



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

Facultad de Química

**EL CRECIMIENTO Y LA RESPIRACIÓN  
DE *Gluconacetobacter xylinum* EN SISTEMA  
DE CULTIVO ESTÁTICO Y AGITADO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

**M. en B. Juan Luis Chávez Pacheco**

**DIRECTOR: Dr. José Edgardo Escamilla Marván**



México, D. F.

Mayo, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Agradezco la participación de los miembros del Comité Tutorial, por los conocimientos y aportaciones realizadas para el enriquecimiento de este trabajo:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
Facultad de Química, UNAM

Dr. Jorge Membrillo Hernández  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. José Edgardo Escamilla Marván  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Así mismo agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por concederme la beca doctoral para la realización de este proyecto y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca doctoral complementaria que me otorgó para realizar el Doctorado.

A los proyectos CONACYT 400346-5-34300N y DGAPA-UNAM IN-219799 por el financiamiento para la realización del proyecto doctoral.

## DEDICATORIA

*A Dios, por darme vida para alcanzar una más de mis metas.*

*A mi angelitos, **André Sebastián** por alegrar todos mis días y noches. A **Emiliano, Brandon, Dana y Daniel**, gracias pequeños por recordarme lo que de verdad es importante.*

*A **Sury**, mi amiga y compañera, gracias por compartir todo conmigo y traer a mi vida lo más hermoso que tenemos... como describir en tan poco espacio lo que significas para mí.*

*A mis **Padres, Gloria y Félix**, quienes me han apoyado siempre e impulsado para realizar todo proyecto que emprenda. A mis **Abuelos, Elena y Francisco**, gracias viejita por enseñarme que solo caminando por buenas sendas se llega al éxito.*

*Con todo mi cariño a mis **Hermanos: Carlos, Armando y Beatriz**, a toda mi familia (**Pacheco García y Martínez Yee**); por su apoyo, cariño y formación. Cada meta que alcanzo es un triunfo compartido.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Al Dr. José Edgardo Escamilla Marván, por su aporte de conocimientos, el apoyo brindado y las ideas proporcionadas para el enriquecimiento de este trabajo.*

*A los Doctores: Sergio Sánchez, Mario Soberón, Amanda Gálvez, Heliodoro Celis, Salvador Uribe, José de Jesús García y Jorge Membrillo Hernández, por las aportaciones realizadas para la mejora de esta tesis.*

*A la Dra. Martha L. Contreras Zentella, por su valiosa colaboración para la realización de este proyecto, sus enseñanzas, pero sobre todo por su amistad..*

*A mi amigo, Juan Manuel Méndez Franco, me enseñaste a sacar adelante un proyecto con inteligencia, gracias por tu apoyo en el trabajo experimental y por tu amistad.*

*A todos mis compañeros del 101 oriente del IFC: Miguel, Saúl, Abigail, Martín, Lucha, Gaby, Erika y Rolando.*

*Mi agradecimiento muy especial a **Leticia García Gutiérrez (Lety)** y **Adelina González, (Ade)**, muchas gracias por su amistad, apoyo, consejos, ayuda y su gran eficiencia. Ustedes hacen que los trámites en el Posgrado sean más fáciles.*

---

---

## INDICE

Indice de cuadros	i
Indice de figuras	ii
Abreviaturas	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCION	2
1.1. Celulosa bacteriana	2
1.2. Síntesis de celulosa bacteriana	4
1.3. Control del proceso de síntesis por oxígeno	6
1.4. Aplicaciones biotecnológicas	8
II. ANTECEDENTES	9
2.1. Sistemas respiratorios bacterianos	9
2.2. Cadenas respiratorias de bacterias ácido acéticas	10
2.2.1. <i>Gluconacetobacter suboxydans</i>	11
2.2.2. <i>Acetobacter aceti</i>	11
2.2.3. <i>Acetobacter methanolicus</i>	12
2.2.4. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	12
2.3. Cadena respiratoria de <i>Gluconacetobacter xylinum</i>	14
2.4. La oxidación de alcohol en bacterias ácido acéticas	14

---

---

---

III.	HIPOTESIS	18
IV.	OBJETIVOS	19
4.1.	Objetivo General	19
4.2.	Objetivos Específicos	19
V.	MATERIALES Y METODOS	20
5.1.	Microorganismo y condiciones de cultivo	20
5.1.1.	Condiciones de cultivo y optimización del rendimiento celular	20
5.1.2.	Recuperación de células de <i>G. xylinum</i> de cultivo estático y agitado	21
5.1.3.	Obtención de membranas	21
5.1.4.	Cuantificación de proteína	21
5.2.	Actividades respiratorias y análisis espectroscópico	22
5.3.	Efecto de inhibidores de sitio específico sobre la actividad de oxidasa	23
5.4.	Electroforesis desnaturalizante en gel (SDS PAGE) y gel nativo	23
5.4.1.	Zimografía de actividad de deshidrogenasa en gel nativo	24
5.4.2.	Detección de citocromo tipo c en SDS-PAGE	24
5.5.	Extracción de hemos y espectros de hemocromos de piridina	25
5.6.	Determinación de hemos por HPLC	25
5.7.	Microscopía electrónica de barrido	26
5.8.	Purificación de la PQQ alcohol deshidrogenasa	26
5.8.1.	Extracción de la enzima a partir de membranas	26
5.8.2.	Cromatografía	26
5.9.	Titulación potenciométrica de citocromos de la PQQ-ADH	27
5.10.	Cinética de oxidación de etanol por la PQQ alcohol deshidrogenasa	28

---

---

5.11. Efecto de inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre la PQQ alcohol deshidrogenasa	28
VI. RESULTADOS	29
6.1. Optimización del medio de cultivo en condiciones estáticas	29
6.1.1. Recuperación de biomasa de películas de celulosa	32
6.2. Cinética de crecimiento de <i>G. xylinum</i> en condiciones estáticas y agitadas	35
6.3. Composición citocrómica del sistema respiratorio de <i>G. xylinum</i>	37
6.4. Actividades respiratorias en membranas	41
6.4.1. Oxidasas y deshidrogenasas membranales	41
6.4.2. Inhibición de oxidasas con KCN	43
6.4.3. Inhibidores de complejo <i>bc<sub>1</sub></i> afectan la actividad de oxidasa	44
6.5. El sistema de oxidación de alcoholes de <i>G. xylinum</i>	46
6.5.1. Las deshidrogenasas periplásmicas de alcohol y aldehído	46
6.5.2. Purificación de la PQQ alcohol deshidrogenasa	48
6.5.3. Caracterización de la enzima alcohol deshidrogenasa	49
VII. DISCUSION	59
VIII. CONCLUSIONES	69
IX. REFERENCIAS	71
X. ANEXO I	81
XI. ANEXO II	93

---



---

---

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro I.</b>	Aplicaciones industriales de la celulosa de origen bacteriano	8
<b>Cuadro II.</b>	Rendimiento de biomasa y respiración estimulada por sustrato en células liberadas de <i>G. xylinum</i> de películas de celulosa	34
<b>Cuadro III.</b>	Cuantificación de citocromos en membranas de <i>G. xylinum</i> de cultivo estático y agitado	41
<b>Cuadro IV.</b>	Actividades de oxidasa y deshidrogenasa en membranas de cultivo estático y agitado	42
<b>Cuadro V.</b>	Concentración media inhibitoria para las actividades de oxidasa en membranas de <i>G. xylinum</i>	44
<b>Cuadro VI.</b>	Tabla de purificación de la PQQ alcohol deshidrogenasa	48
<b>Cuadro VII.</b>	Oxidación de sustratos por la PQQ- ADH purificada	50
<b>Cuadro VIII.</b>	Parámetros cinéticos para sustratos de la enzima PQQ-ADH purificada	52
<b>Cuadro IX.</b>	Concentración media inhibitoria para las actividades de oxidasa en membranas de <i>G. xylinum</i> y <i>G. diazotrophicus</i>	65
<b>Cuadro X.</b>	Composición oligomérica de PQQ-ADH purificadas en bacterias ácido acéticas.	67

---

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructura lineal de la celulosa	2
<b>Figura 2.</b>	Estructuras de la celulosa bacteriana	4
<b>Figura 3.</b>	Rutas metabólicas y de síntesis de celulosa en <i>G. xylinum</i>	5
<b>Figura 4.</b>	Regulación de la síntesis de celulosa por oxígeno	6
<b>Figura 5.</b>	Composición general de una cadena respiratoria aeróbica	9
<b>Figura 6.</b>	Estructura cristalográfica de la PQQ metanol deshidrogenasa de <i>M. extorquens</i>	15
<b>Figura 7.</b>	Estructura cristalográfica de la PQQ etanol deshidrogenasa de <i>C. testosteroni</i>	16
<b>Figura 8.</b>	Optimización del medio de cultivo	31
<b>Figura 9.</b>	Microscopía electrónica de barrido de muestras de celulosa bacteriana y células liberadas de <i>G. xylinum</i>	33
<b>Figura 10.</b>	Cinética de crecimiento de <i>G. xylinum</i> en condición estática y agitada	36
<b>Figura 11.</b>	Espectros diferenciales a 77K en membranas de <i>G. xylinum</i> de cultivo estático y cultivo agitado	38
<b>Figura 12.</b>	Determinación de hemos por HPLC	39
<b>Figura 13.</b>	Espectros diferenciales reducidos con ditionita menos oxidados con persulfato de piridinhemocromos	40
<b>Figura 14.</b>	Efecto del KCN sobre las actividades de oxidasa	43
<b>Figura 15.</b>	Inhibición de la actividad de oxidasa por estigmatelina, mixotiazol y antimicina	45
<b>Figura 16.</b>	Espectroscopía y electroforesis nativa del solubilizado	46

---

<b>Figura 17.</b>	Electroforesis desnaturalizante del solubilizado de Tritón X100 al 0.5%	47
<b>Figura 18.</b>	Electroforesis de la PQQ alcohol deshidrogenasa purificada	49
<b>Figura 19.</b>	Caracterización espectroscópica y actividad dependiente de pH de la enzima purificada	51
<b>Figura 20.</b>	Cinética de oxidación de etanol y liberación de acetaldehído	53
<b>Figura 21.</b>	Titulación potenciométrica de la PQQ-ADH	55
<b>Figura 22.</b>	Cinética de reducción de citocromos de la PQQ alcohol deshidrogenasa en presencia de inhibidores	56
<b>Figura 23.</b>	Inhibición de la PQQ alcohol deshidrogenasa	58
<b>Figura 24.</b>	Composición del sistema respiratorio de <i>G. xylinum</i>	64

---

## ABREVIATURAS

c-diGMP	Diguanosina monofosfato cíclico
CS	Celulosa sintasa
DCPIP	Diclorofenol indofenol oxidado
DCPIPH <sub>2</sub>	Diclorofenol indofenol reducido
DGC	Diguanilato ciclasa
E' <sub>m7</sub>	Potencial redox estándar
FMN	Mononucleótido de flavina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I <sub>50</sub>	Concentración media inhibitoria
kDa	Kilo Daltones
Km	Constante de afinidad (Michaelis-Menten)
Mr	Masa relativa
NADH-DH	NADH deshidrogenasa
p/v	Relación peso: volumen
PDEA	Fosfodiesterasa A
PDEB	Fosfodiesterasa B

---

PMS	Metasulfato de fenazina
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PQQ	Pirroloquinolina quinona
PQQ ADH	Alcohol deshidrogenasa dependiente de PQQ
PQQ ALDH	Aldehído deshidrogenasa dependiente de PQQ
rpm	Revoluciones por minuto
TCHQ	Tetraclorohidroquinona
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TMPD	Tetrametilfenilendiamina
v/v	Relación volumen: volumen

Las abreviaturas no mencionadas son las convenciones de la Biochemical Society.

