



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“La PQQ-Acetaldehído deshidrogenasa
periplásmica de Acetobacter diazotrophicus”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ALEJANDRA ABIGAIL GONZALEZ VALDEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA





Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandra Abigail González Valdéz
FECHA: 18 mayo 2004
FIRMA: Abigail

GOBIERNO NACIONAL
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"La PQQ-Acetaldehído deshidrogenasa periplásmica de Acetobacter diazotrophicus"

realizado por González Valdéz Alejandra Abigail

con número de cuenta 9221421-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. José Edgardo Escamilla Marván

Propietario Dr. Roberto Arreguin Espinosa de Los Montero

Propietario Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

Suplente Dr. José Salud Rodríguez Zavala

Suplente QFB Saúl Gómez Manzo

Consejo Departamental de Biología

M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

Dedicatoria

Dedico este trabajo a:

DIOS,
MÉXICO,
LA UNAM,
MIS PADRES Y HERMANAS,
LUIS FELIPE
TI QUE CONTINUAS

Mi padres me enseñaron que:

Que no es más rico el que tiene más,
Sino el que aprende a vivir con lo que tiene.
Y que si se quiere ser rica
Se debe entender que:
A lo largo de la vida existen alegrías y penas,
Lo primero hay que disfrutarlo
Y con lo segundo se ha de templar el carácter.
No se debe reclamar lo que no se ha ganado,
Pero hay que cuidar lo que es propio.
Y darle ayuda al que se pueda,
Pues nunca sabrás de quien puedas necesitar.
Muchas gracias.

Agradecimientos

Agradezco a todos y cada una de las personas que hicieron posible mi crecimiento espiritual e intelectual.

Sinceramente agradezco:

Al Doctor J. Edgardo Escamilla Marván, por todo el apoyo y la paciencia brindada.

A mis sinodales: Dr. Roberto Arreguin, Dra. Luisa Alba Lois, Dr. José S. Rodríguez, y al candidato a Doctor Saúl G. Manzo, por la ayuda en la realización de este trabajo.

A la Doctora Martha Contreras, por hacerme ver que la vida no es fácil, por enseñarme que es necesario aprender las cosas que no nos gustan.

Al Sr. Juan Méndez Franco por su invaluable trabajo que realiza en el laboratorio.

A Martín Sará Páez que junto con Saúl fuimos el grupo de las deshidrogenasas y juntos aprendimos a aprender, a tolerar, a creer y a soñar pero sobre todo Gracias por permitirme ser su amiga.

A Armando . Lucumí por todo lo que me has enseñado. Gracias.

A mis compañeros del Laboratorio 101 Ote: Beatriz Rodarte, Bernardo, Jorge, Juan Luis, Juan Manuel, Luz María (la lucha), Marcela, Marcos, Martha, Mauricio, Miguel Angel, Suri Karina y Rodrigo.

A mis compañeros y amigos: J Ángel, March, Gabi, Jessi, Erick, Miguel, Ale, Mariana (la rana), José, Erika (quika), Hugo, Aurorita, Mónica e Isra, Lilianita, cris, Juan, Nicole, Gerbo, Rosa, Por supuesto que Adriana Uribe.

Agradezco a Roberto Arreguín porque fue un gran apoyo en el trabajo, gracias por ser mi sosiego, alentarme en los momentos difíciles y contagiarme de su buena vibra. Gracias Mil

Agradezco a Joseph, Nelvin, Pablone y Arturín por recordarme en todo momento qué es ser niño, pero sobre todo por enseñarme las cosas elementales de la vida: la risa, el amor y el olvido.

Agradezco infinitamente al Sr. Nelvin y la Sra. María de la Luz; Luis y Noemí; Crusi y Frank; Mila y Jesús por abrirme las puertas de su casa pero sobre todo por abrigarme en su corazón.

A la tía Conchy and family porque la aceptación en silencio es lo más reconfortante para el alma.

Todo es causa del azar y la necesidad

*“ La PQQ-Acetaldehído deshidrogenasa periplásmica de
Acetobacter diazotrophicus.”*

CONTENIDO

	PAGINA.
Resumen	1
Abreviaturas	2
I.INTRODUCCIÓN	3
1.1. Fijación Biológica de Nitrógeno y Respiración	3
1.2. Protección Respiratoria.	4
1.3. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .	6
1.4. Características del sistema respiratorio de <i>G. diazotrophicus</i> .	7
II. ANTECEDENTES	10
2.1 Sistema oxidativo de alcoholes	10
2.2 PQQ (Pirrol Quinolin-Quinona).	11
2.3 Aldehído deshidrogenasa	13
2.4 PQQ-Acetaldehído deshidrogenasa en <i>G. diazotrophicus</i>	15
III. HIPÓTESIS	16
IV OBJETIVO GENERAL	17
V. ESTRATEGIA GENERAL	18
VI MATERIALES Y METODOS	
A. Obtención del material.	19
1. Material Biológico.	19
2. Mantenimiento y cultivo del organismo.	19
3. cultivo masivo.	19
B. Preparación de la fracción membranal.	20
1. Cuantificación de proteína.	21
2. Actividades de deshidrogenasas.	21
C. Purificación	21
1. Solubilización de ALDH.	21
2. Cromatografía.	22
2.1 DEAE-Toyopearl.	22
2.2 QAE- Toyopearl.	23
2.3 HA-Ultrogel.	23
D. Caracterización Molecular.	24
1. Composición oligomérica.	24
1.1. Electroforesis (PAGE - SDS).	24
1.2. Zimografía de peroxidasa para hemo.	24
1.3. Zimografía con sustrato acetaldehído.	25
2. Análisis espectral del contenido citocrómico.	25

Caracterización Cinética.	26
2. Determinación del pH óptimo.	26
3. k_m por sustrato acetaldehído.	26
4. Especificidad por sustratos aldehído.	26
5. Efecto de compuestos sobre la actividad de ALDH.	27
VII. RESULTADOS	28
A. Condiciones del cultivo.	28
B. Purificación.	31
1. Solubilización de ALDH.	31
2. Cromatografía en columna.	32
2.1 DEAE-Toyopearl.	32
2.2 QAE-Toyopearl.	34
2.3 HA-Ultrogel.	35
C. Caracterización oligomérica.	38
1. Composición oligomérica.	38
2. Zimografía con sustrato acetaldehído.	38
3. Electroforesis (PAGE - SDS).	40
4. Zimografía de peroxidasa para hemo.	44
5. Análisis espectral del contenido citocrómico.	44
D. Caracterización cinética.	46
1. Determinación de pH óptimo.	46
2. Especificidad por sustratos aldehído.	47
3. Constantes cinéticas: k_m y $V_{(max)}$.	48
4. Efecto de compuestos sobre la actividad de ALDH.	50
VIII DISCUSIÓN.	51
IX. CONCLUSIÓN.	54
X. BIBLIOGRAFÍA.	56

RESUMEN

Acetobacter diazotrophicus es una bacteria Gram negativa, la cual se ha aislado de diferentes plantas y se sabe que tiene una asociación endófito con su hospedero; existen evidencias que muestran que este organismo presenta una protección respiratoria para su nitrogenasa, este mecanismo se manifiesta en cultivos con una alta aereación y fijando nitrógeno atmosférico. Para que se lleve a cabo este fenómeno la bacteria cuenta con una batería de deshidrogenasas periplásmicas como glucosa deshidrogenasa (GDH), alcohol deshidrogenasa (ADH) y acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). Es de nuestro interés la caracterización de la ALDH que cataliza la oxidación de acetaldehído a ácido acético. En este proceso los electrones son transferidos directamente a la ubiquinona en la cadena respiratoria y aquí, mientras que la enorme actividad respiratoria impide que el O₂ en el citoplasma alcance niveles tóxicos para la nitrogenasa, la fosforilación oxidativa resultante, genera el ATP requerido para costoso proceso de fijación de N₂.

En este trabajo se purificó parcialmente a la ALDH encontrándose que tiene una masa oligomérica aproximado de 125 kDa y que está conformada por dos subunidades: (S1) 75; (S2) 50 kDa de masa relativa. La enzima contiene un citocromo tipo c. Presenta un pH óptimo de catálisis de 7.0; con una Km de 4.3 X 10⁻⁴ M. La preparación oxida acetaldehído con la mayor eficiencia, seguido de formaldehído, glutaraldehído y no oxida alcoholes. La actividad de la enzima se ve inhibida por iones como cobre y mercurio. El 2,6- diclorofenol indolfenol y el NTB fueron buenos aceptores de electrones. No se ensayaron quinonas como aceptores de electrones.

ABREVIATURAS

A	Absorbencia.
ADH	Alcohol deshidrogenasa.
ALDH	Aldehído deshidrogenasa.
APS	Persulfato de amonio.
ATP	Adenosin de trifosfato.
DCIPH ₂	2,6-Diclorofenol-indolfenol reducido.
DEAE	Dietil aminoetil
D.O.	Densidad Óptica.
ϵ_{600}	Coefficiente de extinción molecular.
EDTA	
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno.
GDH	Glucosa deshidrogenasa.
KCN	Cianuro de potasio.
KDa	kilo daltones.
k_m	Constante de Michaelis-Menten.
LGI-P	
N ₂	Nitrógeno molecular.
NASA	Nitrogenasa.
NADH	Nicotinamida adenosin dinucleótido.
NTB	Azul de nitrotetrazolio.
PEG	Polietilen glicol
PMS	Fenacina metasulfato.
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro.
PQQ	Quinona de pirrol-quinolina.
Q	Quinona.
QAE	Aminoetil cuaternario
S ₁	Subunidad.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamida
TMB	3,3",5,5"-tetrametilbencidina.
TMPD	Tetrametil-p-fenilendiamida.
UQ	Ubiquinona.
V _{max}	Velocidad máxima.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO Y RESPIRACIÓN .

Los microorganismos endófitos comprenden a los hongos y bacterias que viven sin causar daño en el interior de células o tejidos de plantas superiores durante una parte considerable de su ciclo de vida. En general, los microorganismos endófitos pueden localizarse en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular.

La diversidad y número de bacterias rizosféricas es muy grande, lo cual ocasiona que en este ambiente exista una fuerte competencia por los nutrientes y en consecuencia que su disponibilidad sea limitada. Sobre esta base se ha considerado que las bacterias endófitas podrían tener algunas ventajas competitivas sobre las bacterias rizosféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de las plantas y el número de microorganismos endófitos es menor que el de los rizosféricos (**Cavalcante et al.**, 1988). Por otro lado, se ha sugerido que el interior de las plantas es un ambiente propicio para que se lleve a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN) ya que en ese ambiente es bajo en oxígeno y relativamente alto en fuentes de carbono (**James**, 2000), por lo que las bacterias endófitas podrían fijar el nitrógeno y liberarlo directamente, contribuyendo con una parte de los requerimientos nitrogenados de la planta hospedera (**Boddey et al.**, 1995). Existe interés por entender los procesos involucrados en el metabolismo aeróbico, el cual debe de coexistir con la naturaleza de otros procesos biológicos, como la FBN que sólo ocurre en condiciones anaeróbicas (**Hill**, 1998).

A pesar de que el nitrógeno elemental (N_2) es un gas abundante en la atmósfera, como fuente de nitrógeno no es utilizable por la mayoría de los seres vivos. Esta capacidad para fijar nitrógeno está limitada a un número restringido

de organismos procariontes a los que se les ha llamado **diazótrofos** y ocurre tanto en bacterias anaeróbicas, aerobias facultativas, aerobios estrictos; así como en bacterias fotosintéticas(Hill, 1998; Robson, 1979 y Kim y Rees, 1994).

La fijación de nitrógeno es un proceso necesariamente anaeróbico pues se envenena fácilmente por O_2 , también requiere de un aporte considerable de ATP (16 a 18 moléculas de ATP por mol de N_2 fijado). Este debe ser generado por fosforilación oxidativa que a su vez exige la disponibilidad y consumo de importantes cantidades de O_2 . Es pues paradójico, que el complejo enzimático responsable directo de la FBN, la nitrogenasa (NASA), sea una enzima que fácilmente se intoxica por el O_2 , lo cual resulta de su inactivación irreversible. La Nitrogenasa (NASA) es un complejo, que consta de dos proteínas: la ferroproteína (Fe) y la ferro-molibdeno proteína (Fe-Mo), las cuales son altamente sensibles al oxígeno y son inactivadas de manera irreversible en su presencia y esto resulta en una paradoja.

1.2 Protección Respiratoria.

Dalton y Postgate en 1969 postularon que la nitrogenasa se protege del daño por el oxígeno a través de la alta respiración celular, mecanismo que se le denominó Protección Respiratoria. Alternativamente, ante una elevación transitoria del O_2 , la nitrogenasa se asocia reversiblemente a ferrosulfoproteínas formando un complejo que no es activo pero queda protegido del O_2 . El mecanismo se le ha llamado protección conformacional. De acuerdo con la hipótesis de la protección respiratoria, el O_2 se consume en las proximidades de la superficie celular y de esta forma se previene que O_2 entre a la célula. Esta hipótesis fue propuesta basándose en el hecho que *las Azotobacterias*, tienen una de las más altas tasas de respiración registradas entre los organismos aerobios. *Azotobacter vinelandii* es un organismo aeróbico estricto, el cual tiene la capacidad de fijar nitrógeno en el estado de vida libre y lo pueden hacer en un

amplio intervalo de concentraciones de oxígeno. A su vez, este organismo cuenta con varias deshidrogenasas flavín-dependientes para NADH, succinato, lactato y malato; que donan los electrones directamente a la quinona (Q_8). Las actividades específicas registradas se encuentran en el orden de μ molar, indicando una gran capacidad de la bacteria para oxidar rápidamente estos sustratos (**Kavanagh et al.**, 1998).

También se ha propuesto que el incremento en la respiración se acompaña de un desacoplamiento del transporte de electrones, de tal manera que un aumento en el consumo de O_2 no se asocia obligadamente, a un incremento en la producción de ATP (**Dalton y Postage**, 1969). Este desacoplamiento parcial en la respiración celular, es posible gracias a que el sistema respiratorio de las azotobacterias está ramificado y cuenta con dos citocromos oxidasas: una de tipo *ba* y otra de tipo *bd*, esta última esta relacionada con el desacoplamiento (**Linkenhägner and Oelze**, 1995). De acuerdo a éste mecanismo la respiración provee el ATP suficiente para sostener el alto costo energético que implica la fijación de nitrógeno; y remueve el exceso de oxígeno, como parte del mecanismo que protege la nitrogenasa de la inactivación, ya que todas las nitrogenasas examinadas hasta el momento son extremadamente sensibles a este gas (**Hill**, 1998).

