ) ([Fig. 6C](#)). El primer frente presentó color (naranja) ( $A_{405\text{nm}}$ ) fue obtenido después de haber pasado un volumen de cama de la columna; las fracciones que corresponden a éste frente presentaron actividad con etanol y acetaldehído. El segundo frente de elución, no presentó color y tampoco, actividad con etanol o acetaldehído ([Fig. 6C](#)). Los resultados del proceso de purificación de la enzima PQQ-ADH son presentados en la [tabla 3](#). Al final del proceso, la enzima fue purificada 46.2 veces, con un rendimiento de 15% y una recuperación de proteína de 9 miligramos.

Tabla 3. Tabla de purificación de la enzima PQQ-ADH.

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Act. específica (unidades/mg <sup>a</sup> )	Actividad total (unidades)	Rendimiento (%)
Membrana	2515	6	15090	100
Solubilizado	546	15	8190	54
QAE-Toyopearl	228	21	4788	31
DEAE-Toyopearl	62	54	3348	22
Ha-ultrigel	15	180	2700	18
Sephacryl 200	9	256	2250	15

La actividad específica fue ensayada por medio del método de ferricianuro de potasio bajo las condiciones estándares descritas en Materiales y Métodos.

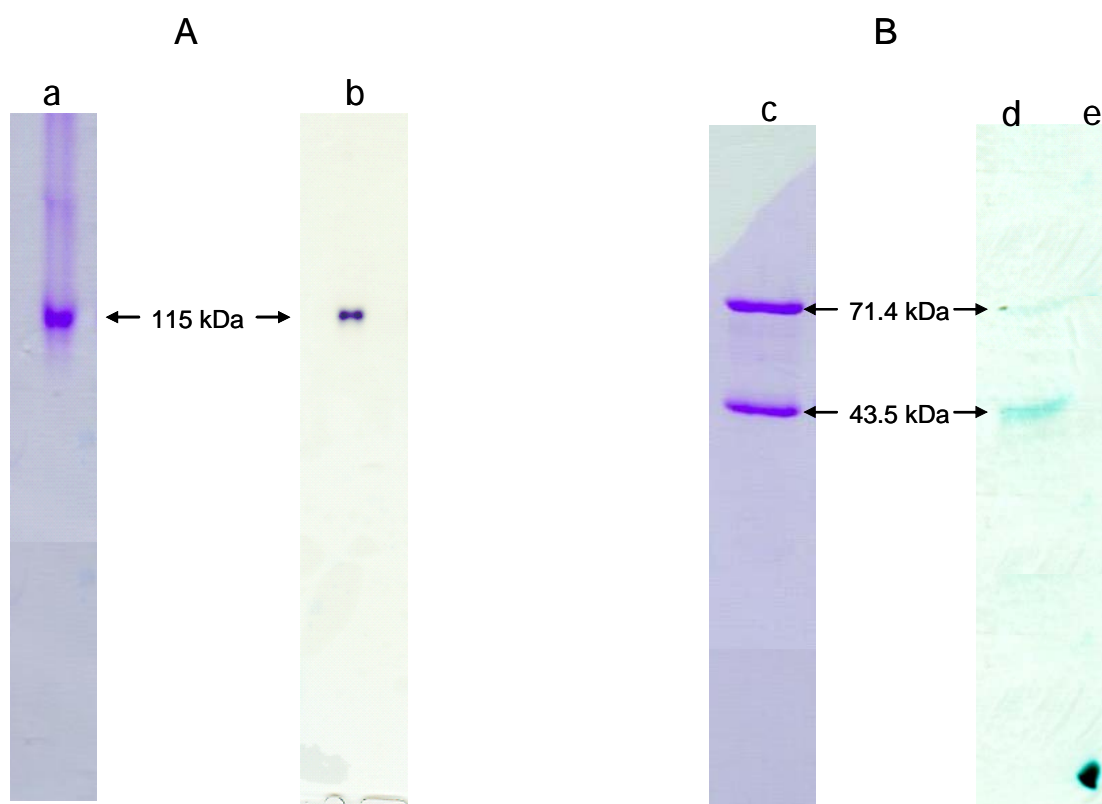
### 6.3. Caracterización molecular

#### 6.3.1. Análisis electroforético.

Para analizar la homogeneidad de la enzima PQQ-ADH purificada de la fracción membranal de *Ga. diazotrophicus*, se realizaron diferentes geles. Un gel de electroforesis en condiciones nativas (PAGE - NATIVO) reveló la presencia de una sola banda cuando el gel fue teñido con azul de coomassie (Fig. 7A) lo cual nos indica que la enzima purificada es homogénea. Bajo las mismas condiciones electroforéticas, a la enzima PQQ-ADH se le realizó la zimografía con azul de nitrotetrazolium (NTB) y (PMS); donde el gel es incubado con el sustrato etanol, dando reacción positiva una sola banda que se ve incrementada en su intensidad cuando se adiciona el sustrato acetaldehído (Fig. 7B). La banda que da positivo por medio de la zimografía es la misma que se observa cuando el gel fue teñido con azul de coomassie (Fig. 7A).

La composición oligomérica de la enzima purificada de *Ga. diazotrophicus* fue determinada por geles en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) al 10%, mostrando la presencia de dos bandas positivas cuando se tiñe con azul de coomassie (Fig. 7C). La masa molecular de cada subunidad fue determinada por su movilidad en gel y corroborada por espectroscopia de masas. La masa molecular de la subunidad mayor fue de 71.4 kDa y la de la subunidad menor de 43.5 kDa, respectivamente. Por densitometría se determinó que estas dos bandas están en una relación estequiométrica de 1 : 1; y por esta misma técnica se midió la intensidad relativa de las dos bandas que dan positivo para la reacción de actividad de peroxidasa; encontrándose una relación de intensidad de 1 : 3 para la subunidad mayor y menor, respectivamente (Fig. 7D).





**Figura 7.** (A) Análisis electroforético (PAGE- NATIVO) de la enzima PQQ-ADH purificada, (a) Gel teñido con azul de coomassie brillante R-250. (b) actividad de etanol deshidrogenasa detectada por zimografía. (B) Análisis electroforético de la enzima PQQ-ADH purificada bajo condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), (c) Tinción con azul de Coomassie brillante R-250. (d) Tinción de la actividad de peroxidasa detectada por zimografía. (e) Citocromo *c* de caballo (tinción de peroxidasa) fue usado como estándar. Las condiciones usadas para la electroforesis nativa y desnaturalizante y las técnicas de tinción son descritas en materiales y métodos.

### 6.3.2. Análisis de la secuencia N-terminal.

La secuencia amino terminal de cada una de las subunidades fue determinada por la técnica de degradación de Edman; ambas subunidades se encontraron bloqueadas; por lo cual, la enzima fue digerida con tripsina y analizada por medio de la técnica de espectroscopia de masas: Para la subunidad I se obtuvieron los siguientes péptidos internos: 1) YSPLDQINR. 2) GOEGTPLVIDGVMYATTNWSK. 3) VPGNIADK. 4) VYFGTFDGR. 5) VIINGGSEFGAR. 6) HVIVHAPH. 7) NGFFYIDAK. 8) NYVYVNWASGLDPK. 9) HQDAFYNVVGR; los cuales corresponden a las regiones amino terminal, región consenso del citocromo *c* y en la región del carboxilo terminal de la subunidad I. La subunidad II presentó dificultades al momento de ser analizada por espectrometría de masas debido al alto contenido de hierro presente en dicha subunidad, con lo cual no se pudo determinar

secuencias internas. La subunidad II, también fue analizada por medio de la técnica de Ettan MALDI-Tof Pro, donde se obtuvo la siguiente secuencia amino terminal: *M-A-S-V-F-P-G-K*.

Los péptidos internos obtenidos de la subunidad I de la PQQ-ADH purificada de *Ga. diazotrophicus*, fueron alineados por el programa "Mascot Search results" y se observó que todos los péptidos internos encontrados para la subunidad I se alinean perfectamente con la subunidad I de las PQQ-ADHs membranales purificadas en las bacterias del ácido acético. Como se muestra en la [tabla 4](#), los péptidos internos presentan una mayor identidad con la PQQ-ADH de *Ga. polyoxogenes*, *Ga. europaeus* y en menor identidad con los precursores de la subunidad I de *G. suboxydans*, *A. aceti* y *A. pasteurianus*. También se encontró identidad con la sorbitol deshidrogenasa de *G. oxydans* y con la glucosa deshidrogenasa membranal de *Rubrivivax gelati*. Estas identidades de nuestros péptidos internos de la subunidad I de la PQQ-ADH con otras PQQ-ADHs previamente purificadas y secuenciadas, nos indican claramente que nuestra enzima purificada se trata de una enzima PQQ-ADH membranal, que tiene como característica distintiva, la de oxidar con eficiencia cercana, alcoholes y aldehídos lineales como es descrito posteriormente.

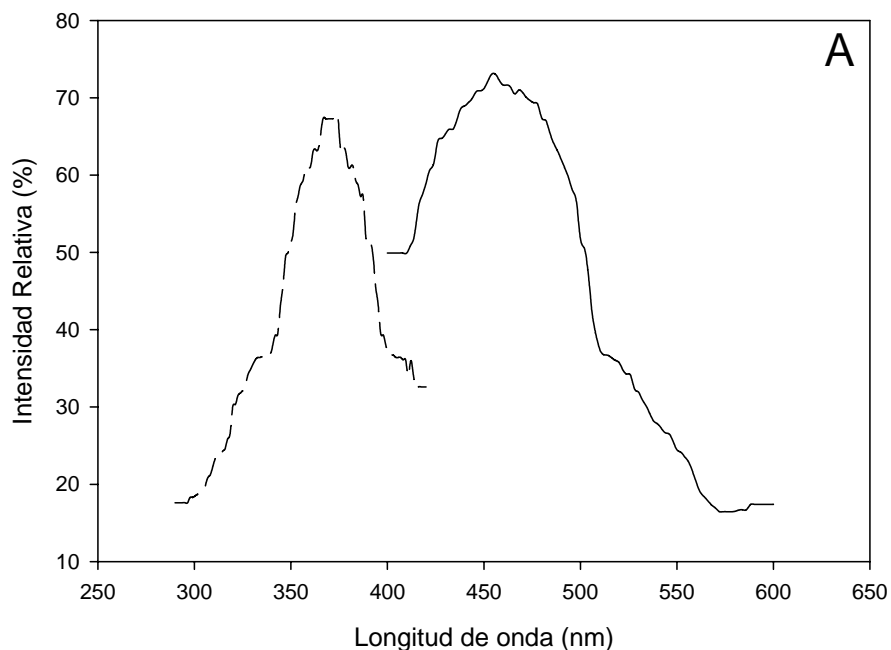
**Tabla 4.** Péptidos internos determinados de la subunidad I de la enzima PQQ-ADH.

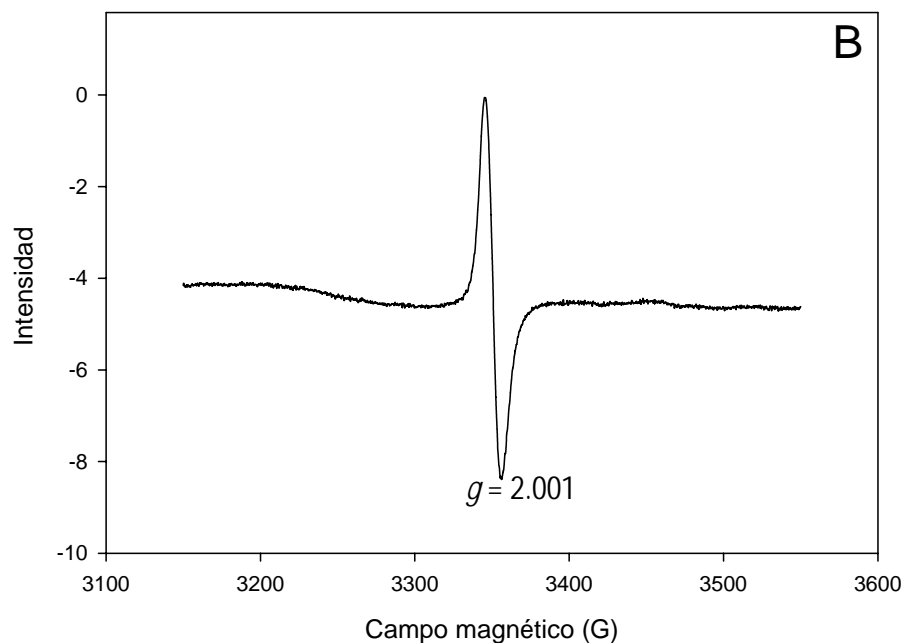
Acceso	Proteína	Organismo	Score (bits)	Identidad
gi 216186	ADH	<i>Gluconacetobacter polyoxogenes</i>	154	64/155
gi 1050421	ADH	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	154	64/155
gi 33338429	Sorbitol-DH	<i>Gluconobacter oxydans</i>	133	57/155
gi 452586	Sub. I ADH	<i>Acetobacter aceti</i>	130	58/155
gi 2055286	Precursor Sub. I	<i>Gluconobacter oxydans</i>	128	56/155
gi 61255121	ADH sub. I	<i>Gluconobacter</i>	128	56/155
gi 118555	ADH	<i>Acetobacter aceti</i>	127	57/155
gi 21321310	ADH	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	123	56/155
gi 47571435	GDH	<i>Rubrivivax gelati</i>	95.6	50/155

### 6.3.3. Grupos prostéticos de la enzima PQQ-ADH.

#### 6.3.3.1. Medida del contenido de PQQ.

La identificación de los grupos prostéticos de la enzima PQQ-ADH, como por ejemplo la presencia del grupo pirrolo-quinolina-quinona (PQQ) en la PQQ-ADH purificada fue determinado por medio de espectroscopía de fluorescencia, con una señal característica de emisión a 480 nm y excitación a 370 nm (Fig. 8A). Esta señal de emisión y excitación es igual a lo encontrado en otras PQQ-ADHs (Tayama *et al.*, 1989; Matsushita *et al.*, 1992). Por Resonancia Paramagnética del Electrón (EPR) a temperatura de 8°K se analizó a la PQQ-ADH en su estado “como se purifica” (solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH, 6.0 conteniendo 0.1% de Tritón X-100), y se observó la presencia de una señal del grupo prostético PQQ en su forma de semiquinona; ya que se encontró una señal con una  $g$  de 2.001, que corresponde a un radical orgánico con un electrón desapareado (paramagnético) (Fig. 8B). Como control positivo se analizó el cofactor PQQ obtenido de Sigma y se encontró una señal de  $g$  de 2.001 (datos no mostrados), lo cual corrobora que la señal orgánica encontrada en la enzima PQQ-ADH purificada corresponde al grupo prostético PQQ.



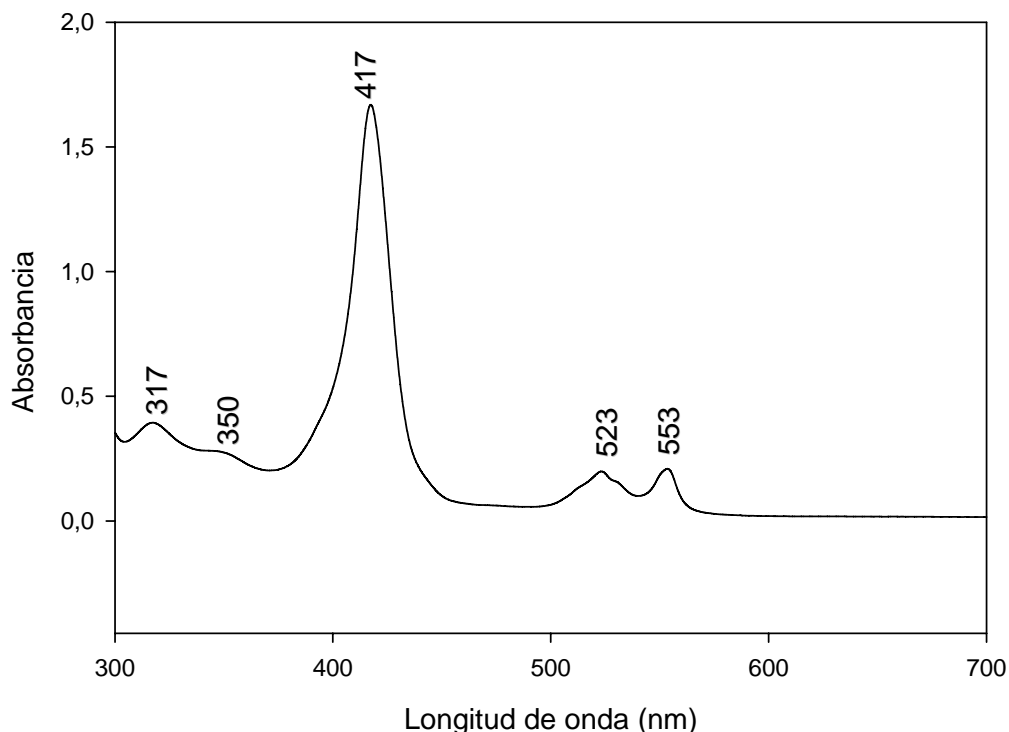


**Figura 8.** Determinación del grupo prostético PQQ. A) Espectro de fluorescencia del sobrenadante metanólico realizado a la enzima PQQ-ADH como es descrito en materiales y métodos. B) La enzima PQQ-ADH “como es purificada” fue analizada a 8°K por medio de la Resonancia Paramagnética del Electrón (EPR) empleando un espectrómetro Bruker Elexsys E500. Se usó la banda-X a una frecuencia de 9.54 GHz. La banda-X del EPR fue obtenida por medio de un flujo continuo de Helio líquido.

### 6.3.3.2. Análisis de citocromos presentes en la PQQ-ADH purificada.

#### 6.3.3.2.1. Espectro diferencial de la enzima PQQ-ADH.

El espectro diferencial de absorción de la PQQ-ADH presentó señales características de citocromos tipo *c* reducido con máximas a 417, 523 y 553 nm; y del grupo prostético PQQ con máximas a 317 y 350 nm, respectivamente como es presentado en la [figura 9](#). También, se observa una ligera señal (hombro) a 530 nm, la cual es sugerente de la presencia de hemo tipo *B*. Se determinó a temperatura ambiente, la concentración de citocromo *c* presente en la enzima purificada, la cual fue de  $34.7 \text{ } \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ; este resultado difiere del reportado con la PQQ-ADH de *Ga. xylinus* ([Chávez-Pacheco. Tesis de doctorado, 2006](#)); donde la concentración de citocromo *c* a temperatura ambiente fue de  $18 \text{ } \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ .



**Figura 9.** Espectro de absorción de la enzima membranal PQQ-ADH purificada. Enzima purificada (164  $\mu\text{g}$  proteína) con actividad específica de 256 unidades fue usada en 10 mM de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0 conteniendo 0.1% de Tritón X-100. El espectro diferencial fue generado por la adición de ditionita de sodio a la celda que contenía la muestra y persulfato de amonio a la celda de referencia.

#### 6.3.3.2.2. Identificación de los citocromos asociados a la PQQ-ADH purificada.

Para corroborar la identificación espectral de los citocromos asociados a la PQQ-ADH purificada (Fig. 9) se realizaron dos tipos de ensayo: A) El primero de ellos fue someter a la enzima a un proceso de extracción de hemos con acetona ácida para remover los hemos tipo *B* que se encuentran unidos de manera no covalente, bajo el procedimiento reportado por Puustinen and Wikström, (1991); esto fue decidido debido a que en los espectros diferenciales de la PQQ-ADH se observa un hombro a 530 nm, sugiriendo así, la presencia de hemo tipo *B* como componente de la enzima. El producto de la extracción de acetona-HCl fue aplicado al sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando una columna de fase reversa Waters Delta-Pack y se eluyó mediante un gradiente de acetonitrilo. Se utilizó como control positivo (protohemo IX). El cromatograma de HPLC obtenido para el protohemo IX es presentado en la figura 10A, donde se observa que el protohemo IX (hemo *B*) eluye con un tiempo de retención de 22 minutos. En el cromatograma obtenido para la muestra de la enzima

PQQ-ADH (Fig. 10B. Línea discontinua) no se observa señal alguna con ese mismo tiempo de retención (22 minutos) que nos confirmara la presencia de hemo tipo *B* en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. También se analizó a la PQQ-aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) purificada del mismo organismo. En este caso confirmamos la presencia de hemo tipo *B* en la PQQ-ALDH purificada (Fig. 10B. Línea sólida).