---

---

## RESUMEN

*Gluconacetobacter xylinum* (anteriormente *Acetobacter xylinum*) es una bacteria Gram negativa, ácido acética. Su alta tasa de producción de celulosa la ha convertido en la bacteria modelo para estudios de biogénesis de este polímero, así mismo la alta pureza de la celulosa bacteriana le confiere propiedades únicas de alto potencial biotecnológico.

El oxígeno tiene un papel importante en la regulación de la síntesis de celulosa: aporta la totalidad del ATP requerido para la síntesis del polímero (2 moles de ATP por mol de glucosa) y en forma indirecta controla la actividad de la celulosa sintasa. A pesar de estos conocimientos poca información se ha recabado sobre las propiedades bioenergéticas de *G. xylinum*; en el presente estudio se caracterizó el sistema respiratorio de la bacteria en sistemas de cultivo estático y agitado en células productoras de celulosa.

Se implementó un sistema de cultivo estático y se optimizó un medio de cultivo que permiten obtener cantidades de biomasa suficientes para estudios bioquímicos exhaustivos. El análisis de los componentes del sistema respiratorio mostró que tanto en cultivos estáticos como en agitados, *G. xylinum* expresa las mismas deshidrogenasas membranales y oxidasas terminales: PQQ-glucosa deshidrogenasa, PQQ-alcohol deshidrogenasa y PQQ-aldehído deshidrogenasa; ubiquinol oxidasa *bd* y *ba<sub>3</sub>*. La titulación con cianuro de potasio mostró que la oxidasa *bd* es predominante y resistente a cianuro mientras la oxidasa *ba<sub>3</sub>* es minoritaria y sumamente sensible al inhibidor.

---

Aunque no existen indicios de que la bacteria posea complejo III (citocromo *bc<sub>1</sub>*) inhibidores típicos de este complejo afectan fuertemente la actividad de oxidasa asociada a los sustratos etanol, glucosa y acetaldehído. Se determinó que estos compuestos actúan a nivel del sitio de unión a ubiquinona de las deshidrogenasas membranales impidiendo del flujo de electrones hacia la oxidasa terminal.

La PQQ-alcohol deshidrogenasa de *G. xylinum* es una enzima peculiar, ya que tanto en cultivos estáticos como agitados posee una alta actividad y es capaz de oxidar alcoholes y aldehídos. Los estudios con la enzima purificada muestran claramente que la oxidación de etanol hasta ácido acético procede en la enzima sin previa liberación de acetaldehído, por ello postulamos que la oxidación es secuencial en el mismo sitio activo.

---

---

## ABSTRACT

*Gluconacetobacter xylinum* (previously *Acetobacter xylinum*) is an acetic acid bacterium, Gram negative, whose high rate of cellulose production has turned it the archetype for studies of biogenesis of this polymer. Also, the high purity of the bacterial cellulose confers it unique properties with high biotechnological uses.

It has been discovered that oxygen has an important role in regulating cellulose synthesis: it contributes to the totality of the ATP required for the polymer synthesis (2 mol of ATP by mol of glucose) and in indirect way controls the activity of the cellulose synthase. Notwithstanding the important role of oxygen in cellulose synthesis, little information has successfully obtained on the bioenergetics properties of *G. xylinum*. In the present study we characterized the respiratory system of *G. xylinum* in static and shaken cultures conditions.

We implemented a system of static culture and a culture medium that allow to obtain suitable amounts of biomass for exhaustive biochemical studies. The analysis of the respiratory system showed that in both conditions of culture the bacterium expresses same membrane dehydrogenases and terminal oxidases: PQQ- glucose dehydrogenase, PQQ- alcohol dehydrogenase and PQQ- aldehyde dehydrogenase; ubiquinol oxidases *bd* and *ba<sub>3</sub>*. Titration with potassium cyanide showed that *bd* oxidase is predominant and resistant to cyanide while *ba<sub>3</sub>* oxidase is minority and extremely sensitive to cyanide.



---

Although the bacterium probably does not have complex III (cytochrome *bc<sub>1</sub>*), inhibitors typical of this complex strongly affect the oxidase activity associated to the substrates ethanol, acetaldehyde and glucose. We determined that these compounds act at the docking site to ubiquinone of membrane dehydrogenases preventing electron flow towards the terminal oxidase.

The PQQ- alcohol dehydrogenase of *G. xylinum* is a peculiar enzyme, in both conditions of culture it has high activity and it is able to oxidize alcohol and aldehydes. The studies with the purified enzyme show clearly that the ethanol oxidation until acetic acid comes in the enzyme without previous acetaldehyde liberation. We postulated that the oxidation is sequential in the same active site.

**EL CRECIMIENTO Y LA RESPIRACIÓN DE *Gluconacetobacter*  
*xylinum* EN SISTEMA DE CULTIVO ESTÁTICO Y AGITADO**

---

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Celulosa bacteriana

La celulosa es el polímero de mayor abundancia natural (se generan aproximadamente 18<sup>13</sup> toneladas anuales; Englehardt, 1995). El polímero está conformado por una larga cadena lineal de moléculas de D-glucopiranososa enlazadas mediante los carbonos C<sub>1</sub> y C<sub>4</sub> con enlace β<sub>1-4</sub> (Figura 1). La celulosa puede visualizarse como una cuerda compuesta por múltiples cadenas lineales unidas por puentes de hidrógeno.

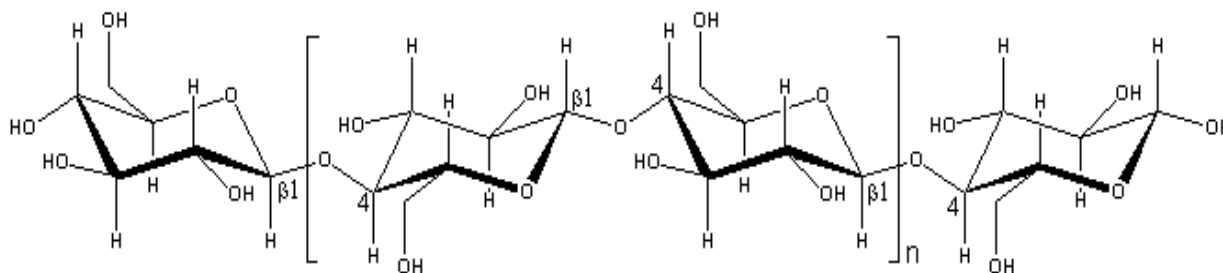


Figura 1. Estructura lineal de la celulosa.

Diferentes especies dentro de los géneros *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Zoogloea* y *Gluconacetobacter* producen celulosa (Cannon y Anderson, 1991). En los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, que pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, las especies *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconacetobacter hansenii* y *Gluconacetobacter xylinum* son productoras de celulosa, siendo *G. xylinum* la bacteria con mayor capacidad de síntesis.

Los primeros reportes sobre celulosa bacteriana (CB) provienen de Adrian Brown (1886); en sus estudios sobre la fermentación de vinagre observó que se formaba una masa gelatinosa sobre la superficie del medio de cultivo. La masa gelatinosa fue denominada “madre del vinagre”. Un análisis posterior determinó que la masa estaba compuesta por celulosa y que la bacteria *Bacterium aceti* era el organismo responsable de su producción. Posteriormente, la bacteria fue referida como *Acetobacterium xylinum* ó *Bacterium xylinodes*; el nombre derivó a *Acetobacter xylinum* y finalmente con base en el análisis filogenético del gen que codifica para el ARN 16S y de la ubiquinona endógena, Yamada y colaboradores (1997) ubicaron a esta bacteria dentro del género *Gluconacetobacter*, de esta manera el nombre actual de la bacteria es *Gluconacetobacter xylinum*.

---

*Gluconacetobacter xylinum* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*; tiene forma de bacilo cuyo tamaño va de 0.6 a 0.8  $\mu\text{m}$  x 1.0 a 1.4  $\mu\text{m}$ . Es un microorganismo aerobio estricto, con metabolismo respiratorio que oxida en forma incompleta azúcares y alcoholes mediante una “fermentación oxigénica” (Matsushita *et al.*, 1994). Su hábitat natural son frutas y vegetales en proceso de descomposición.

En cultivo estático, la bacteria secreta microfibrillas de celulosa, las cuales en el exterior se ensamblan formando una nata gruesa ó “película”; en condiciones normales la película cubre toda la superficie del medio expuesta al aire. La bacteria también sintetiza pequeñas cantidades de un heteropolisacárido ramificado denominado “acetan”.

Se ha propuesto que la celulosa permite a las células alcanzar la superficie del medio de cultivo, donde existe mayor disponibilidad de  $\text{O}_2$  para su crecimiento (Schramm y Hestrin, 1954). Recientemente se demostró que durante la cinética de crecimiento, *G. xylinum* produce un gradiente de concentración de  $\text{O}_2$  dependiente del grosor de la película de celulosa (Verschuren *et al.*, 2000), el gradiente observado va desde un 100% de saturación de aire en la superficie de la película hasta 0% de saturación a 200  $\mu\text{m}$  de profundidad. Este mismo estudio demostró que la fase inicial de crecimiento es dependiente de la velocidad de difusión de oxígeno mientras la etapa final depende de la difusión de la fuente de carbono (sacarosa).

Estudios posteriores mostraron que la película de celulosa posee otras funciones de vital importancia para *G. xylinum*: aumenta la habilidad para colonizar sustratos, evita la desecación del sustrato y protege a la bacteria contra la radiación ultravioleta (Williams y Cannon, 1989).

La celulosa producida por *G. xylinum* posee alta pureza y una estructura similar a la de celulosa vegetal (Yamanaka *et al.*, 1989). La formación de la celulosa es dependiente de las condiciones de cultivo; en condiciones de cultivo estático se genera una “película” en la interfase aire/líquido; en cultivo agitado se forman gránulos irregulares, cadenas fibrosas o ramificadas de celulosa (Figura 2).

La celulosa bacteriana es de pureza superior a la celulosa vegetal debido a que no contiene hemicelulosa ni lignina, el grado de pureza le confiere características peculiares: alto grado de cristalización, alta resistencia a la presión, elasticidad y durabilidad, elevada absorción de agua y mayor área superficial que la presente en la celulosa vegetal. Además, es inerte metabólicamente, no es tóxica, ni provoca reacción alérgica al contacto, propiedades de particular importancia para fines biomédicos y cosméticos (Krystynowicz y Bielecki, 2003).