La presente propuesta concierne a la bacteria *Acetobacter diazotrophicus*, nombre que fue cambiado recientemente por *Gluconacetobacter diazotrophicus*; gracias a nuevas evidencias moleculares comparativas en el RNA ribosomal 16S (**Yamada et al.**, 1997). Esta bacteria junto con *G. johannae* y *G. azotocaptans*, son las únicas especies conocidas actualmente que tienen la capacidad de fijar nitrógeno y en conjunto son agrupadas dentro de la familia *Acetobacteraceae*; llamadas comúnmente bacterias acéticas. En la presente Tesis se conservó el uso de la nomenclatura anterior: *Acetobacter*, en Título, Resumen e Introducción en razón del registro original de la Tesis. A continuación dejo de usar la nomenclatura anterior y la reemplazo por la recientemente aceptada: *Gluconacetobacter*.

1.3 *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Gluconacetobacter diazotrophicus ha sido encontrado en asociación endófito en plantas no leguminosas como la caña de azúcar, el camote, pasto forrajero (Döbereiner et al., 1993), café (Jiménez –Salgado et al., 1997), piña (Tapia-Hernández et al., 2000) y en el nanche (Fuentes-Ramírez et al., 2002). Esta bacteria se ha aislado de los espacios intercelulares de raíces, tallos y hojas de éstas plantas. *G. diazotrophicus* es un bacilo Gram negativo, es móvil, posee varios flagelos laterales, mide aproximadamente 0.7µm ancho x 2µm de largo y es un aerobio estricto. El crecimiento óptimo se presenta a 30 °C en medios de cultivo que contienen 10% de sacarosa y pH de 5.5. Sin embargo, esta bacteria es capaz de crecer en concentraciones de sacarosa elevadas hasta el 30% (Cavalcante et al., 1988). La especie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, puede usar glucosa, fructosa o sacarosa como única fuente de carbono, produciendo ácido a partir de estos sustratos (Cavalcante et al., 1988). Con excepción de la sacarosa, esta especie no usa otros disacáridos y no es capaz de crecer con ácidos dicarboxílicos como única fuente de carbono (Stephan et al., 1991).

Gluconacetobacter diazotrophicus lleva a cabo la FBN en condiciones de alta areación (aerotolerante en extremo) a pH ácido (5.0 –3.0), incluso debajo de 3.0, así como en presencia de altas concentraciones de nitratos (10mM) y su actividad de nitrogenasa es inhibida sólo parcialmente aún en concentraciones de 20mM de (NH₄)₂SO₄ o por aminoácidos. (Stephan et al., 1991). Estas características de *G. diazotrophicus*, son compartidas por las especies *G. johannae* y *G. azotocaptans*, pero se pueden diferenciar entre ellas gracias al fenotipo color chocolate que presentan cuando son cultivadas en un medio a base de extracto de papa y LGIP.

1.4 Características del Sistema respiratorio de *G. diazotrophicus*

Nuestro laboratorio (Flores-Encarnación et al., 1999) aportó evidencias suficientes que indican que la concentración de amonio en el medio de cultivo juega un papel determinante en la expresión de los componentes de la cadena respiratoria de *G. diazotrophicus*. Siendo una propiedad única entre las bacterias ácido acéticas. Se encontró que los niveles de glucosa, citocromos tipo **c** y las oxidasas alternas **ba** y **bd** son fuertemente afectadas, en su nivel de expresión, por la concentración de amonio en el medio.

El sistema respiratorio de *G. diazotrophicus* está constituido por una sección de bajo potencial que corresponde a diversas deshidrogenasas acopladas directamente a la cadena respiratoria, incluyendo flavoproteínas para NADH y succinato; las cuales tienen su sitio catalítico orientado hacia el lado citosólico de la membrana plasmática. Los sitios catalíticos de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa, y las quinohemoproteínas alcohol y acetaldehído deshidrogenasa las cuales contienen citocromos de tipo **c**, están orientados hacia el espacio periplásmico. Una poza de quinona (Q₁₀) colecta los equivalentes reducidos de todas las deshidrogenasas funcionales, transfiriendo los electrones a la quinol oxidasa citocromo **ba** (condición de fijación de nitrógeno). Alternativamente, cuando las células crecen en exceso de amonio y bajo condiciones aeróbicas se expresa la quinol oxidasa citocromo **bd**. También se determinó la existencia de una oxidasa terminal insensible a cianuro; dicha oxidasa no se ha podido identificar debido a que no presenta señales en el espectro visible; y se especula que en la vía insensible a cianuro participan los citocromos de tipo **c** que presenta las enzimas periplásmicas ADH y ALDH.

A continuación se representa el modelo propuesto para la composición y organización del sistema respiratorio de *G. diazotrophicus* PAL5.

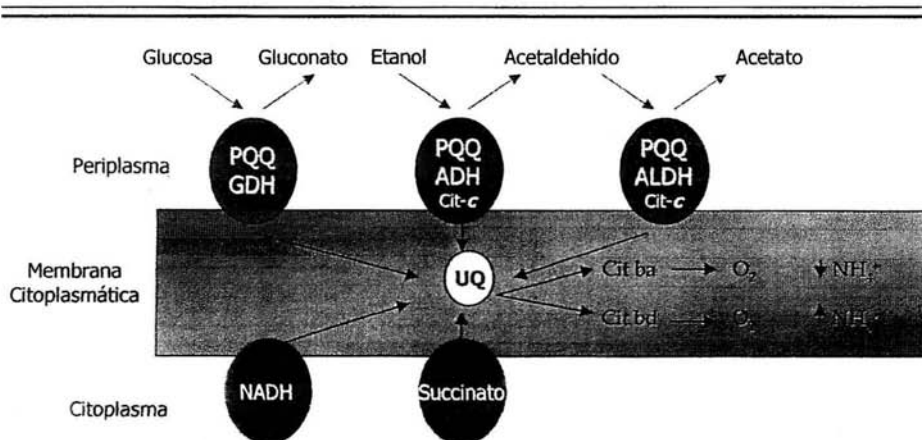


Figura 1. Modelo del sistema respiratorio en *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Flores-Encarnación et al., 1999).

Evidencias experimentales recientes indican que el sistema respiratorio de *G. diazotrophicus* participa activamente protegiendo a la nitrogenasa del daño por O₂ (Flores-Encarnación et al., 1999). Nuestro laboratorio demostró recientemente que las actividades de las PQQ-deshidrogenasas periplásmicas para glucosa, etanol y acetaldehído se elevan de manera considerable cuando la bacteria crece en cultivos bien aireados y bajo condiciones de fijación de nitrógeno y por otro lado, bajan considerablemente cuando la bacteria se encuentra creciendo en un medio con alto amonio. Estas deshidrogenasas se convierten en poderosos donadores de electrones a la ubiquinona, ayudando así a mantener los niveles de energía requeridos para la fijación de nitrógeno, mientras que las oxidasas terminales abaten la tensión de oxígeno del medio; de esta forma se previene que el oxígeno penetre en la célula causando daño a la nitrogenasa.

De la misma manera, en fechas recientes nuestro laboratorio demostró que *G. diazotrophicus* puede crecer en etanol como única fuente de carbono y no se ha evaluado, si bajo ésta condición la bacteria es capaz de fijar nitrógeno. (Domínguez, 2003).

Al poseer esta bacteria deshidrogenasas periplásmicas se favorece la protección respiratoria debido a que la oxidación de sustratos ocurre en el exterior de la bacteria. Esto implica un ahorro energético puesto que los sustratos no tienen que ser transportados al interior para su metabolismo, como ocurre en otras bacterias. Además, los productos de oxidación se acumulan en el exterior de la bacteria, así los protones liberados causan acidificación del medio sin restricción termodinámica en su acumulación como sucede con los sustratos oxidados en el lado interno de la membrana.

II. ANTECEDENTES.

Aldehídos y cetonas son importantes intermediarios en muchas rutas metabólicas, incluyendo el metabolismo de azúcares, la biosíntesis de esteroides, aminoácidos y la biosíntesis de metabolitos secundarios.

El acetaldehído es un compuesto tóxico para muchos organismos; de ahí la importancia de metabolizarlo rápidamente (Lehninger, 2000). La reactividad del grupo carbonilo del acetaldehído, lo hace un compuesto altamente reactivo, tiene la capacidad de formar radicales libres, los cuales se sabe están implicados directamente en la lipoperoxidación de las membranas biológicas; la capacidad para metabolizar aldehídos da una ventaja selectiva a los microorganismos que son expuestos a ello (Ellis, 2002).

2.1 Sistema oxidativo de alcoholes

Las bacterias ácido acéticas son aerobios obligados y son especialmente conocidas por su rápida e incompleta oxidación de azúcares, alcoholes y aldehídos; los productos correspondientes (aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos) son depositados en el medio. En dichas bacterias el etanol es oxidado a ácido acético; esta oxidación se lleva a cabo por reacciones sucesivas catalizadas por dos complejos enzimáticos; la alcohol deshidrogenasa (ADH) y acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). En 1994 Matsushita propuso un esquema general del sistema oxidativo de alcoholes en bacterias ácido-acéticas; en este modelo él propone que las enzimas antes mencionadas se les encuentra físicamente en el citoplasma, y son dependientes de NADH⁺ y/o en la membrana citoplásmica, las cuales se asocian con grupos prostéticos como son citocromo *c* y PQQ (pirrol quinolin quinona). Las enzimas que se encuentran en el periplasma tienen la capacidad de donar electrones a la ubiquinona dentro de la cadena respiratoria y

son enzimas acopladas. Por lo anterior, es muy complicado hablar de una y evitar a la otra, pues el producto de una es el sustrato de la otra; las reacciones que llevan a cabo son las siguientes:

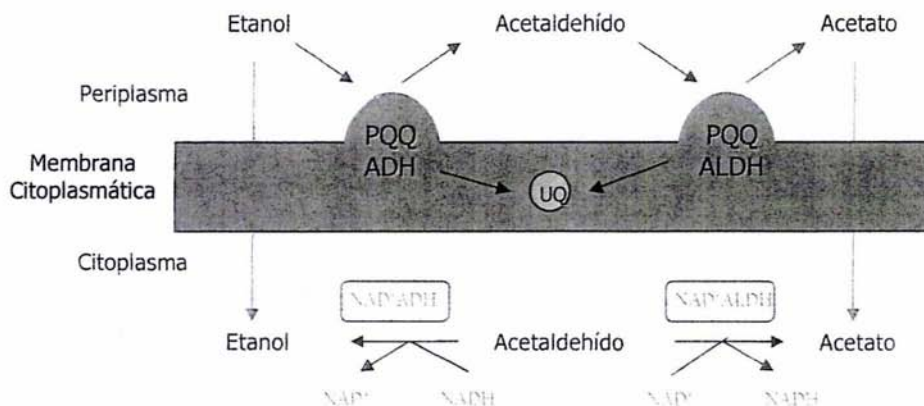


Figura 2. Esquema del sistema oxidativo de alcoholes en bacterias ácido-acéticas (Matsushita et al., 1994).

2.2 PQQ (Pirrol quinolin quinona).

El PQQ es una *orto*-quinona en las posiciones C4 y C5 del anillo de la quinolina. El carbonilo C5 en la forma oxidada es muy reactiva al ataque de nucleófilos como alcoholes, aminas, cianuro y aminoácidos; y esta reactividad debe de ser considerada cuando se quiere deducir el mecanismo de reacción de la enzima. Una característica importante del PQQ, la cual ha sido apreciada mas recientemente es la habilidad de formar complejos con Ca^{2+} o Mg^{2+} en solución. Esto fue presentado por vez primera por **Mutzel y Gorish** en 1991 y explicado por **Itoh et al.**, (1997) en su modelo químico sistemático del complejo Ca^{2+} -PQQ que es capaz de catalizar la oxidación de alcoholes y aldehídos en solventes orgánicos.

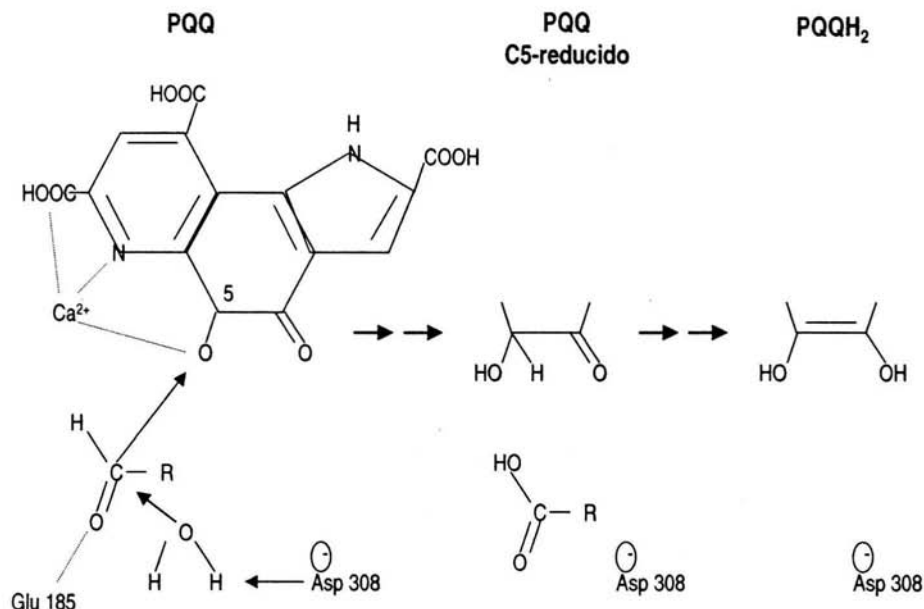


Figura 3. Mecanismo de reacción propuesto para la conversión de acetaldehído por las quinoproteínas por medio del C5 del PQQ (Oubrie et al., 2002).