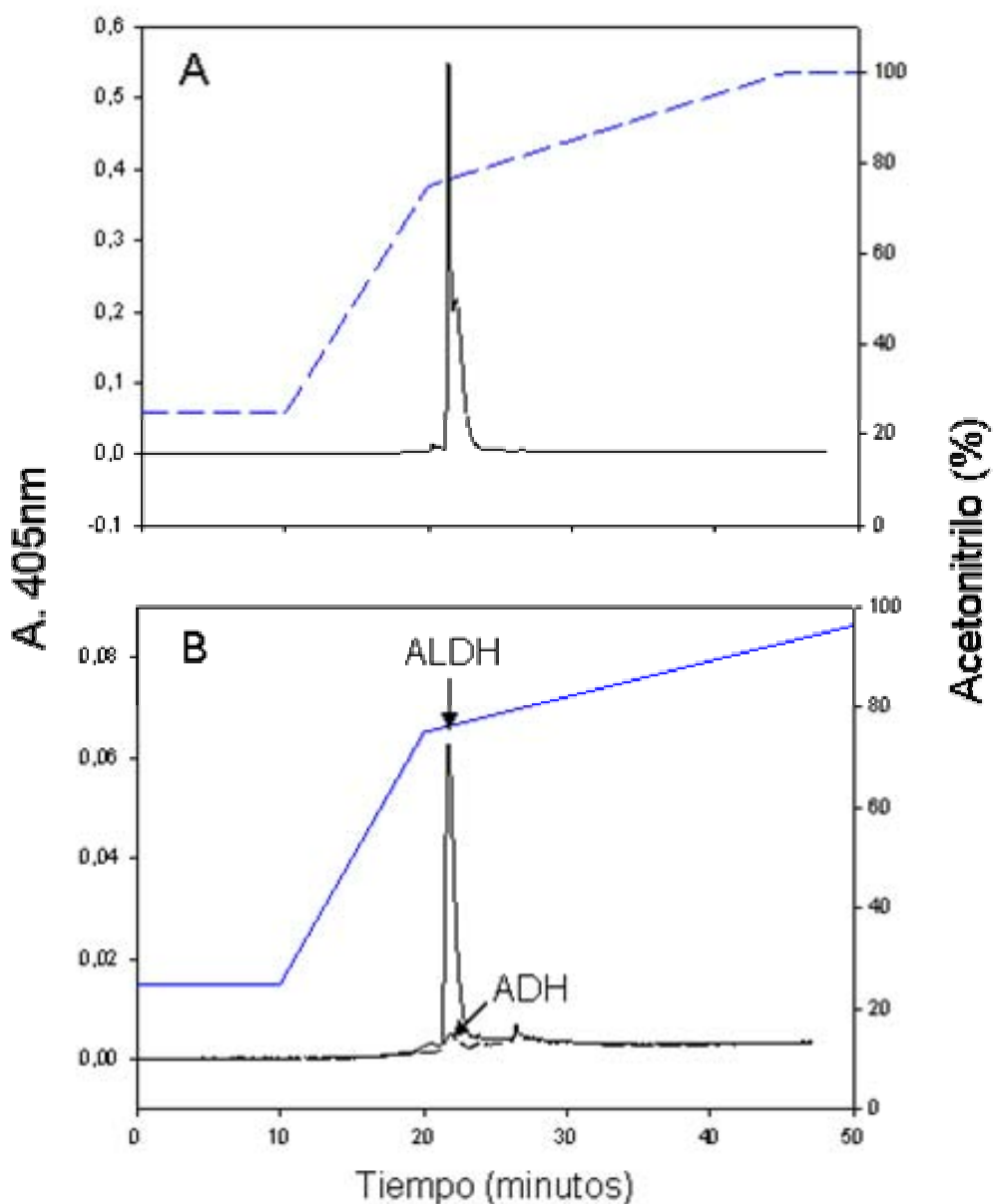


Figura 10. Análisis de hemos asociados a la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* por HPLC de fase reversa. A) El estándar protohemo IX obtenido de Sigma Chemical co. fue utilizado como control positivo de hemo tipo *B*. B) Los hemos extraídos de la enzima PQQ-ADH (línea discontinua) y PQQ-ALDH purificada (línea continua) fueron disueltos en la mezcla

---

de solventes descrita. Los hemos fueron eluidos por un gradiente de acetonitrilo y detectados a 405<sub>nm</sub>. El sistema fue equilibrado con una mezcla de agua-acetonitrilo-ácido trifluoroacético (TFA) (75:25:0.5).

#### 6.3.3.2.3. Titulación potenciométrica de los citocromos de la PQQ-ADH purificada.

Se determinaron los potenciales redox de los citocromos tipo *c* asociados a la enzima PQQ-ADH. La titulación potenciométrica se realizó en solución amortiguadora de fosfatos bajo condiciones anaeróbicas. Se utilizó un electrodo combinado de Ag/AgCl platino y se emplearon diferentes quinonas como amortiguadores del potencial redox. Para generar los valores de potencial deseados, se adicionó gradualmente solución de ferricianuro de potasio o de ditionita de sodio. Los niveles de reducción de los citocromos fueron determinados a partir de los espectros de absorción registrados a cada valor de potencial seleccionado. A partir de la curva de titulación se pudo detectar la presencia de cuatro citocromos tipo *c* asociados a la PQQ-ADH (Fig. 11). Los valores obtenidos para cada uno de los potenciales son: -55, +42, +132 y +227 mV, respectivamente. El citocromo *c* con un valor de -55 mV probablemente sea el que se encuentre presente en la subunidad I (*cl*), y los tres citocromos restantes se encuentran localizados en la subunidad II (*cll*<sub>1</sub>, *cll*<sub>2</sub>, *cll*<sub>3</sub>). Es de llamar la atención un valor de potencial redox obtenido: *cll*<sub>3</sub> = +227 mV; debido a que el potencial redox determinado para la quinona endógena (Q<sub>10</sub>) de *A. methanolicus* fue de +220 mV a pH 4.5 (Hauska *et al.*, 1983) y suponemos que el potencial redox de la Q<sub>10</sub> de *Ga. diazotrophicus* es muy cercano a lo determinado en *A. methanolicus*. De acuerdo al potencial redox estimado para la quinona, este citocromo *c* no le entregaría los electrones a la quinona endógena; debido a que en la transferencia intramolecular de electrones de los citocromos *cl*, *cll*<sub>1</sub> y *cll*<sub>2</sub> hacia la quinona ( $E_m^7 = +220$  mV) es favorable debido a que poseen un potencial redox más electronegativo con respecto a la quinona endógena; y por otro lado, el paso de electrones del citocromo *cll*<sub>3</sub> hacia la quinona es una reacción desfavorable. Sin embargo, cuando la enzima PQQ-ADH (reducida) es oxidada con quinonas solubles como Q<sub>1</sub> y posteriormente vuelta a reducir por etanol o acetaldehído, se observó los mismos niveles de reducción a los obtenidos con ditionita; lo cual nos indican que a pesar de que se determinó un valor alto en uno de los citocromos de la enzima, los electrones si fluyen a través de los cuatro citocromos tipo *c* presentes, y si participan en la transferencia intramolecular de electrones. La asignación experimental de cuatro valores de potencial redox para citocromo *c* está en concordancia con lo reportado

previamente (Inoue *et al.*, 1989; Kondo y Horinuochi, 1997; Tamaki *et al.*, 1991); donde se observó que la secuencia de los genes que codifican para las subunidades I y II de la PQQ-ADHs de *A. acetii*, *G. suboxydans* y *Ga. polyoxogenes*, muestran, un motivo de unión de hemo tipo *C* en la subunidad I y tres sitios de unión de hemo tipo *C* en la subunidad II.

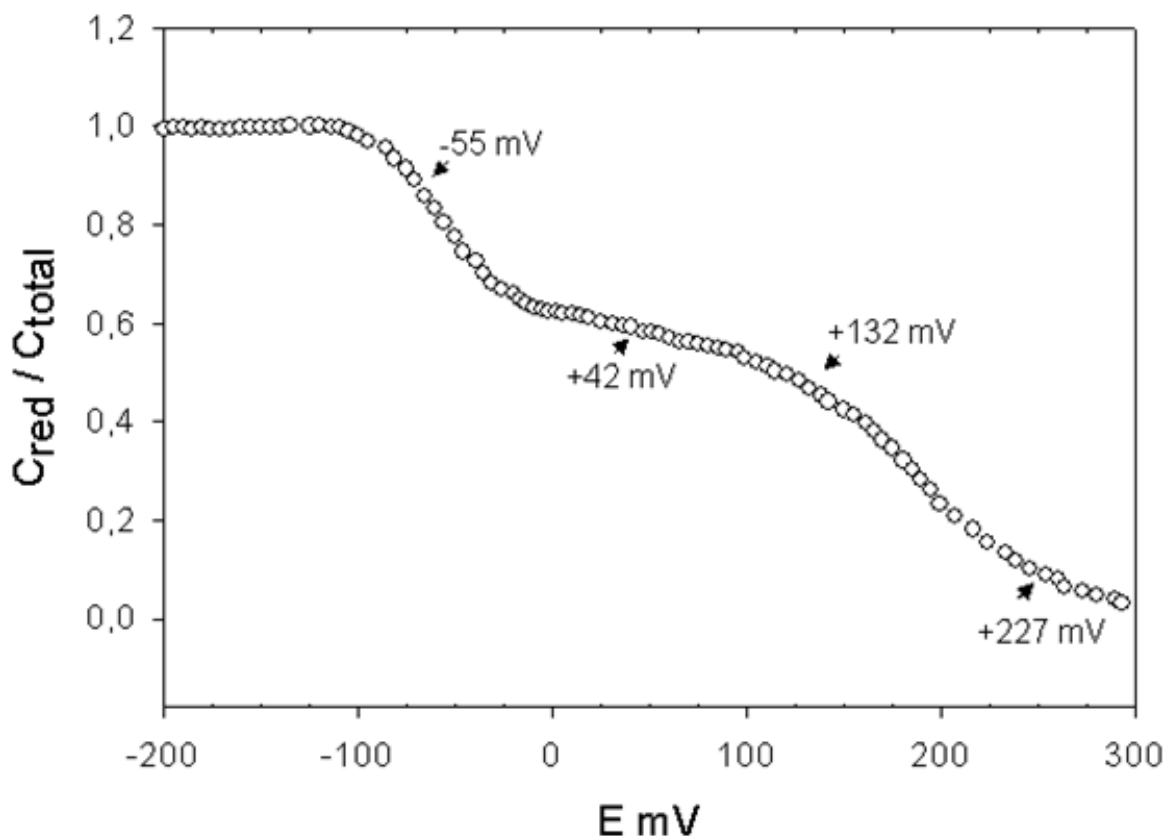


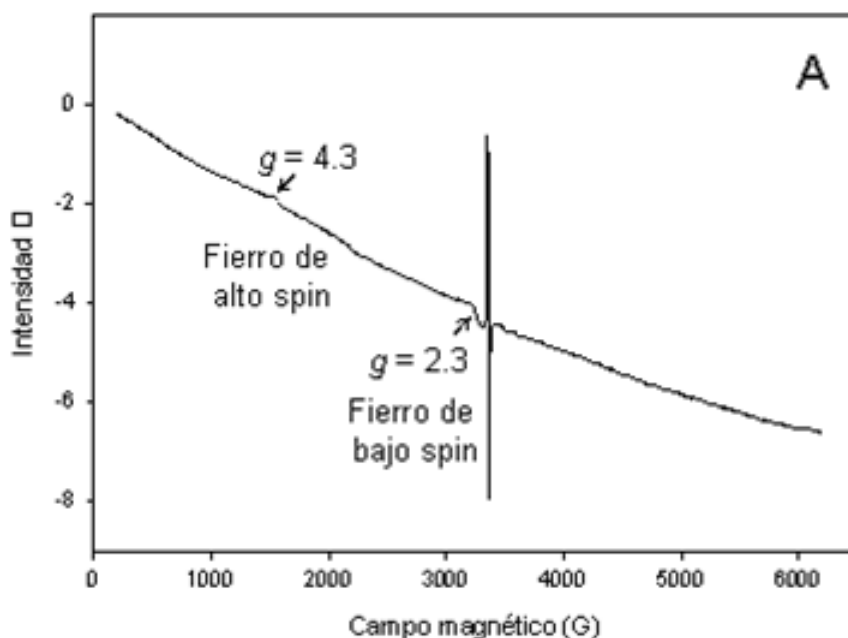
Figura 11. Titulación potenciométrica de hemos en la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Los potenciales redox fueron titulados en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH, 6.0 a 25°C en la presencia de la siguiente mezcla de mediadores de electrones: Antraquinona-2-sulfonato, 2-hidroxi-naftoquinona, menadiona, 1,4-naftoquinona, duroquinona, 1,2-naftoquinona, 1,4-benzoquinona y plumbagina, las cuales fueron adicionadas a una concentración final de 35 mM. PMS también fue adicionado a una concentración final de 60  $\mu$ M. La gráfica representa los datos obtenidos en cuatro titulaciones independientes tanto en la dirección reducida como oxidada.



#### 6.3.3.2.4. Análisis de los hemos C por EPR

Reportes previos en bacterias del ácido acético se ha descrito la presencia de un citocromo *c* de bajo spin en la fracción membranal de *G. suboxydans* que une monóxido de carbono y cuyo aducto es fotodisociable (Matsushita *et al.*, 1981) Así, nos preguntamos si la enzima ADH de *Ga. diazotrophicus* posee también, algún hemo de bajo spin con las mismas propiedades. Se realizó nuevamente el ensayo de EPR bajo las condiciones descritas en materiales y métodos para la determinación del grupo prostético PQQ.

Como se observa en la figura 12, la enzima presenta nuevamente la señal de un radical orgánico de quinona a una  $g$  de 2.001, el cual corresponde a la presencia del grupo prostético PQQ de la enzima purificada. También se observa la presencia de una señal con una  $g$  de 4.3 el cual corresponde a la presencia de fierro de alto spin. Además, se observa una señal con una  $g$  de 2.3 la cual es indicativa de la presencia de fierro de bajo spin. De acuerdo a la relación estequiométrica observada en el espectro de EPR (Fig. 12), se tiene que la enzima en su composición oligomérica está constituida mayoritariamente por hemos de bajo spin (tres) y que probablemente al menos un hierro sea de alto spin. Para reforzar la identificación de hierro de alto spin ( $g$  de 4.3) en la PQQ-ADH purificada, se realizaron espectros diferenciales de monóxido de carbono y su posterior fotodisociación.



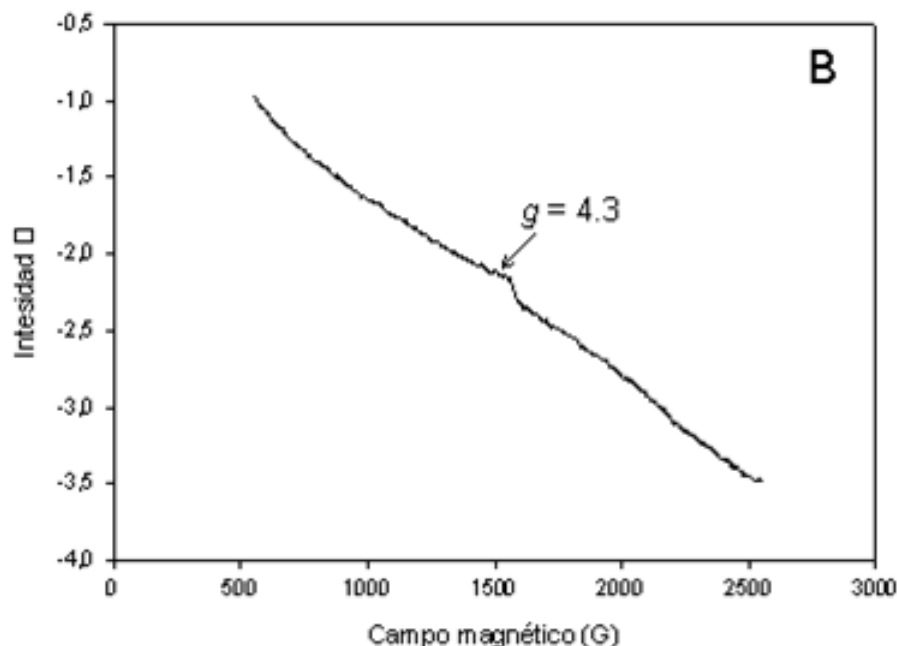


Figura 12. Espectro de EPR de la enzima PQQ-ADH. A) Espectro general de EPR de la enzima PQQ-ADH de *Ga diazotrophicus*. 0.98 mg de proteína purificada fue oxidada con persulfato de amonio y posteriormente congelada con nitrógeno líquido. La muestra fue analizada en todo el campo magnético, se utilizó la banda X y resonador SHQE. B) Amplificado del campo magnético de 0 a 3000 (G) para observar la señal del hierro de alto spin.

#### 6.3.3.2.5. Espectro diferencial de monóxido de carbono y su espectro de fotodisociación de la PQQ-ADH purificada.

El espectro diferencial de monóxido de carbono fue obtenido por medio de una resta matemática del espectro reducido + CO, menos el espectro reducido de la PQQ-ADH (espectro pre-fotólisis). Para reducir a la enzima se utilizó ditionita (Fig. 13) o sus sustratos fisiológicos, etanol o acetaldehído (datos nos mostrados). El espectro de fotodisociación se obtuvo cuando la muestra fue sometida a fotólisis por medio de tres disparos de flash fotográfico y se obtuvo el espectro post-fotólisis. El diferencial de fotodisociación se obtuvo por medio de la resta del espectro pre-fotólisis y el espectro post-fotólisis

El diferencial de monóxido de la enzima PQQ-ADH presentó señales para aductos citocromo *c*-CO (valles a 419.6, 522.5 y 548.4 nm, respectivamente, y pico a 414 nm) (Fig. 13; línea sólida). El complejo *c*-CO fue disociado por luz (Figura 13; línea

discontinua) como lo muestran las señales de pico a 414, 521.8 y 522 nm respectivamente y valle a 540 nm. Este resultado refuerza la identificación previa de hierro de alto spin sugerida por el análisis de EPR de nuestra enzima purificada.