---

A) Cultivo estático



B) Cultivo agitado

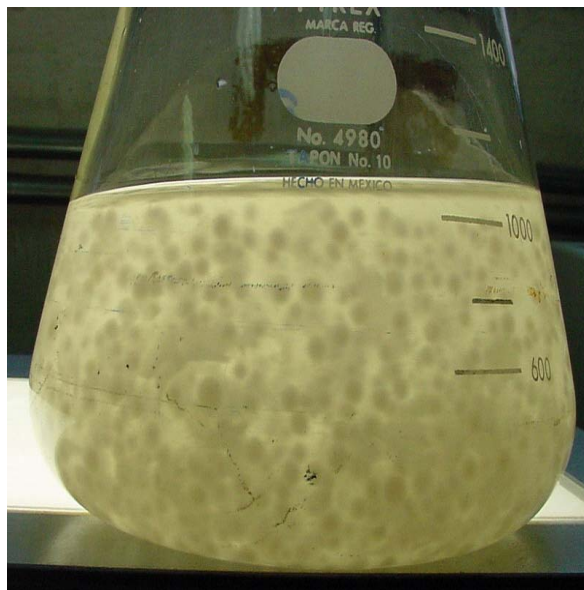


Figura 2. Formación de la celulosa bacteriana. A) Película de celulosa bacteriana en cultivo estático. B) Gránulos de celulosa en cultivo agitado.

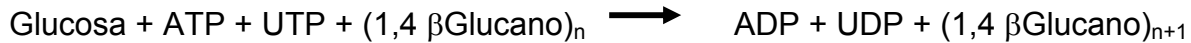
## 1.2. Síntesis de la celulosa bacteriana

*G. xylinum* sintetiza celulosa como mecanismo de flotación que le permite mantenerse en la interfase aire-líquido y así obtener con mayor facilidad oxígeno; así mismo, la producción de celulosa está asociada a la colonización de sustratos (Williams y Cannon, 1989). Se sabe que *G. xylinum* no realiza glucólisis (carece de la enzima fosfofructocinasa-1), pero si lleva a cabo la gluconeogénesis a partir de triosas fosfato (Weinhouse y Benziman, 1974); la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs son las vías anfibólicas más activas en la bacteria (Ross *et al.*, 1991). Mediante estas vías la celulosa puede ser producida a partir del conjunto de hexosas fosfato (glucosa, fructosa, manosa) ó por síntesis mediante la vía gluconeogénica (Figura 3).

El flujo de hexosas hacia celulosa ó al ciclo de las pentosas fosfato parece estar controlado por un mecanismo dependiente de energía, cuyo punto de intersección está en la enzima NAD-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la cual es sensible a los niveles de ATP. Un alto contenido de ATP inhibe a la enzima desviando el flujo de carbono hacia la síntesis de celulosa. La reacción global de síntesis de celulosa implica el gasto de dos ATP por cada residuo de glucosa añadido al polímero, lo cual consume hasta un 10% del ATP generado por el metabolismo. El primer ATP se utiliza para fosforilar la glucosa y produce glucosa 6-

fosfato; este compuesto se isomeriza a glucosa 1-fosfato por la fosfoglucomutasa. Posteriormente, la glucosa 1-fosfato en presencia de UTP se convierte en UDP-glucosa mediante la acción de la uridín glucopirofosforilasa. La UDP-glucosa es el sustrato de la enzima celulosa sintasa.

La reacción global del proceso es:



El aporte energético para la síntesis proviene del metabolismo aerobio, por lo cual la cadena respiratoria juega un papel importante en la síntesis de CB. La bacteria posee dos operones conteniendo genes que codifican para la celulosa sintasa: el operon *acs* y el operon *bcs* (Saxena *et al.*, 1994; Saxena y Brown, 1995).

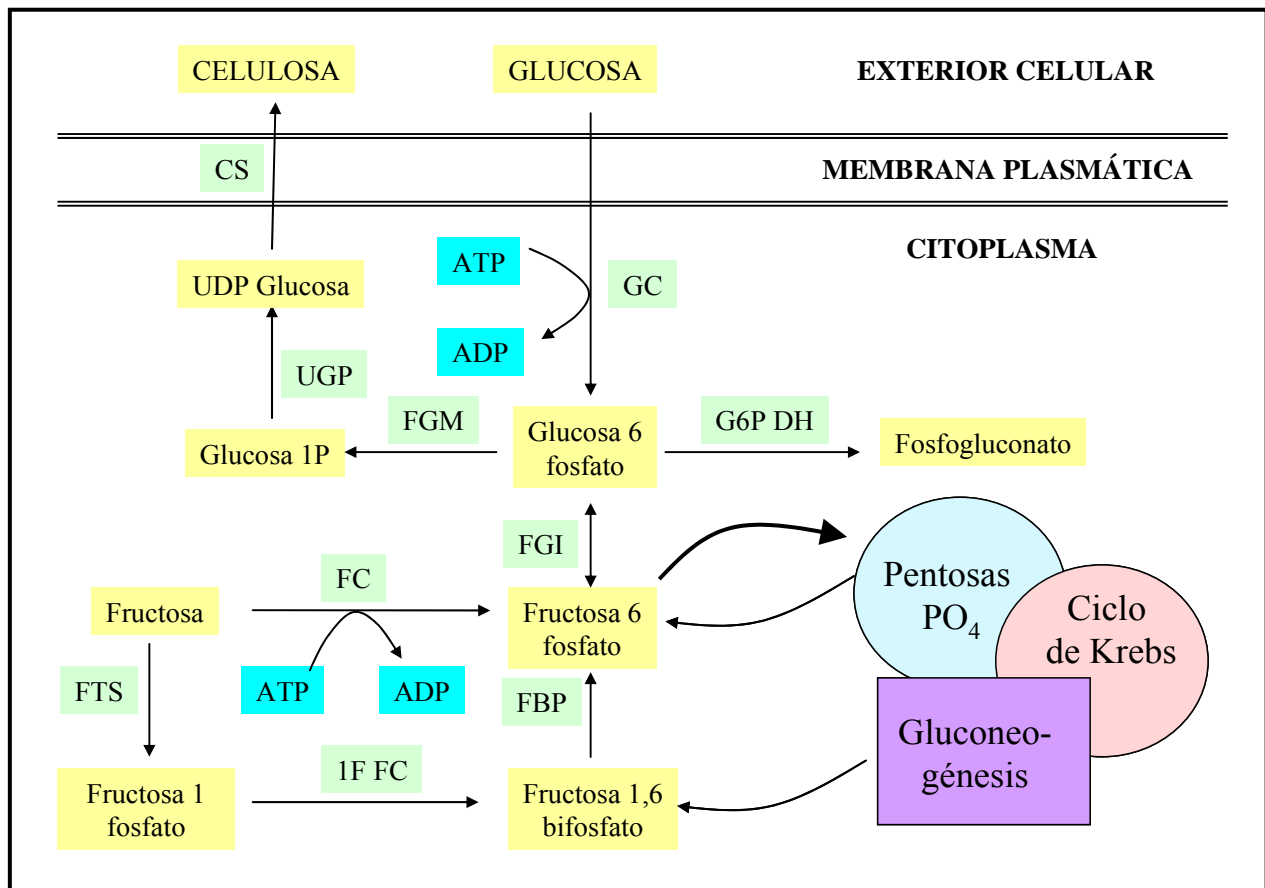


Figura 3. Rutas metabólicas y de síntesis de celulosa en *G. xylinum*. Abreviaturas: CS, celulosa sintasa; FBP, fructosa bifosfatasa; FC, fructocinasa; 1FFC, fructosa 1-fosfato cinasa; FGI, fosfoglucoisomerasa; FGM, fosfoglucomutasa; FTS, fosfofructotransferasa; GC, glucocinasa; G6P-DH, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; UGP, uridín difosfato glucopirofosforilasa (Ross *et al.*, 1991).

### 1.3. Control del proceso de síntesis por oxígeno

La actividad de la celulosa sintasa está regulada por la concentración del cofactor diguanosina monofosfato cíclico (c-diGMP); en presencia de c-diGMP, la celulosa sintasa aumenta su actividad en un factor de 200 veces. La diguanilato ciclasa sintetiza c-diGMP a partir de 2 moléculas de GTP, mientras la degradación requiere de la participación de dos enzimas, la fosfodiesterasa A que rompe el anillo del c-diGMP generando una molécula de diGMP lineal y la fosfodiesterasa B que cataliza la ruptura del diGMP y produce dos moléculas de 5' GMP (Figura 4).

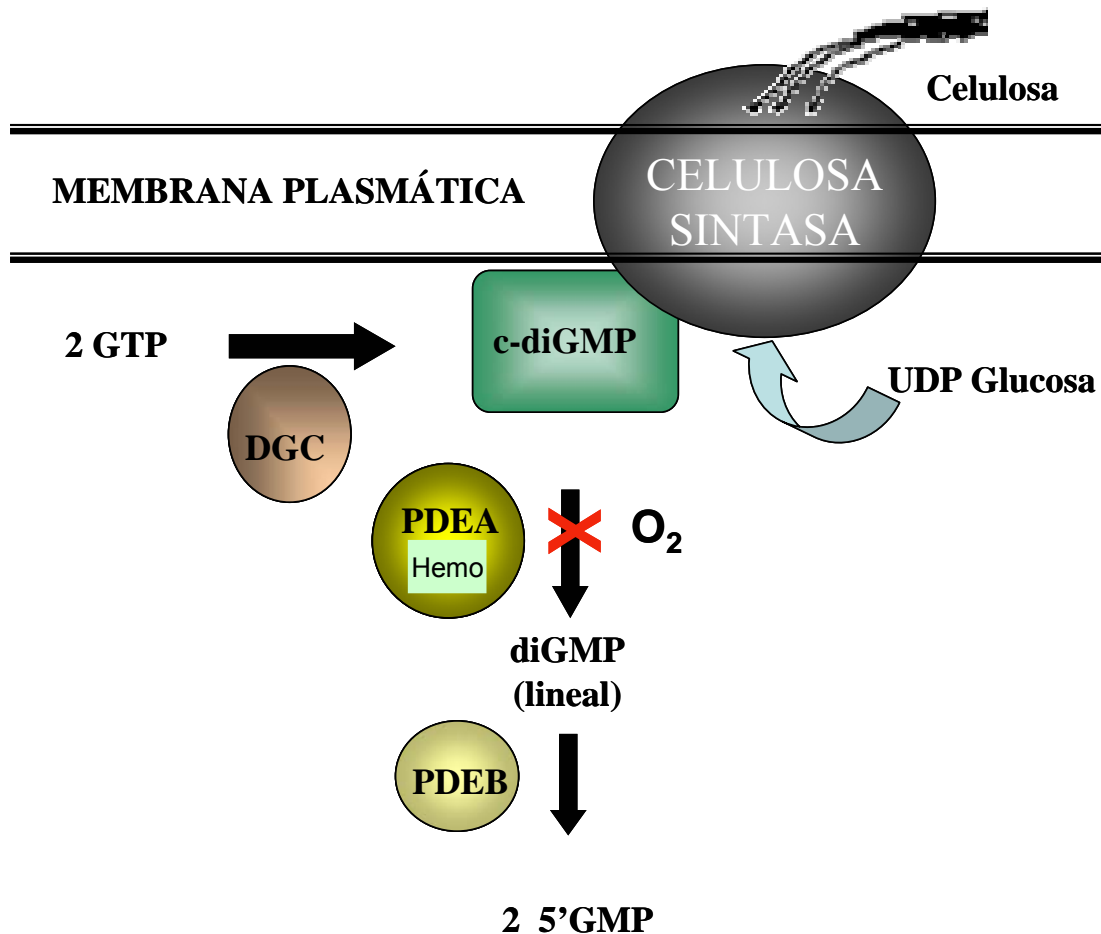


Figura 4. Regulación de la síntesis de celulosa por oxígeno. La concentración del cofactor es dependiente de la tasa de síntesis y degradación. Enzimas: diguanilato ciclasa (DGC); fosfodiesterasa A (PDEA); fosfodiesterasa B (PDEAB). Adaptado de Gilles-González, 2001.