Todas las deshidrogenasas dependientes de PQQ tienen la función de ser donadores de electrones para la cadena respiratoria. La razón de la localización periplásmica de las quinoproteínas es incierta. Se ha mencionado que puede ser porque las enzimas activas deben ser ensambladas en el exterior de la célula debido a la incorporación del grupo PQQ ó porque el plegamiento adecuado de la proteína no debe de ocurrir en un medio ambiente con un potencial rédox (E°) bajo. Como se ha mencionado, las quinoproteínas deben de estar acopladas al sistema de transporte de electrones, y por lo tanto la producción de ATP. Este sistema debe de estar organizado de manera tal que produzca una fuerza protón-motriz a través de la membrana interna citoplásmica y con ello manejar la síntesis de ATP por la ATP sintetasa (Poole, 1998). Muchas de las bacterias pueden sintetizar su propio PQQ y excretarlo al medio bajo cierta condiciones (Ameyana et al., 1988; Van Kleef y Duine, 1989). Esto puede ser importante en comunidades microbianas, en su medio ambiente natural porque se ha visto que en ciertas circunstancias el PQQ puede estimular el crecimiento bacteriano.

2.3 Aldehído deshidrogenasa.

Las aldehídos deshidrogenasas se encuentran ampliamente distribuidas en toda la escala biológica, predominando en el grupo de las bacterias; se clasifica de acuerdo al lugar donde lleva a cabo su función dentro de la célula; puede encontrarse en el citoplasma y generalmente es dependiente de NAD; podemos encontrarla en las membranas, ya sea en la membrana mitocondrial en eucariontes o en la membrana citoplásmica de bacterias (Nicolás et al., 2001). En estas últimas se ha visto que tienen asociado citocromo de tipo *c* y en algunos casos presentan un PQQ como grupo prostético (Deppenmeier et al., 2002).

Las quinoproteínas aldehídos deshidrogenasas membranales de bacterias que se han purificado hasta la fecha nos muestran un panorama interesante; por un lado, no se conoce suficiente sobre sus propiedades y por otro lado existe ambigüedad en los resultados por la dificultad en su purificación (Poole, 1998). Se han purificado y caracterizado (ALDH membranar) en diferentes especies del género como en *Gluconobacter suboxydans*, *A. aceti*, *A. europaeus*, *A. polyoxogenes* y *A. rancens* encontrándose que presentan una masa molecular aproximada de 150 KDa (*A. aceti*, *A. europaeus* y *G. suboxydans*) y 94 KDa en *A. polyoxogenes*. Estas enzimas están constituidas de dos o tres subunidades, algunas contienen citocromo de tipo *c* y PQQ como grupos prostéticos; cabe mencionar que la enzima de *A. polyoxogenes* es menos común ya que se reportó que carece de citocromo-*c* y su peso molecular es pequeño con respecto a las demás.

A continuación se muestra una tabla comparativa de diferentes ALDH_s purificadas de bacterias acéticas:

Tipos de ALDH

Bacteria	Masa Molécul ar	Subunidades	Componentes
<i>G. suboxydans</i>	140 kDa	Dos	Citocromos c
<i>A. polyoxogenes</i>	94 kDa	Dos	PQQ
<i>A. europaeus</i>	142 kDa	Tres	Citocromos c Citocromos b
<i>A. rancens</i>	145 kDa	Dos	PQQ Citocromos c
<i>A. aceti</i>	150 kDa	Tres	PQQ Citocromos c

Tabla 1. Tabla comparativa de las diferentes ALDHs, membranales que se han purificado dentro de la familia Acetobacteraceae **Adachi et al.**, (1980); **Fukaya et al.** (1989); **Thurner et al.**, (1997); **Hommel y Kleber**, (1990) y **Ameyama et al.**, (1981).

Estas enzimas usualmente trabajan en ambientes ácidos, su pH óptimo es de 4 -6; oxidan aldehídos de cadena corta C2 - C5 en el periplasma, producidos por la acción de la enzima membranal alcohol deshidrogenasa (ADH). Los aldehídos libres no han sido detectados durante la oxidación del etanol a ácido acético (**Poole**, 1998).

En *A. europaeus* se han identificado los genes que dan origen a dicha enzima; se sabe que se encuentran codificados en un solo operón el cual presenta tres genes que se arreglan en tándem, por dicho motivo se dice que los tres genes se comportan como una unidad transcripcional. Los genes se llaman *aldF*, *aldG* y *aldH* (codifican para las subunidades de 49, 17 y 84 KDa respectivamente; **Thurner et al.**, 1997).

Estas enzimas han sido purificadas a homogeneidad a través de las técnicas convencionales de cromatografía en columna (intercambio iónico y exclusión molecular). En *G. suboxydans*, *A. aceti*, y *A. polyoxogenes* se ha visto que la enzima se inactiva conforme se va purificando, por lo que se ha catalogado como una enzima muy inestable **Adachi et al.**, (1980), **Hommel y Kléber**, (1990) y **Ameyama et al.**, (1981).

Por otro lado, se conoce que todas las deshidrogenasas periplásmicas son capaces de reaccionar con colorantes artificiales como aceptores de electrones; de los cuales destacan fenacina metasulfato (PMS), diclorofenol indolfenol (DCPIP), ferricianuro de potasio ($\text{Fe}(\text{CN})_6$) y tetrametilparafenilendiamina (TMPD). Se ha postulado que la ubiquinona (UQ_{10}) endógena es el aceptor fisiológico para las PQQ-deshidrogenasas.

2.4 PQQ-acetaldehído deshidrogenasa en *G. diazotrophicus*.

Se demostró que el sistema respiratorio de *G. diazotrophicus* presenta una ALDH periplásmica, la cual se asocia a un grupo PQQ y citocromo-*c* como grupos prostéticos. Esta presenta actividades del orden de $1633 \text{ nmoles min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ en membrana y es sobreexpresada bajo condiciones de cultivo donde la actividad diazotrófica es condición indispensable para el crecimiento (**Flores-Encarnación et al.**, 1999).

En el presente trabajo se purificó parcialmente la PQQ-acetaldehído deshidrogenasa membranal de *G. diazotrophicus* PAL5, y se evaluaron algunas de sus propiedades cinéticas y moleculares.

III. HIPÓTESIS

La oxidación de etanol hasta ácido acético produce acetaldehído como intermediario y éste es un producto tóxico que debe ser eliminado mediante su oxidación a ácido acético. La PQQ-acetaldehído deshidrogenasa es la enzima responsable de este proceso en *Gluconacetobacter diazotrophicus*. El conocimiento de las propiedades cinéticas y moleculares de esta enzima son importantes para una mejor comprensión de la fermentación aeróbica en bacterias acéticas.

IV. OBJETIVOS

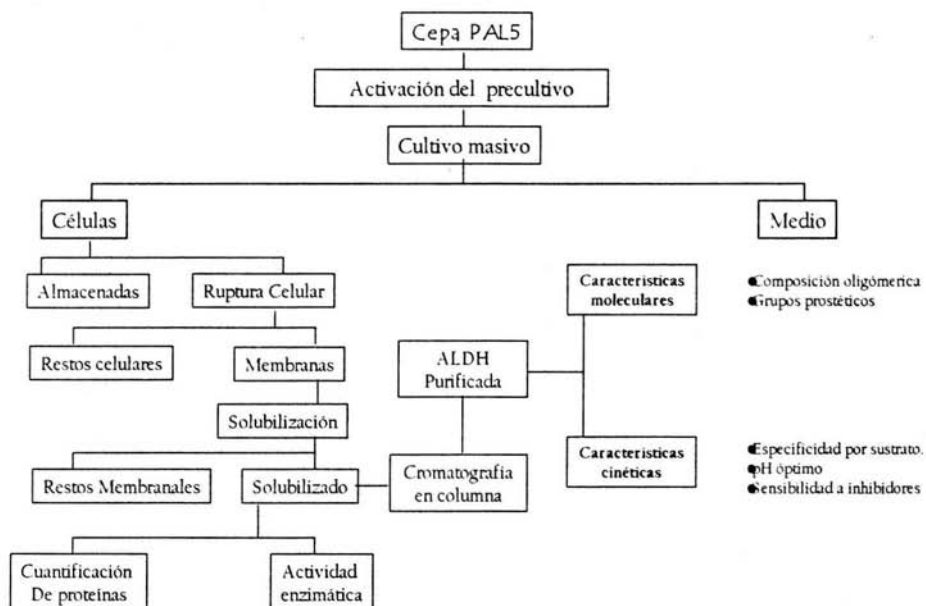
OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades moleculares y cinéticas de la PQQ-acetaldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) periplásmica de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar las condiciones del cultivo para la obtención de un rendimiento celular óptimo, bajo condiciones que proporcionen una buena expresión de PQQ-deshidrogenasas para alcohol y acetaldehído.
2. Estandarización del método de ruptura celular para la obtención de la fracción membranal.
3. Establecer las condiciones óptimas para la solubilización de la PQQ-acetaldehído deshidrogenasa.
4. Establecer un protocolo de purificación a través de cromatografía por columna: intercambio iónico.
5. Definir las propiedades cinéticas y moleculares de la enzima purificada.

V. ESTRATEGIA GENERAL.



VI. MATERIALES Y METODOS.

A. OBTENCIÓN DEL MATERIAL.

1.- Material biológico.

Gluconacetobacter diazotrophicus cepa PAL 5

2.- Mantenimiento y cultivo del organismo.

G. diazotrophicus se mantuvo en el medio LGI-P gelificado, pH 5.5, el cual contenía (g/L): 13 g de agar bacteriológico y 12 g de azul de bromotimol al 0.5 %. El pH se ajustó a 5.5. con HCl. Para cultivar a *G. diazotrophicus* se utilizaron los componentes del medio de cultivo LGI-P descrito por **Reis et al.**, 1994. El medio LGI-P se compone de: (g/L): 5 g de K_2HPO_4 , 4 g de KH_2PO_4 , 0.2 g de $MgCl_2 \cdot 7 H_2O$, 0.02 g de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0.002 g de $NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$, 0.01 g de $FeCl_3$, 5 g de citrato de sodio, 0.1321 g de $(NH_4)_2 SO_4$ y como fuente de carbono se utilizó 5 % de sacarosa (azúcar comercial). El pH del medio se ajustó a 5.5 con HCl.

3.- Cultivo masivo.

Para el cultivo masivo de *G. diazotrophicus* se utilizaron los componentes del medio de cultivo LGI-P descrito por **Reis et al.**, 1994. La preparación del cultivo inicial fue bajo condiciones aeróbicas a 30 °C en un volumen de 50 mL de medio, agitado a 250 r.p.m. El inóculo activo (1 litro) fue obtenido después de 24 horas de crecimiento en matraces Ferenbach de 2.8 litros, agitado a 250 r.p.m. que fueron utilizadas para inocular 60 litros de medio LGI-P en un fermentador de tipo Planta Piloto (Fermentador BIOFLO 5000, New Branswick Scientific), El medio de cultivo fue complementado con $(NH_4)_2SO_4$, 1mM y sacarosa al 5 %; el cultivo fue incubado por un periodo de 48 horas con agitación de 320 r.p.m. a 30 °C y

aeración de 32 litros de aire por minuto. A las 36 horas de crecimiento (fase exponencial) se le adicionó alcohol etílico suficiente para alcanzar una concentración de 0.5% con el objetivo de estimular la expresión de las enzimas del sistema oxidativo de alcoholes. Durante este periodo se tomaron muestras del medio de cultivo para determinar el crecimiento (A_{560nm}), pH y oxígeno disuelto en el medio. Las células se colectaron al final de la fase exponencial de crecimiento (36–48 horas), se lavaron tres veces a 4°C con K_2HPO_4 50 mM (pH 6.0), el cual contenía $CaCl_2$ 0.5mM y $MgCl_2$ 0.5mM (Barquera et al., 1991).

B. PREPARACIÓN DE LA FRACCIÓN MEMBRANAL.

La obtención de la fracción membranal se realizó por el método de Escamilla et al., 1987 modificada por Gómez-Manzo 2002. La ruptura celular se realizó en presencia de PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro), para evitar la degradación por proteasas endógenas y en una solución reguladora de K_2HPO_4 50mM (pH 6.0), se utilizaron perlas de vidrio (0.1-0.2 mm) en una licuadora (Bead-Beater). Se aplicaron 3 a 5 pulsos de 1 min con intervalos de 5 min en hielo frappe, para evitar el calentamiento de las células. Las perlas fueron removidas con la ayuda de un filtro poroso y una bomba de vacío. El filtrado fue centrifugado a 10,000 x g por 10 min. a 4°C con la finalidad de eliminar las células que no se rompieron. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 30,000 x g a 4 °C durante 40 min. que es la velocidad de sedimentación de la fracción membranal (pellet) éste se resuspendió y se lavó tres veces con el mismo amortiguador. Se determinó la cantidad de proteína y se midieron las actividades específicas de oxidasas y deshidrogenasas.

1.- Cuantificación de proteína.

La cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry et al., (1951) empleando albúmina bovina como patrón (BSA).

2.- Actividades de deshidrogenasas.

2.1. Método cinético (2,6-dicloro fenol indolfenol reducido: DCPIPH₂).

La determinación de la actividad de las deshidrogenasas se realizó utilizando el método cinético (Adachi, et al., 1978). Este método se basa en medir la pérdida de color del DCPIP cuando éste se reduce. Se utilizó 1 mL de una mezcla conteniendo amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, KCN 2 mM, DCPIP 0.08 mM, PMS 0.06 mM, 20 mM del sustrato (acetaldehído). La reacción se inició adicionando 30 µg de proteína y se leyó a una longitud de onda de 600 nm.

Para obtener la actividad específica se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Umol/mg/mL} = (m / 21 / \text{Proteína total})$$

$$\text{DCPIP } \epsilon_{600} = 21 \mu\text{M cm}^{-1}$$

donde:

m pendiente

ϵ_{600} = coeficiente de extinción molecular a 600 nm

C. PURIFICACIÓN.

1. Solubilización de ALDH.

Se ensayaron diferentes concentraciones de un único detergente (Tritón X-100) de 0.1-1.0% con la finalidad de encontrar la condición adecuada para solubilizar la mayor actividad de la enzima. Se determinó que la mejor concentración de Tritón X-100 para solubilizar ALDH es de 0.5% (ver resultados), por lo que la solubilización rutinaria se llevó acabo con esta concentración. Las

membranas se solubilizaron en una solución reguladora de fosfatos 10 mM pH 6, conteniendo una concentración final de proteína de 10 mg mL⁻¹; 0.5 % de Tritón X-100 y 1 mM de PMSF; el solubilizado se agitó suavemente durante dos horas y se centrifugaron a 30,000 x g durante 40 min. En el sobrenadante quedó la proteína de interés, obteniéndose una coloración rojiza. Al volumen recuperado se le midió la cantidad de proteína, así como también la actividad específica de deshidrogenasa.