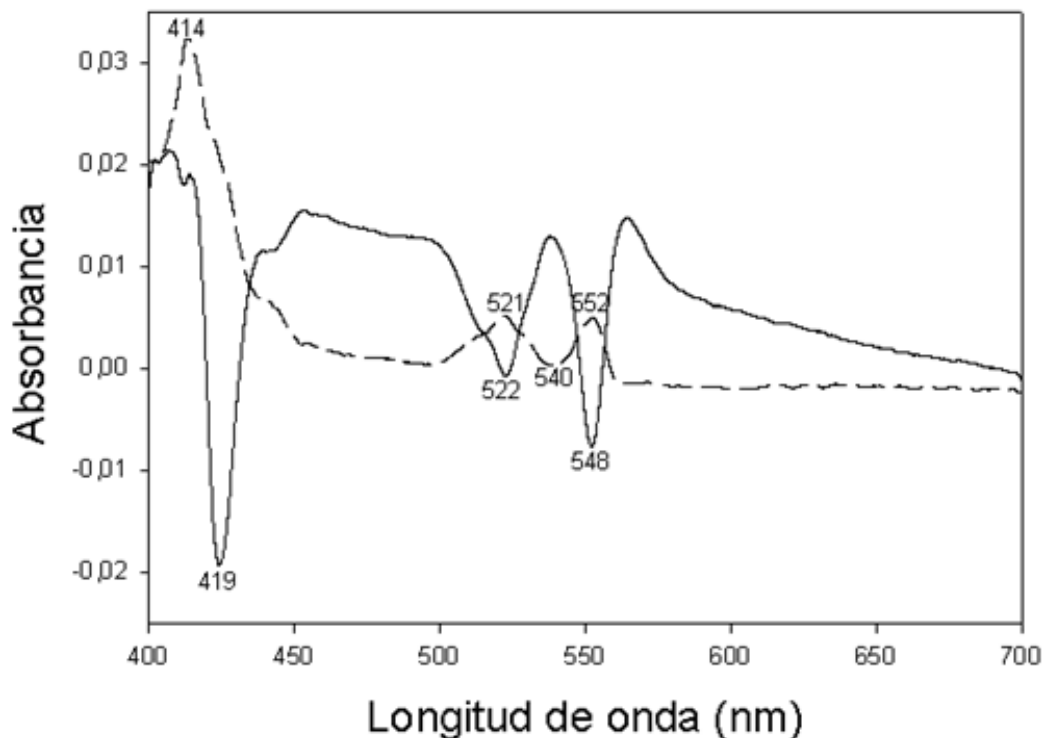


Figura 13. Espectro de monóxido de carbono y su fotodisociación de la PQQ-ADH purificada de la fracción membranal de *Ga. diazotrophicus*. Diferencial de monóxido de carbono (línea sólida) y su fotodisociación (línea discontinua). 200  $\mu\text{g}$  de proteína fueron resuspendidos en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH, 6.0 conteniendo Tritón X-100 al 0,1%. La enzima fue reducida con etanol o ditionita. El espectro fue realizado a 77  $^{\circ}\text{K}$ .

## 6.4. Caracterización cinética

### 6.4.1. Propiedades catalíticas de PQQ-ADH.

#### 6.4.1.1. pH óptimo y especificidad de sustratos.

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima PQQ-ADH, donde se encontró que la actividad de deshidrogenasa mostró un perfil simétrico con un pH óptimo de 6.0 y considerable actividad en un rango de pH de 5 a 7, el perfil fue casi idéntico para los dos sustratos fisiológicos (etanol o acetaldehído) y aceptores de electrones utilizados (PMS+DCIPI o ferricianuro), como se muestra en la [figura 14A](#).

El punto isoeléctrico de la enzima PQQ-ADH fue determinado por electroenfoque en el equipo Rotoford (Biorad) donde el perfil de distribución de la enzima mostró la máxima actividad a pH 6.0 y perfiles semejantes para ambos sustratos fisiológicos como se muestra en la [figura 14B](#). Este resultado nos asegura que las actividades con ambos sustratos fisiológicos radican en la misma entidad molecular purificada.

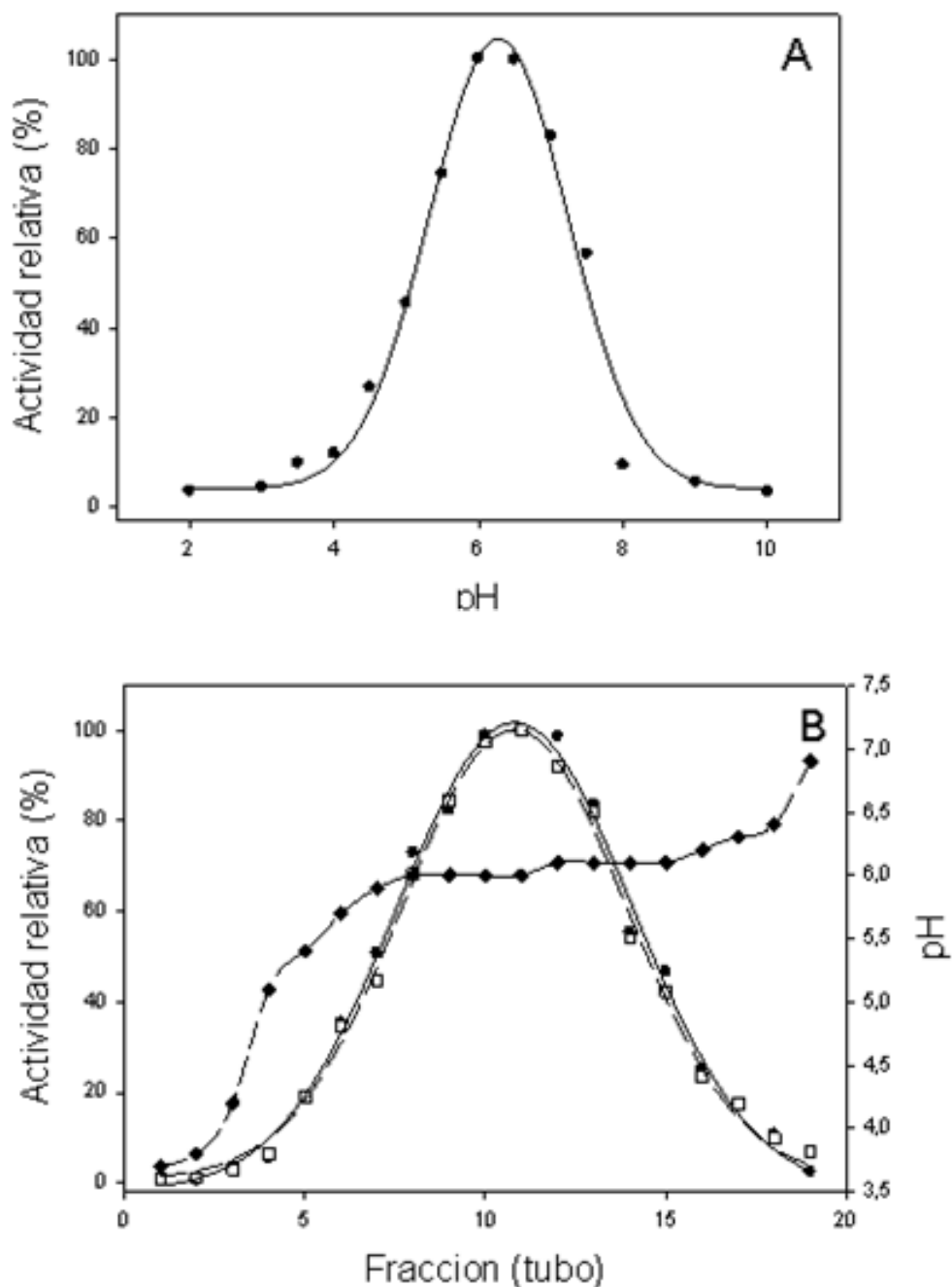


Figura 14. pH óptimo y enfoque isoeléctrico de la enzima PQQ-ADH purificada. A) Actividad de deshidrogenasa de la PQQ-ADH purificada dependiente del pH. 30  $\mu$ g de la enzima PQQ-ADH fue incubada solución amortiguadora de citratos y fosfatos (McIlvaine)

a diferentes pHs como es indicado en la figura. Se empleó el ensayo de ferricianuro reductasa. B) El enfoque isoeléctrico fue determinado en el equipo Rotofor (BioRad) conteniendo amfolinas (obtenidas de Pharmacia) en un rango de pH de 3.4 a 9.0.

La especificidad por sustrato de la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* es presentada en la [tabla 5](#); donde se observa que la enzima presenta la mayor actividad con alcoholes lineales como etanol (95%), butanol (98%) y alcohol alílico (100%); excepto el metanol que no fue oxidado. La enzima tiene capacidad de oxidar acetaldehído con un 87% de su actividad respecto al mejor sustrato como alcohol alílico. También oxida formaldehído (49%), propionaldehído (42%) y glutaraldehído (25%). Llama la atención que la PQQ-ADH purificada no tiene la capacidad de oxidar metanol; pero en cambio, si oxida formaldehído.

Tabla 5. Especificidad por sustrato de la PQQ-ADH purificada de la fracción membranal de *Ga. diazotrophicus*.

Sustratos	Actividad relativa %
Metanol	0
Etanol	95
n-Propanol	90
n-Butanol	98
Alcohol alílico	100
Isopropanol	18
Glicerol	0
Sorbitol	0
Acetona	0
Formaldehído	49
Acetaldehído	87
Glutaraldehído	25
Propionaldehído	42
Benzaldehído	0
Glucosa	0

La preparación enzimática con una actividad específica de 256 unidades/mg proteína fue usada. La actividad de ferricianuro reductasa fue medida bajo condiciones estándar

como es descrito en Materiales y Métodos. Los sustratos fueron adicionados a una concentración final de 0.02 M. La reacción enzimática fue realizada en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0 en presencia de Tritón X-100 al 0.1%.

Se determinaron los parámetros cinéticos para los mejores sustratos oxidados por la PQQ-ADH como etanol, butanol, alcohol alílico y acetaldehído (Tabla 6). La  $K_m$  obtenida para etanol nos indica que nuestra enzima es casi un orden de magnitud más afín que las PQQ-ADHs previamente caracterizadas de otras bacterias del ácido acético. Las  $K_m$ s reportadas para las PQQ-ADHs de *A. aceti* (Adachi *et al.*, 1978); *G. suboxydans* (Matsushita *et al.*, 1995) y *Ga. polyoxogenes* (Tayama *et al.*, 1989) están en el orden de  $1.2$  a  $1.6 \times 10^{-3}$  M. En la tabla 6 también se muestran las constantes cinéticas para butanol y alcohol alílico, no examinadas previamente en otras bacterias del ácido acético.

Tabla 6. Constantes cinéticas de los mejores sustratos oxidados por la PQQ-ADH purificada de *Ga. diazotrophicus*.

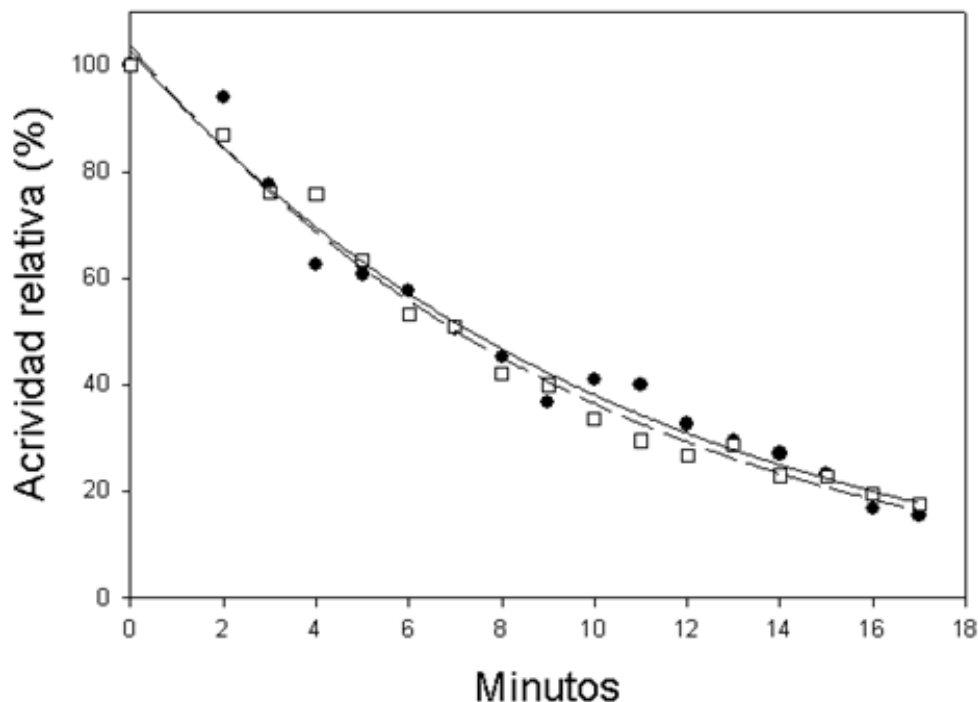
Sustratos	$K_m$ (M)	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $M \cdot s^{-1}$ )
Etanol	$4.6 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^5$	$3.6 \times 10^8$
Butanol	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^9$
Alcohol alílico	$2.1 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^5$	$7.5 \times 10^8$
Acetaldehído	$3.7 \times 10^{-4}$	$9.3 \times 10^5$	$2.5 \times 10^9$

La actividad enzimática fue ensayada como es descrito en materiales y métodos.

#### 6.4.1.2. Curva de termoinactivación de la enzima PQQ-ADH purificada.

El espectro de especificidad por sustrato nos indica que la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* tiene la capacidad de oxidar alcoholes y aldehídos de cadena lineal, con gran eficiencia. Los perfiles semejantes obtenidos para las actividades con etanol o acetaldehído, en la determinación de pH óptimo (Fig. 14A) y punto isoeléctrico (Fig. 14B) nos indicaron que la oxidación de ambos tipos de sustrato es llevada a cabo por la misma entidad enzimática. En el mismo sentido, se analizó el curso temporal de la inactivación térmica (40 °C) con ambos sustratos (etanol y acetaldehído) (Fig. 15). Las

curvas de inactivación para ambos sustratos fueron idénticas, lo que viene a confirmar que la PQQ-ADH es una enzima bifuncional con eficiencia cercana para oxidar etanol y acetaldehído.



**Figura 15.** Perfil de termoinactivación de la PQQ-ADH purificada. La enzima fue incubada a 40 °C en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH. 6.0 conteniendo Tritón X-100 al 0.1 %. Se utilizó etanol (●) y acetaldehído (□) a una concentración final de 0.02 M. DCPIP + PMS fueron utilizados como mezcla de aceptores de electrones.

#### 6.4.1.3. Análogos de UQ<sub>10</sub> como aceptores de electrones para la PQQ-ADH.

La capacidad de la PQQ-ADH para utilizar quinonas análogas de UQ<sub>10</sub> como aceptores de electrones fue medida por el ensayo espectroscópico de quinona reductasa. Se ensayó Decil ubiquinona (DUQ), Ubiquinona con una (Q<sub>1</sub>) y dos unidades (Q<sub>2</sub>) de isopreno. La mayor actividad de quinona reductasa se obtuvo con la Q<sub>1</sub>. La cinética con respecto a la concentración de la quinona fue hiperbólica. Las constantes cinéticas determinados para la Q<sub>1</sub>, fueron:  $K_m = 3.089 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $K_{cat}$  de  $392.5 \text{ s}^{-1}$  y  $K_{cat}/K_m$  (Constante de especificidad para Q<sub>1</sub>) de  $1.27 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Con la DUQ y Q<sub>2</sub> no se obtuvo una curva de saturación micaseliana bien definida como fue obtenida para Q<sub>1</sub>.

#### 6.4.1.4. Reconstitución de la etanol oxidasa en membranas de un mutante deficiente en PQQ-ADH

Se realizó reconstitución de la actividad de etanol oxidasa en membranas de *Ga. diazotrophicus* C6 (mutantes deficientes en PQQ-ADH) con 50  $\mu\text{g}$  de la enzima PQQ-ADH purificada, etanol 0.02 M como sustrato y quinona soluble como mediadora de electrones entre la PQQ-ADH y las membranas del mutante C6 de *Ga. diazotrophicus*. Las quinonas ensayadas fueron: DUQ, Q<sub>1</sub> y Q<sub>2</sub>. Como se observa en la [figura 16](#), Q<sub>2</sub> fue la mejor quinona para reconstituir la actividad de etanol oxidasa.

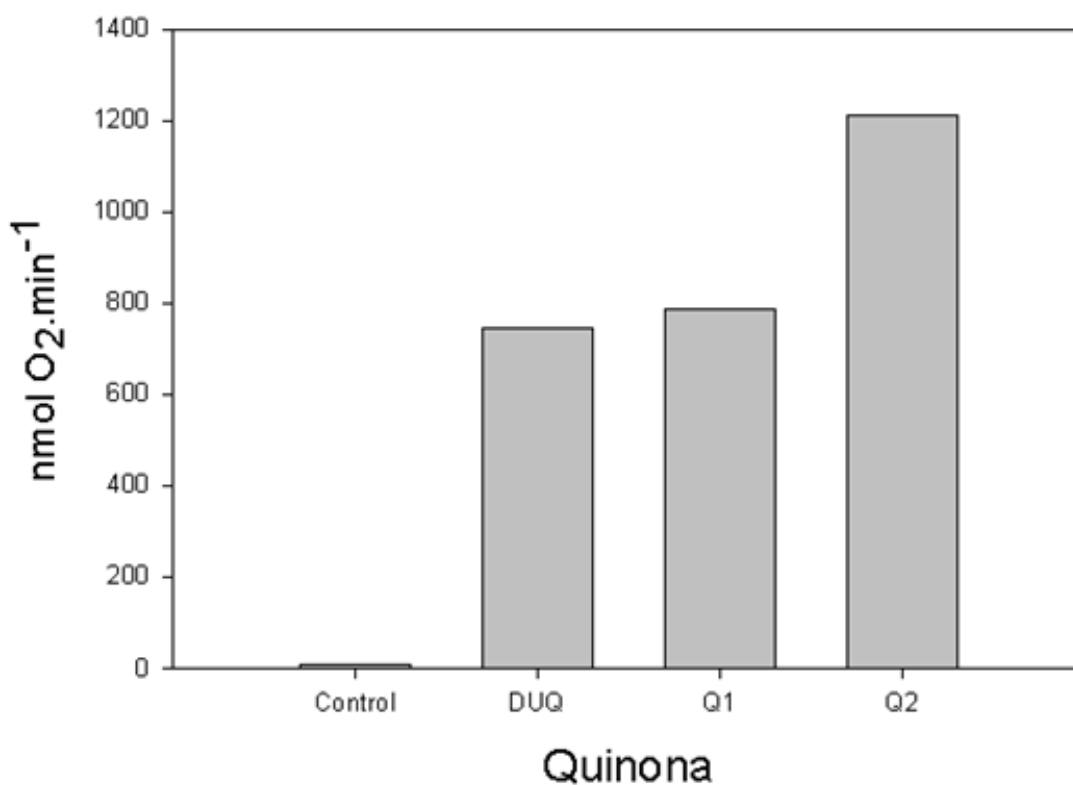


Figura 16. Ensayo de acoplamiento de la actividad de etanol oxidasa en membranas de *Ga. diazotrophicus* cepa C6, deficiente en la actividad de PQQ-alcohol deshidrogenada, con la enzima PQQ-ADH purificada y quinonas hidrosolubles como mediadores de electrones. Se adicionó 50  $\mu\text{g}$  de proteína PQQ-ADH purificada y 50  $\mu\text{M}$  de quinona soluble. La reacción fue realizada en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0.



Utilizando el ensayo de acoplamiento de la PQQ-ADH con quinonas hidrosolubles y membranas de *Ga. diazotrophicus* de la cepa C6, se determinaron las constantes cinéticas de la enzima y se compararon con las constantes obtenidas en el ensayo de PMS-DCPIP reductasa previamente mostrados (Tabla 6). Para lo cual, se realizó una curva de saturación con sustrato etanol siguiendo la actividad de etanol oxidasa en el sistema acoplado, utilizando a la  $Q_2$  como mediadora de electrones. El sistema mostró una cinética de saturación típica de Michaelis Menten para los sustratos etanol (Fig. 17) o acetaldehído (datos no mostrados).