---

Además de la participación del O<sub>2</sub> para cubrir los requerimientos de ATP en la síntesis de celulosa mediante la fosforilación oxidativa; el oxígeno también posee un papel fundamental en regular la concentración de c-diGMP disponible. Las enzimas diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa A comparten una homología estructural: ambas poseen dominios GGDEF y PAS. El dominio GGDEF está implicado en enzimas involucradas en la ciclización de GTP, mientras el dominio PAS está ampliamente distribuido en bacterias y se asocia con eventos de transducción de señales: luz, voltaje, potencial redox, oxígeno (Méndez-Ortiz y Membrillo-Hernández, 2004).

La PDEA funciona como un sensor cuyo extremo N-terminal posee un dominio PAS con un grupo hemo asociado, mientras su extremo C-terminal contiene el dominio de fosfodiesterasa. En condiciones aeróbicas el grupo hemo del dominio PAS se oxigena y la actividad de fosfodiesterasa disminuye significativamente, mientras en anaerobiosis el hemo desoxigenado aumenta la actividad de la fosfodiesterasa (Figura 4). En consecuencia, en condiciones aeróbicas los niveles de c-diGMP y por lo tanto de celulosa se incrementan debido a la baja actividad de la fosfodiesterasa A; sin embargo en anaerobiosis la alta actividad de fosfodiesterasa disminuye la concentración de c-diGMP y decae la síntesis de celulosa (Gilles-González, 2001).

Este peculiar sistema regulatorio conecta la síntesis de celulosa con el estado energético celular. La actividad de la diguanilato ciclasa está ligada a otros procesos dependientes de GTP como la síntesis de proteínas ó ácidos nucleicos. Por otra parte, la actividad de fosfodiesterasa está controlada por la tensión de O<sub>2</sub>, el cual al mismo tiempo es indispensable para el sistema respiratorio y en consecuencia para la generación de ATP requerido para la síntesis de celulosa. A la fecha poco se ha estudiado sobre la bioenergética de la bacteria, aunque se han reportado actividades de oxidasas membranales y contenido de citocromos (Matsuoka *et al.*, 1996).

Para *G. xylinum*, la síntesis de celulosa es un proceso costoso debido a los requerimientos de energía y fuente de carbono; sin embargo, la película de celulosa permite a la bacteria situarse cerca de la superficie del medio y obtener mayor acceso a los nutrientes y sobre todo al oxígeno indispensable para la síntesis de ATP.

---



#### 1.4. Aplicaciones biotecnológicas

La celulosa bacteriana generada por *G. xylinum* tiene cualidades únicas no presentes en la celulosa vegetal; es un producto de alta pureza que no posee lignina ni algún otro material presente en la celulosa de otras fuentes. La celulosa nativa posee un alto grado de hidrofiliidad, puede retener una cantidad de agua aproximada a 600 veces su peso seco. Estudios previos han mostrado que el 99% de la película de CB está constituida por agua (Yamanaka *et al.*, 1994).

La hidrofiliidad de la celulosa se debe a que las microfibrillas se ensamblan extracelularmente y el proceso de “cristalización” permite atrapar una enorme cantidad de líquido. Así mismo, la película formada posee una extensa área superficial interna que la faculta para interactuar con miles de moléculas de agua. Las propiedades únicas de la celulosa de origen bacteriano le permiten una variedad de aplicaciones en la industria cosmética, farmacéutica y biomédica (Cuadro I).

<b>Industria</b>	<b>Aplicaciones</b>
Turística	Ropa deportiva, equipo para acampar.
Textil	Material de alta retención acuosa.
Papel	Restauración de documentos, papel de alta calidad
Alimentos	Aditivo de alimentos, emulsificante, fibra dietética.
Refinería	Material para la absorción de aceites.
Maquiladora	Componente de partes y refacciones para autos, aviones, etc.
Tecnología	Diafragmas de alta sensibilidad en micrófonos y audífonos
Investigación	Inmovilización de proteínas y células, resinas para cromatografía
Medicina	Fabricación de “piel artificial” en terapia de quemaduras. Componente en implantes dentales.

Cuadro I. Aplicaciones industriales de la celulosa de origen bacteriano. Adaptado de Krystynowicz y Bielecki, 2003.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Sistemas respiratorios bacterianos

Las cadenas respiratorias transportan electrones a lo largo de la membrana y translocan protones a través de ella, generando un gradiente protón-motriz transmembranal que es utilizado para la formación de ATP vía la ATP sintasa ó para el transporte activo de solutos (Mitchell y Moyle, 1967; Escamilla *et al.*, 1999). En general, las cadenas respiratorias bacterianas tienen un arreglo modular, el cual pueden variar en función del medio ambiente (Figura 5).

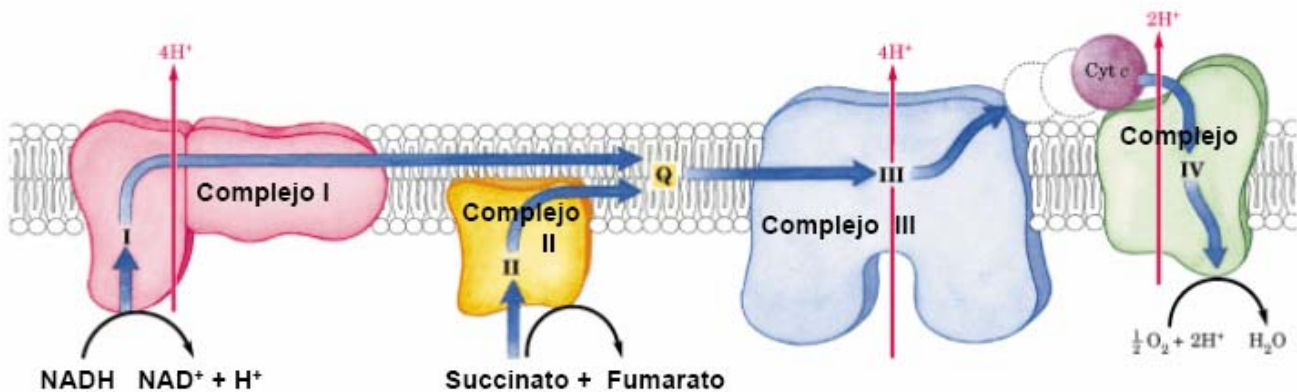


Figura 5. Composición general de una cadena respiratoria aeróbica (adaptado de Lehninger, 1993).

Los sistemas respiratorios en general contienen a la NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductasa (complejo III ó citocromo *bc<sub>1</sub>*) y la oxidasa terminal (complejo IV). Además, poseen componentes móviles que participan en el transporte de electrones, como las quinonas y el citocromo *c* soluble (Anraku y Gennis, 1987). Las bacterias además de las deshidrogenasas para NADH y succinato poseen una gama de deshidrogenasas que les permiten oxidar una amplia variedad de sustratos.

Todas las cadenas respiratorias conducen los electrones hacia un aceptor final que en la mayoría de los casos es el oxígeno; las enzimas que cataliza la reducción del  $O_2$  a  $H_2O$  se denominan oxidasas terminales. En ausencia de oxígeno, las bacterias emplean otros aceptores de electrones como fumarato, sulfato, nitrito ó nitrato y las enzimas que catalizan el proceso se denominan reductasas.

---

Las oxidasas terminales se pueden dividir en dos grupos importantes, las quinol oxidasas, que reciben los electrones directamente del quinol (quinona reducida) y las citocromo *c* oxidasas que reciben los electrones del quinol a través del complejo III y el citocromo *c* soluble (Anraku y Gennis, 1987). Las cadenas respiratorias conteniendo citocromos *c* oxidasas son más eficientes energéticamente por la incorporación de un sitio extra de bombeo de protones (complejo III) y aumentan la generación de gradiente protón-motriz.

Las bacterias poseen más de una oxidasa terminal que difieren en su afinidad por O<sub>2</sub>; esto les confiere una gran flexibilidad para la generación de energía, así, en respuesta a las variaciones en la concentración de O<sub>2</sub>, las bacterias expresan diferentes oxidasas terminales, que les permiten existir en un amplio intervalo de tensiones de O<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-6</sup> M). La función principal de los sistemas respiratorios es la producción de ATP, aunque también funcionan para generar calor y para disipar el exceso de poder reductor generado en el metabolismo.

## 2.2. Cadenas respiratorias de bacterias ácido acéticas

Las bacterias ácido acéticas son aerobias estrictas que metabolizan en forma incompleta azúcares y alcoholes mediante deshidrogenasas membranales. Este tipo de metabolismo ha sido empleado en múltiples procesos biotecnológicos para la obtención de: sorbosa (precursor biológico del ácido ascórbico), gluconato y ceto gluconato (de utilidad alimenticia y farmacéutica para la síntesis de ácido tartárico), de dihidroxiacetona (precursor usado en la industria cosmética), de biopolímeros (celulosa, acetan) y etanol. La utilidad más antigua y conocida de las bacterias ácido acéticas es la producción de vinagre, producto empleado como saborizante de alimentos o para su preservación (Gupta *et al.*, 2001; Deppenmeier *et al.*, 2002).

En general, la síntesis de compuestos de relevancia industrial (sorbosa, gluconato, dihidroxiacetona, etc.), dependen de enzimas deshidrogenasas membranales dependientes de PQQ (pirroloquinolin quinona). Las PQQ-deshidrogenasas aportan electrones en forma directa a la cadena respiratoria vía la quinona endógena (Martínez-Yee, 2005). Por su relevancia en la síntesis de los compuestos anteriores, las PQQ-deshidrogenasas han sido exhaustivamente estudiadas; sin embargo, existe poco conocimiento sobre la cadena respiratoria general y de la relación de las PQQ-deshidrogenasas con la bioenergética celular (Matsushita *et al.*, 1994). Las cadenas respiratorias estudiadas con profundidad en las bacterias ácido acéticas son las de *Gluconobacter suboxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter methanolicus* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Matsushita *et al.*, 1994; Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

---

---

### 2.2.1. *Gluconobacter suboxydans*

Los estudios realizados en *G. suboxydans* indican la presencia de citocromos de tipo *c*, *b* y *o* (Matsushita *et al.*, 1994). Los citocromos *c* de *G. suboxydans* corresponden a dos proteínas, la PQQ-alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH; citocromo  $c_{553}$ ) y la PQQ-aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH; citocromo  $c_{551}$ ), el  $c_{553}$  es de particular interés por su capacidad de unir monóxido de carbono como lo hacen los citocromos de alto spin de las oxidasas terminales, mientras los citocromos de tipo *b* y *o* son encontrados en la ubiquinol oxidasa terminal  $bo_3$ . Cuando *G. suboxydans* crece en un medio con alta concentración de azúcar, la bacteria posee altas actividades de oxidasa para los sustratos glucosa, etanol, acetaldehído, lactato y NADH (Ameyama *et al.*, 1987); estas actividades son enlazadas a la oxidasa terminal  $bo_3$  vía la quinona endógena (ubiquinona-10).