2. Cromatografía.

2.1. DEAE-Toyopearl.

La enzima solubilizada se aplicó a una columna de intercambio aniónico de DEAE-Toyopearl de (3 X 25 cm), la cual fue equilibrada con un amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 6 y 0.1 % de Tritón X-100; después de aplicar la muestra, la columna se lavó con 300 mL del mismo amortiguador. El flujo fue de 0.5 mL min⁻¹. La muestra adsorbida por la columna fue removida aplicando un gradiente lineal de cloruro de sodio (NaCl) de 0.01 a 0.25 M. Se colectaron las fracciones cada 6 min., (aproximadamente 3 mL). Se determinó la absorbencia a 280 nm (proteína) y a 405 nm (hemo); así mismo se determinaron sus actividades relativas por el método cinético de DCPIP y se graficó el perfil cromatográfico. Se colectaron las fracciones que cayeron dentro del 75 % de la curva y la mezcla se concentró en un tubo de diálisis aplicado polietilenglicol 20,000 (PEG) sobre la superficie externa de la tripa. El concentrado se dializó contra 200 veces de su volumen en la misma solución reguladora, se le determinó la cantidad de proteína y actividad específica por el método espectroscópico.

2.2 QAE-Toyopearl.

La fracción activa obtenida de la columna de DEAE-Toyopearl se adsorbió en una columna de intercambio aniónico QAE-Toyopearl (3 X 25cm) equilibrada con un amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 6 conteniendo Tritón X-100 al 0.1%; después de aplicar la muestra la columna se lavó con 300 mL del mismo amortiguador. El flujo fue de 0.5 mL min⁻¹. La muestra adsorbida por la columna fue removida aplicando un gradiente lineal de cloruro de sodio (NaCl) de 0.01 a 0.25 M. Se colectaron las fracciones cada 6 min. (aproximadamente 3 mL), se determinaron sus actividades relativas por el método cinético de DCPIP, se graficó el perfil cromatográfico. Las fracciones que ubicadas dentro del 75 % de la curva se colectaron y se concentró en un tubo de diálisis aplicado polietilenglicol 20,000 (PEG) sobre la superficie externa de la tripa. El concentrado se dializó contra 200 veces de su volumen en la misma solución reguladora, se le determinó la cantidad de proteína y se midió la actividad específica por el método cinético por DCPIP.

2.3. Hidroxiapatita Ultrogel (HA-ultrogel)

La fracción dializada se adsorbió en la columna de HA-ULTROGEL, la cual fue equilibrada y lavada con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.0 que contiene Tritón X-100 al 0.1%. La muestra fue eluida aplicando un gradiente lineal de fosfatos de 0.01 a 0.10 M. Las fracciones activas fueron colectadas cada 2 min. (aproximadamente 1 mL) y concentradas con centricon 30 (Amicon) para su posterior caracterización cinética y molecular.

D. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

1.- Composición oligomérica.

1.1. *Electroforesis (PAGE SDS).*

La electroforesis desnaturalizante se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Laemli modificada (Del Arenal et al., 1997). El gel concentrador contenía acrilamida al 4.5% más bisacrilamida al 0.12% , glicerol 8%, SDS al 1%, TEMED al 0.07%, persulfato de amonio al 0.05% y Tris-HCl, 0.125M, pH 7. Las concentraciones finales de la mezcla de digestión en presencia de la muestra, fueron al 5 % SDS, 3 % de β -mercaptoetanol, 15 % de glicerol, 0.15 M de Tris HCl, pH 6.7 (azul de Bromofenol); ésta se calentó durante 3 minutos a temperatura de ebullición. Se utilizó marcador de peso molecular comercial (Mark IX Bio-Rad) El corrimiento se llevó a cabo en un amortiguador de tris, glicina y SDS al 1% ajustando el pH a 8.3. El gel se corrió a 12 mA durante aproximadamente 7 horas. Las bandas fueron reveladas con la tinción de plata de acuerdo a **Oakley et al.**, (1980).

1.2. *Zimografía de peroxidasa para hemos.*

Zimografía para citocromo *c*. Esta técnica nos ayuda a revelar la presencia de citocromo *c* por su actividad de peroxidasa como lo describe **Thomas et al.**, (1976). Después que las muestras se sometieron en SDS-PAGE (10 %); el gel fue sumergido en una solución reguladora de acetato de sodio 175 mM pH 5.0. con TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina) 0.2 mM disuelta en metanol. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad y en agitación suave; después se reveló con H_2O_2 a una concentración final de 30 mM. Las bandas con actividad peroxidasa debida a citocromo-*c* se tiñieron de un color verde, se identificaron marcándolas con un palillo y se paró la reacción adicionando una solución reguladora de acetato de sodio 175 mM, pH 5.0 conteniendo alcohol isopropílico al 30 % (7:3).

1.3. Zimografía con sustrato acetaldehído.

Esta técnica nos ayuda a detectar la actividad de la enzima *in situ* en PAGE-NATIVO. La banda positiva con actividad de ALDH forma un precipitado de color azul en presencia del NTB. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 7.5 % con Tritón X-100 al 0.1%. Después de correr las muestras, el gel se colocó en una solución que contenía acetaldehído 100 mM, 0.4 mg mL⁻¹ de NTB, 0.14 mg mL⁻¹ de PMS y buffer de McIlvaine pH 6, se incubó en la oscuridad durante 30 minutos con una agitación suave, la reacción se paró adicionando ácido acético al 7 % (Adachi, 1978).

2. Análisis espectral del contenido citocrómico.

El análisis espectrofotométrico de citocromos tipo *c* se llevó a cabo de acuerdo a la metodología establecida por Barquera et al., (1991); Wilson et al., (1978). En un espectrofotómetro Shimadzu UV240 1PCDW 2000; se usaron cubetas de cuarzo con un paso de luz de 1.0 cm. Para la obtención de espectros diferenciales de absorción reducido menos oxidado se empleó la fracción obtenida (30 µg de proteína). La proteína se suspendió en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0. Esta muestra fue reducida con el sustrato (acetaldehído) 20 mM y posteriormente con ditionita; y fue oxidada con persulfato de amonio (APS) obteniéndose el espectro diferencial (reducido menos oxidado). El espectro se corrió en un intervalo de longitud de onda de 400-700 nm.

E. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA.

1. Determinación del pH en la fracción purificada.

Se realizó una curva de pH (Adachi, 1978) la preparación parcialmente purificada, se midió la actividad de PQQ-acetaldehído deshidrogenasa (DCPIP aceptor). Esto se realizó con un amortiguador de ácido cítrico- Na_2HPO_4 (Buffer de McIlvaine) y para los valores de pH de 8 - 9 se utilizó un amortiguador constituido de Glicina - NaOH.

2. K_m por sustrato acetaldehído.

A la preparación purificada se le determinaron los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) utilizando el método espectroscópico (2,6-diclorofenol- indolfenol DCIPIP). Los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de los gráficos de regresión no lineal, editando la ecuación de Michaelis-Menten en el programa sigma plot 2000. A su vez utilizando la gráfica de Lineweaver burk se obtuvo una regresión lineal y con la ecuación se determinaron las constantes de K_m y de V_{max} .

3. Especificidad por sustrato.

A la preparación purificada se le determinó la especificidad por sustrato. Se utilizaron los siguientes sustratos a una concentración final de 20 mM acetaldehído, metanol, etanol, glicerol, benzaldehído, glutaraldehído, formaldehído, isopropanol y n-butanol.

4. Efecto de compuestos sobre la actividad de ALDH.

Se ensayaron diferentes inhibidores sobre la actividad de la preparación obtenida. La preparación purificada se incubó durante 10 minutos a 4°C con una concentración final de 1 mM de los diferentes metales como CuSO₄, HgCl₂, CaCl₂, MgCl₂; así como el agente quelante EDTA y se midió la actividad residual (Kenji Tayama et al., 1994).

VII. RESULTADOS.

A. CONDICIONES DEL CULTIVO.

Aunque *G. diazotrophicus* puede crecer en un medio conteniendo alcohol como única fuente de carbono, su crecimiento es muy pobre (Domínguez, M. A. 2003), de tal manera que esta condición no podía ser utilizada para generar la biomasa que requeríamos para la purificación. Sin embargo pensamos que la presencia de cantidades moderadas de etanol (0.5%) podría favorecer la expresión de las enzimas responsables de la oxidación de alcoholes y aldehídos. Así, se realizaron cultivos en un fermentador de tipo Mobile Pilot Plant (Fermentor BIOFLO 5000, New Brunswick Scientific). Se emplearon 60 litros de medio LGIP conteniendo sacarosa al 5 %, 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y para la inducción de las enzimas del sistema oxidativo de alcoholes (ADH y ALDH) se agregó alcohol etílico al 0.5% al cultivo en la fase exponencial (36 horas). Se determinó la turbidez del medio de cultivo ($A_{560\text{nm}}$) como indicador de crecimiento, también se midió la cantidad de oxígeno disuelto y pH del medio. Las propiedades de crecimiento se muestran en la Figura 4.

El crecimiento celular (\blacktriangle) presentó una disminución en la absorbencia después de adicionarle alcohol etílico (0.5%) a las 36 horas. El efecto del alcohol sobre el cultivo fue la formación de agregados celulares los cuales no permiten que la muestra sea homogénea para ser leída su verdadera densidad de crecimiento en el espectro ($A_{560\text{nm}}$). Por otro lado, se conoce que la utilización de la glucosa por *G. diazotrophicus* conduce a la acidificación del medio de cultivo, debido a la producción y acumulación de ácido glucónico (Cavalcante, V. A. and Döbereiner, 1988). Se ha reportado que este proceso lo realiza una glucosa deshidrogenasa ligada a la membrana (Attwood, M. M. et al. 1991). En este trabajo la acidificación fue determinada midiendo directamente el pH del medio de cultivo (\blacktriangledown). Así, el cultivo registró la mayor acidificación (pH 4.0) a las 40 horas,

lo cual corresponde con lo reportado por Flores-Encarnación, 1999. El oxígeno disuelto (▼) indicó que, después de las 12 horas de crecimiento, la concentración de O_2 disuelto en el medio cae en un 80 % como lo describe Flores-Encarnación et al., (1999) y esto es condición necesaria para que la actividad de la nitrogenasa se exprese.

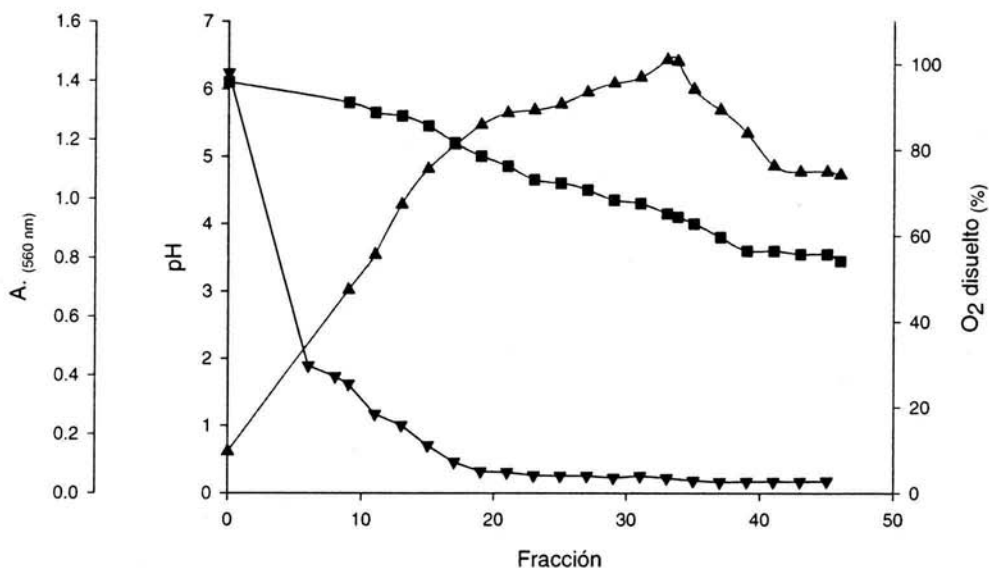


Figura 4. Curva de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGIP a las 48 horas. A las 36 horas adición de etanol al 0.5 %. (▲) D.O (560 nm). (▼) Oxígeno disuelto. (■) pH. Se observa una disminución de la densidad óptica después de las 36 horas (adición de alcohol etílico).

Cuando se obtiene la fracción membranal y se determinan las actividades de deshidrogenasa para *PQQ-ADH* y *PQQ-ALDH* se observa un aumento significativo en sus respectivas actividades causado por la adición del alcohol etílico (0.5%). A continuación se muestra la tabla comparativa.

Tabla comparativa de actividades

Sustrato	Medio LGIP (A)	Medio LGIP + 0.5 % Etanol (B)	Relación B/A
Glucosa	0.48	0.55	1.14
Acetaldehído	0.60	1.68	2.80
Etanol	0.20	0.76	3.00

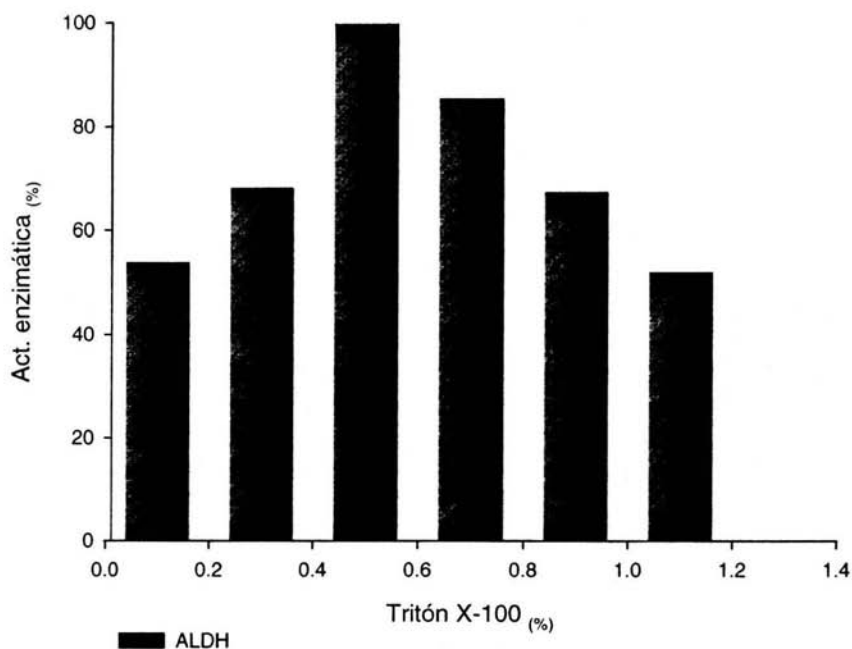
Tabla 2. Tabla comparativa de actividades de deshidrogenasa en membranas ($\mu\text{mol DCPIP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) crecidas en medio LGIP y cuando son inducidas con alcohol etílico al 0.5% (36 horas). Ensayo realizado en solución reguladora de fosfatos pH 6.0. Diclorofenol indolfenol como aceptor de electrones.