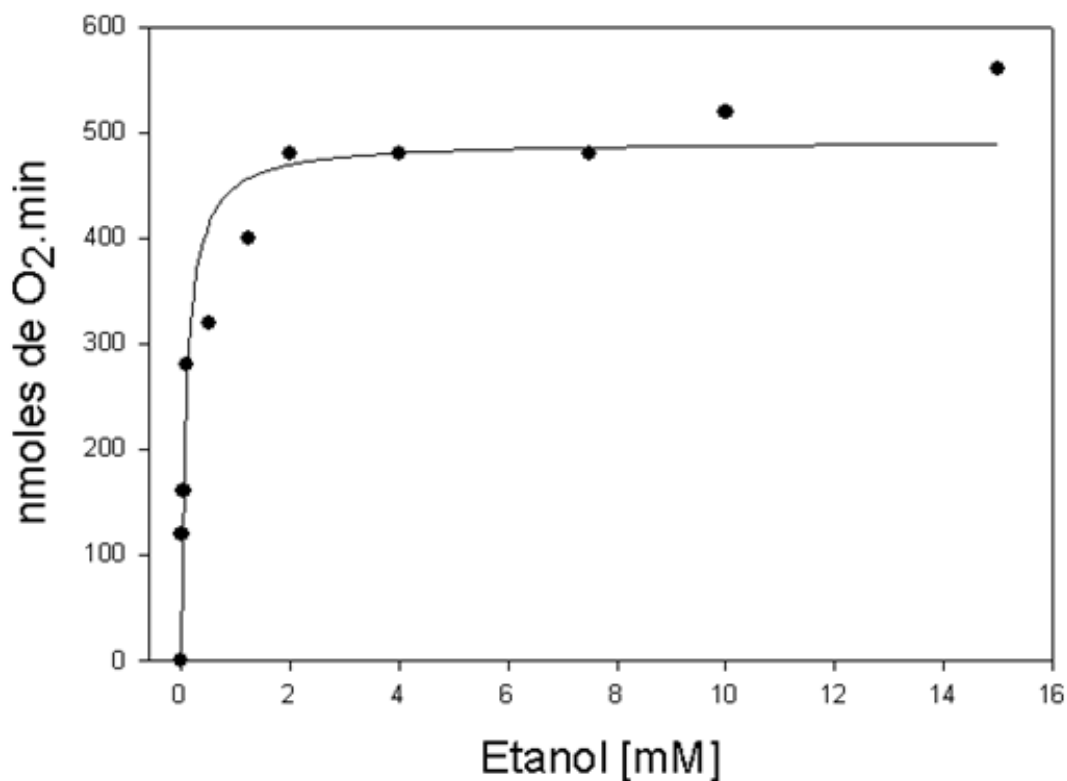


Figura 17. Curva de saturación de la PQQ-ADH con sustrato etanol utilizando el ensayo de acoplamiento de la actividad de etanol oxidasa con membranas de *Ga. diazotrophicus* cepa C6 (deficiente en la actividad de alcohol deshidrogenada) y  $Q_2$  como quinona mediadores de electrones. La concentración de etanol fue variada como es indicado en la figura.

Los parámetros cinéticos determinados en la PQQ-ADH purificada para el sustrato etanol y acetaldehído son presentados en la tabla 7. De acuerdo a estos datos, la afinidad de la enzima PQQ-ADH por el sustrato etanol en el sistema reconstituido de *Ga. diazotrophicus* es casi un orden de magnitud mayor; debido a que la  $K_m$  determinada

con el método cinético de DCPIP reductasa para la enzima purificada es de  $4.6 \times 10^{-4}$  M (Tabla 6) y en el sistema reconstituido de etanol oxidasas la  $K_m$  obtenida para el etanol fue de  $7.56 \times 10^{-5}$  M. Los parámetros cinéticos como  $K_{cat}$  y  $K_{cat}/K_m$  obtenidos para el sustrato etanol están en el mismo rango a los determinados en el ensayo de PMS + DCPIP. Los resultados anteriores demuestran que las quinonas análogas  $Q_1$  y  $Q_2$  actúan con la misma eficiencia catalítica que los aceptores artificiales utilizados en los ensayos habituales.

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos de la enzima PQQ-ADH obtenidos por medio del ensayo acoplado de la enzima PQQ-ADH con quinonas solubles y membranas de *Ga. diazotrophicus* cepa C6, deficiente en PQQ-ADH.

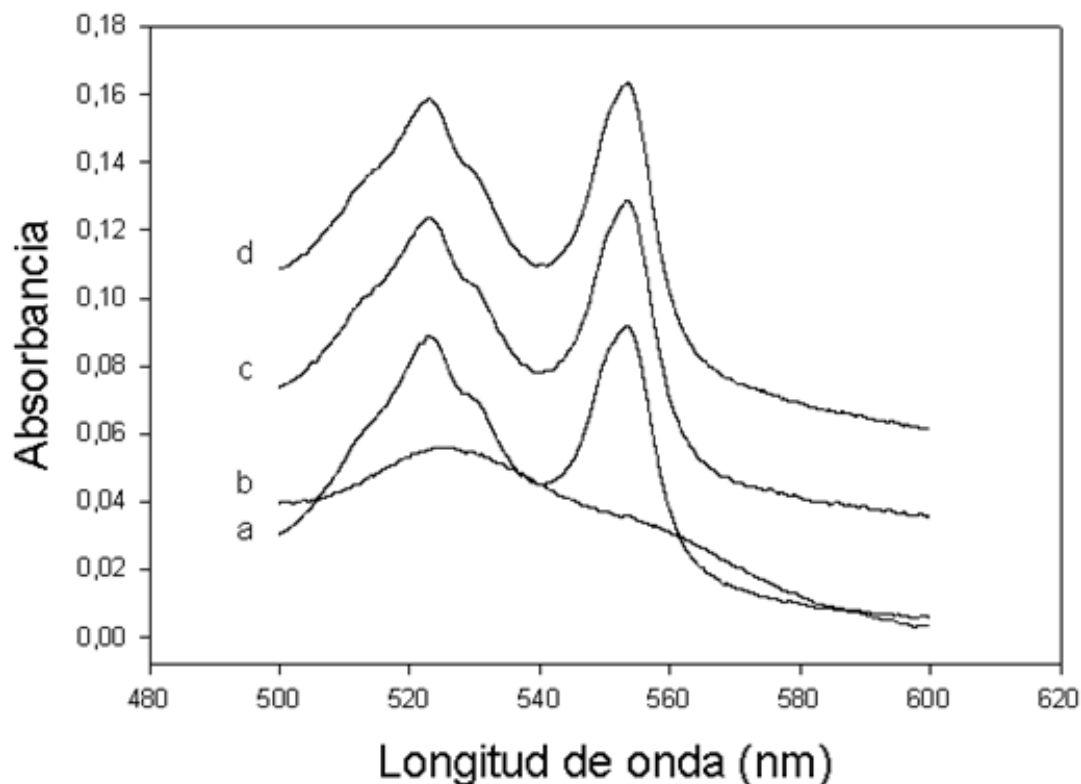
Parámetros	Etanol		Acetaldehído	
	<i>Deshidrogenasa</i>	<i>Oxidasa</i>	<i>Deshidrogenasa</i>	<i>Oxidasa</i>
$K_m$	$4.6 \times 10^{-4}$	$7.5 \times 10^{-5}$	$3.7 \times 10^{-3}$	$1.1 \times 10^{-3}$
$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$1.6 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$9.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$
$K_{cat}/K_m$ ( $M \cdot s^{-1}$ )	$3.6 \times 10^8$	$1.8 \times 10^9$	$2.5 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$

La actividad enzimática fue medida en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0 como es descrito en materiales y métodos.

#### 6.4.2. Transferencia intramolecular de electrones PQQ-ADH purificada.

##### 6.4.2.1. Determinación de la transferencia intramolecular de electrones

La enzima PQQ-ADH presenta sus cuatro citocromos tipo *c* en su estado reducido cuando se le purifica (Fig. 18a). La transferencia intermolecular de electrones del sitio catalítico (PQQ) hacia la quinona endógena ocurre a través de los cuatro citocromos tipo *c*; de tal manera que el transporte intramolecular de electrones se le puede seguir por espectroscopía (Fig. 18a), igualmente su oxidación con ferricianuro de potasio puede ser seguida de la misma manera (Fig. 18b); la enzima oxidada fue reducida con sustrato etanol o acetaldehído a una concentración final de 0,02 M (Fig. 18c), y posteriormente reducida con ditionita para conocer el nivel máximo de reducción (Fig. 18d). Como se observa en la figura 18, la reducción máxima de los citocromos tipo *c* es alcanzada con cualquiera de los dos sustratos ya que la ditionita no incrementa ese nivel de reducción.



**Figura 18.** Propiedades rédox del complejo PQQ-ADH purificado de *Ga. diazotrophicus*. Una preparación enzimática conteniendo 100  $\mu\text{g}$  de proteína, con una actividad específica de 256 unidades/mg fue usada. (a) Espectro del complejo de la enzima PQQ-ADH como es purificada. (b) espectro oxidado del complejo de la enzima PQQ-ADH, obtenido después de la titulación de la enzima con pequeñas cantidades de ferricianuro de potasio y después, (c) la enzima vuelta a reducir con etanol (0.02 M). (d) Espectro de reducción total, obtenido con ditionita.

Alternativamente, la cinética de reducción de los citocromos *c* puede ser seguida a longitud de onda fija (550-540 nm) como se muestra en la [figura 19](#). La enzima purificada (reducida) fue previamente oxidada con ferricianuro de potasio y se inicia la reducción con el sustrato etanol. Como se observa en la [figura 19](#), la adición de etanol o acetaldehído es suficiente para que los citocromos *c* se reduzcan y en los 30 s se alcance el máximo de reducción con sustrato que corresponde a la reducción total dada por la ditionita. Con base en los resultados anteriores concluimos que los cuatro citocromos tipo *c* presentes en la enzima PQQ-ADH son reducidos por cualquiera de los dos tipos de sustrato y que muy probablemente los 4 participen en la transferencia de  $e^-$  a la  $\text{UQ}_{10}$  endógena.

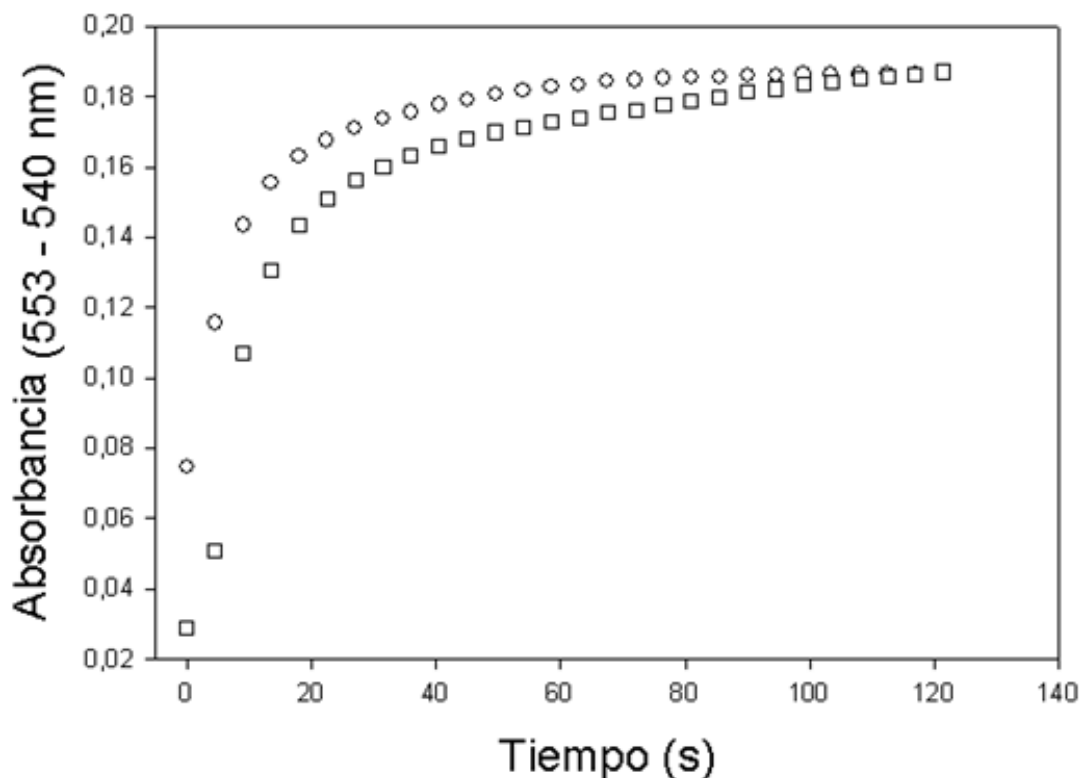


Figura 19. Cinética de reducción de citocromos *c* de la PQQ-ADH purificada. La enzima fue previamente oxidada con ferricianuro de potasio y entonces vuelta a reducir por etanol (o) o acetaldehído (□). La reducción de los citocromos *c* fue determinado por medio del diferencial de absorbancia 554-540 nm.

#### 6.4.2.2. Inhibidores específicos del complejo *bc1* también inhiben a la PQQ-ADH.

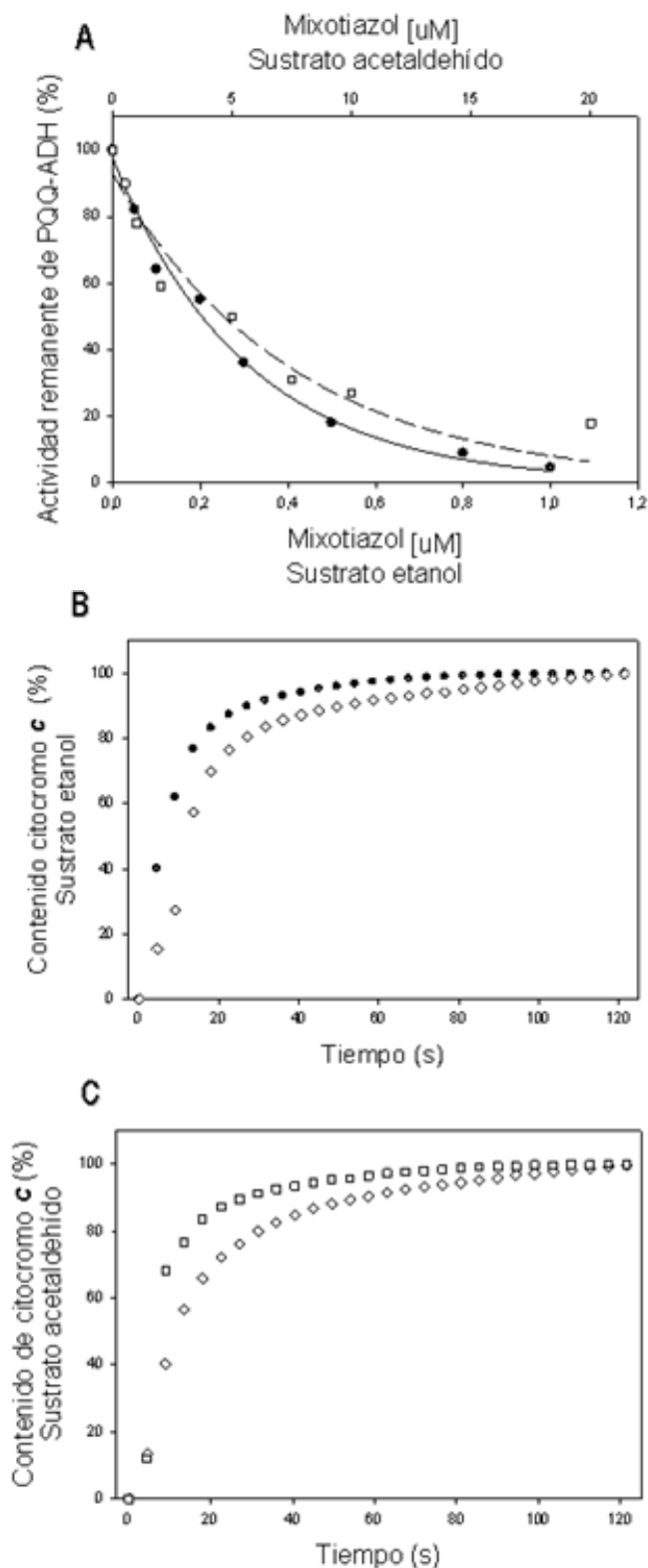
De acuerdo a lo reportado en las bacterias del género *Acetobacter* y especialmente por Flores-Encarnación 2001 (Tesis doctoral) para *Ga. diazotrophicus*, se demostró que esta bacteria no posee un complejo *bc<sub>1</sub>*; dentro de la composición de su cadena respiratoria. Sin embargo, análisis en membranas de *Ga. diazotrophicus* demostraron que inhibidores específicos de este complejo como antimicina y mixotiazol afectan la actividad de etanol oxidasa, tal como lo corroboró Martínez-Yee, (2005. Tesis de maestría) en *Ga. diazotrophicus*. El sitio de acción para estos inhibidores no ha sido investigado por lo que decidimos localizar su sitio de acción en la PQQ-ADH purificada.

---

Se postularon cuatro posibles sitios de unión de los inhibidores a la PQQ-ADH.

- 1) Que la inhibición se llevara a cabo a nivel del grupo prostético PQQ y en este caso el sustrato no puede ser oxidado. Así, el PQQ y los cuatro citocromos *c* permanecerían oxidados en presencia del inhibidor.
- 2) Que la inhibición se llevara a cabo entre el grupo prostético PQQ y el primer citocromo tipo *c*, localizado en la subunidad I. En este caso el PQQ quedaría reducido pero los cuatro citocromos *c* de la enzima no podrían reducirse.
- 3) Que la inhibición se llevara a cabo en algún sitio ubicado en la secuencia de los cuatro citocromos *c*; donde se observaría un nivel de reducción parcial con respecto a lo observable en ausencia del inhibidor.
- 4) Que la inhibición se llevara a cabo en el sitio de la SII de la enzima donde la UQ<sub>10</sub> acepta los electrones. En este caso se observaría la reducción total de los cuatro citocromos *c*.

Con esto en mente, decidimos repetir la titulación de la etanol oxidasa descrita por [Martinez-Yee \(2005. Tesis de maestría\)](#) (Fig. 20) y compararla con la titulación de las actividades de PMS-DCPIP y ferricianuro reductasa en membranas y en la enzima purificada (Datos no mostrados). Sin embargo, cuando se tituló la actividad de alcohol oxidasa en membranas con inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>*, mostró que a bajas concentraciones de mixotiazol con sustrato etanol o acetaldehído, abatían notablemente el consumo de O<sub>2</sub>. La I<sub>50</sub> determinada en la fracción membranal con mixotiazol fue de 0.3 μM con el sustrato etanol y de 5 μM con el sustrato acetaldehído (Fig. 20A). La diferencia en la I<sub>50</sub> registrada para los dos sustratos en membranas, se debe probablemente a que el acetaldehído es oxidado por dos enzimas en paralelo: la verdadera PQQ-ALDH y la PQQ-ADH; mientras que el etanol solo es oxidado por la ADH. La actividad de PMS-DCPIP y ferricianuro reductasa de la PQQ-ADH para etanol o acetaldehído no sufrió un cambio significativo, a diferencia cuando la enzima fue incubada con mixotiazol o antimicina (Datos no mostrados). Este resultado sugiere que el sitio de inhibición no se encuentra a nivel del PQQ o de la secuencia de los citocromos *c*, ya que de otro modo, los inhibidores deberían ser efectivos contra las actividades de DCPIP y/o ferricianuro reductasa.