*G. suboxydans* no posee ninguna citocromo *c* oxidasa terminal aunque los estudios de inhibición con KCN muestran una cinética bifásica, lo cual indica la presencia de otra oxidasa diferente a la  $bo_3$ . La oxidasa en cuestión es resistente a cianuro, su naturaleza es desconocida debido a la carencia de señales espectrales específicas. Se postuló que la oxidasa insensible a cianuro recibe electrones a través del citocromo  $c_{553}$  de la enzima alcohol deshidrogenasa (Ameyama *et al.*, 1987); sin embargo, en el genoma reportado de esta bacteria existe el operon que codifica para una ubiquinol oxidasa terminal *bd*, lo cual explicaría la resistencia al cianuro (Prust *et al.*, 2005).

### 2.2.2. *Acetobacter aceti*

La cadena respiratoria de *A. aceti* está bien caracterizada; posee deshidrogenasas periplásmicas y citoplásmicas que donan electrones a la quinona endógena (ubiquinona-9), la cual transfiere los electrones a la oxidasa terminal. Las mayores actividades de oxidasa se reportan para los sustratos etanol, acetaldehído, glucosa, lactato y NADH; la bacteria posee actividad de ubiquinol oxidasa pero no existe actividad de citocromo *c* oxidasa.

*A. aceti* posee dos oxidasas terminales cuya expresión está regulada por la concentración de  $O_2$ . En condiciones de cultivo agitado, *A. aceti* expresa una oxidasa terminal de tipo  $ba_3$ ; en condición de cultivo estático, la bacteria posee la peculiaridad de producir celulosa y flota en la superficie del medio; bajo tales condiciones la bacteria expresa el mismo conjunto de deshidrogenasas membranales y el único cambio observable es la sustitución de la oxidasa terminal  $ba_3$  por una oxidasa  $bo_3$ , esto ocurre por sustitución promiscua del citocromo *a* por citocromo *o* en la misma ubiquinol oxidasa (Matsushita *et al.*, 1992a). Ambas enzimas son sensibles a cianuro.

---

---

### 2.2.3. *Acetobacter methanolicus*

*A. methanolicus* es la única bacteria ácido acética con capacidad de oxidar metanol. Al crecer en este alcohol, la bacteria posee alta actividad de metanol deshidrogenasa y gran cantidad de citocromo *c* soluble. La cadena respiratoria está compuesta por citocromos de tipo *c* y *b*, tiene actividad de ubiquinol oxidasa y citocromo *c* oxidasa (Frebortová *et al.*, 1997a; Matsushita *et al.*, 1992b).

La expresión de las oxidasas terminales se regula mediante las condiciones de cultivo, cuando *A. methanolicus* crece en metanol predomina la citocromo *c* oxidasa *co* mientras que creciendo en glicerol predomina la ubiquinol oxidasa *bo*<sub>3</sub>.

De esta manera la bacteria tiene dos sistemas respiratorios independientes para oxidar etanol y metanol. La cadena respiratoria de metanol oxidasa funciona con una enzima metanol deshidrogenasa y un citocromo *c* soluble que transfiere los electrones de la deshidrogenasa a la citocromo *c* oxidasa *co*. La cadena respiratoria de etanol oxidasa consiste de la enzima etanol deshidrogenasa y de ubiquinona-10 que transfiere los electrones a la ubiquinol oxidasa *bo*<sub>3</sub>.

### 2.2.4. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La cadena respiratoria de *G. diazotrophicus* es una de las mejor caracterizadas; está compuesta por múltiples deshidrogenasas membranales, algunas están orientadas hacia el citoplasma (NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa) y otras están orientadas hacia el espacio periplásmico como las PQQ deshidrogenasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y glucosa deshidrogenasa; Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

Todas las deshidrogenasas membranales donan los electrones hacia el conjunto de quinonas endógenas; esta bacteria posee principalmente ubiquinona-10 aunque existen trazas de ubiquinona-9 en la membrana plasmática; las quinonas a su vez ceden los electrones hacia la oxidasa terminal (Martínez-Yee, 2005).

El análisis espectroscópico y de HPLC en membranas identifica la presencia de citocromos de tipo *c*, *b*, *a* y *d*; no existe evidencia de citocromo tipo *o*. A pesar de que *G. diazotrophicus* posee un alto contenido de citocromo tipo *c*, no existe actividad de citocromo *c* oxidasa terminal y se han reportado al menos dos ubiquinol oxidasas terminales (Flores-Encarnación, 2001).

---

---

En *G. diazotrophicus* la regulación en la expresión de las ubiquinol oxidasas es peculiar, a diferencia de los sistemas regulados por concentración de O<sub>2</sub>, las oxidasas son controladas por la concentración de amonio. En condiciones de baja concentración de amonio la bacteria fija nitrógeno atmosférico y se expresa una ubiquinol oxidasa *ba*<sub>3</sub> mientras que en condiciones de alto amonio (no fijación) sustituye a la *ba*<sub>3</sub> por la ubiquinol oxidasa *bd* (Flores-Encarnación, 2001).

Además de la sustitución de oxidasa terminal, en condición de no fijación las actividades para las deshidrogenasas periplásmicas disminuyen considerablemente. Se comprobó que estas deshidrogenasas tienen un papel importante en la fijación de nitrógeno debido a que la alta tasa respiratoria consume el O<sub>2</sub> del medio lo que impide que éste afecte de manera irreversible a la enzima nitrogenasa (Flores-Encarnación, 2001), fenómeno conocido como “protección respiratoria”, el cual también ha sido reportado en *Azotobacter vinelandii* (Poole y Hill, 1997).

Las PQQ-deshidrogenasas periplásmicas para glucosa, alcohol y aldehído han sido purificadas y caracterizadas; la deshidrogenasa de alcohol es bifuncional oxidando alcoholes de cadena corta y aldehídos, contiene 4 citocromos de tipo *c* y el grupo prostético PQQ (Gómez-Manzo, comunicación personal). La aldehído deshidrogenasa es una enzima con dos subunidades que posee un citocromo de tipo *c* y el cofactor PQQ y es específica de aldehídos (González-Valdez, 2004), mientras la glucosa deshidrogenasa es un monómero que oxida hexosas y solo posee PQQ como grupo prostético.

La NADH deshidrogenasa citoplásmica se le identificó como una enzima de tipo I, por su sensibilidad a rotenona y resistencia a flavona; esta enzima está acoplada a la cadena respiratoria, bombea protones al espacio periplásmico y posee FMN como cofactor. La cadena respiratoria de la bacteria crecida en condiciones de fijación de nitrógeno cuenta además de la ubiquinol oxidasa *ba*<sub>3</sub> con otra oxidasa terminal la cual es resistente a cianuro (Flores-Encarnación, 2001). La naturaleza de esta oxidasa no ha sido determinada pero se descarta a una posible ubiquinol oxidasa *bd* por ausencia de señales espectroscópicas de citocromos de tipo *d* y de una oxidasa terminal alterna por su resistencia a los inhibidores específicos para este tipo de oxidasa como son propilgalato y ácido salicilhidroxámico (Martínez-Yee, 2005).

De esta manera, la cadena respiratoria de *G. diazotrophicus* está compuesta por deshidrogenasas membranales (periplásmicas y citoplásmicas); ubiquinona-10 y ubiquinol oxidasas terminales reguladas por la concentración de amonio en el medio de cultivo.

---

---

### 2.3. Cadena respiratoria de *Gluconacetobacter xylinum*

Los estudios de las propiedades bioenergéticas de esta bacteria han sido escasos, esto quizás causado a que la mayor parte de las investigaciones realizadas sobre *G. xylinum* se han enfocado a mejorar la producción de celulosa (Ross *et al.*, 1991) y a que existen serias dificultades para recuperar las células inmersas en la película de celulosa.

Los esfuerzos realizados en bioenergética mostraron la ausencia de la enzima fosfofructocinasa (enzima crucial en la vía Embden-Meyerhof) y la presencia del conjunto de enzimas que conforman la vía de las pentosas, del ciclo de ácidos tricarbóxicos y enzimas que permiten la síntesis de glucosa de novo (gluconeogénesis; Gromet *et al.*, 1957). Posteriormente, se identificó la presencia de ubiquinona-10 y citocromos de tipo *c*, *b* y *a* (Benziman y Goldhamer, 1968); y se purificó y caracterizó la enzima malato deshidrogenasa (Benziman y Galanter, 1964). El estudio más reciente, reporta las actividades de oxidasas para etanol, glucosa y acetaldehído así como la relación  $H^+ : O_2$  generada por cada sustrato (Matsuoka *et al.*, 1996).

A pesar de la relevancia del oxígeno como regulador de la síntesis de celulosa (Ross *et al.*, 1990; Gilles-González, 2001) y de su participación en la fosforilación oxidativa para cubrir los requerimientos de ATP (Klemm *et al.*, 2002), no existen reportes sobre la composición y regulación del sistema respiratorio de *G. xylinum*. En el presente estudio se realizó la caracterización del sistema respiratorio de *G. xylinum* crecido en condición de cultivo estático y agitado; se purificó y caracterizó a la enzima PQQ-alcohol deshidrogenasa e identificamos las oxidasas terminales presentes en ambas condiciones de cultivo.

### 2.4. La oxidación de alcohol en bacterias ácido acéticas

En bacterias la oxidación de alcoholes se lleva a cabo por la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual se puede clasificar en tres grandes grupos con base al cofactor: dependientes de NAD(P); dependientes de PQQ y citocromo *c*; y alcohol oxidasas dependientes de FAD (Gómez-Manzo *et al.*, 2005).

Las PQQ-alcohol deshidrogenasas se encuentran en bacterias Gram negativas de las clases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  proteobacterias; en general se encuentran en el periplasma en forma soluble ó asociadas a la membrana con su sitio activo orientado hacia el periplasma. Estas enzimas se dividen en tres grupos: PQQ-ADH tipo I que contiene PQQ como único grupo prostético y se le denomina quinoproteína; las PQQ-ADH tipo II (solubles) y tipo III (unidas a membrana) se

---

---

les nombra quinohemoproteínas dado que además de PQQ contienen uno o más moles de hemo C (Ameyama y Adachi, 1982a).

La metanol deshidrogenasa de *Methylobacterium extorquens* es una PQQ-ADH de tipo I que ha sido extensamente estudiada, su estructura fue descrita mediante difracción de rayos X (Protein Data Bank, número de acceso PDB 1H4I). Es una enzima con estructura tetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ), la subunidad  $\alpha$  tiene un Mr de 66 kDa y contiene el PQQ y un ión  $\text{Ca}^{+2}$  coordinado (Anthony *et al.*, 1994); la subunidad  $\beta$  con un Mr de 8.5 kDa posee una función estructural dado que la disociación de las subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  es irreversible y produce la desnaturalización de la enzima (Figura 6).