Como se esperaba, la presencia de etanol en el medio LGIP (Tabla 2) causó un incremento significativo en el nivel de expresión de las actividades de deshidrogenasas, registrándose un incremento de 3 veces para la PQQ-ADH y 2.8 veces para la PQQ-ALDH en comparación con las mismas actividades registradas en el cultivo crecido en medio LGIP simple; este resultado demuestra que *G. diazotrophicus* expresa las PQQ-deshidrogenasa de etanol y acetaldehído de manera constitutiva pues en el medio LGIP simple las dos actividades están presentes y se sobreexpresan cuando el cultivo es retado con alcohol en el medio LGIP- etanol. Cabe destacar que al sobreexpresar una enzima, en este caso ADH en respuesta al etanol, también se sobreexpresa la ALDH; esto por, como ya se mencionó, son enzimas que se encuentran acopladas en el sistema oxidativo de alcoholes (producto de ADH es el sustrato de ALDH). Este fenómeno se ha reportado para la enzima ADH en una bacteria del mismo género. *Acetobacter pasteurianus*; aumenta 10 veces la actividad de ADH cuando se le adiciona etanol (1 %) como inductor en el medio de cultivo (Takemura et al., 1993). Es importante destacar que la adición de etanol al medio no modificó significativamente los niveles de expresión de la glucosa deshidrogenasa (GDH).

B. PURIFICACIÓN.

1. Solubilización de ALDH.

Con el objetivo de purificar la enzima ALDH se obtuvo la fracción membranal para establecer un protocolo de solubilización para la PQQ-ALDH; esto se realizó ensayando diferentes concentraciones (0.1 a 1.0 %) del detergente Tritón X-100 (Fig. 5). En esta gráfica se observa que la concentración de 0.5% de detergente Tritón X-100 fue la óptima para solubilizar a la PQQ-ALDH y casualmente, a esta misma concentración, también se obtiene la mejor solubilización de la PQQ-ADH.



Figurar 5. Patrón de Solubilización de ALDH de membranas de *G. diazotrophicus* a diferentes concentraciones de Tritón X-100. (Barras) Actividad relativa de ALDH (%). Ensayo realizado en solución reguladora de fosfatos pH 6.0. Diclórofenol indolifenol (DCPIP) como aceptor de electrones. 100 % = 1.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

Resulta interesante observar que ambas enzimas cosolubilizan a la misma concentración de detergente y que la concentración requerida (0.5%) de Tritón X-100 es suficientemente baja para pensar que se trata de proteínas laxamente unidas a la membrana, seguramente periféricas. Por otro lado, si se comparara la cantidad de detergente Tritón X-100 necesaria para solubilizar a la enzima *PQQ-ALDH* en *G. diazotrophicus* (0.5 %) con lo reportado para esta misma enzima en otros *Acetobacteraceae* (1 a 1.5 %); resulta que nuestra enzima podría estar mas laxamente unida a la membrana pues su solubilización requiere concentraciones de detergente que son 2 veces menores.

2. Cromatografía en Columna.

Para purificar a la *PQQ-ALDH* se utilizaron columnas de intercambio iónico como: DEAE-Toyopearl, QAE-Toyopearl y una columna de Hidroxiapatita Ultrogel. Toda la purificación se llevó a cabo en una solución reguladora de fosfatos 0.01 M pH 6.0, con Tritón X-100 al 0.1%, a 4°C.

2.1. Columna DEAE–Toyopearl

El solubilizado obtenido con 0.5 % de Tritón X-100 se aplicó a la columna de intercambio aniónico DEAE-Toyopearl, la cual fue lavada con dos veces el volumen de cama de la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0. La enzima fue eluída aplicando un gradiente lineal de 0.01 a 0.25 M de NaCl. Se colectaron las fracciones cada 6 min, (aproximadamente 3 mL) y se midieron actividades de deshidrogenasa con DCPIP como aceptor de electrones. El patrón cromatográfico se siguió a 280 (▲) y 405 (●●) nm.

Como se aprecia en la **Figura 6**, que corresponde al perfil cromatográfico de la columna de DEAE-Toyopearl, se observaron dos diferentes frentes de elución para la proteína; el primer pico, se obtiene aproximadamente con una molaridad de 45 mM; en éste pico observamos que las mismas fracciones que oxidan acetaldehído, también oxidan etanol, con una mayor eficiencia. Sin embargo, la mayor actividad para *PQQ*-ALDH se encontró en el segundo pico que se obtiene con una molaridad (-◆-) de 85 mM y en donde no se registró actividad de *PQQ*-ADH en las mismas fracciones. De este modo pudimos diferenciar a la *PQQ*-ADH, eluída en el primer pico y con actividad tanto sobre alcoholes como sobre aldehídos. La verdadera *PQQ*-ALDH apareció con el segundo pico y solo mostró actividad sobre aldehídos, ambas enzimas presentan señal de hemoproteínas a 405 nm.

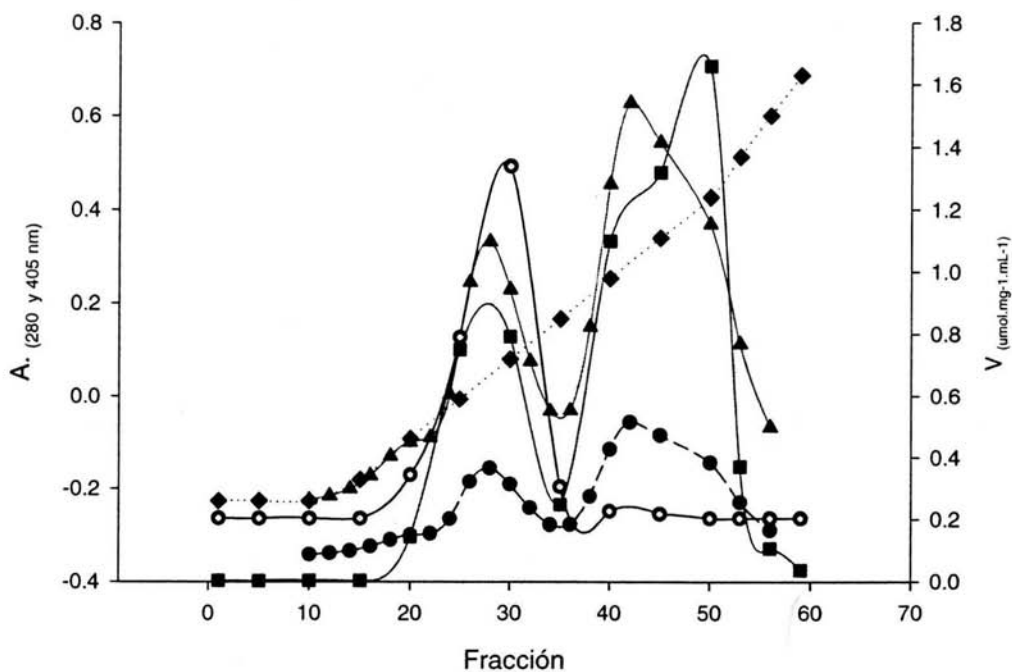


Figura 6. Perfil cromatográfico de la columna DEAE-Toyopearl. (○) Actividad enzimática relativa de ADH; (■) Actividad enzimática relativa de ALDH. (-◆-) Conductividad. (▲) Proteína (280 nm). (-●-) Hemo (405 nm). Utilizando diclorofenol-indolifenol (DCPIP) como aceptor artificial de electrones.

Este fenómeno sugiere que PQQ-ADH y PQQ-ALDH son isoenzimas con respecto a su capacidad para oxidar aldehídos y esto ocurre en otra especie de bacteria ácido-acética: *Acetobacter polyoxogenes*, **Fukaya et al.**, (1989) en donde se encontró el mismo comportamiento.

Se tiene evidencia de la existencia de hemoproteínas como etanol deshidrogenasa que tienen la capacidad de oxidar aldehídos. Sin embargo, esto sólo sucede para la enzima soluble. (**Duine**, **J. A.** 1987). Cabe destacar que para la enzima PQQ-ALDH de los *Acetobacter* no existen evidencias que indiquen la presencia de isoformas, por lo que planteamos que en *G. diazotrophicus* existe la enzima PQQ-ADH que tiene la capacidad para oxidar ambos sustratos y además presenta la enzima PQQ-ALDH.

2.2. Columna QAE – Toyopearl.

La fracción activa de PQQ-ALDH, libre de la enzima PQQ-ADH, se adsorbió a la columna de intercambio iónico QAE-Toyopearl, la cual fue equilibrada y lavada con dos volúmenes (de cama) de la misma solución amortiguadora de fosfatos. La enzima fue removida aplicando un gradiente lineal de cloruro de sodio (NaCl) de 0.01 a 0.25 M. Se colectaron las fracciones cada 6 min, (aproximadamente 3 mL) y se midieron sus actividades, dando el perfil cromatográfico como se muestra en la **Figura 7**.

A diferencia de la columna de DEAE-Toyopearl, en ésta columna (**Fig. 7**) solamente se aprecia un pico de actividad y éste, no oxida etanol como sustrato. La enzima ALDH se eluyó a una concentración de NaCl de 70 mM, obteniendo una actividad específica de $19.5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 2.8 veces más con respecto a la columna anterior.

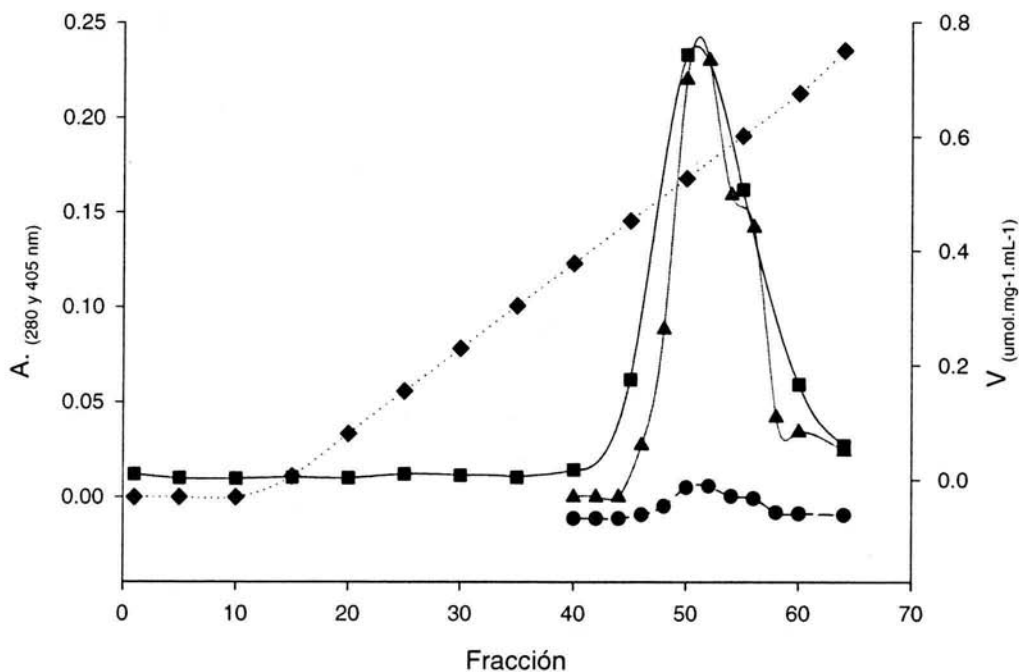


Figura 7. Perfil cromatográfico de la columna QAE-Toyopearl. (■) Actividad enzimática relativa de ALDH. (-◆-) Conductividad. (▲) Proteína (280 nm). (-●-) Hemo (405 nm). Utilizando diclorofenol-indolifenol (DCPIP) como aceptor artificial de electrones.

2.3. Columna Hidroxiapatita.

Por último se decidió pasar la fracción obtenida de la columna QAE-Toyopearl por la columna Hidroxiapatita (HA-ULTROGEL) que se sabe tiene propiedades de hidrofobicidad y de intercambio iónico. La enzima se adsorbió a dicha columna y se eluyó con un gradiente lineal de amortiguador de fosfatos de 0.01 a 0.1M; obteniendo el perfil cromatográfico que se muestra a continuación.

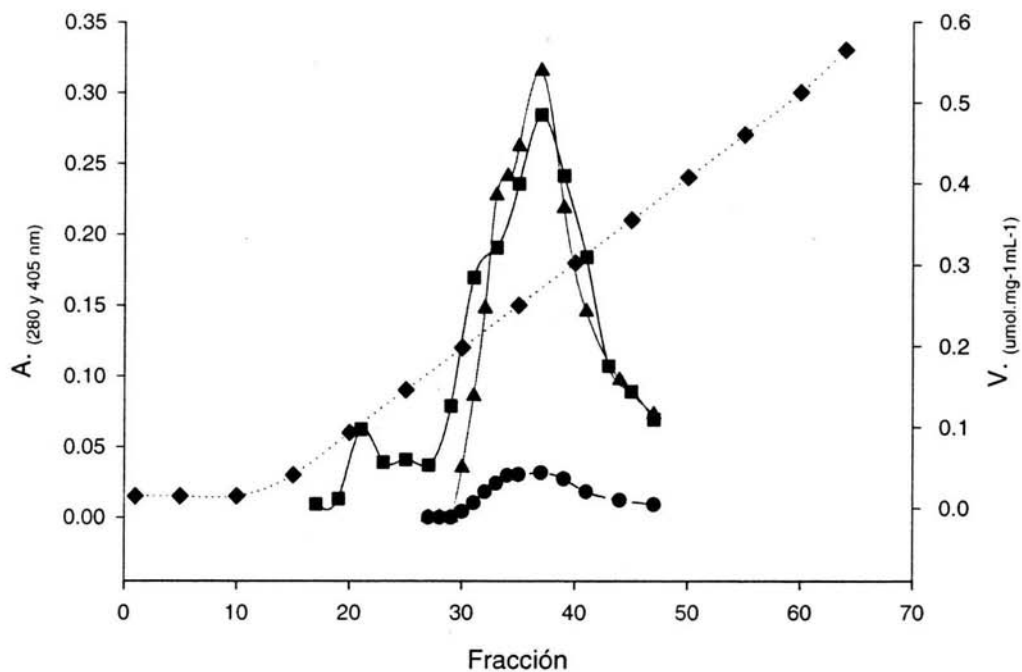


Figura 8. Perfil cromatográfico de la columna HA-ULTROGEL. (■) Actividad enzimática relativa (%) de ALDH. (◆) Conductividad. (▲) Proteína (280 nm). (●) Hemo (405 nm). Utilizando diclorofenol-indolifenol (DCPIP) como aceptor artificial de electrones.