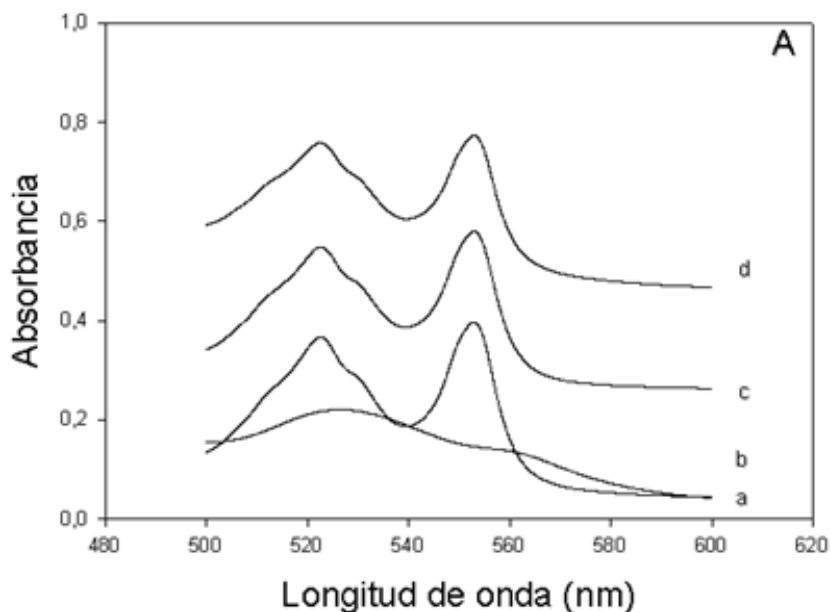


**Figura 20.** Efecto del mixotiazol sobre la actividad enzimática de la PQQ-ADH. **A)** Actividad de etanol y aldehído oxidasa de la fracción membranar de *Ga. diazotrophicus*. **B)** Cinética de reducción por etanol de los citocromos c de la PQQ-ADH purificada (oxidada con ferricianuro de potasio) e incubada con y sin mixotiazol **C)** Mismo experimento con acetaldehído como sustrato reductor. La reacción fue realizada en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0. La enzima PQQ-ADH fue oxidada con

1 mM de ferricianuro de potasio y reducida con sustrato etanol (●) o acetaldehído (□) a una concentración final de 0.02 M. Mixotiazol (◇) fue adicionado a la mezcla de reacción a una concentración final de 100  $\mu$ M.

Por lo anterior, ahora solo faltaba definir el sitio de acción de los inhibidores, dentro de la estructura de la PQQ-ADH. Para ello, la enzima purificada en su estado reducido fue oxidada con ferricianuro de potasio (2 mM) e incubada con 100  $\mu$ M de mixotiazol (cantidad en exceso) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A la par, un control se incubó con etanol o acetaldehído sin mixotiazol. La reacción fue iniciada con etanol (Fig. 20B) o acetaldehído (Fig. 20C), y se siguió el curso temporal de la reducción de citocromos *c* ( $\Delta A_{554 - 540 \text{ nm}}$ ). Se cuantificó la reducción relativa de citocromos con respecto a la reducción total generada con ditionita. En la figura 20B y C, se observa que los niveles de reducción de citocromos de la enzima incubada con mixotiazol y reducida con etanol o acetaldehído son los mismos a los alcanzados con ditionita, lo cual sugiere que la inhibición se lleva a cabo en el sitio de la SII de la enzima PQQ-ADH, donde la UQ<sub>10</sub> acepta los electrones; ya que en este caso se observó la reducción total de los cuatro citocromos *c*.

Finalmente, la PQQ-ADH purificada en su estado reducido fue oxidada con Q<sub>1</sub>, incubada con mixotiazol y reducida con etanol o acetaldehído como es presentado en la figura 21; donde se observa que la enzima en ausencia (Fig. 21A) o presencia de mixotiazol (Fig. 21B) se alcanzan los mismos niveles de reducción a los obtenidos con ditionita.



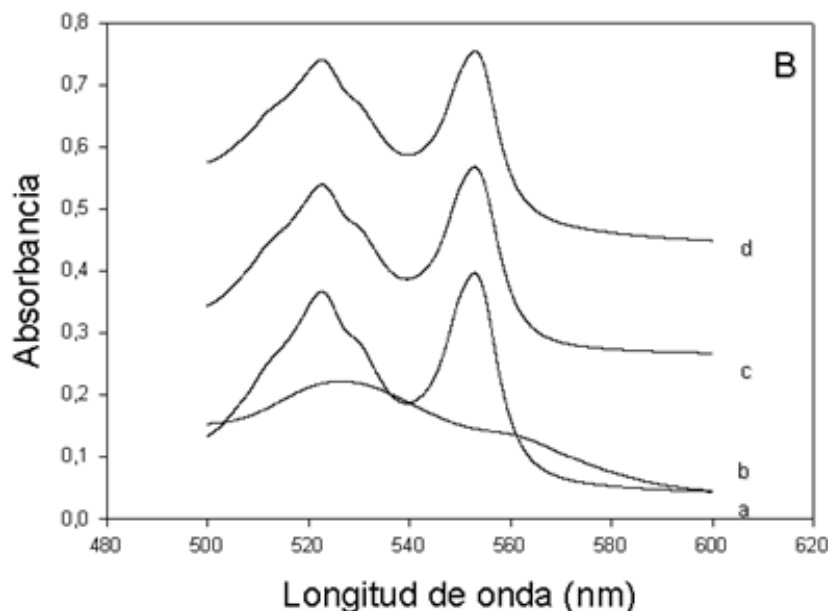


Figura 21. Propiedades de reducción de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. 100  $\mu\text{g}$  de proteína, con una actividad específica de 256 unidades/mg fue usada en ausencia (A) o presencia de mixotiazol (B). (a) Espectro de la PQQ-ADH como es purificada. (b) PQQ-ADH oxidada con  $\text{Q}_1$ , (c) la enzima vuelta a reducir con etanol (0.02 M). (d) Espectro de reducción total, obtenido con ditionita. El mixotiazol fue incubado cuando la enzima fue oxidada por  $\text{Q}_1$ .

Finalmente, ante la falta de efecto del mixotiazol sobre las actividades medidas con colorantes redox como aceptores y sobre la cinética de reducción de los citocromos *c*, decidimos ensayar el efecto del mixotiazol sobre la actividad de quinona reductasa utilizando ubiquinona-1 ( $\text{Q}_1$ ) como aceptor de electrones. Este experimento nos acercaría a condiciones de ensayo que serían lo más cercano a un sistema fisiológico. Como es presentado en la figura 21, la enzima purificada en su estado reducido fue incubada con 100  $\mu\text{M}$  de mixotiazol (cantidad en exceso) por 10 minutos, se adicionó sustrato etanol o acetaldehído (0.02 M). La reacción fue iniciada cuando se le adicionó  $\text{Q}_1$  como aceptor de electrones y la reacción  $\text{Q}_1$ -reductasa fue seguida por la disminución de absorbencia a 275 nm. La enzima PQQ-ADH en ausencia de mixotiazol presentó actividad de quinona reductasa (Fig. 22a). En presencia de mixotiazol (Fig. 22b) o antimicina (Fig. 22c) la PQQ-ADH no mostró actividad de  $\text{Q}_1$ -reductasa; de tal manera que estos inhibidores son capaces de inhibir drásticamente la reducción de un aceptor de quinona ( $\text{Q}_1$ ) por parte de la PQQ-ADH purificada. Este resultado nos refuerza la idea que el sitio de unión de los inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* es a nivel del sitio de unión de la enzima PQQ-ADH con la quinona endógena.



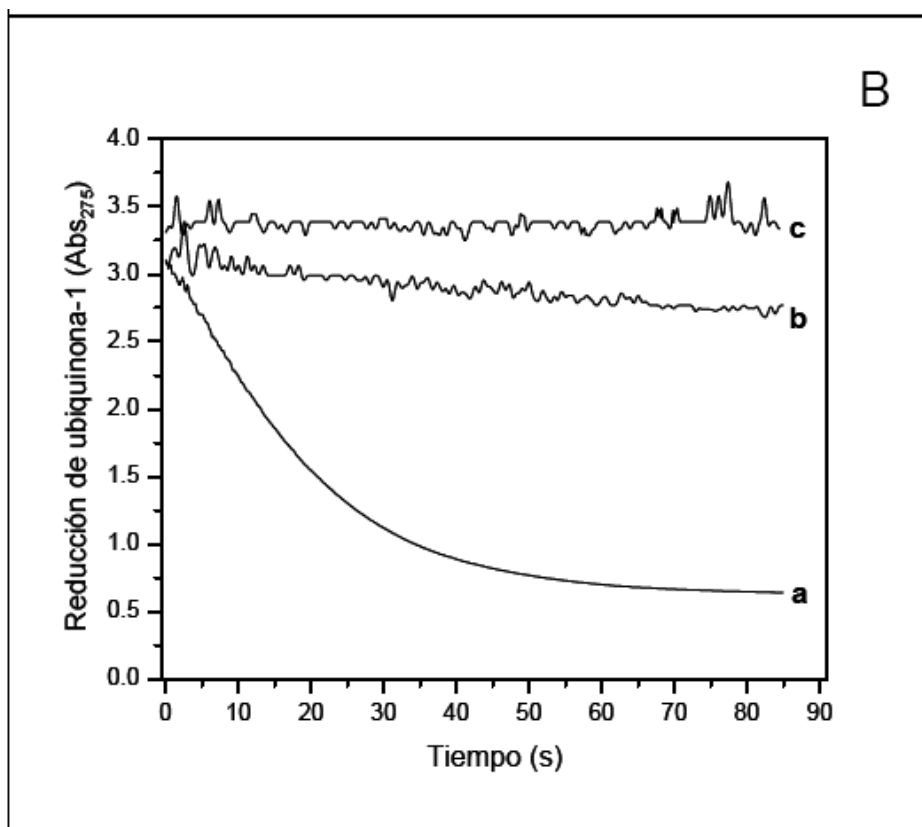


Figura 22. Cinética de reducción de ubiquinona-1 en (a) ausencia de inhibidores, (b) en presencia de mixotiazol 100  $\mu$ M o de (c) antimicina 100  $\mu$ M.

Hasta el momento, se ha demostrado que los inhibidores como mixotiazol y antimicina no impiden la reducción de los cuatro citocromos tipo *c* en la enzima purificada. Los resultados generados nos permiten concluir que los inhibidores específicos de *bc<sub>1</sub>*, tienen un mismo sitio de acción al menos sobre la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*, y probablemente sea el sitio de unión a la quinona endógena, impidiendo la transferencia de electrones de los citocromos *c* a la ubiquinona endógena (Q-10).

#### 6.4.3. Determinación de los productos finales de reacción.

En la especificidad por sustratos la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* (Tabla 5), se observó que la enzima tiene la capacidad de oxidar alcoholes lineales y aldehídos con gran eficiencia. Se realizaron diferentes ensayos para saber si la enzima PQQ-ADH tenía la capacidad de oxidar el etanol y llevarlo hasta acetato sin liberar el intermediario acetaldehído al medio de reacción. Para ello se realizaron los siguientes ensayos:

#### 6.4.3.1. Cromatografía de gases acoplado a masas.

La enzima PQQ-ADH en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 6.0, fue incubada con ferricianuro de potasio como aceptor de electrones y etanol como sustrato. Después de haber transcurrido la reacción, se tomó una alícuota y se aplicó al cromatógrafo de gases. Dentro de los productos de reacción determinados; se observa al etanol con un tiempo de retención de 2.73 minutos (sustrato inicial) y al acetato con un tiempo de retención 4.29 minutos como único producto final presente (Fig. 23). No se observó la presencia del acetaldehído como producto final.

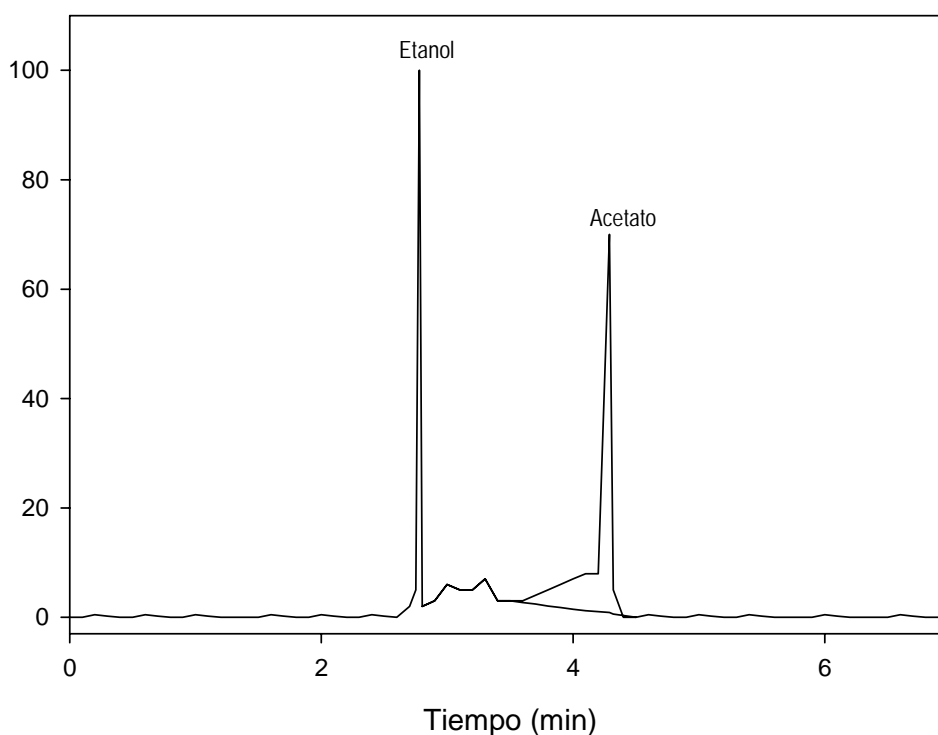
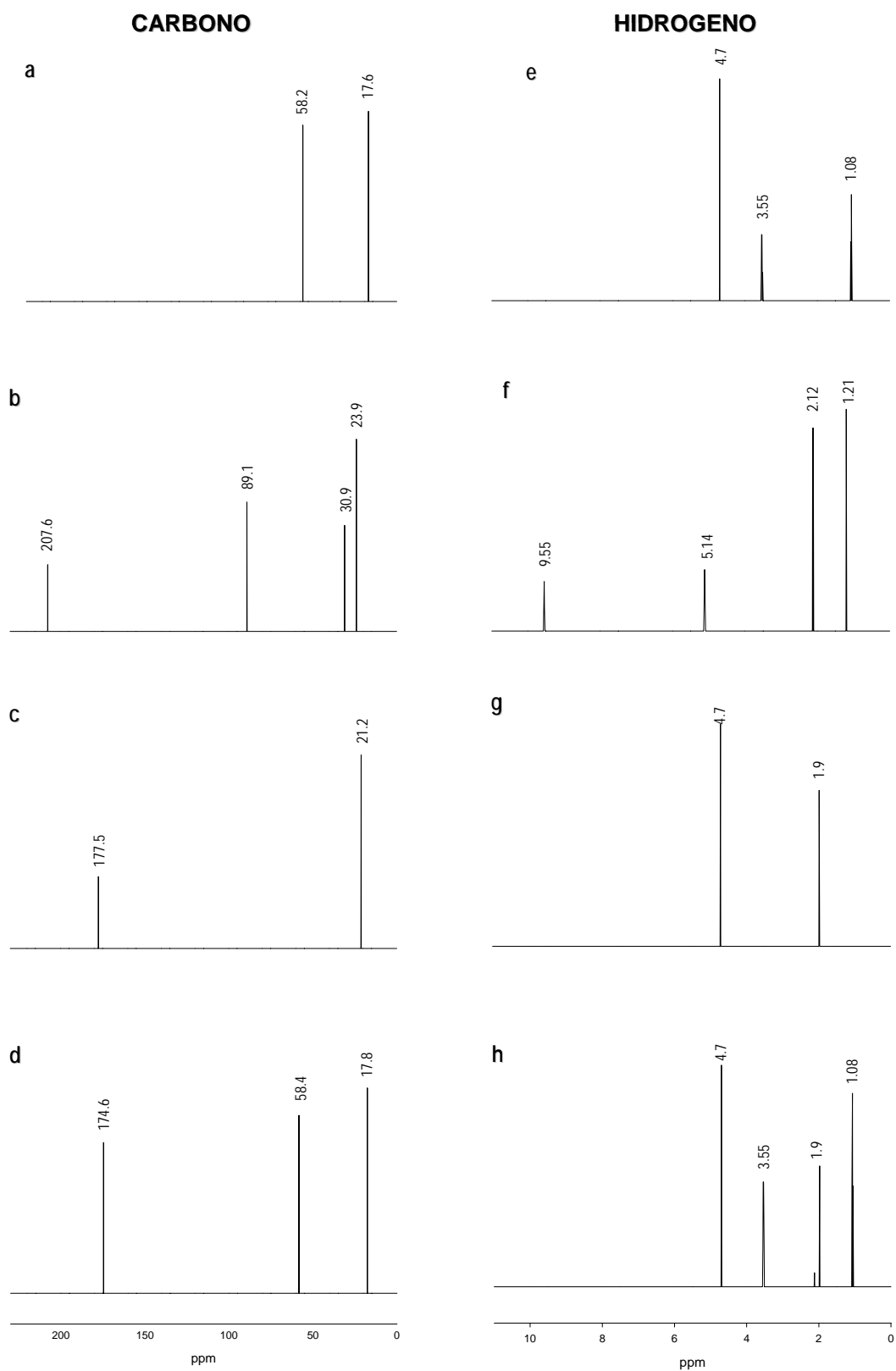


Figura 23. Determinación de los productos finales de reacción de la enzima PQQ-ADH por cromatografía de gases acoplado a masas. Después de la reducción total del ferricianuro de potasio, una alícuota de la mezcla de reacción fue aplicada al equipo de cromatografía de gases acoplado a masas JEOL/JM-AXSOSHA.

#### 6.4.3.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Por RMN se determinó las señales de Carbono e Hidrógeno de los compuestos presentes en la mezcla final de reacción cuando la enzima fue incubada con etanol y ferricianuro de potasio como aceptor de electrones. Se determinó el carbono e Hidrógeno para etanol, acetaldehído y acetato, los cuales fueron utilizados como controles (Fig. 24).



**Figura 24.** Determinación de Carbono e Hidrógeno de etanol, acetaldehído, acetato y de la mezcla de reacción de la enzima PQQ-ADH por RMN. Espectros de Carbono de etanol (a), acetaldehído (b), acetato (c) y de la mezcla de reacción de la PQQ-ADH (d). Espectros de Hidrógeno de etanol (e), acetaldehído (f) acetato (g) y de la mezcla de

reacción de la PQQ-ADH purificada (h). El control etanol, acetaldehído y acetato fueron resuspendidos a una concentración final de 0.1 M en agua deuterada.

Como se observa en la figura 29, las señales de Carbono obtenidas para etanol (17.6 y 58.2 ppm; Fig. 24a); acetaldehído (23.9, 30.9, 89.1 y 207.6 ppm; Fig. 24b) y para acetato (21.2 y 177.5 ppm; Fig. 24c). Las señales de Hidrógeno para etanol (1.08, 3.55 y 4.7 ppm; Fig. 24e); acetaldehído (1.2, 2.12, 5.14 y 9.55 ppm; Fig. 24f) y acetato (1.97 y 4.7 ppm; Fig. 24g). Las señales obtenidas en la mezcla de reacción de la PQQ-ADH para Carbono son: 17.8, 58.4 y 174.6 ppm (Fig. 24d) e Hidrógeno (1.08, 1.9, 3.55 y 4.7 ppm) (Fig. 24h) respectivamente. Las señales de Carbono a 17.8 y 58.4 corresponden a las señales obtenidas para etanol; la señal de 174.7 ppm corresponde a las señales para acetato. Las señales de Hidrógeno de 1.08 y 3.56 ppm corresponden al etanol y las señales de 1.9 y 4.7 corresponden a las señales para acetato. Con éstos resultados; se detectó al acetato como único producto final de la reacción de la enzima PQQ-ADH, y que el acetaldehído no es detectado por éstas técnicas como producto final de la reacción.

#### 6.4.3.3. Ensayo de carbazida - carbazona con etanol radioactivo

Se utilizó el ensayo de carbazida para medir el producto final de la enzima PQQ-ADH. En éste ensayo se utilizaron las mismas condiciones de reacción que los dos ensayos anteriores. Se utilizó etanol marcado radiactivamente como sustrato. Después de la reducción del ferricianuro, se midió la marca de  $^{14}\text{C}$  proveniente del etanol. Si la PQQ-ADH produce acetaldehído al medio de reacción, la carbazida lo atraparía y se vería el corrimiento de la señal de carbazida a carbazona; así como la marca de  $^{14}\text{C}$  estaría presente en la mezcla de carbazida. Los resultados obtenidos son presentados en la tabla 8.