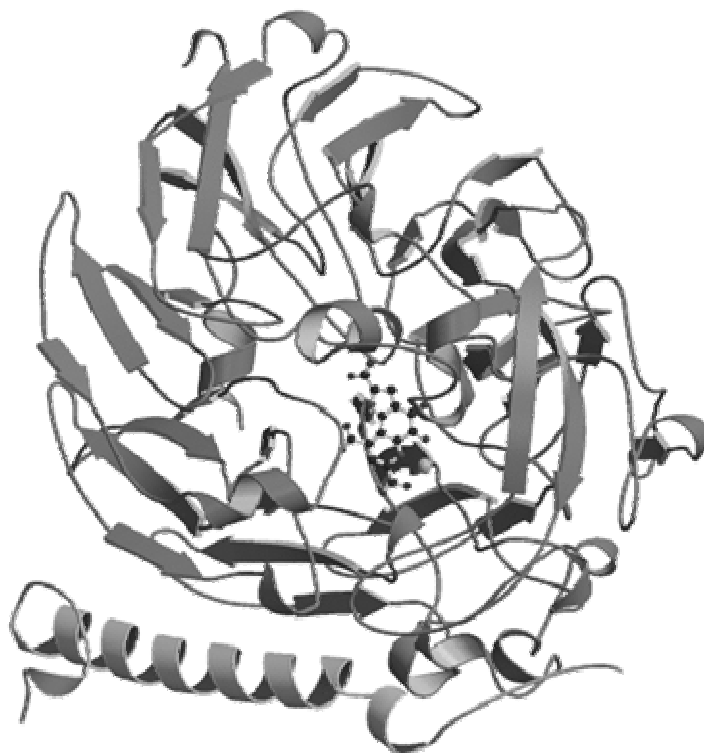


Figura 6. Estructura cristalográfica de la PQQ metanol deshidrogenasa de *M. extorquens*.

La enzima metanol deshidrogenasa presenta un plegamiento de propela que forma una estructura de "super barril", el cual consiste de ocho láminas  $\beta$ -antiparalelas, orientadas en forma radial alrededor de una cavidad central, lo cual asemeja a las aspas de una hélice. Las láminas antiparalelas conforman el "motivo W", dentro de la cavidad central se ubican el PQQ y el ión  $\text{Ca}^{+2}$  (McIntire, 1994). Esta enzima oxida metanol ( $K_m = 10 \mu\text{M}$ ) y con menor eficiencia otros alcoholes primarios; el grupo PQQ reducido transfiere los electrones al citocromo  $c_L$ , el cual interactúa con el citocromo  $c_H$  ó con azurina, los cuales donan sus

---



---

electrones a la citocromo oxidasa terminal *co*. Otras PQQ-ADHs tipo I son la etanol deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, la alcohol deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* y la butanol deshidrogenasa de *Pseudomonas butanovora* (Toyama *et al.*, 2004).

La PQQ-ADH tipo II es una enzima soluble presente en el periplasma, es una proteína monomérica que contiene una molécula de PQQ y de hemo C; se ha aislado de especies como *Comamonas testosteroni*, *Comamonas acidovorans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas butanovora* y *Ralstonia eutropha* (Jongejan *et al.*, 1998).

La PQQ-ADH de *C. testosteroni* (Figura 7, PDB 1KB0) se ha estudiado extensamente, esta proteína consiste de dos dominios funcionales; el amino terminal posee el sitio de unión a PQQ y  $\text{Ca}^{+2}$  mientras el carboxilo terminal posee un hemo tipo C unido covalentemente. Esta enzima oxida alcoholes primarios y aldehídos mediante el sitio activo conteniendo PQQ; el PQQ reducido transfiere los electrones al citocromo *c*, los cuales son acarreados por la proteína azurina a la citocromo oxidasa terminal (Toyama *et al.*, 2004).

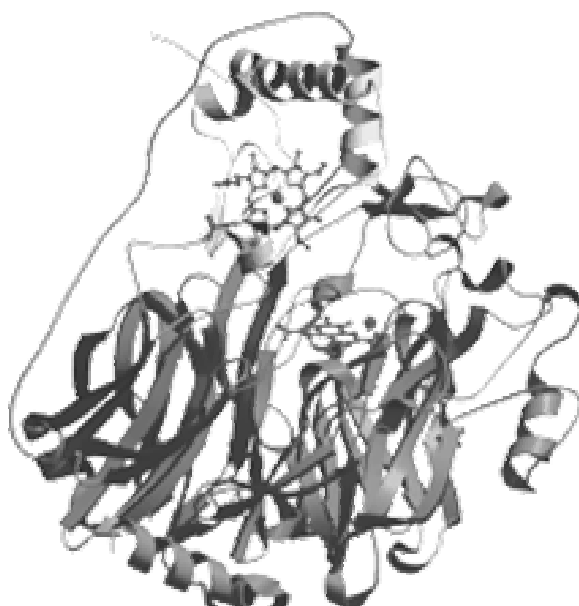


Figura 7. Estructura cristalográfica de la PQQ etanol deshidrogenasa de *C. testosteroni*.

La PQQ-ADH tipo III es una enzima unida a membrana; se ha aislado de bacterias ácido acéticas del género *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Acidomonas*. Es una enzima trimérica, la subunidad I (Mr de 72 a 85 kDa) posee el cofactor PQQ,  $\text{Ca}^{+2}$  y un hemo tipo C unido covalentemente; la subunidad II (Mr de 43 a 49 kDa) contiene tres hemos tipo C asociados; mientras la subunidad III (Mr de 14 a 17 kDa) no posee cofactor. Ninguna de las PQQ-ADH tipo III purificadas ha sido cristalizada.

---

---

La alcohol deshidrogenasa de *Gluconobacter suboxydans* es una de las PQQ-ADHs tipo III estudiadas a mayor detalle. La enzima está constituida por tres subunidades, una con Mr de 85 kDa con actividad de deshidrogenasa, tiene un hemo C enlazado covalentemente y se une mediante coordinación al grupo PQQ y al ion  $\text{Ca}^{+2}$ ; la segunda subunidad tiene un Mr de 49 kDa, contiene tres moles de hemo C que participan en la transferencia de electrones además de un dominio de unión a membrana; la tercera subunidad posee un Mr de 14 kDa y su función es desconocida aunque se postula que actúa como chaperonina. El aceptor de electrones natural es la ubiquinona endógena. Esta enzima cataliza la oxidación de etanol y la subsecuente reducción de la quinona endógena, la cual entrega los electrones a la ubiquinol oxidasa terminal. La oxidación del alcohol requiere de las subunidades I y II, mientras la actividad de ubiquinona reductasa se encuentra en la subunidad II.

La alcohol deshidrogenasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* es una enzima anclada a membrana y a diferencia de otras PQQ-ADHs tipo III solo posee dos subunidades: la subunidad I tiene un Mr de 71 kDa, posee el grupo PQQ y un citocromo *c*, la subunidad II con un Mr de 44 kDa tiene tres citocromos tipo *c*; estas características son similares a la PQQ-ADH de *Acetobacter polyoxogenes* (Tayama *et al.*, 1989).

La PQQ-ADH de *G. diazotrophicus* posee una alta afinidad por etanol ( $K_m = 0.27 \text{ mM}$ ) y puede oxidar alcoholes primarios y secundarios; es una enzima atípica que oxida aldehídos (Gómez-Manzo, comunicación personal).

Para las bacterias ácido acéticas, la PQQ alcohol deshidrogenasa tiene una importante participación fisiológica, la rápida oxidación de etanol produce una alta concentración de ácido acético en el medio, el cual es sumamente tóxico para muchos otros microorganismos y le permite conservar su nicho. Otra función es la generación de energía mediante el acoplamiento a la cadena respiratoria.

---

---

### III. HIPÓTESIS

Diferentes componentes citocrómicos y oxidasas terminales serán expresados en *Gluconacetobacter xylinum* cuando la bacteria se cultive en condiciones estáticas ó agitadas, ya que la concentración de oxígeno y la cinética de crecimiento regulan la expresión del sistema respiratorio.

---

---

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

- Definir la organización, composición y expresión del sistema respiratorio de *G. xylinum* en cultivo estático y agitado.

### 4.2 Objetivos Específicos

- I. Desarrollar un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *G. xylinum* en cultivo estático y una metodología eficiente para la recuperación de la biomasa.
  - II. Identificar y cuantificar los componentes citocrómicos y la(s) oxidasa(s) terminal(es) expresadas de la cadena respiratoria bajo condiciones de cultivo estático y cultivo agitado.
  - III. Caracterizar el sistema respiratorio mediante el empleo de inhibidores de sitio específico.
  - IV. Elaborar un esquema sobre la organización del sistema respiratorio de *G. xylinum* en cultivo estático y agitado.
-

---

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Microorganismo y condiciones de cultivo

*Gluconacetobacter xylinum* IFO 13693 fue donada por el Dr. Wilfredo Barraquio (Instituto de Biología, Universidad de Filipinas). La cepa se mantuvo en medio base (medio-B) conteniendo (g/l): sacarosa, 40.0; extracto de levadura, 5.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.0 y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05, a pH de 6.0 (Watanabe y Yamanaka, 1995); la cepa se preservó en medio-B adicionado con glicerol al 10% (v/v).

#### 5.1.1. Condiciones de cultivo y optimización del rendimiento celular

La optimización del medio-B siguió un procedimiento secuencial: se modificó la fuente de carbono, capacidad amortiguadora y fuente de nitrógeno. La mejor condición en cada parámetro evaluado se empleó en el siguiente paso de optimización, todas las fuentes de carbono se probaron al 4% (p/v); la capacidad amortiguadora se varió en el rango de 20 a 200 mM de fosfato de potasio y la fuente adicional de nitrógeno se probó al 1% (p/v). El inóculo se generó en matraces Erlenmeyer conteniendo 1 L de medio incubado a 30 °C, con agitación de 100 rpm por 24 h.

La optimización del rendimiento celular para cultivo estático se realizó en matraces Fernbach de 2 L conteniendo 0.5 L de medio-B modificado; se adicionó 50 ml de inóculo a cada matraz y se incubó por 10 días a 30 °C. Se adicionó etanol al 1.4% (v/v) en todas las condiciones probadas (Krystynowicz *et al.*, 2002). Posteriormente, para aumentar la obtención de biomasa, los cultivos se realizaron en charolas de aluminio (45 x 35 x 8 cm) con 1 L de medio optimizado (medio BEGG) incubadas en las mismas condiciones (Chávez-Pacheco *et al.*, 2005).

Para el cultivo agitado la bacteria se cultivó en un fermentador de 80 L (Bioflo 5000, New Brunswick) conteniendo 60 L de medio BEGG. Los inóculos se generaron en 4 matraces Fernbach conteniendo 1 L de medio BEGG, se incubaron a 150 rpm, 30 °C por 24 h. Los 4 L de inóculo activo se emplearon para inocular el fermentador, este cultivo se incubó por 48 h a 30 °C, con agitación de 100 rpm y flujo de 4 L de aire por L de medio por min (Flores-Encarnación, 2001).