De acuerdo al perfil cromatográfico obtenido en la columna HA-ULTROGEL (Fig. 8), la enzima ALDH se eluyó a una concentración de 0.04 M de fosfato. Este último paso de purificación no fue satisfactorio debido a que como se puede apreciar en la tabla 3, la actividad específica recuperada cae 6.5 veces. La razón de esta inactivación se desconoce.

Tabla de purificación.

Columna	Proteína Total (mg)	Act. Especifica ($\mu\text{M DCP.P. Min}^{-1} \cdot \text{Mg}^{-1}$)	Act. Total ($\mu\text{M DCP.P. Min}^{-1}$)	Rcuperado (%)
Membrana	2608.0	1.8	4642.2	100.0
Solubilizado	440.0	4.7	2068.0	44.5
DEAE-Toyopearl	129.6	6.8	881.3	19.0
QAE-Toyopearl	36.4	19.5	697.0	15.0
HA-Ultrogel	5.4	3.0	16.2	0.3

Tabla 3. Tabla de purificación obtenida en el proceso de purificación de ALDH de *G. diazotrophicus* PAL5.

Existen antecedentes que reconocen poca estabilidad durante la purificación y posterior almacenamiento. **Hommel et al.**, (1990), purificando la misma enzima de la bacteria *Acetobacter polyoxogenes* con las columnas DEAE-Sepharosa e Hidroxiapatita, obtuvo un rendimiento bajo; esto se atribuyó a que la actividad de la enzima purificada disminuyó en un 50% en 4 días incluso en presencia de tritón X-100 y de agentes estabilizadores como benzaldehído; y por ésta razón, la purificación fue acompañada de un bajo rendimiento. La razón para la inestabilidad de la enzima se desconoce y no proponen un mecanismo.

A pesar que HA-ultrogel no es un paso agresivo en la purificación de proteínas membranales, y no existe evidencia que demuestre su agresividad al purificar esta enzima, nosotros notamos una pérdida dramática en la purificación de la PQQ-ALDH y no podemos decir cuál fue la causa. Este mismo efecto se repitió en dos ocasiones. Posiblemente la pérdida de actividad se deba a la existencia de un componente de la propia enzima PQQ-ALDH que queda unido fuertemente a la resina y que dicho componente es crucial en la actividad.

Debido a la inactivación drástica que sufrió la enzima durante el último paso de purificación en HA-ultrogel no logramos reunir suficiente enzima para realizar su caracterización cinética y molecular, de tal manera que decidimos utilizar, para este fin, la fracción parcialmente purificada obtenida de QAE-TOYOPEARL que corresponde a un paso anterior de purificación y dicha fracción presentó una actividad alta ($19.5 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

C. CARACTERIZACIÓN OLIGOMERICA.

1.- Composición oligomérica.

Con la finalidad de caracterizar bioquímica y molecularmente (grupo prostético y composición oligomérica) la preparación obtenida fue sometida a PAGE NATIVO y PAGE-SDS.

2. Zimografía para el sustrato acetaldehído.

Queríamos conocer el grado de pureza de la fracción obtenida y esto nos lo revelaría un PAGE NATIVO y la zimografía para *PQQ-ALDH* en el mismo gel. Esta técnica nos permitió detectar la actividad de acetaldehído de la enzima *in situ* en PAGE-NATIVO. La banda positiva con actividad de *PQQ-ALDH* forma un precipitado de color azul en presencia del NTB. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 7.5 % y Tritón X-100 al 0.1%. Después de correr las muestras, el gel se colocó en una solución que contenía acetaldehído 100 mM, 0.4 mg / mL de NTB, 0.14 mg / mL de PMS y buffer de McIlvaine pH 6.0, se incubó en oscuridad durante 30 minutos con una agitación suave, se paró la reacción adicionando ácido acético al 7 % (Adachi, 1978).

Las muestras cargadas en el gel fueron: el solubilizado (material de partida) y la proteína obtenida de la última columna QAE- Toyopearl; como se observa en la **Figura 9**.

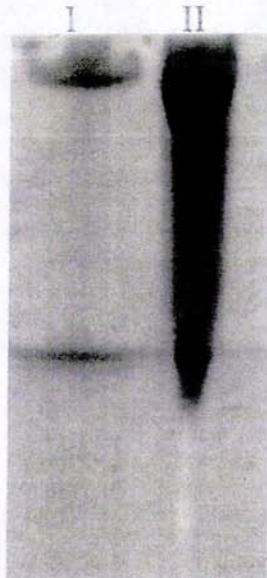


Figura 9. NATIVE-PAGE 7.5 %. Carril I: QAE-Toyopearl; Carril II: Solubilizado (Gel incubado con acetaldehído 100mM).

Como se observa en la **Figura 9**, las bandas que dieron positivo sobre acetaldehído tanto en el solubilizado como en la columna de QAE - Toyopearl son las mismas, con lo cual se comprueba que la fracción purificada tiene la capacidad de oxidar el acetaldehído. Se aprecia también dos bandas en cada carril, una de ellas; la banda superior debido a su aparente gran tamaño parecería ser un agregado activo de la *PQQ-ALDH* que se forma en las condiciones empleadas (Tritón X-100) para correr el gel nativo; sin embargo en la parte inferior se observa otra banda que corrió a través del gel y que tiene la capacidad de oxidar acetaldehído. por falta de una curva de calibración para Mr. desconocemos la masa molecular de dicha preparación. Sin embargo, al comparar la preparación de la *PQQ-ALDH* con la preparación purificada de la *PQQ-ADH* (**Fig. 10**) observamos que tanto la *PQQ-ALDH* como la *PQQ-ADH* corren a la misma distancia. Esto es debido a que ambas tienen masas moleculares similares, las cuales fueron determinadas en condiciones desnaturalizantes para ambas

enzimas. Así como también se ha comprobado por espectrofotometría de masas que la PQQ-ADH presenta una masa molecular relativa de 120 kDa. Dada la movilidad de dichas enzimas en ésta figura podemos inferir que su masa molecular de la PQQ-ALDH es muy semejante a la PQQ-ADH.



Figura 10. NATIVE-PAGE 7.5 %. Carril I: QAE-Toyopearl (PQQ-ALDH); Carril II: Sephacryl 200 (PQQ-ADH). (Gel incubado con acetaldehído 100mM).

3. Electroforesis (PAGE SDS).

Dado que en el gel nativo se aprecia una banda positiva para el sustrato acetaldehído, decidimos saber como era su composición oligomérica y para esto realizamos una electroforesis SDS-PAGE al 10 % (Del Arenal et al., 1997). Las muestras cargadas en el gel fueron: Carril I: Marcadores de referencia (Mark 9); Carril II: QAE Toyopearl y Carril III: Solubilizado. El gel fue teñido aplicando la técnica de tinción de plata dando el patrón de bandeos, que se observa en la **Figura 11**.

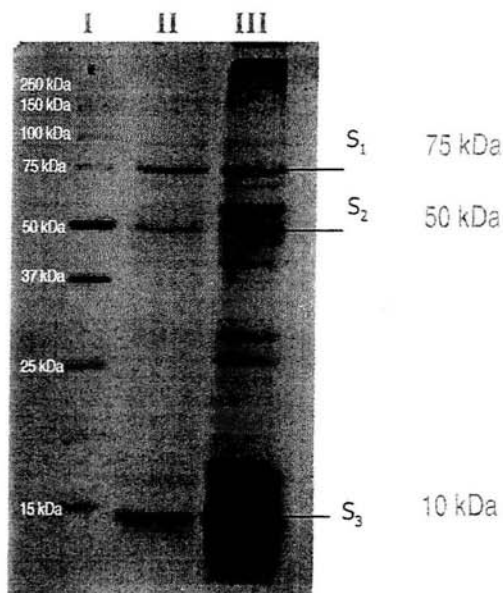


Figura 11. Gel SDS-PAGE 10 %. Carril I: Marcadores; Carril II: QAE-Toyopearl y Carril III: Solubilizado. Tinción de plata.

La imagen que se muestra en la **Figura 11** indica la presencia de 3 bandas enriquecidas en la fracción obtenida de QAE-Toyopearl (carril II) en comparación con la fracción inicial del solubilizado membranal con Tritón al 0.5% (carril III). Las masas moleculares calculadas para las tres bandas fueron: 75 kDa (S₁), 50 kDa (S₂) y 10 kDa (S₃), respectivamente. La intensidad de la banda de masa molecular menor (10 kDa) fue mayor con respecto a las otras dos, este hecho hizo pensar que posiblemente esta banda no pertenecía a la proteína y era una contaminante; de hecho, debido a su menor masa molecular era de esperarse que, en la misma proporción estequiométrica con las bandas mayores, se tiñera menos.

Su identificación como un posible contaminante se determinó por la cuantificación realizada por análisis de densitometría usando el programa BIORAD. A continuación se muestra la tabla.

Densitometría

Banda	Intensidad de banda (%)
S1	17.49
S2	16.18
S3	44.52

Tabla 4. Tabla de intensidades de las bandas de la enzima PQQ-ALDH de la columna QAE-Toyopearl.

De acuerdo a la **Tabla 4** la subunidad 3 que corresponde a 10 kDa se encuentra en bastante mayor proporción que las dos subunidades mayores pues no hay que olvidar que debido a su bajo peso molecular esta banda debe teñirse poco y por la tanto, la cifra obtenida (44.52)% por densitometría nos revela una concentración de proteína que todavía es mayor que la detectada por densitometría. Así, pensamos que la banda pequeña de Mr= 10 KDa copurifica con nuestra enzima pero no es parte del oligómero de la *PQQ-ALDH* o bien, existe una tercera banda para la *PQQ-ALDH* la cual se tiñe anormalmente. Desde luego nuestras dos posibles alternativas deberán ser validadas o rechazadas por el análisis del oligómero purificado a homogeneidad. Tentativamente proponemos que el oligómero de la *PQQ-ALDH* está constituido por dos subunidades con *Mrs* de 75 y 50 kDa, respectivamente.

Tabla Comparativa de ALDH₅

Subunidad	<i>A. europaeus</i>	<i>A. polyoxogenes</i>	<i>A. suboxydans</i>	<i>G. diazotrophicus</i>
I	84.0	72.0	83.0	75.0
II	49.0	44.0	55.0	50.0
III	17.0	—	—	—
Masa Molecular (Oligomero)	150.0	116.0	141.0	125.0

Tabla 5. Tabla comparativa de las diferentes ALDHs purificadas en el genero *Acetobacter* (kDa).

Como se observa en la anterior tabla comparativa (**Tabla 5**) de las masas moleculares del genero *Acetobacter* de las diferentes ALDHs purificadas, tentativamente *G. diazotrophicus* presenta mayor semejanza a la ALDH purificada de *A. polyoxogenes* (**Fukaya et al., 1989**).

Otro punto importante cuando se caracteriza una proteína es conocer los grupos con los que se asocia la proteína de interés. Como se mencionó en los antecedentes la mayoría de las enzimas periplásmicas contienen diferentes grupos asociadas a ella. En *G. diazotrophicus* se ha reportado que presenta dos grupos prostéticos; un grupo PQQ y un citocromo *c*.

Existen diferentes técnicas para detectar la presencia de citocromo-*c*; en este trabajo se utilizaron dos técnicas principalmente. A continuación se detallan en el punto tres (zimografía de hemo) y cuatro (análisis espectral del contenido citocrómico).

4. Zimografía de peroxidasa para hemo.

Zimografía para citocromo *c*. Esta técnica utiliza la actividad peroxidáxica inherente a los grupos hemo y en el caso específico de PAGE-SDS nos revela la presencia de hemos asociados covalente a proteínas, por tanto, de citocromos tipo-*c*. Después del corrimiento el gel PAGE - SDS al 10 % fue sumergido en una solución reguladora de acetato de sodio 175 mM pH 5.0 con TMB (3,3", 5,5"- tetrametilbencidina) 0.2 mM disuelto en metanol. La mezcla se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se reveló con H₂O₂ a una concentración final de 30 mM (Thomas et al., 1976). Las bandas positivas deben de precipitar en un color verde; en este caso, la única banda positiva fue el control (Citocromo *c* de caballo). No se detectó citocromo *c* en la enzima purificada por esta técnica, posiblemente debido a la baja cantidad de proteína que se cargo en el gel (datos no mostrados). El experimento no fue repetido y habrá que hacerlo a partir de la enzima purificada a homogeneidad.

5. Análisis espectral del contenido citocrómico.

Como no se observó alguna banda positiva en la zimografía para hemo, se decidió determinar el citocromo-*c* por espectroscopia de luz visible que es una técnica muy sensible y confiable para la identificación y cuantificación de citocromos. El análisis espectrofotométrico de citocromos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología establecida por Barquera et al., (1991); Wilson et al., (1978). En un espectrofotómetro Shimadzu UV240 1PCDW 2000; se usaron cubetas de cuarzo con un paso de luz de 1 cm. Para la obtención de espectros diferenciales de absorción reducido menos oxidado se empleó la fracción obtenida de la columna QAE-Toyopearl (30 µg de proteína). La fracción obtenida se suspendió en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0. La muestra fue reducida con el sustrato (acetaldehído) 20 mM y posteriormente con ditionita; y fue oxidada con persulfato de amonio obteniendo con esto el espectro diferencial. El espectro se corrió entre 400 y 700 nm como se observa en la siguiente figura.