**Tabla 8:** Reacción de la PQQ-ADH utilizando etanol radioactivo y carbazida.

Ensayo	Carbazida (cpm)	Mezcla de reacción (cpm)
Control (-)	13,285	386,175
Control (+) (ADH-NADH)	89,640	310,360
PQQ-ADH	12,525	383,400

cpm: cuentas por minuto

---

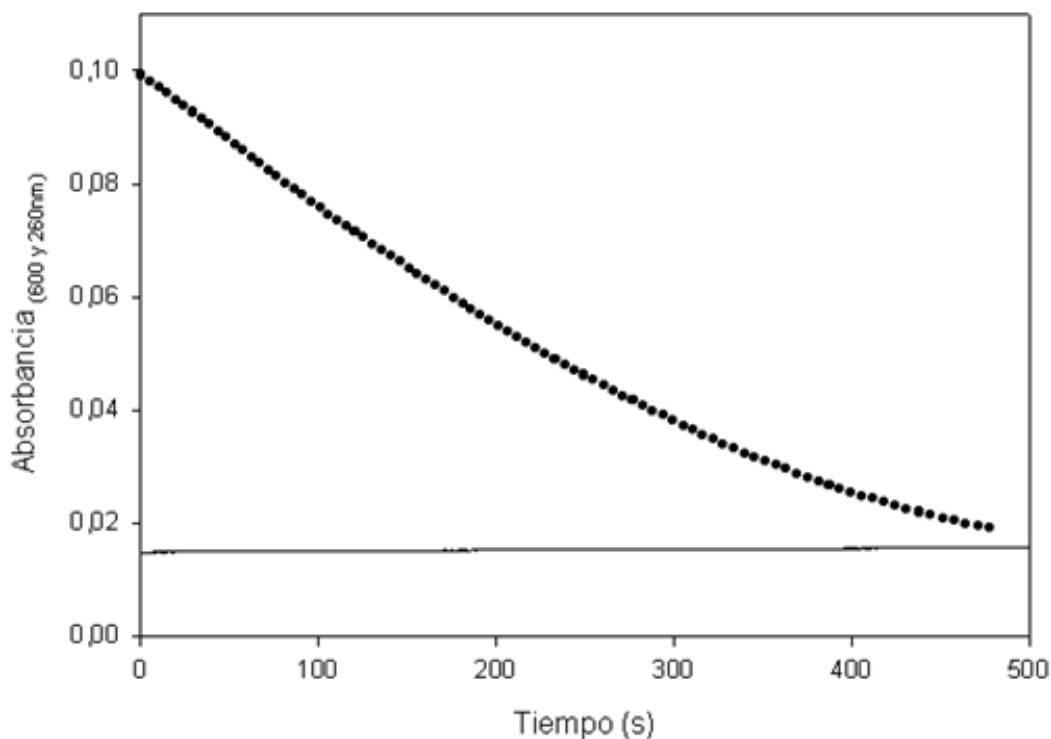
La carbazida del control negativo presentó una marca de 13,285 cpm, probablemente se deba a la evaporación del etanol. En el control positivo (ADH dependiente de NADH) la carbazida presentó una marca de 89,640 cpm. La carbazida presente en la reacción de la PQQ-ADH presentó una marca de  $^{14}\text{C}$  de 12,525 cpm. La mayor parte de marca (383,400 cpm) estuvo presente en la mezcla de reacción, la cual corresponde al 100% de marca inicial, si asumimos que la cantidad de marca determinada en la carbazida fue debido a la evaporación del  $^{14}\text{C}$ -etanol.

#### 6.4.3.4. Ensayo acoplado de 2,6 diclorofenol indolfenol con carbazida.

Este ensayo se realizó con la finalidad de observar de manera cinética y en el tiempo la reducción DCPIP y el incremento de absorbencia de la carbazona ( $A_{223\text{nm}}$ ) cuando éste último atrapa el acetaldehído. Se utilizó solución amortiguadora de fosfatos y DCPIP como aceptor de electrones, etanol como único sustrato fue adicionado a la mezcla de reacción. La carbazida se disolvió a una concentración de 5 mM. Como se observa en la [figura 25](#), conforme el DCPIP se va reduciendo, no se observa un incremento de absorbencia de 223 nm, el cual corresponde al cambio de carbazida a carbazona. Debido a la falta de un coeficiente de extinción de la carbazida, se realizó una curva de acetaldehído-carbazida. El espectro de absorbencia de la carbazida mostró un corrimiento de la señal de carbazida a carbazona; de acuerdo a la intensidad de la señal se determinó que la concentración de acetaldehído liberado por la enzima PQQ-ADH y atrapado por la carbazida durante la reacción es de 0.5 mM, el cual corresponde al 2.3% del producto final; es decir del 100% de producto, el 97.3% del etanol oxidado se va hasta la forma de acetato y solo un 2.3% es liberado en forma de acetaldehído.

Bajo las mismas condiciones de ensayo, se cambio el ensayo de carbazida por tiosemicarbazida debido a que éste último tiene una especificidad mayor. Se observa que las velocidades iniciales obtenidas con DCPIP y a la absorbencia registrada a 260 nm (longitud de detección de la tiosemicarbazida) fue del 100% del producto de la PQQ-ADH, la enzima libera al medio de reacción 1.8 % de etanol oxidado en forma de acetaldehído (0.3 mmoles de tiosemicarbazona); y que el 98% del sustrato etanol es llevado hasta acetato (16.9 mmoles de sustrato/min. mg) y esto ocurre sin participación de la enzima ALDH, lo cual nos lleva a concluir que la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* es capaz de catalizar la doble oxidación del etanol a acetato sin liberar cantidades significativas del intermediario acetaldehído al medio. Este mismo ensayo se

llevo acabo con butanol como sustrato, obteniéndose los mismos resultados. Esta es la primera vez que se demuestra que una enzima PQQ-ADH de bacterias acéticas produce una doble oxidación del sustrato etanol sin liberar acetaldehído al medio. Esto lleva pensar que la ADH de *Ga. diazotrophicus* sería, por sí sola, capaz de llevar a cabo la fermentación oxidativa del etanol sin requerir la participación de una ALDH.



**Figura 25.** Curso temporal de oxidación de etanol por la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. La enzima fue puesta en la mezcla de reacción de DCPIP + PMS, y se midió de manera cinética la reducción del DCPIP ( $A_{600\text{nm}}$ ) (línea discontinua). Cinética de reducción de la carbazida ( $A_{223\text{nm}}$ ) en el tiempo de reacción. La celda de reacción de DCPIP + PMS sellada herméticamente fue conectada a la celda de reacción que contenía la mezcla de carbazida también sellada herméticamente. La formación de carbazona-acetaldehído se determinó a 260 nm (línea continua).

## DISCUSIÓN.

En este trabajo, optimizamos las condiciones para expresar los niveles de la enzima PQQ-ADH en *Ga. diazotrophicus*. El mayor incremento de actividad de la enzima fue obtenido cuando etanol (0.5%) se adicionó como una fuente secundaria de carbono al medio de cultivo LGIP sin comprometer el rendimiento celular como sucede cuando es crecida con etanol como única fuente de carbono (Tabla 2). La expresión de la PQQ-ADH y de la PQQ-ALDH fue sobreinducida en paralelo, sin afectar la expresión de la PQQ-GDH; resultando en un incremento de tres veces en las actividades de estas enzimas (PQQ-ADH y PQQ-ALDH). Takemura *et al.*, (1993) en *A. pasteurianus* estudiaron el mecanismo de inducción de la actividad de la PQQ-ADH por etanol, donde se obtuvo un incremento de 10 veces en las actividades de la PQQ-ADH y PQQ-ALDH cuando el medio de cultivo fue suplementado con 3% de etanol como una fuente de carbono secundaria. Así mismo, Takemura *et al.*, (1993) demostraron en *A. pasteurianus* que cuando la bacteria es crecida con glucosa como única fuente de carbono, la síntesis de la enzima PQQ-ADH depende del promotor que se localiza a 232 pares de bases río arriba del codón de inicio de la transcripción. Cuando el medio de cultivo es inducido con etanol (3%), la transcripción de la enzima PQQ-ADH de *A. pasteurianus* se lleva a cabo por el promotor localizado a 59 pares de bases río arriba del codón de inicio de la transcripción.

Es de llamar la atención que la cantidad de detergente requerido (0.5% v/v) para solubilizar a la enzima PQQ-ADH de la fracción membranal de *Ga. diazotrophicus* es menor a lo reportado para *A. aceti* (Adachi *et al.*, 1978), *Gluronobacter suboxydans* (Matsushita *et al.*, 1995) y *Ga. polyoxogenes* (Tayama *et al.*, 1989) a 1.0% Tritón X-100. Debido a la baja concentración de detergente Tritón X-100, nos hace pensar que la PQQ-ADH y PQQ-ALDH están laxamente unidas a la membrana plasmática. Altas concentraciones de Tritón X-100 fueron requeridas para remover a la PQQ-GDHm, debido a que esta enzima presenta un cruce transmembranal en la membrana plasmática.

La enzima PQQ-ADH fue purificada 42.6 veces y presentó una actividad de 256 unidades/mg por ferricianuro reductasa. Esta actividad está en concordancia a lo encontrado en las PQQ-ADHs purificadas de *Ga. polyoxogenes* (231 unidades/mg; Tayama *et al.*, 1989), *A. aceti* (201 unidades/mg; Matsushita *et al.*, 1992) y de *G.*

*suboxydans* (233 unidades/mg; Matsushita et al., 1995); donde además de la ADH activa se encontró una ADH inactiva (23 unidades/mg) que se expresa cuando la bacteria es crecida a altas concentraciones de aereación y pH ácido. Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo hemos caracterizado únicamente la presencia de la enzima PQQ-ADH activa y no hemos encontrado la presencia de una enzima PQQ-ADH inactiva como fue descrito en *G. suboxydans* (Matsushita et al., 1995); a pesar de la alta aereación y un pH ácido durante el crecimiento celular, condiciones que suponen la presencia de la ADH inactiva. Hemos observado que durante el proceso de purificación, las mismas fracciones que presentaron actividad para etanol, también presentaron actividad para acetaldehído; lo cual nos indica que la enzima PQQ-ADH tiene la capacidad de oxidar alcoholes (C2-C6) y aldehídos de cadena lineal (C1-C6). En este sentido es notable el resultado que muestra, que no siendo el metanol sustrato oxidable de la ADH, si lo es el formaldehído que es oxidado a una velocidad relativa significativa (51% con respecto al etanol, Tabla 5). No tenemos explicación para esta selectividad diferencial entre el metanol y su producto de oxidación, el formaldehído, sobre todo que la velocidad de oxidación relativa del formaldehído con respecto a etanol es considerablemente alta.

#### 7.1. Caracterización molecular.

La enzima PQQ-ADH purificada en gel Nativo presentó una banda homogénea con masa molecular relativa de 115 kDa (Fig. 7a) detectada por etanol o acetaldehído en la zimografía *in situ* o en la tinción con el azul de Coomassie (Fig. 7a, b). Bajo condiciones desnaturalizantes (Fig. 7c), la enzima PQQ-ADH fue disociada en dos subunidades con masas moleculares de 71.4 y 43.5. Ambas subunidades dieron reacción positiva a la tinción de hemo peroxidasa. La subunidad II con una mayor intensidad respecto a la subunidad I. En la determinación por Piridin hemocromo demostramos que la enzima presenta cuatro citocromos tipo c por mol de enzima (datos no mostrados). De acuerdo a las propiedades moleculares de la enzima PQQ-ADH; ésta enzima pertenece al grupo de las ADHs purificadas en las bacterias ácido acéticas que tienen dos subunidades y que se han encontrado únicamente en las especies de *Gluconacetobacter*, como es presentado en la tabla 9; lo cual podría ser utilizada como una herramienta taxonómica para definir al género *Gluconacetobacter*; en contraste, a lo obtenido en las especies de *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Tabla 9) donde además de la subunidad I y II, se ha encontrado una tercera subunidad (SIII) de 14-16 kDa con función desconocida.



Tabla 9. Estructura molecular de las ADHs membranales purificadas de las bacterias ácido acéticas.

Organismo	Masa molecular subunidad (kDa)			Referencia
	I	II	III	
<i>A. aceti</i>	72	50	15	Adachi <i>et al.</i> , 1978
<i>A. pasteurianus</i>	74	44	16	Kondo y Honnuochi, 1997
<i>G. suboxydans</i>	78	46	14	Matsushita <i>et al.</i> , 1995
<i>Ga. europaeus</i>	72	45	-	Trcek <i>et al.</i> , 2006
<i>Ga. polyoxogenes</i>	72	44	-	Tayama <i>et al.</i> , 1989
<i>Ga. Xylinus</i>	71	44	-	Chavez-Pacheco, 2006
<i>Ga. diazotrophicus</i>	71,4	43,5	-	Este trabajo

## 7.2. Propiedades espectroscópicas.

El espectro de absorción de la enzima PQQ-ADH demostró que es purificada en su estado reducido al igual que las otras enzimas ADHs purificadas de las bacterias del ácido acético. La incubación con etanol o ditionita no ocasionó un incremento en el nivel de reducción a lo obtenido con la enzima purificada. El estado reducido de la enzima sugiere la presencia de un agente oxidable durante el proceso de purificación. Resultados similares han sido reportados para otras ADHs y se ha propuesto que el agente responsable de mantener en estado reducido a la enzima es debido a la presencia de trazas de alcohol o aldehídos contaminantes en los reactivos usados durante el proceso de purificación (Adachi *et al.*, 1978; Toyama *et al.*, 2004). En nuestro caso, proponemos que el estado reducido de la enzima es debido a la presencia de residuos de etoxi-etanol del detergente Tritón X-100 usado durante el proceso de purificación; el cual podría ser un sustrato potencial para ser oxidado por la enzima y así permanecer en su estado reducido. Es importante mencionar que la ADH en su estado reducido es notablemente estable y que cuando se le oxida artificialmente, por cualquier proceso, la enzima se aglutina y se inactiva (datos no mostrados).

El espectro de absorción de luz visible de la PQQ-ADH presentó señales a 317 y 350 nm (PQQ), y a 417, 523 y 553 nm (citocromos tipo c). El PQQ fue confirmado por espectroscopia de fluorescencia, presentando una excitación a 370 nm y una señal de emisión a 480 nm; las cuales corresponden a las señales determinadas en el auténtico PQQ (Duine *et al.*, 1987; Duine y Jongejan, 1989). Por EPR se observó la presencia del radical orgánico PQQ ( $g = 2.001$ ) el cual corresponde a lo encontrado en la ADH de *Comamonas testosterona* (De Jong *et al.*, 1995) y *Pseudomonas aeruginosa* (Christopher *et al.*, 2004). Por esta técnica, se observó que la enzima está constituida por tres hemo de bajo spin ( $g = 2.3$ ) y un hemo de alto spin ( $g = 4.3$ ). La presencia de un hemo de alto spin ( $g = 4.3$ ) podría ser el responsable de formar el aducto con monóxido de carbono. Debido a su nula reactividad con oxígeno, pensamos que esta enzima ADH, a pesar de que presente un hemo de alto spin, no actúa como una oxidasa dentro el sistema biológico de *Ga. diazotrophicus*. Al igual que lo observado en *Ga. diazotrophicus*; se ha reportado (Matsushita *et al.*, 1981) la presencia de un hemo de bajo spin que presentó la capacidad de formar el aducto con monóxido de carbono, aducto que fue parcialmente fotodisociado en la fracción membranal de *G. suboxydans*.

### 7.3. Caracterización cinética.

La especificidad por sustrato en las ADHs purificadas en las bacterias ácido acéticas ha sido relativamente restringida; generalmente, las ADHs tipo III que oxidan alcoholes primarios de dos a seis átomos de carbono; no oxidan metanol; pero sí oxidan alcoholes secundarios (Goodwin y Anthony, 1998; Matsushita *et al.*, 1992; Matsushita *et al.*, 1994). La enzima PQQ-ADH de *Ga. polyoxogenes* presentó dentro de su especificidad por sustrato la capacidad de oxidar formaldehído (62%), gliceraldehído (44%) y acetaldehído (18%); además de oxidar alcoholes alifáticos. La actividad detectada para aldehídos fue propuesta como una probable contaminante de la enzima PQQ-ALDH en la fracción purificada de la PQQ-ADH. En este trabajo, la enzima ADH de *Ga. diazotrophicus* oxida alcoholes primarios C2-C6; interesantemente el alcohol alílico, que es usado en nuestro laboratorio para la selección de cepas mutantes deficientes en la enzima PQQ-ADH fue el mejor sustrato, seguido por n-butanol, etanol y n-propanol. Por otro lado, aldehídos como acetaldehído fue oxidado con un 85% de eficiencia, comparada a la obtenida con alcohol alílico (Tabla 5), formaldehído (49%), propionaldehído (42%) y glutaraldehído (25%); la cual la hace una enzima totalmente

diferente a la PQQ-ADH de *Ga. polyoxogenes*; ya que en el caso referido, el acetaldehído fue el aldehído más pobremente oxidado, mientras que la enzima de *Ga. diazotrophicus* el acetaldehído es el mejor sustrato oxidado (85%). Esta capacidad de oxidar alcoholes y aldehídos es una propiedad que no ha sido descrita previamente en enzimas ADHs membranales tipo III en las bacterias ácido acéticas (Adachi *et al.*, 1978; Ameyama *et al.*, 1981; Tayama *et al.*, 1989; Matsushita *et al.*, 1992; Matsushita *et al.*, 1995). Los parámetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$  y la constante de especificidad) para etanol, butanol, alcohol alílico y acetaldehído (Tabla 6, 7), demuestran que ésta enzima está muy cerca de la perfección catalítica pues su parámetro  $K_{cat}/K_m$  está muy cerca de la velocidad de procesos controlados por difusión. Es pertinente el considerar que cuando la bacteria crece realizando la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), la PQQ ADH podría participar activamente en la protección respiratoria de la Nitrogenasa, colaborando a la alta tasa de respiración en *Ga. diazotrophicus*, previamente determinada en nuestro laboratorio por Flores Encarnación *et al.*, (1999). La constante de Michaelis ( $K_m$ ) de la ADH para etanol y acetaldehído fue de  $4.6 \times 10^{-4} M$  y  $2.9 \times 10^{-4} M$  (Tabla 6). La  $K_m$  por etanol de nuestra PQQ-ADH es casi un orden de magnitud menor a lo reportado en las ADHs purificadas de *Ga. polyoxogenes* (Tayama *et al.*, 1989) *A. acetii* (Adachi *et al.*, 1978, Adachi *et al.*, 1978b) y *G. suboxydans* (Ameyama y Adachi, 1982). Esta alta afinidad podría estar relacionada con su estilo de vida endófito, donde la concentración de alcoholes naturales en los tejidos de la planta podría ser limitante a la actividad de la enzima.