---

---

### 5.1.2 Recuperación de células de *G. xylinum* de cultivo estático y agitado

Cultivo estático: las películas de celulosa se resuspendieron en 2 L de amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.0 y se homogenizaron (6 ciclos de 30 s, con 5 min de descanso entre ciclos) en una licuadora industrial a 4 °C. La suspensión obtenida se filtró a través de fieltro y se centrifugó a 8,670 g por 10 min. La celulosa retenida fue sujeta a una segunda ronda de homogeneización. La biomasa recuperada de las dos rondas se lavó con amortiguador de fosfatos 100 mM y se cuantificó en peso húmedo, la biomasa total se almacenó a -70 °C hasta su uso. Para los experimentos de recuperación celular, el amortiguador de fosfatos se suplementó con NaCl 0.1 M ó Tween 20 al 0.1% (v/v). Los residuos de celulosa se colocaron en NaOH 0.5 M por 30 min, a 100 °C, se lavaron con abundante agua y se cuantificó la celulosa en peso seco después de 5 h a 80 °C (Son *et al.*, 2001).

Cultivo agitado: la biomasa generada después de las 48 h de cultivo se recuperó mediante filtración del medio de cultivo a través de malla de fieltro; las células fueron separadas del filtrado mediante una centrifuga de flujo continuo (Sharpless Co.). La biomasa recuperada se lavó dos veces con amortiguador y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

### 5.1.3. Obtención de membranas

Para la obtención de membranas las células de cultivo estático ó agitado fueron procesadas por ruptura mecánica mediante perlas de vidrio (150 -212  $\mu\text{m}$ ) en un Bead-beater, todo el proceso se realizó a 4 °C. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos y se adicionó una pizca de PMSF y una pastilla inhibidores de proteasas (Complete<sup>®</sup>, Roche<sup>™</sup>). Se aplicaron de 13 a 14 pulsos de 30 s, con descansos de 5 min. (Martínez-Yee, 2005). La suspensión celular se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min para separar los desechos celulares se recuperó el sobrenadante que se centrifugó a 40,000 rpm por 40 min. Las membranas se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos 100 mM conteniendo 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  y 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ .

### 5.1.4. Cuantificación de proteína.

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry modificado empleando albúmina de suero bovino como proteína estándar (Markwell *et al.*, 1981).

---

---

## 5.2. Actividades respiratorias y análisis espectroscópico

Las actividades de oxidasa se determinaron con un electrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark. Las muestras (0.1 mg de proteína membranal) fueron resuspendidas en amortiguador de fosfatos 100 mM, (pH 6.0 ó 7.4) a un volumen final de 2 ml. La reacción se inició por adición del sustrato a una concentración final para glucosa, etanol, acetaldehído y succinato de 10 mM y 5 mM para NADH. Se midió la respiración en presencia de donadores artificiales de electrones: ascorbato (7.5 mM) más TMPD (0.05 mM) ó ascorbato (7.5 mM) más TCHQ (3.5 mM) (Flores-Encarnación, 2001).

Las actividades de deshidrogenasas se determinaron por espectrofotometría mediante dos procedimientos:

Procedimiento 1. Se utilizó diclorofenol indofenol como aceptor final de electrones; la mezcla de reacción se ajustó a 1 ml conteniendo: amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 6.0 ó 7.4); KCN, 1.5 mM; DCPIP, 80  $\mu$ M; PMS, 0.6 mM; sustratos (glucosa, etanol ó acetaldehído a 10 mM; NADH, 0.1 mM sin adición de PMS). La reacción se inició por adición de 0.03 mg de proteína membranal y se midió el cambio de absorbancia a 600 nm. La actividad se cuantificó en nanomoles de DCPIPH<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

Procedimiento 2. Mediante la reducción de ferricianuro de potasio; la mezcla de reacción se ajustó a 1 ml conteniendo: amortiguador de fosfato y citrato, pH 6.0; KCN, 1.5 mM; ferricianuro de potasio, 10 mM; etanol, 10 mM. La reacción se inició por adición de 10  $\mu$ L de muestra y se incubó por 20 min, a 30 °C. Posterior a la incubación la reacción se detuvo por adición de 0.5 ml de dupanol (FeCl<sub>3</sub>, 5 g; dodecil sulfato de sodio, 3 g y ácido fosfórico al 85%, 95 ml; aforados a 1 L con agua) y 3.5 ml de agua, la mezcla se incubó por 10 min, y se determinó la absorbancia de la solución a 660 nm (Ameyama y Adachi, 1982a).

Para el análisis espectral, las membranas (5 mg de proteína) se resuspendieron en amortiguador de fosfato 100 mM, pH 6.0 conteniendo polietilenglicol 3,350 al 25% (v/v) y los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro SLM DW2000 Olis conversión a 77 K con celdas de 2 mm de paso de luz. Las membranas se redujeron con una pizca de ditionita de sodio, 5 mM de NADH ó 10 mM de cualquier otro sustrato empleado y se incubaron por 20 min, las referencias se oxidaron con persulfato de amonio. Los espectros diferenciales reducido menos oxidado se obtuvieron por sustracción. El espectro diferencial de cianuro se obtuvo mediante adición de 5 mM de KCN a la muestra reducida.

---

---

El espectro diferencial de CO obtuvo por reducción de las membranas con ditionita ó sustrato y posterior burbujeo con monóxido por 5 min previo a su congelación (Flores-Encarnación *et al.*, 1999). El espectro diferencial de monóxido se obtuvo por sustracción matemática del espectro de monóxido menos el espectro reducido.

El espectro de fotodisociación se obtuvo a partir de la muestra reducida y burbujeada con monóxido (espectro pre-fotólisis). Posteriormente, la muestra fue sometida a fotólisis con tres disparos de flash fotográfico y el espectro fue obtenido (espectro post-fotólisis). El diferencial de fotodisociación se obtuvo por resta del espectro pre-fotólisis al espectro post-fotólisis (Kelly *et al.*, 1993).

La concentración de citocromos se determinó a partir de espectros diferenciales reducido menos oxidado ó diferenciales de monóxido realizados a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401. Los coeficientes de extinción molar empleados fueron: citocromo *b* (560-575 nm)  $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; citocromo *c* (554-540 nm)  $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; citocromo *d* (630-650 nm)  $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; citocromo *a*-CO (590-605 nm)  $8.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 5.3. Efecto de inhibidores de sitio específico sobre la actividad de oxidasa

Se determinó el efecto de diferentes inhibidores de la NADH deshidrogenasa (rotenona y flavona), sobre las PQQ deshidrogenasas periplásmicas (antimicina, mixotiazol, estigmatelina) y del KCN sobre la oxidasa terminal. La mezcla de reacción estuvo constituida por: amortiguador de fosfatos 100 mM, (pH 6.0 ó 7.4), suspensión membranal (50 – 100  $\mu\text{g}$  de proteína) y el inhibidor a diferentes concentraciones. Las membranas obtenidas se incubaron con el inhibidor (3 min), la reacción se inició por adición del sustrato (10 mM) y se determinó el consumo de oxígeno en cada ensayo.

### 5.4. Electroforesis desnaturizante en gel (SDS PAGE) y gel nativo

La electroforesis desnaturizante se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970). El gel de resolución se preparó al 10% de acrilamida, conteniendo (%): glicerol, 8.0; SDS, 1.0; persulfato de amonio, 0.028; TEMED, 0.074 y Tris-HCl 375 mM, pH 8.9. El gel concentrador se realizó al 4.5% de acrilamida, el cual contuvo (%): glicerol, 8.0; SDS, 1.0; persulfato de amonio, 0.066; TEMED, 0.05 y Tris-HCl 125 mM, pH 6.8. Las muestras se diluyeron en la mezcla de digestión (%): SDS, 5.0;  $\beta$ -mercaptoetanol, 3.0;

---



---

glicerol, 15.0 y Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, las muestras en mezcla de digestión se pusieron a ebullición por 3 min. El amortiguador de corrida estuvo compuesto de (%): glicina, 1.44; Tris-HCl 0.302; SDS, 1.0; la electroforesis se realizó a 20 mA de corriente constante y a temperatura ambiente.

La electroforesis nativa en gel al 10% se practicó como se describió anteriormente, se sustituyó el SDS por Tritón X-100 al 0.1% en el gel de concentración, gel de resolución y el amortiguador de corrida. Las muestras fueron diluidas en Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 conteniendo Tritón X-100 al 0.1% y aplicadas al gel. La electroforesis se realizó a 20 mA de corriente a 4 °C. La tinción de proteínas se realizó con azul de Coomassie R250 en solución de metanol (20% v/v), ácido acético (7% v/v) y agua.

#### **5.4.1. Zimografía de actividad de deshidrogenasa en gel nativo**

Las actividades enzimáticas de alcohol y aldehído deshidrogenasa se determinaron en gel nativo. El gel se sumergió en 200 ml de amortiguador de McIlvane, pH 6.0; 28 mg de PMS y 8 mg de azul de nitrotetrazolio, se incubó en oscuridad por 20 min con agitación suave, la reacción se inició por adición del sustrato (etanol ó acetaldehído, 100 mM concentración final), la reacción se detuvo por adición de ácido acético al 7% (Adachi *et al.*, 1978). La reacción positiva de deshidrogenasa se evidenció por la aparición de bandas en tono azul.

#### **5.4.2. Detección de citocromo tipo c en SDS-PAGE**

El gel se sumergió en 120 ml de acetato de sodio (250 mM, pH 5.0) más 80 ml de solución metanólica de tetrametilbencidina (18 mg). La mezcla se incubó por 2 h en oscuridad, con agitación suave a temperatura ambiente (Thomas *et al.*, 1976). La presencia de citocromos tipo c se reveló por adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM). La reacción se detuvo adicionando al gel, 100 ml de acetato de sodio (250 mM, pH 5.0) con isopropanol al 30%.

---

---

## 5.5. Extracción de hemos y espectros de hemocromos de piridina

Las membranas se trataron con acetona de acuerdo al método reportado por Puustinen y Wikström (1991), brevemente: 40 mg de proteína membranal se lavaron con amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4 conteniendo KCl, 0.4 M; EDTA, 1 mM; desoxicolato de sodio en relación de 0.1 mg de detergente por mg de proteína membranal. Las membranas lavadas se resuspendieron en 5 ml de acetona básica (acetona 90%, NH<sub>4</sub>OH 10 mM), se agitaron suavemente y se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min. El procedimiento se repitió 5 veces.

El sedimento se trató con acetona ácida (acetona 90%, HCl 5%, H<sub>2</sub>O 5%) por tres ocasiones (volúmenes de 50, 20 y 10 ml, respectivamente) bajo el siguiente protocolo: el sedimento se resuspendió en acetona ácida y se incubó por 10 min en hielo y 10 min a temperatura ambiente bajo total oscuridad; posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min. Los volúmenes de extracción se colectaron en un frasco ámbar y el sedimento membranal se preservó a – 20 °C hasta su uso.

Los hemocromos de piridina se prepararon por resuspensión del sedimento membranal en solución de piridina al 10% conteniendo KOH 100 mM, el mismo proceso se realizó para el residuo de membranas del tratamiento con acetona ácida. Las muestras se redujeron con ditionita y oxidaron con persulfato de amonio como se reportó en la metodología de análisis espectroscópico (.).