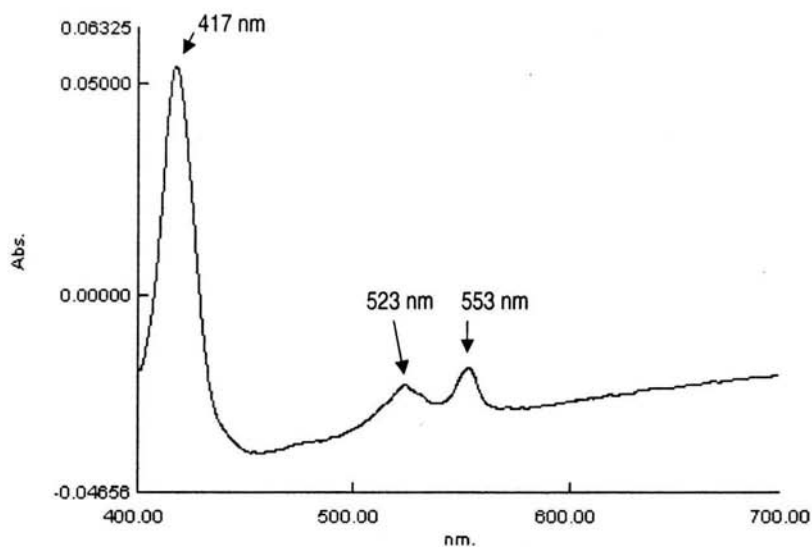


Figura 12. Espectro diferencial de PQQ-ALDH de *A. diazotrophicus*. La enzima fue oxidado con persulfato de amonio (APS) y reducido con el sustrato acetaldehído 20 mM a temperatura ambiente.

El espectro que obtuvimos presenta las señales características de citocromo-*c*, donde se observan tres picos (553, 523 y 417) que corresponden a las zonas α , β y solet, respectivamente. El citocromo-*c* se encuentra distribuido dentro del género *Acetobacter*, ha sido reportado en las ALDHs purificadas de *A. europaeus*, *A. suboxydans*, *A. aceti* y *A. rancens*. Se ha encontrado que *A. polyoxogenes* sp. carece de citocromos *c*; sin embargo, presenta un grupo prostético PQQ como centro de Oxido – Reducción.

D. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA.

1. pH óptimo

A la preparación purificada se le determinó el pH óptimo de \square lectrone sobre acetaldehído. La \square lectronesión se hizo para un intervalo de pH de 2.6 a 7.6, utilizando el amortiguador de McIlvaine. Y para el rango de pH 8 a 9 se utilizó el amortiguador de \square lectro – Hidróxido de sodio.

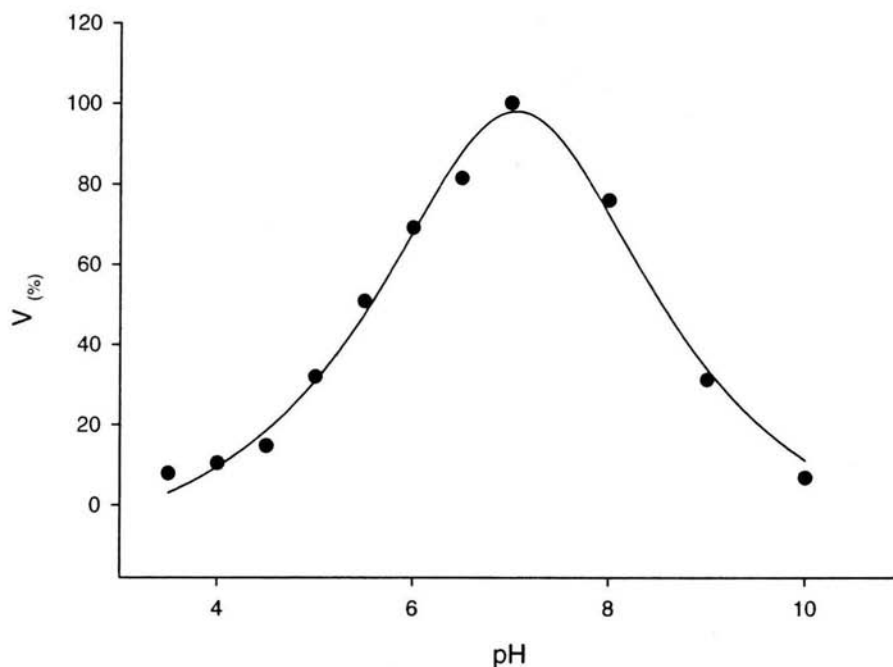


Figura 13. Perfil de pH óptimo de la fracción purificada. (●) \square lectrone enzimática específica de la fracción purificada utilizando acetaldehído 20 mM.

Como se puede apreciar en la **Figura 13** se obtuvo un pH óptimo de 7.0 para la *PQQ-ALDH* de la fracción obtenida de QAE Toyopearl, utilizando acetaldehído. El ensayo fue medido utilizando DCPIP como aceptor de \square lectrones.

Dicho resultado concuerda con lo reportado para *A. polyoxogenes*. Sin embargo, en otros *Acetobacteraceae* el pH óptimo de la ALDH es diferente: a pH 4.0 para *G. suboxydans*, pH 5 para *A. aceti* y a un pH de 5.7 para *A. rancens*.

2. Especificidad por sustrato aldehído.

A la preparación purificada se le determinó el espectro de actividad sobre diversos alcoholes y aldehídos, utilizando: metanol, etanol, isopropanol, butanol, glicerol, acetona, acetaldehído, formaldehído, glutaraldehído y benzaldehído. El ensayo se llevó a cabo en un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6; se utilizó DCPIP como aceptor de electrones y 20 mM de cada uno de los sustratos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Especificidad por sustrato (%)

Substrato	Actividad enzimática (%)
Metanol	0
Etanol	0
Iso propanol	0
N- butanol	0
Glicerol	0
Formaldehído	25
Acetaldehído	100
Glutaraldehído	45
Benzaldehído	5

Tabla 6. Se determinó la especificidad por sustratos a la preparación obtenida con una actividad específica de 19.25 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. El ensayo fue realizado en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6 en presencia de DCPIP como aceptor de electrones.

En la **Tabla 6** se muestra que la preparación obtenida no oxida alcoholes de cadena sencilla y seguramente tampoco, alcoholes ramificados. Dentro de los aldehídos ensayados él que prefiere, después de acetaldehído, es el glutaraldehído con una actividad del 45%, seguida de formaldehído 25%; hay que destacar que dentro de las ALDH_s purificadas para *G. suboxydans* (**Adachi et al., 1980**), *A. polyoxogenes* (**Fukaya et al., 1989**) y *A. aceti* (**Ameyama et al., 1981**) ninguna presenta actividad sobre formaldehído.

3. K_m por sustrato acetaldehído.

A la preparación purificada se le determinó su constante de afinidad K_m . Se midió la actividad a concentraciones crecientes de acetaldehído como sustrato, se graficaron los resultados y se realizó el ajuste con el modelo de Michaelis Menten. La cinética para el sustrato acetaldehído muestra un comportamiento hiperbólico típico de saturación como se observa en la **Figura 14**.

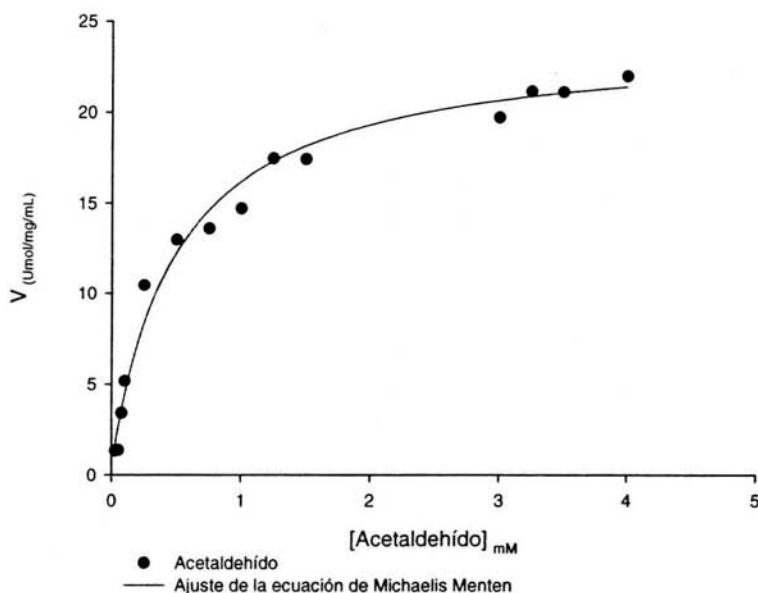


Figura 14. Gráfica de Michaelis Menten utilizando acetaldehído como sustrato a diferentes concentraciones.

Los datos se linealizaron a través de los inversos y fueron graficados por el método Lineweaver-Burk con un ajuste del 0.97% para obtener así los parámetros de la constante aparente de Michaelis Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) como se aprecia en la **Figura 15**.

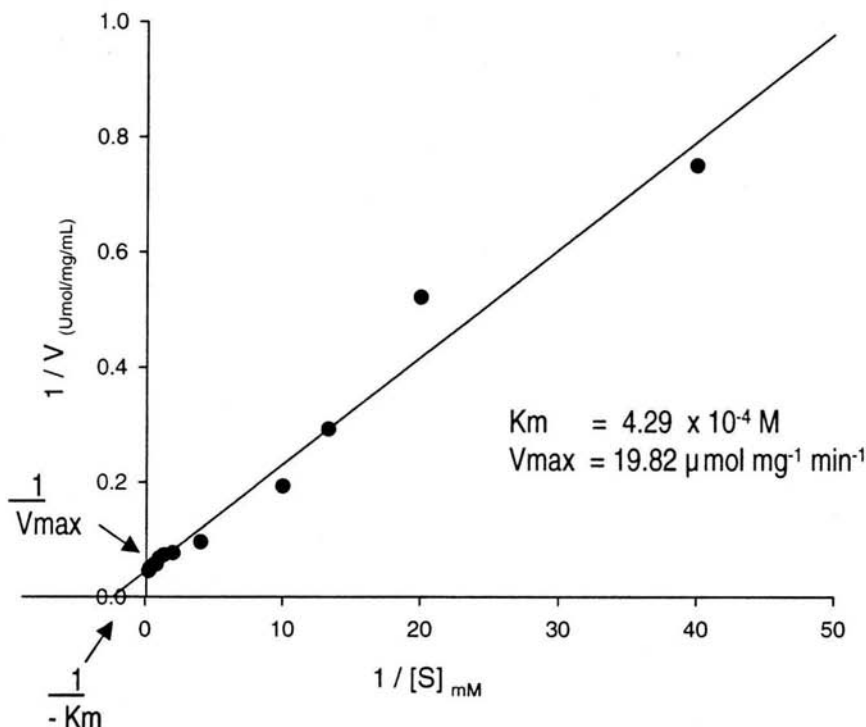


Figura 15. Gráfica de Lineweaver plot, usando acetaldehído como sustrato a diferentes concentraciones.

La K_m de la enzima purificada fue de $4.29 \times 10^{-4} \text{ M}$ y una V_{max} de $19.82 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; lo cual nos indica que la enzima purificada en *G. diazotrophicus* es muy afín en la oxidación de este sustrato (acetaldehído), ya que la K_m obtenida es menor en un orden de magnitud comparada con las obtenidas en *A. aceti* (Ameyana et al., 1982), *A. suboxydans* (Adachi et al., 1980), *A. polyoxogenes* (Fukaya et al., 1989) y *A. europaeus* (Thurner et al., 1997) en orden de 1.2 a $3.3 \times 10^{-3} \text{ M}$.

4. Efecto de compuestos sobre la actividad de ALDH.

Se ensayó el efecto de diferentes iones sobre la actividad de la fracción purificada. La preparación fue incubada durante 10 minutos a 4°C con una concentración final de 1 mM de los diferentes metales. La actividad fue medida en el espectrofotómetro utilizando DCPIP como aceptor artificial de electrones y acetaldehído (20 mM) como donador de electrones.

Efecto de metales

Cationes	Actividad remanente (%)
Control	100
CaCl ₂	88
MgCl ₂	85
HgCl ₂	2
CuSO ₄	17
EDTA	70

Tabla 7. Efecto de los diferentes iones sobre la actividad de acetaldehído deshidrogenasa de la fracción parcialmente purificada.

Como se puede apreciar en la **Tabla 7** el mayor efecto inhibitorio (casi 100%) sobre la actividad enzimática fue el promovido por sulfato de cobre, seguido del cloruro de mercurio. Se ha reportado que estos dos iones (Cu²⁺ y Hg²⁺) también presentan un efecto inhibitorio sobre la enzima ALDH de *A. polyoxogenes* (Fukaya et al., 1989). Sin embargo, en este caso el efecto inhibitorio es mayor en presencia de cloruro de mercurio (98%) que con sulfato de cobre (83%). Cuando se trata la muestra en presencia de cationes como magnesio, calcio o con EDTA (1 mM) no se presenta inhibición significativa de la actividad enzimática. El EDTA, es un agente quelante y podría secuestrar los iones calcio y magnesio que se encuentran asociados al grupo prostético PQQ, el cual actúa como un centro oxido-reducción dentro de esta enzima.

VIII. DISCUSIÓN.

G. diazotrophicus se ha reconocido por su capacidad para crecer y fijar nitrógeno bajo condiciones de alta aereación, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo de protección respiratoria dado por deshidrogenasas periplásmicas (Flores-encarnacion et al., 1999). En éste trabajo se determinó que el alcohol etílico (0.5%) tuvo un efecto positivo de inducción sobre las enzimas alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y acetaldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH), lo cual se vió reflejado en el aumento de sus actividades enzimáticas (Tabla 2); este dato mostró claramente que las enzimas son sobreexpresadas en presencia de etanol, queda por averiguar si los aldehídos ejercen el mismo efecto de inductor sobre ambas enzimas, tal y como lo hizo el etanol en la presente Tesis. Los experimentos deberán tener especial cuidado en la cantidad aplicada del aldehído ya que hay que recordar que el acetaldehído es tóxico.