#### 7.4. pH óptimo, punto isoeléctrico y termoestabilidad de la enzima ADH purificada.

La actividad de ferricianuro reductasa de la PQQ-ADH purificada presenta una simetría típica en respuesta al pH; la actividad máxima fue detectada a pH 6.0 con etanol o acetaldehído como donadores de electrones (Fig. 14). El mismo pH óptimo fue obtenido por DCPIP reductasa (datos no mostrados); donde la respuesta catalítica de la enzima al pH depende de las propiedades del complejo de la enzima, independientemente del tipo de sustrato y del aceptor de electrones utilizado. Este único pH óptimo de 6.0 para ferricianuro reductasa y PMS-DCPIP con etanol y acetaldehído es contrario a lo que se encontró en las PQQ-ADHs de *G. suboxydans*, *A.*

*methanolicus*, *A. acetii* y *Ga. polyoxogenes*. La enzima ADH de *G. suboxydans* presentó actividad de ferricianuro reductasa en un amplio rango de pH que va desde el ácido hasta el neutral (Matsushita et al., 1996). La actividad de ferricianuro reductasa para la PQQ-ADH de *A. methanolicus* (Frébartova et al., 1998) presentó dos pHs óptimos a 4.5 y 7.0; mientras que la actividad de PMS reductasa presentó un rango de pH óptimo de 4.5 a 6.5, y la actividad de DCPIP reductasa estuvo por debajo del pH de 6.0. La ADH de *A. acetii* (Adachi et al., 1978) presentó una actividad de ferricianuro reductasa con un solo pH óptimo de 4.0. Finalmente, la enzima PQQ-ADH purificada de *Ga. polyoxogenes* (Tayama et al., 1989) presentó un rango de pH óptimo de pH 5.0 a 6.0 para la actividad de ferricianuro reductasa. Tanto en la PQQ-ADHs de *G. suboxydans*, *A. methanolicus*, *A. acetii* y *Ga. polyoxogenes*, la respuesta catalítica está dada por el aceptor de electrones utilizado y no por las propiedades moleculares de cada una de las enzimas como ocurre en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* que presentó el mismo pH óptimo independiente del aceptor de electrones utilizado.

El punto isoeléctrico determinado para la PQQ-ADH fue de 6.1, el cual es menos ácido al encontrado en *G. suboxydans* (Matsushita et al., 1996) que fue de 5.1 y al encontrado en el complejo de la ALDH purificada de *Ga. diazotrophicus* que fue de 5.2 (Gomez-Manzo et al., 2007).

La estabilidad térmica de nuestra enzima PQQ-ADH fue examinada y se observó que al igual que la ADH de *Ga. polyoxogenes* (Tayama et al., 1989) presentó estabilidad a una temperatura de 40°C. Cuando la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* es incubada a 40°C a diferentes intervalos de tiempo; se observó que la actividad de etanol y acetaldehído ferricianuro reductasa presentaron una pérdida de la actividad de forma paralela para los dos sustratos.

De acuerdo a lo expuesto con anterioridad en el proceso de purificación de la enzima PQQ-ADH, caracterización molecular, caracterización cinética y pH óptimo, se ha demostrado que en la fracción purificada se encuentra únicamente la enzima PQQ-ADH activa con capacidad de oxidar alcoholes y aldehídos; y que no está co-purificada con la enzima PQQ-ALDH del mismo organismo por: 1) determinación zimográfica de la enzima PQQ-ADH in situ en geles PAGE-NATIVO, donde se reveló un solo oligomero que tiene la capacidad de oxidar alcoholes y aldehídos; y que ese oligomero se disocia en dos

subunidades (Fig. 7a, b) que presentan masas moleculares muy diferentes a la encontrado en la PQQ-ALDH purificada y caracterizada del mismo organismo (Gómez-Manzo et al., 2007). 2) Por curvas de termoinactivación la PQQ-ADH se observó el mismo decaimiento de la actividad para etanol y acetaldehído. 3) Determinación del pH óptimo de 6.0 para el sustrato etanol y acetaldehído, y de 3.5 para la PQQ-ALDH purificada por ferricianuro reductasa. 4) Determinación del punto isoelectrónico de 6.1, el cual difiere totalmente al determinado en la PQQ-ALDH del mismo organismo que fue de 5.2 (Gómez-Manzo et al., 2007) y 5) Determinación y alineamiento de la secuencias internas de la subunidad II, que presentó una alta identidad con las secuencias de las PQQ-ADHs purificadas de *Ga. polyoxogenes* (gi 216186), *Gluconobacter europaeus* (gi 1050421) y *Gluconobacter oxydans* (gi 33338429).

### 7.5. Transferencia intramolecular de electrones.

Las ADHs de las bacterias ácido acéticas funcionan como deshidrogenasas primarias en la cadena respiratoria, donde los electrones removidos del sustrato por la enzima son inicialmente transferidos a su grupo prostético PQQ y posteriormente pasados a través de los cuatro citocromos tipo c presentes en la enzima (uno localizado en la subunidad I (cI) y tres localizados en la subunidad II, cII<sub>1</sub>, cII<sub>2</sub> y cII<sub>3</sub>) a la ubiquinona membranal (UQ<sub>8-10</sub>). La PQQ-ADH purificada de la fracción membranal de *Ga. diazotrophicus* en su composición nativa presentó actividad de quinona reductasa (Q<sub>1</sub>); lo cual indica que los electrones provenientes de la oxidación de alcoholes son transferidos por los citocromos hasta llegar a reducir a la quinona endógena.

Se determinarán los potenciales rédox de los cuatro citocromos c de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Los valores obtenidos fueron: -55, +49, +132 y +227 mV, respectivamente. El citocromo c con un valor de -55 mV probablemente sea el que se encuentre localizado en la subunidad I (cI), y los tres citocromos restantes se encuentran localizados en la subunidad II (cII<sub>1</sub>, cII<sub>2</sub> y cII<sub>3</sub>).

Los valores de potencial rédox determinados para los cuatro hemos C de la PQQ-ADH de *A. methanolicus* fueron -130, +49, +188 y +188 mV, a pH 7.0; y a pH 4.0 fueron de: 24, 187, 190 y 225 mV, respectivamente. Cuando esta enzima es disociada en los complejos I/III y II; y al ser reconstituida se observó que dos valores de hemos C (cI y

$cH_2$ ) regresan a su potencial redox normal; mientras que el potencial de  $cH_1$  y  $cH_2$  no son completamente recuperados (+78 y +174 mV) comparado a lo obtenido en condiciones normales que fue de +188 mV. La no recuperación de los dos hemo C ( $cH_1$  y  $cH_2$ ) de la PQQ-ADH de *A. methanolicus* es correlacionado con los estudios cinéticos que han sugerido que uno de los sitios de reacción con ferricianuro no está trabajando en la ADH híbrida (Freboitova et al., 1997).

El Potencial redox del hemo C de la ADH de *C. testosteroni* (ADH tipo II) (De Jong et al., 1995) presentó un valor de +140 mV a pH 7.5; este valor es muy diferente a lo encontrado en el hemo C en la subunidad I de la ADH de *Ga. diazotrophicus* (-55 mV). Esta diferencia de valores de potencial puede estar relacionada con la importancia fisiológica; ya que el aceptor de electrones de las dos ADHs es diferente. En el caso de la ADH de *Ga. diazotrophicus*, los electrones son transferidos a los hemo C de la subunidad II y después a la ubiquinona; mientras que el aceptor de electrones de la ADH de *C. testosteroni* es una proteína azul de cobre o azurina.

En espectros de absorción de la PQQ-ADH de *A. methanolicus* se observó que el 63% del hemo C fue oxidado por ubiquinona a pH 4.5; lo cual sugiere que el hemo  $cH_1$  es un componente no involucrado en la transferencia de electrones a la ubiquinona. Nosotros hemos observado que cuando la enzima ADH en su estado reducido es incubada con quinona soluble ( $Q_1$ ), el 100% de los citocromos c son oxidados a pH 6.0. Así mismo, la enzima purificada en su estado reducido fue oxidada al 100% por ferricianuro de potasio y reducida con etanol o acetaldehído, la enzima regresa a los mismos niveles de reducción que presenta la enzima al final de la purificación ("as prepared"). Los niveles de reducción obtenidos con ditionita fueron los mismos a los que se obtuvieron después de la reducción con alcoholes o aldehídos. Chávez-Pacheco (2006, Tesis doctoral) en la caracterización de la ADH membranar de *Ga. xylinum* encontró datos similares a los obtenidos en la enzima ADH de *G. suboxydans*; esto es, después de oxidar a la enzima con ferricianuro y al volver a ser reducida con etanol, se alcanza un nivel de reducción del 77% comparado a lo obtenido con ditionita, llegando a la conclusión de que sólo tres de los cuatro citocromos tipo c presentes en la enzima ADH de *Ga. xylinum* participan en la transferencia intramolecular de electrones. Estos datos nos indican que los cuatro citocromos tipo c presentes en la enzima purificada de *Ga. diazotrophicus* son completamente reducidos por sustratos y muy probablemente participan en la

transferencia de electrones a la UQ<sub>10</sub>; esto a pesar de que encontramos un valor alto de potencial de +227 mV en el complejo de la ADH de *Ga. diazotrophicus*.

Se demostró que el efecto del mixotiazol sobre la actividad enzimática de la PQQ-ADH no está dado a nivel del sitio catalítico (PQQ) y de los cuatro citocromos tipo c, debido a que cuando la enzima fue incubada con el inhibidor se obtuvieron los mismos niveles de reducción con etanol y acetaldehído en presencia o ausencia de mixotiazol como fue presentado en la figura 20; además de que los ensayos con PMS+DCPIP o con ferricianuro no son afectados por el inhibidor (Fig. 21B). Por lo contrario, el ensayo con Q<sub>1</sub> como aceptor fue totalmente inhibido por mixotiazol (Fig. 22) por lo cual proponemos que el sitio de pegado e inhibición del mixotiazol es a nivel de unión de la quinona endógena (Q<sub>10</sub>), localizado en la subunidad II de esta enzima.

#### 7.6. Determinación del producto final de la reacción catalizada por la PQQ-ADH.

Por cromatografía de gases acoplado a masas, Resonancia Magnética Nuclear (RMN), ensayo acoplado de DCPIP a tiosemicarbazida y etanol radioactivo, se demostró que la enzima PQQ-ADH es capaz de oxidar el etanol hasta acetato, sin la intervención de la enzima PQQ-ALDH. Esta propiedad la hace una enzima bifuncional en términos de la capacidad de oxidar alcoholes y aldehídos con gran eficiencia; contrario a lo que sucede en las ADHs bifuncionales dependientes de NAD<sup>+</sup> que parecen ser un producto de fusión de los dos genes (ADH y ALDH) que se encuentran enlazadas por una secuencia de unión o un "linker"; ya que en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal es altamente homólogo a la familia de aldehídos oxidoreductasas dependientes de NAD<sup>+</sup> y el extremo COOH-terminal es homólogo a la familia alcohol oxidoreductasa dependiente de NAD<sup>+</sup> que requiere Fe<sup>2+</sup> como cofactor. Estas ADHs han sido descritas en *Clostridium acetobutylicum* (Nair *et al.*, 1994), *Escherichia coli* (Goodlove *et al.*, 1989; Membrillo-Hernández *et al.*, 2000), *Polytomella sp* (Atteia *et al.*, 2003) y *Leuconostoc Mesenteroides* (Koo *et al.*, 2005). Estas enzimas alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD<sup>-</sup> que poseen actividad de alcohol/aldehído deshidrogenasa en condiciones de crecimiento anaeróbico convierten el acetil-CoA a acetaldehído en el dominio de la aldehído deshidrogenasa y en una reacción posterior el acetaldehído es reducido a etanol en el dominio de la alcohol deshidrogenasa.

Sin embargo, dentro de las enzimas dependientes del grupo prostético PQQ, solo se ha caracterizado a una quinohemoproteína PQQ-ADH tipo II de *Comamonas testosteroni* (Antes *Pseudomonas testosteroni*) que presentó la capacidad de oxidar un amplio espectro de alcoholes primarios, secundarios y aldehidos (Groer *et al.*, 1986), la cual, dentro de su composición oligomérica, resultó ser un monómero de 65 kDa conteniendo como grupos prostéticos 1 mol de PQQ, 1 mol de hemo tipo C y 1 mol de  $\text{Ca}^{2+}$  por cada mol de enzima. A pesar de que ésta enzima oxida alcoholes y aldehidos, se demostró que la enzima por si sola es capaz de oxidar el etanol y liberar el intermediario acetaldehído al medio de reacción. Nosotros hemos caracterizado una enzima quinohemoproteína PQQ-ADH tipo III que resultó ser un dímero de 115 kDa, con subunidades de 71.43 kDa y 43.548 kDa. La enzima contiene 1 mol de PQQ, 4 mol de hemo C y 1 mol de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Además, por diversas estrategias experimentales hemos demostrado que la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* tiene la capacidad de oxidar alcoholes y aldehidos; y que el aldehído producido en el ciclo de la reacción a partir de etanol se mantiene unido al sitio catalítico y es llevado hasta acetato. Esta es la primera vez que se demuestra que una PQQ-ADH (ADH tipo III) es capaz de catalizar la doble reducción en secuencia del etanol hasta acetato sin liberar el intermediario acetaldehído al medio de reacción como es presentado en la figura 26 y que los electrones provenientes de la oxidación de su sustrato, son llevados directamente a la cadena respiratoria y participar de manera activa en la "Protección respiratoria de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Nuestros resultados son contrarios a los que obtuvo Groer *et al.*, (1986), quien demostró que la ADH tipo II de *Comamonas testosteroni* libera el intermediario acetaldehído al medio. Nuestros resultados modifican sustancialmente el mecanismo de reacción propuesto para ADH II donde se propone que el etanol y el intermediario libre acetaldehído compiten por el sitio activo (mecanismo alternativo). En nuestro caso no hay competencia pues el intermediario acetaldehído no abandona el sitio activo (doble reducción secuencial).



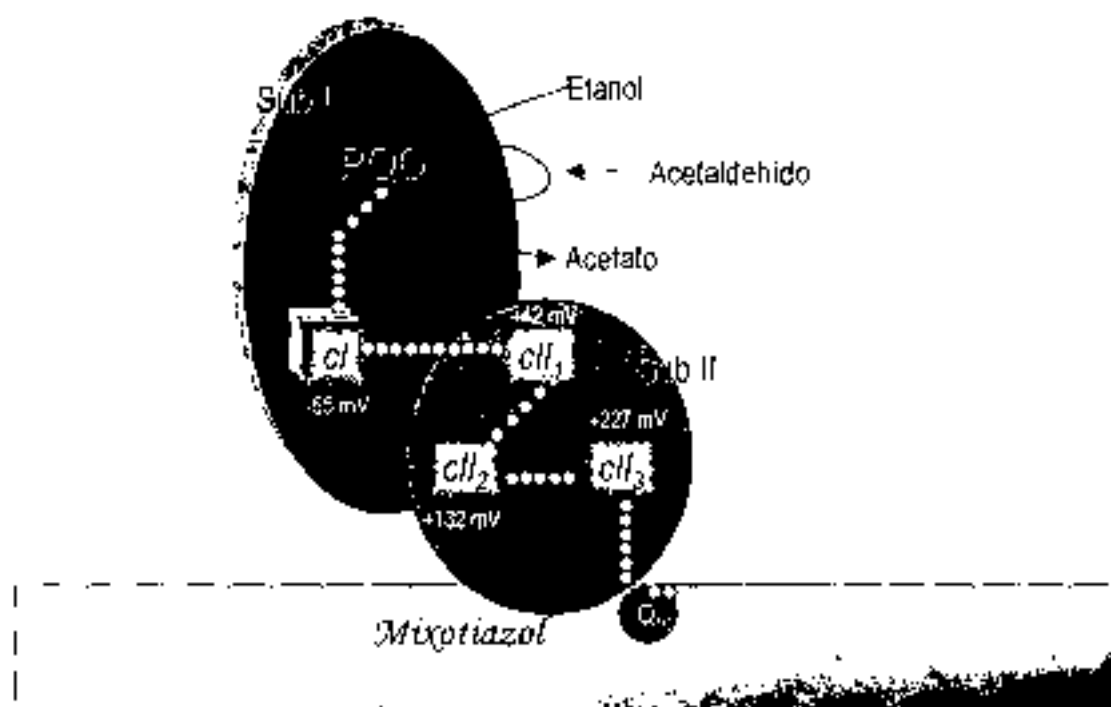


Figura 26. Modelo hipotético de la transferencia intramolecular de electrones de la quinohemoproteína alcohol deshidrogenasa tipo III purificada de la fracción membranal de *Ga. diazotrophicus*. Cl, chl<sub>1</sub>, chl<sub>2</sub>, y chl<sub>3</sub> corresponden a los 4 sitios de hemo C en cada una de las subunidades I y II, respectivamente. Q<sub>o</sub> es representado como el sitio de unión de quinona *in vivo*. El PQQ está presente en la forma de semiquinona (PQQ•) como fue determinado por EPR y los hemo C están en su forma reducida.

---

## VIII. CONCLUSIONES.

Se optimizó las condiciones de expresión de la enzima PQQ-ADH en *Ga. diazotrophicus* sin comprometer el rendimiento celular. Las actividades de las enzimas PQQ-ADH y PQQ-ALDH fueron inducidas tres veces respecto al cultivo no inducido con etanol (0.5%).

La enzima PQQ-ADH fue purificada de *Ga. diazotrophicus* con una actividad de 256 unidades/mg medida por ferricianuro reductasa; y la enzima fue purificada 42.6 veces.

En condiciones nativas la PQQ-ADH presentó una banda homogénea con una masa molecular de 115 kDa detectada por zimografía *in situ* o con tinción de azul de Coomassie. En condiciones desnaturalizantes la enzima fue disociada en dos subunidades con masas moleculares de 71.4 y 43.5 kDa; ambas dieron reacción positiva a la tinción de hemo peroxidasa.

La enzima PQQ-ADH es purificada en su estado reducido. La incubación con etanol o ditionita no ocasionó un incremento en el nivel de reducción a lo obtenido con la enzima purificada. El espectro de absorción de luz visible de la PQQ-ADH presentó señales a 317 y 350 nm (PQQ), y a 417, 523 y 553 nm (citocromos tipo *c*).

El PQQ fue determinado por espectroscopía de fluorescencia, dando una señal de excitación a 370 nm y emisión a 480 nm; El PQQ fue corroborado por EPR, donde se obtuvo la presencia de un radical orgánico a una *g* de 2.001 (PQQ).

La enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* presento la capacidad de oxidar alcoholes y algunos aldehídos; presentó un pH óptimo de 6.0 tanto para el sustrato etanol y acetaldehído. El mismo pH óptimo para ambos sustratos fue obtenido por DCPIP reductasa.

Los parámetros cinéticos para etanol, butanol, alcohol alílico y acetaldehído demostraron que ésta enzima está muy cerca de la perfección catalítica pues su parámetro  $K_{cat}/K_m$  está muy cerca del valor obtenido para procesos controlados por difusión.

---

Las secuencias internas determinadas para la subunidad II, fueron alineadas; las cuales presentaron una alta identidad con las secuencias de las PQQ-ADHs purificadas de *Gluconacetobacter polyoxogenes*, *Gluconobacter europaeus* y *Gluconobacter oxydans*.

La PQQ-ADH presentó cuatro potenciales rédox de los diferentes citocromos *c* con valores de: -55, +42, +132 y +227 mV. El primer valor de -55 mV probablemente se encuentra localizado en la subunidad I (*cI*), y los tres citocromos restantes se encuentran localizados en la subunidad II (*cII<sub>1</sub>*, *cII<sub>2</sub>* y *cII<sub>3</sub>*).

Los cuatro citocromos son oxidados por analogos de quinonas y ferricianuro de potasio y vueltos a reducir por sustratos; lo que sugiere que participan en la transferencia de electrones a la UQ<sub>10</sub>.

El efecto del mixotiazol sobre la actividad enzimática de la PQQ-ADH no está dado a nivel del PQQ, ni en los citocromos *c*; si no que que esta dado a nivel de unión de la quinona endógena (Q<sub>10</sub>); localizado en la subunidad II de esta enzima.

Por cromatografía de gases acoplado a masas, Resonancia Magnética Nuclear, ensayo acoplado de DCPIP a tiosemicarbazida y etanol radioactivo, se demostró que la enzima PQQ-ADH es capaz de oxidar el etanol hasta acetato, sin la intervención de la enzima PQQ-ALDH.

---

## IX. REFERENCIAS.

- Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K. and Ameyana M. Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* 42(12): 2331-2340 (1978).
- Adachi, O., Kubota, T., Hacisalihoglu, A., Toyama, H., Shinagawa, E., Duine, J.A. and Matsushita, K. Characterization of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 469-478 (1998).
- Alvarez, B., and Martínez-Drets, G. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol.* 41:918-924 (1995).
- Amaratunga, K., Goodwing, P. M., O'Connor, D. C. and Anthony, C.. The methanol oxidation genes *mxoFJGIR(S)ACKLD* in *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 146: 31-38 (1997a).
- Ameyana, M., Shinagawa, E., Matsushita, K. and Adachi, O. D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*: solubilization, purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 851-861 (1981).
- Ameyama M, Adachi O. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* 89:450-457 (1982).
- Ameyana, M., Matsushita, K., Shinagawa, E., Hayashi, M. and Adachi, O. Pirroloquinoline quinone: excretion by methylotrophs and growth simulation for microorganisms. *Biofactors* 1, 51-53 (1988).
- Anthony, C., and Zatman, L. J. The microbial oxidation of methanol: The prosthetic group of alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas*. *Biochem. J.* 304: 665-674 (1967).
- Anthony, C. The bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv Microbial Physiol.*, 27: 113-210 (1986).
- Anthony, C. Quinoprotein-catalysed reactions. *Biochem. J.*, 320: 697-711 (1996).
- Anthony, C. Quinoprotein-catalysed reactions. *In: Comprehensive Biological Catalysis; A Mechanistic Reference* (M. Sinnott, ed), Academic Press, London (1998).
- Anthony, C. Principle and applications for quinoproteins, Marcel Dekker, New York. pp 50-68. (1993).
- Asakura, A., and Hoshino, T. Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-sorbose/L-sorbose dehydrogenase. *Biosci. Biotech Biochem*, 62: 469-478 (1999).

- 
- Ashbolt, N.J., and Inkerman, P.E. Acetic acid bacterial biota of the pink sugarcane mealybug, *Sacchariococcus sacchari*, and its environs. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:707-712 (1990).
- Atteia, A., Van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Henze, K., Martin, W., Riveros-Rosas, H. and González-Halphen, D. Bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase (ADHE) in chlorophyte algal mitochondria. *Plant Molecular Biology* 53 : 175-188 (2003).
- Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R. and Bottini, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg.* 24:7-11 (1998).
- Bulygina, E. S., Gulikoca, O. M., Dikanskaya, E. M., Netrusov, A. I., Tourova, T. P. and Chumakov, K. M. Taxonomic studies of the genera acidomonas and Gluconobacter by 5S ribosomal RNA sequencing. *J. Gen. Microbiol.* 138:2283-2286 (1992).
- Cavalcante, V.A., and Döbereiner, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil.* 108: 23-31 (1988).
- Chávez-Pacheco, J. L., Martínez-Yee, S., Contreras, M. L., Gómez-Manzo, S., Membrillo-Hernández, J. and Escamilla, J. E. Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology. *J. Appl. Microbiol.* 99 (5), 1130-1140 (2005).
- Chavez-Pacheco, J. El crecimiento y la respiración de *Gluconacetobacter xylinum* en sistema de cultivo estático y agitado. UNAM. Instituto de Fisiología Celular. Tesis de doctorado (2006).
- Christopher, W. M. K., Mennenga, B., Gorisch, H. and Bittl, R. Characterisation of the PQQ cofactor radical in quinoprotein ethanol dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *FEBS Letters* 564: 69-72 (2004).
- Cojno, E. H., Reis, V.M., Chenberg, C. and Dobereiner, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 106 :23-31 (1993).
- Dalton, H. and J. R. Postage. Effect of oxygen on grown of *Azotobacter chroococcum* in batch an continues cultures. *J. Gen. Microbiol.* 54:463-473 (1969).
- Del Arenal, I. P., Contreras, M. L., Svlateorova, B. B., Rangel, P., Lledias, F., Dávila, J. R. and Escamilla, J.E. Haem O and a putative cytochrome *bo* in a mutant of

- 
- Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A. *Arch Microbiol.* 167: 24-31 (1997).
- De Ley J, Gillis M, Swings J. The genus *Gluconobacter* In: Krieg N.R. Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 267-278 (1984).
- De Jong, G. A. H., Geerlof, A., Stoorvogel, J., Jongejan, J. A., Devries, S. and Duine, J. A. Quinohemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* purification, characterization, and reconstitution of the apoenzyme with pyrroloquinoline quinone analogues. *Eur. J. Biochem.* 230, 899-905 (1995).
- Djurdjić, V., and Stojanović, S. A method for spectrophotometric determination of acetaldehyde with thiosemicarbazide in blood. *Facta Universitatis* 1 (5): 129 - 134 (1998).
- Duine, J. A., Frank, J. and Jongejan, J. A. Enzymology of quinoproteins. *Adv. Enzymol.*, 59: 169-212 (1987).
- Duine, J. A., and Jongejan J. A. Pyrroloquinoline quinone: a novel cofactor. *Vitam Horm.*;45:223-62 (1989).
- Duine, J. A. Quinoproteins-enzyme containing the cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan quinone. *Eur. J. Biochem.* 200, 271-284 (1991).
- Domínguez-Pérez, M. Crecimiento y expresión del sistema respiratorio de *Acetobacter diazotrophicus* en etanol como única fuente de carbono. UNAM. Instituto de Fisiología Celular. Tesis de licenciatura (2003).
- Drozd, J., and Postgate, J. R. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J Gen Microbiol.* 63:63-73 (1970).
- Escamilla, J. E., R. Ramirez, I. P., del Arenal, G. Zorzosa. and Linares, V. Expresión of cytochrome oxidase in *Bacillus cereus*; effects of oxygen tension and carbon source. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3549-3555 (1987).
- Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzúa, L., Aguilar, G. R., Baca, B. E., Escamilla, J. E. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bact.* 181 (22): 6987-6995 (1999).
- Flores-Encarnación, M. La diazotrofia aeróbica en *Acetobacter diazotrophicus*. Modelo para el estudio de la Protección Respiratoria de la Nitrogenasa. UNAM. Instituto de Fisiología Celular. Tesis de doctorado (2001).

- 
- Fuentes-Ramirez, L. E., Jiménez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R. and Caballero-Mellado, J. *Acetobacter diazotrophicus* *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154:145-150 (1993).
- Fuentes-Ramirez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernandez, A., Jimenez-Salgado, T., Wang, E. T., Martinez-Romero, E. and Caballero-Mellado, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johnanae* sp. Nov., and *Gluconacetobacter azocaptans* sp. Nov., associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol Microbiol* (2001)
- Franke, I. H., Fegan, H., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E., Sly, L.I. Description of *Gluconacetobacter schhari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugarcane mealy bug. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1681-1693 (1999).
- Frébortova, J., Matsushita, K., Yakushi, T., Toyama, H. and Adachi, O. Quinoprotein alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: Kinetic study on the enzyme purified from *Acetobacter methanolicus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61:459-465 (1997).
- Frébortova, J., Matsushita, K., Arata, H. Adachi, O. Intramolecular electron transport in quinoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter methanolicus*: a redox-titration study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1363:24-34 (1998).
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Teixeira, K. R. S., Dobereiner, J. and De Ley, J. *Acetobacter diazotrophicus* *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:361-364 (1989)
- Gómez-Manzo, S., Contreras-Zentella, M., González-Valdez, A., Sosa-Torres, M., Arreguín-Espinoza, R and Escamilla-Marván, E. The PQQ-Alcohol Dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Internacional Journal Food of Microbiology*. In Press (2007).
- Goodwing, P. M., and Anthony, C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv. Microb. Physiol.* 40: 1-80 (1998).
- Goodlove, P. E., Cunningham, P.R., Parker, J. and Clark, D. P. Cloning and sequence analysis of the fermentative alcohol-dehydrogenase-encoding gene of *Escherichia coli*. *Gene.*, 85: 209-214 (1989).

- 
- Gorisch, H., and Rupp, M. (1989) Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas*. In: PQQ and quinoproteins (J.A Jongejan and J.A. Duine, eds), pp 23-34. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*.
- De Jong. A. H. G., Geerlog, A., Stoorvogel, J., Jongejan, A., De Vries, S. and Duine, A. J. Quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. Purification, characterization, and reconstitution of the apoenzyme with pyrroloquinoline quinone analogues. *Eur. J. Biochem.* 230:899-905 (1995).
- Groen, B.W., Frank, J. and Duine, J.A. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.* 234: 611-615 (1986).
- Hagerhall, C., Magnitsky, S., Sled, V. D., Schroder, I., Gunsalus, R. P., Cecchini, G., Ohnishi, T. An *Escherichia coli* mutant quinol:fumarate reductase contains an EPR-detectable semiquinone stabilized at the proximal quinone-binding site. *J. Biol. Chem.* 274 (37):26157-64 (1999).
- Huaska, G., Hurt, E., Gabellini, N. and Lockau, W. Comparative Aspects of Quinol-Cytochrome c/Plastocyanin Oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 726: 97-133 (1983)
- Hill S. (1998) How is nitrogenase regulated by Oxygen? *FEMS Microbio. Lett* 54: 111-130.
- Hommel, R., and Kleber, H. P. Properties of the quinoprotein aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter rances*. *Journal of General Microbiology.* 136, 1705-1711 (1990).
- Houck, D. R., Hanners, J. L. and Unkefer, C. J. Biosynthesis of pyrroloquinoline quinone. Identification of biosynthetic precursors using <sup>13</sup>C and NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 110: 6920-2921 (1988).
- Houck, D. R., Hanners, J. L. and Unkefer, C. J. Biosynthesis of pyrroloquinoline quinone 2. Biosynthetic assembly from glutamate and tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.*, 113: 3162-3166 (1991).
- Hopper, D. J., and Rogozinski, J. Redox potential of the haem group in the quinocytocrome, lupanine hydroxylase, an enzyme located in the periplasma of a *Pseudomonas* sp. *Biochem Biophys Acta.* 1383: 160-164 (1998).
- Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi, M. and Yano, K. Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Ferment Bioeng.* 73: 419-424 (1989).



- 
- Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi, M. and Yano, K. Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **171**, 3115-3122 (1989).
- Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi, M. and Yano, K. Nucleotide sequence of the gene encoding the 45-kilodalton subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Bac.* **73**: 419-424 (1992).
- Itoh, S., Kawakami, H. and Fukuzumi, A. Modeling of the chemistry of quinoprotein methanol dehydrogenase, oxidation of methanol by calcium complex of coenzyme PQQ via addition-elimination mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 439-440 (1997).
- Jiménez-Salgado, T., Aparicio Fabr e, R y Caballero-Mellado, J. Detecci n de citocinas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de ca a de azucar. XVIII Reuni n Latinoamericana de Rhizobiologia. La Habana, Cuba (1994).
- Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez, L. E., Tapia-Hernández, A., Mascarua-Esparza, M. A., Martínez-Romero, E. and Caballero-Mellado, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (9) : 3676-3683 (1997).
- Kavanagh, E. P., Callis J. B., Edwards S.E., Poole, R. K. and Hills, S. Redox poise and oxygenation of cytochrome bd in the diazotroph *Azotobacter vinelandii* assessed in vivo using diode-array reflectance Spectrophotometry. *Microbiology* **144**, 2271-2280 (1998).
- Kelly, D. P., Lu, W. P. and Poole, R. K. Cytochromes in *T. tepidarius* and the respiratory chain involved in the oxidation of thiosulfate and tetrathionate. *Arch. Microbiol.* **160**, 87-95 (1993).
- Kinter, M., and Sherman, N.E. In protein sequencing and identification using tandem mass spectroscopy, Desiderio, D. M., Nibbering, N. M. M. Eds; John Wiley-Interscience, Inc. New York. Pp 147-165 (2000).
- Kondo, K., Beppu, T. and Horinouchi, S. Cloning, sequencing, and the characterization of the gene encoding the smallest subunit of the three component membrane bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter pasteurians*. *J. Bacteriol.* **177**, 5048-5055. New York (1995).
- Kondo, K., and Horinouchi, S. Characterization of the genes encoding the three component membrane bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter*

- 
- suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurians*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1131-1138 (1997).
- Koo, O. K., Jeong, D.W., Lee, J. M., Kim, M. J., Lee, J. H., Chang, H. C., Kim, J. H. and Lee, H. J. Cloning and characterization of the bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *Biotechnol. Lett.* 27:505-510 (2005)
- Li, R.P., and MacRae, I. C. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* 23: 999-1002 (1991).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).
- Loganathan, P., Sunlta, R., Parkda, A. K. and Fair, S. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleunise coracana*. *L.J. Appl. Microbiol.* 87:167-172 (1999).
- Lubben, M., and Morand, K. Novel prenylated hemes and cofactors of cytochrome oxidases. Archea have modified heme A and O. *J. Biol. Chem.* 269, 21473-21479 (1994).
- Martínez-Yee, S. El sistema de deshidrogenasas del periplasma y la ubiquinona (UQ<sub>10</sub>) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. UNAM. Instituto de Fisiología Celular. Tesis de Maestría (2005).
- Matsushita, K., Tayama, E., Shinagawa, E., Adachi, O. and Ameyama, M. Purification and characterization of co-binding cytochrome *c*-553 from the membrane of *Gluconobacter suboxydans*. *FEMS Microbiology Letters* 10(3), 267-270 (1981).
- Matsushita, K., Takahashi, K., Takahashi, M., Ameyama, M. and Adachi, O. Methanol and ethanol oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanolicus*. *J Biochem* (Tokyo). Jun; 111(6):739-47 (1992).
- Matsushita, K., Takaki, E., Shinogawa, M., Ameyama, O. and Adachi. Ethanol oxidase respiratory chain of acetic acid bacteria. Reactivity with ubiquinone of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase purified from *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56:304-310 (1992b).
- Matsushita, K., Toyama, H. and Adachi, O. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv Microb Physiol.* 36:247-297 (1994).
- Matsushita, K., Toyama, H., Ameyana, M., Adachi, O., Dewanti, A. and Duine. J. A. Soluble and membrane quinoprotein D-glucose dehydrogenase of *Acinetobacter*

- 
- calcoaceticus*: the binding process of PQQ to the apoenzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1548-1555 (1995a).
- Matsushita, K., Yakushi, T., Takaki, Y., Toyama, H. and Adachi, O. Generation mechanism and purification of an inactive form convertible in vivo to the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans*. *J. Bacteriol.* 177, 6552-6559 (1995).
- Matsushita, K., Yakushi, T., Toyama, H., Shinagawa, E. and Adachi, O. Function of multiple heme C moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase cytochrome c complex of *Gluconobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.* 271, 4850-4857 (1996).
- Membrillo-Hernandez, J., Echeval, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J. and Lin, C.C. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry.*, 275: 33869-33875 (2000).
- Merrick, M. J. 1992. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria, p. 935-876. In G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, N.Y.
- Meulenbergh, J.J., Sellink, E., Riegman, N.H. and Postma, P.Q. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae pqq* operon. *Mol. Gen. Genet.*, 232, 284-294 (1992).
- Moshiri, F., Kim, J. K., Changlin, F. and Maier, R. J. The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase *in vitro* and *in vivo*. *Mol Microbiol.* 14:101-114 (1994).
- Mutzel, A., and Gorisch, H. Quinoprotein ethanol dehydrogenase preparation of the apo-form and reconstitution with pyrroloquinoline quinone and Ca<sup>2+</sup> or Sr<sup>2+</sup> ions. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1721-1726 (1991).
- Nair, R. V., Bennett, G. N. and Papoutsakis, E. T. Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* 176:871-885 (1994).
- Ng, T.C.N., Laker, A.N. and Marer, R.J. Cloning, sequencing and mutagenesis of the mutant strain and a proposed new branch in respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1230:119-129 (1995).

- 
- Puustinen, A., and M, Wikström. 1991 The heme groups of cytochrome *o* from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:6122-6126
- Reis, V. M., Olivares, F. L. and Döbereiner J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J Microbiol Biotechnol*.10:401-405 (1994).
- Rudnick, P., Meletzus, D., Green, A., He, L. and Kennedy, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biol. Biochem*. 29:831-841 (1997).
- Robson, R. L. Characterization of an Oxygen-Stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*, *Biochem. J*. 181:569-575 (1979).
- Shibata, T., Ishii, Y., Noguchi, H., Yamada, H., Saito, Y. and Yamashita, M. Purification and characterization of a quinoprotein alcohol dehydrogenase from *Pseudogluconobacter saccharoetigenes* IFO 14464. *J. Biosic. Bioeng*. 92 524-531 (2001).
- Shimao, M., Ninomiya, K., Kuno, O., Kato, N. and Sakazawa, C. Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone-dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Appl Environ Microbiol*. Feb;51(2):268-75 (1986).
- Sievers, M., Ludwig, W. and Teuber, M. Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodospila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the alpha-subclass of proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *Syst. Appl. Microbiol*. 17:189-196 (1994).
- Sokollet, S. J., Hertel, C. and Hammes, P. Description of *Acetobacter obodiens* sp. Nov. and fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 48:935-940 (1995).
- Stephan, M. P., Oliverira, M., Teixeira, K. R. S. Martínez-Drets, G. and Döbereiner. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett*. 77:67-72 (1991).
- Sugisawa, T. and Hoshino, T. Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Biosci Biotechnol Biochem*. Jan; 66(1):57-64 (2002).
- Swings, J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*, p. 2268-2286. In. A. Balows, H. G. Truper, M. Dworking, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.). The prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, Vol. III. Springer-Verlag, New York, N.Y (1992).

- 
- Tachinaba, S., Kuba, N., Kawai, F., Duine, J. and Yasuda, M. Involvement of a quinoprotein (PQQ-containing) alcohol dehydrogenase in the degradation of polypropylene glycols by the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiolog Letters*. 128, 345-349 (2003).
- Takagi, K., Torimura, M., Kawaguchi, K., Kano, K. and Ikeda, T. Biochemical and electrochemical characterization of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*. May 25;38(21):6935-42 (1999).
- Takemura, H., Kondo, K., Horrinduchi, S. and Beppu, T. Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Bacteriology*. 175. 6857-6866 (1993).
- Tamaki, T., Fukaya, M., Takemura, H., Tayama, K., Okumura, H., Kawamura, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1088: 292-300 (1991).
- Tayama, H., Fukawa, M., Okumura, H., Kawamura, Y. and Beppu, T. Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 181-185 (1989).
- Thomas P. E., Ryan, D. and Levin W. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome *P-450* on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 75 (1) : 168-176 (1976).
- Toyama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyana, M. and Adachi, O. Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenase are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J. Bacteriol.*, 177: 2442-2450 (1995).
- Toyama, H., Mathews, F.S., Adachi, O. and Matsushita, K. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Arch Biochem Biophys.* Aug 1;428(1):10-21 (2004)
- Treck, J., Toyama, H., Czuba, J., Misiewicz, A. and Matsushita, K. Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70:366-373 (2006).
- Urakami, T., Tamaoka, J., Susuki, K. I. and Komagata, K. *Acidomonas* gen. nov., incorporation *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas mathanolica* comb. Nov. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 39:50-55 (1989).

- 
- Ureta, A., and Nordlund, S. Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. *J. of Bacteriology*. 184(20):5805-5809 (2002).
- Vangnai, AS., and Arp, D.J. An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohaemoprotein, is involved in the oxidation of butane by "*Pseudomonas butanovora*". *Microbiology*. Mar;147(Pt 3):745-56 (2001).
- Van Kleef, M. A. G., and Duine, J. A. L-tyrosine is the precursor of PQQ biosynthesis in *yphomicrobium X*. *FEBS Lett*. 237, 91-97 (1998).
- Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 61:1244-1251 (1997).
- Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T.. *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]. In Validation of publication of new names combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 48:327-328 (1998).
- Yamanaka, K., and Tsuyuki, Y. Purification and characterization of membrane-bound glycerol dehydrogenase (GLDH) of *Gluconobacter* species. *Agric. Biol.. Chem*. 47 2173-2183 (1983).
- Young, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism. p. 43-86. In G. Stacey, . H. Burris and H. J. Evans (Ed), Biological Nitrogen Fixation. Capman and Hall, New York (1992).
- Zarnt, G., Schrader, T. and Andreesen, J. R. Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. *J Bacteriol*. Mar; 183(6):1954-60 (2001).