La concentración óptima del detergente Tritón X-100 encontrada para solubilizar la enzima PQQ-ALDH fue del 0.5% (Fig. 5). Resultó interesante y novedoso que a esta misma concentración solubiliza óptimamente a la proteína PQQ-ADH (datos no mostrados). Sin embargo, al purificar la enzima ALDH por la columna de intercambio iónico (DEAE-Toyopearl) se detectaron dos picos bien separados, con actividad sobre acetaldehído (Fig. 6), ésto nos hizo pensar que la enzima PQQ-ALDH presentaba isoformas; sin embargo, no se tiene reportes de la existencia de esto. Paralelamente en nuestro laboratorio Gómez-Manzo estaba purificando la enzima PQQ-ADH, por lo que se decidió medir las actividades para ambos sustratos en estos dos picos, encontrándose que el primer pico oxida con una mayor eficiencia el sustrato etanol (100%) y en un 50% oxida el sustrato acetaldehído, para el segundo pico, analizado en la presente Tesis, se encontró que sólo oxida el sustrato acetaldehído (Fig. 6). Esto nos indica que *G. diazotrophicus* tiene dos isoenzimas capaces de oxidar el acetaldehído del medio y que una de ellas (PQQ-ADH) tiene la capacidad primaria para oxidar

alcoholes. Hasta la fecha no se conoce la existencia de una enzima bifuncional en las bacterias ácido- acéticas. El único reporte que se tiene de éste fenómeno lo encontramos para la bacteria *E. coli* la cual oxida etanol y acetaldehído.

La enzima ALDH parcialmente purificada con la columna de intercambio aniónico QAE – Toyopearl, se obtuvo con un rendimiento de 11 veces (**Tabla 3**) con respecto al solubilizado y se obtuvo una cantidad de proteína total de 36.4 mg. Esta fracción se utilizó para realizar la caracterización molecular y cinética de la acetaldehído deshidrogenasa.

De acuerdo al gel PAGE-SDS al 10% la enzima purificada parcialmente mostró la presencia de tres bandas mayores, con masas moleculares aproximadas de 75.0, 50.0 y 10.0 kDa respectivamente. La tercera banda parece ser un contaminante que copurifica con nuestra enzima. El oligómero tiene una masa total de 125 kDa; dicha masa, se encuentra en el rango de lo reportado para ALDH en *A. polyoxogenes* (**Takemura et al., 1985**).

En PAGE-NATIVO se logró detectar la actividad de la enzima ALDH *in situ* con NTB como aceptor de electrones. Las bandas que dieron positivo tanto en la fracción de solubilizado como en la fracción purificada corren a la misma distancia, lo que indica que es la misma enzima y que ésta oxida el sustrato acetaldehído en el gel.

No se detectó señal para citocromo-*c* con la reacción de peroxidasa en SDS-PAGE al 10 %, quizá debido a la cantidad de proteína aplicada al gel ó porque la cantidad de citocromos-*c* que tiene asociada la enzima es pequeña (1 citocromo *c* por mol de proteína **Adachi et al., (1980)**; sin embargo, se detectó la presencia de citocromo *c* por espectrofotometría, obteniéndose las señales características para citocromos *c*. Para la obtención del espectro diferencial la enzima se oxido con persulfato de amonio, y se redujo con acetaldehído como sustrato y con ditionita, obteniéndose espectros semejantes. Lo cual nos indica

que existe un flujo dinámico de electrones a partir del sustrato y que los electrones pasan por el citocromo *c*.

En cuanto a la especificidad por sustrato, se encontró que la enzima no tiene capacidad para oxidar ninguno de los alcoholes probados, incluyendo al etanol. Preferentemente oxida acetaldehído, seguido por glutaraldehído y formaldehído. El dato de la oxidación del sustrato formaldehído por esta enzima es muy relevante ya que las ALDH purificadas hasta la fecha de otros microorganismos no oxidan este sustrato (**Adachi et al.**, 1980; **Hommel**, 1990; **Thurner et al.**, 1997; **Fukaya et al.**, 1989 y **Ameyama et al.**, 1981).

La K_m obtenida fue de 4.29×10^{-4} M. Lo que indica la alta afinidad que tiene la enzima por el sustrato, esto nos lleva a proponer que la PQQ-ALDH es una enzima eficiente en la eliminación del acetaldehído como intermediario en el sistema oxidativo de alcoholes, impidiendo la acumulación de este intermediario (metabolito) en el medio y evitando la intoxicación del organismo.

Al evaluar el efecto de cationes metálicos sobre la actividad enzimática de la fracción purificada (ALDH) se observó que ésta se ve afectada por sulfato de cobre y cloruro de mercurio principalmente. Es posible que estos metales pesados se unan de manera irreversible a algún componente del sitio activo, crítico para la catálisis. Otros cationes divalentes como calcio y magnesio no presentaron efecto inhibitorio significativo.

IX. CONCLUSIONES.

- El alcohol etílico (0.5 %) añadido al medio de cultivo hacia el final del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGIP simple, causó la sobre expresión (2-3 veces) de las enzimas *PQQ-ADH* y *PQQ-ALDH*, sin afectar de manera significativa, la expresión de la *PQQ-GDH*.

- Las enzimas *PQQ-ALDH* Y *PQQ-ADH* son proteínas unidas laxamente a la membrana, a juzgar por la baja concentración (0.5%) de Tritón X-100 requerida para su solubilización.

- Las columnas de intercambio iónico QAE y DEAE-Toyopearl ayudaron a purificar la enzima *PQQ-ALDH*. Sin embargo, la enzima resultó inestable durante la cromatografía en la columna HA-Ultrogel.

- La enzima *PQQ-ALDH* purificada parcialmente para *G. diazotrophicus* tiene una masa aproximada de 114 kDa y está constituida por dos subunidades con Mrs de 75 y 50 kDa; contiene citocromo-*c* asociado, tentativamente en relación estequiométrica con el dímero.

- La *PQQ-ADLH* presenta una K_m de 4.29×10^{-4} M y una V_{max} de 19.82 $\mu\text{mol} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, utilizando acetaldehído como sustrato.

- La enzima *PQQ-ALDH* oxida con preferencia decreciente a los sustratos acetaldehído, glutaraldehído, formaldehído y benzaldehído. No oxida alcoholes.

- El CuSO_4 y HgSO_4 tuvieron un fuerte efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima ALDH. Presumiblemente, los metales pesados utilizados son responsables del efecto inhibitorio.

- *Gluconacetobacter diazotrophicus* posee dos enzimas PQQ-deshidrogenasas distintas, que son capaces de oxidar al sustrato acetaldehído. Una, la PQQ-ADH oxida primariamente alcoholes, la segunda, la PQQ-ALDH parcialmente purificada en la presente tesis es específica para oxidar aldehidos.

X. REFERENCIAS.

- Ameyama, M. and Adachi, O.** (1982) Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods in Enzymology*. Edited for Wood. W. A. Academic Press, Inc. London. **89**: 491-497.
- Boddey, R. M., O.C. de Oliveira, Urquiaga, V. M., Reis, F. L., De Olivares, V. L. D. Baldani and Döbereiner.** (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant* **174**:195-209.
- Barquera, B., Garcia-Horsmann, A. and Escamilla, J.E.** (1991) Cytochrome *d* expression and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* **155**: 114-119.
- Cavalcante, V.A. and Döbereiner, J.** (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil.* **108**: 23-31.
- Dalton, H. and J. R. Postage.** (1969) Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* **54**:463-473.
- Daniel R. M.** (1970) *Biochem Biophys Acta.* **216**: 328-341.
- De Jong, G.A.H., Jongejan, J.A., De Vries, S., Duine, J.A., Caldeira, J., Moura, L., Moura, J.J.G., Sun, J and Oler, T.M.** (1995b) Characterization of the interaction between PQQ and heme C in the quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *Biochemistry.* **34**: 9451-9458.
- De Ley J, Gillis M, Swings J.** (1984) 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.
- Del Arenal, I.P., Contreras, M. L., Svlateorova, B.B., Rangel, P., Lledias, F., Dávila, J.R. and Escamilla, J.E.** (1997) 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.
- Döbereiner, J., V. M. Reis, M. A. Paula, and F. L. Olivares.** 1993. Endophytes diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. *Curr. Plant. Sci. Biotechnol. Agric.* **17**: 671-676
- Escamilla, J.E., R.Ramirez, I.P., del Arenal, G. Zorzosa. and V. Linares.** (1987) Expresión of cytochrome oxidase in *Bacillus cereus*; effects of oxygen tension and carbon source. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3549-3555.

Flores-Encarnacion, M., Contreras, M., Soto, L.V., Aguilar, G.R., Baca, B.E. and Escamilla, J.E. (1999) The respiration system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. of Bacteriol.* **181**: 6987-6975.

Fuentes-Ramírez, L. E., Santoyo-Páez, Y., León-Burgoa, D., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Mascarua-Esparza, M. A., Caso-Vargas, L. R. and Rosales Pérez, M. (2002) Diversidad de habitat de las acetobacterias fijadoras de nitrógeno, p.44. In XXI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y VI Congreso Nacional de la Fijación Biológica de Nitrógeno. 21-24 Octubre de 2002. Cocoyoc, Morelos, México.

Fukaya, Masahiro., Tayama, Kenji., Okumura, Hajime., Kawamura, Yoshiya. and Beppu. (1989) Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. Nov. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **32**: 176-180.

Gennis, R.B. and V. Stewart. (1996) Respiration. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Biology* ed Umbarger

Groen, B.W., Frank, J. and Duine, J.A. (1986) Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.* **234**: 611-615.

Hill S. (1998) How is nitrogenase regulated by Oxygen? *FEMS Microbio. Lett* **54**: 111-130.

Hommel R. and Kleber P. (1990) Properties of the quinoprotein aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter rancens*. *J. of Microbiology.* **136**:1705-1711.

Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez, L. E., Tapia-Hernández, A., Mascarua-Esparza, M. A., Martinez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (9) : 3676-3683.

James, E. K. (2000) Nitrogen fixation in endophyt and associative symbiosis. *Field Crops Research* **65**: 197-209.

Kasting J.F. (1993) Earths early atmosphere *Science* **259**:920-99.

Kavanagh E.P., Callis, J.B., Edwards, S.E., Poole R,K and Hills S. (1998) Redox poise and oxygenation of cytochrome *bd* in the diazotroph *Azotobacter vinelandii* assessed in vivo using diode-array reflectance Spectrophotometry. *Microbiology.* **144**: 2271-2280.

Kim, J. y Rees, D. (1994) Nitrogenase and biological nitrogen fixation *Biochemistry.* **33**, 389-397.

-
-
- Kondo, K. And Horinouchi, S.** (1997) 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.
- Linkenhägner, K., and J. Oelze.** 1995. Cellular ATP levels and nitrogenase switch off upon oxygen stress in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **177**:5289-5293.
- Lehninger, L. A.** (2000) Principles of Biochemistry. Worth publishers. 3ª edición pp. 1115.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- M. Ellis, Elizabeth.** (2002) Microbial alde-keto reductases. *FEMS Microbiology Letters.* **216**:123-131
- Matsushita, Y., Takaki, E., Shinogawa, M., Ameyama, O. and Adachi.** (1992) Brosci, Brotech, Brochem, SE 304-310.
- Matsushita, K. and Adachi, O.** (1993a) Bacterial quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase. In: *Principles and Applications of Quinoproteins* (V.L. Davidson, ed.), pp.47-63. *Marcel Dekker Inc. New York.*
- Matsushita, K., Toyama, H. and Adachi, O.** (1994). Respiratory chains and bioenergetics of acid bacteria. *Adv. Microbial. Physiol.* **36**: 247-301.
- Moshiri, F., Kim J. W., Fu, C. and Mark, R. J.** (1994). *Mol. Microbial.* **14**: 101-114.
- Mutzel, A. and Gorisch, H.** (1991). Quinoprotein ethanol dehydrogenase preparation of the apo-form and reconstitution with pyrroloquinoline quinone and Ca^{2+} o Sr^{2+} ions. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1721-1726.
- Poole, R.K.** (1998). Bacterial cytochrome oxidases In: *Bacterial energy transducción* (C.Anthony, ed.) pp. 231-219. *Academic Press, London.*
- Reis, V.W., Olivares, F.L. and Dobereiner, J.** (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *Word J. Microbiol. and Biotech.* **10**: 401-405.
- Robson R. L.** (1979) Characterization of an Oxygen-Stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*, *Biochem. J.* **181**:569-575.

Stephan, M. P., Oliveira, M., Teixeira, K. R. S., Martinez-Drest, G. and Dobereiner, J. (1991) *FEMS. Microbiol. Lett.* **77**:67-72.

Takemura, H., Kondo, K., Horionuchi, S. and Beppu, T. (1993) Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurians*. *J. Bacteriol.* **175**: 6857-6866.

Tamaki, T., Fukaya, M., Takemura, H., Tayama, K., Okumura, H., Kawamura, Y., Nishiyama, M., Horiouchi, S. and Beppu, S. (1991) Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1088**: 292-300.

Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jiménez-Salgado T., Caballero-Mellado, J. and Fuentes-Ramírez, L. E. (2000). Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb. Ecol.* **39**:49-55

Tayama, H., Fukawa, M., Okumura, H., Kawamuri, Y. And Beppu, T. (1989) Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 181-185.

Tohayama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyana, M. and Adachi, O. (1995) Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenase are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J. Bacteriol.* **177**: 2442-2450.

Thomas P. E. and Ryan D. Levin W. (1976) 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.

Thurner Claudia, Cinzia Vela, Linda-Meyer, Leo Meile, Michael Teuber. (1997) Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*. *Arch. Microbiol.* **168**:81-91.

Deppenmeier, U., Hoffmeister, M. and Prust, C. (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *App. Microbiol. Biotechnol.* **60**:233-242.

Ureta Alejandro and Nordlund Stefan. (2002). Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. *J. of Bacteriology.* **184**(20):5805-5809.

Van Kleef, M.A.G. and Duine, J.A. (1998) L-tyrosine is the precursor of PQQ biosynthesis in *Hyphomicrobium X*. *FEBS Lett.* **237**: 91-97.

Van Schic, B.J., Pronk, J.T., Hellingwer, K.J., van Dijken, J.P. and Kuenen, J.G. (1987a) Glucose dehydrogenase mediated solute transport and ATP synthesis in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3427-3435.

Yamada Y., Hocino, K. and Ishikawa, T. (1997) 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.