## 5.6. Determinación de hemos por HPLC

La composición de hemos presentes en la membrana de *G. xylinum* fue determinado mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa. Los hemos fueron extraídos mediante el procedimiento de acetona ácida descrito previamente y se resuspendieron en acetonitrilo conteniendo ácido trifluoroacético al 0.5%. La solución fue aplicada a una columna de C<sub>18</sub> (Deltapak, Waters) fase reversa usando un cromatógrafo de líquidos (Waters Chromatography System); los grupos hemo se eluyeron en gradiente de acetonitrilo-agua (Lubben y Morand, 1994). La calibración se realizó con los siguientes estándares: hemo B y O extraídos de membranas de *Escherichia coli* cultivada en alta aeración (expresión de oxidasa *bo*); hemos B y D obtenidos de membranas de *E. coli* cultivada en condición de microaerofilia (expresión de oxidasa *bd*); hemos B y A extraídos de membranas de *Bacillus cereus* y protoporfirina IX comercial (protohemo B, Sigma).

---

---

## 5.7. Microscopía electrónica de barrido

Muestras de celulosa bacteriana y células provenientes de cultivos estáticos fueron sometidas a microscopía electrónica. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5% (v/v) en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0), seguido de tetraóxido de osmio al 1%. Las muestras fijadas se lavaron con fosfato de potasio 100 mM (pH 7.0) y se deshidrataron por adición de etanol (gradiente de 30 a 100% v/v). Las preparaciones se secaron a punto crítico y se practicó la tinción de oro para su visualización en un microscopio de barrido JEOL JSM-5410LV (Molinari *et al.*, 1998).

## 5.8. Purificación de la PQQ alcohol deshidrogenasa

### 5.8.1. Extracción de la enzima a partir de membranas

La purificación se realizó a partir de membranas de células de cultivo estático, las cuales se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 10 mM (10 mg proteína/ml concentración final); se adicionó Tritón X100 al 0.5% (v/v) y se mantuvo con agitación suave por 2 h a 4 °C. La suspensión membranal se centrifugó a 30,000 rpm, 4 °C durante 40 min el sobrenadante (solubilizado) contuvo la enzima de interés y se empleó para la separación cromatográfica. Se cuantificó la proteína del solubilizado y se determinó la actividad de alcohol deshidrogenasa mediante espectrofotometría empleando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones.

### 5.8.2. Cromatografía

El procedimiento de purificación se basó en los resultados obtenidos para la PQQ-ADH de *G. diazotrophicus* (Gómez-Manzo, comunicación personal). La separación cromatográfica se realizó en resinas de intercambio iónico (QAE Toyopearl y DEAE Toyopearl), de afinidad (HA Ultrogel) y de filtración molecular (Sephacryl S200). Todas las resinas se equilibraron con amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 6.0) conteniendo Tritón X100 al 0.1% (v/v). En cada paso de purificación se determinó la proteína y la actividad de deshidrogenasa por el método de ferricianuro.

El solubilizado de Tritón X100 al 0.5% se aplicó a una columna de QAE Toyopearl (22 cm de largo por 2.5 cm de diámetro; 125 ml de volumen de columna). La columna se lavó con amortiguador de fosfatos 10 mM con Tritón X100 al 0.1%. Se midió la absorbencia a 280 nm (proteína) y a 405 nm (citocromos), así como la actividad enzimática con ferricianuro

---

---

durante todo el proceso de purificación. La enzima no interacciona con la resina a pH 6.0 y fue recuperada en el volumen de lavado.

La fracción recuperada se aplicó a una columna de DEAE Toyopearl (22 cm de largo por 2.5 cm de diámetro; 125 ml de volumen de columna). La muestra adsorbida fue eluída mediante la adición de 200 ml de NaCl 100 mM. La presencia de la enzima se determinó como en la columna anterior, las fracciones con actividad fueron mezcladas. La mezcla se concentró con polietilenglicol 8,000 y se dializó contra 100 veces su volumen en amortiguador de fosfatos 10 mM y Triton X100 al 0.1% por toda la noche.

La muestra dializada se aplicó a una columna de HA Ultrogel (22 cm de largo por 2.5 cm de diámetro; 100 ml de volumen de columna). La columna fue eluída con un gradiente lineal de fosfatos (10 - 250 mM). Las fracciones conteniendo la PQQ alcohol deshidrogenasa fueron mezcladas y concentradas por filtración empleando tubos Centricon 30 con filtro de 30,000 daltons (Amicon™).

El paso final de purificación se realizó en una columna de Sephacryl S200 (58 cm x 5 cm de diámetro, 380 ml de volumen interno), la muestra concentrada fue aplicada a la columna y se lavó con amortiguador de fosfatos 10 mM y Tritón X100 al 0.1%. Las fracciones con actividad de alcohol deshidrogenasa se mezclaron y concentraron en un filtro Centricon 30 para su caracterización.

### 5.9. Titulación potenciométrica de citocromos de la PQQ alcohol deshidrogenasa

La titulación potenciométrica de la enzima (300  $\mu$ g) se realizó a temperatura ambiente en 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 Tris-HCl 50 mM (pH 6.0) conteniendo Tritón X100 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); PMS ( $E_{m7} = + 80$  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 reducción (500 a 600 nm); la reducción de citocromo c se determinó mediante el diferencial de absorbancia:  $A_{554}$  menos  $A_{540}$ .

---

---

### 5.10. Cinética de oxidación de etanol por la PQQ alcohol deshidrogenasa

Para determinar la liberación del acetaldehído del sitio activo de la enzima se empleó el reactivo tiosemicarbazida; este compuesto reacciona con el aldehído generando una tiosemicarbazona (Djurdjic y Stojanovic, 1998). El ensayo se realizó en celdas de cuarzo (500  $\mu$ l de volumen) herméticamente selladas y unidas mediante un conducto de látex.

A la celda de reacción (celda 1), se adicionó 300  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos pH 6.0 (10 mM), PQQ-ADH purificada (6  $\mu$ g), DCPIP (0.8 mM) y PMS (0.06 mM); la reacción se inició por adición de etanol (20 mM). La celda 2 contenía 300  $\mu$ l de solución de tiosemicarbazida (5 mM) en amortiguador de fosfatos pH 6.0 (50 mM); la tiosemicarbazida reaccionó con el acetaldehído formando una carbazona con absorbancia específica a 260 nm. La actividad de alcohol deshidrogenasa se realizó mediante la cinética de diclorofenol indofenol ( $Abs_{600}$ ); la formación de la tiosemicarbazona fue verificada a 260 nm, para este ensayo se añadió un exceso de diclorofenol indofenol (3 mM) con la finalidad de aumentar el tiempo de oxidación del etanol. Se realizó un control negativo sin enzima y un control positivo con acetaldehído grado reactivo (20 mM) a la celda de reacción.

Ante la ausencia de un coeficiente de extinción molar para la tiosemicarbazona se realizó una curva de calibración estándar para cuantificar el acetaldehído liberado durante la reacción (Djurdjic y Stojanovic, 1998).

### 5.11. Efecto de inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* sobre la PQQ alcohol deshidrogenasa

Para discernir el sitio de acción de los inhibidores se recurrió a un ensayo cinético de reducción de citocromos en presencia de los inhibidores. Brevemente, a una celda de espectro se adicionó la enzima (75  $\mu$ g), se añadió ferricianuro de potasio (2 mM) y se trazó el espectro de oxidación. Se agregó el inhibidor (100  $\mu$ M) y la mezcla se incubó por 10 min; la cinética de reducción se inició por adición de etanol (10 mM) y se graficó el diferencial de absorbancia 554 nm menos 540 nm.

Al finalizar el ensayo se trazó el espectro de reducción con etanol, para alcanzar la máxima reducción de citocromos se adicionó una pizca de ditionita y se trazó el espectro de reducción con ditionita. Se realizó un ensayo control de reducción con etanol sin inhibidores; en cada ensayo se calculó el porcentaje de reducción de citocromos con respecto a la reducción total con ditionita (100%).

---

---

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Optimización del medio de cultivo en condiciones estáticas

Es conocido que *G. xylinum* produce grandes cantidades de celulosa en forma de película sobre la superficie del medio de cultivo cuando se incubaba en condición estática; las células de esta bacteria viven dentro de la película de celulosa, lo cual dificulta su recuperación para su posterior estudio bioquímico. El problema inicial para el estudio del sistema respiratorio de *G. xylinum* que implica la obtención de una gran cantidad de biomasa se resolvió al modificar el medio de cultivo basal para aumentar el crecimiento bacteriano e implementar una metodología simple y eficiente para liberar y recuperar las células de la celulosa producida.

La bacteria crecida en medio-B produjo 0.28 g de biomasa y 0.81 g de celulosa por litro de medio (Figura 8A); con base en el reporte donde se indicó que la adición de etanol incrementa la síntesis de celulosa y biomasa (Krystynowicz *et al.*, 2002) decidimos adicionar etanol al 1.4% (v/v) al medio-B. La modificación impuesta aumentó significativamente el rendimiento celular (1.9 veces) con poco efecto sobre la producción de celulosa (1.1 veces, Figura 8A); a partir de este resultado el etanol fue adicionado a todos los medios probados subsecuentemente.

Posteriormente, la sacarosa del medio-B fue reemplazada por otras fuentes de carbono (Figura 8B), la sustitución de sacarosa por fructosa, sorbitol o lactosa no tuvo un efecto importante sobre el crecimiento celular ó la producción del polímero. El reemplazo de sacarosa por glucosa provocó un efecto positivo, incrementando 1.5 veces la síntesis de biomasa y de celulosa; como consecuencia la fuente de carbono para el medio-B modificado fue glucosa al 4% (p/v).

El análisis del pH de los medios mostró un descenso a pH 2.7 al final del cultivo, lo cual podría ser inhibitorio para el crecimiento bacteriano; con la finalidad de disminuir el descenso del pH se aumentó la concentración de fosfato monobásico. El incremento en el amortiguador tuvo poco impacto sobre el crecimiento celular (Figura 8C), sin embargo a 100 mM de fosfatos se obtuvo la mejor relación biomasa: celulosa, así mismo el pH final del medio de cultivo fue de 3.2. A partir de estos ensayos la concentración de fosfatos en el medio-B se incrementó a 100 mM.

---

---

Los medios de cultivo reportados para *G. xylinum* incluyen fuentes de nitrógeno complejas (Ramana *et al.*, 2000), en consecuencia se suplementó al medio-B con una fuente de nitrógeno secundaria. La adición de grenetina, sulfato de amonio ó hidrolizado de caseína al medio-B modificado no tuvo efecto sobre el crecimiento celular (Figura 8D) aunque todos ellos aumentaron la producción de celulosa (1.35, 1.9 y 1.35 veces, respectivamente). Por el contrario, el glutamato monosódico además de aumentar la producción de celulosa (1.3 veces) tuvo un fuerte efecto positivo sobre la biomasa (1.45 veces). Este resultado es congruente con estudios previos donde se reporta al glutamato como una buena fuente de nitrógeno para *G. xylinum* en condiciones de cultivo estático (Ramana *et al.*, 2000).

Las modificaciones impuestas al medio-B produjeron un notable incremento en la producción de biomasa (4.5 veces) y de celulosa (1.8 veces), con lo cual se obtuvo un medio de cultivo que, aunque incrementa ambos parámetros, privilegia el crecimiento bacteriano. Al medio-B optimizado se denominó medio BEGG, el cual contiene (g/l): glucosa, 40.0; extracto de levadura, 5.0; glutamato sodio, 10.0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5;  $KH_2PO_4$ , 13.6 y etanol, 1.4% (v/v); este medio generó 1.25 g de biomasa por litro de medio.

---

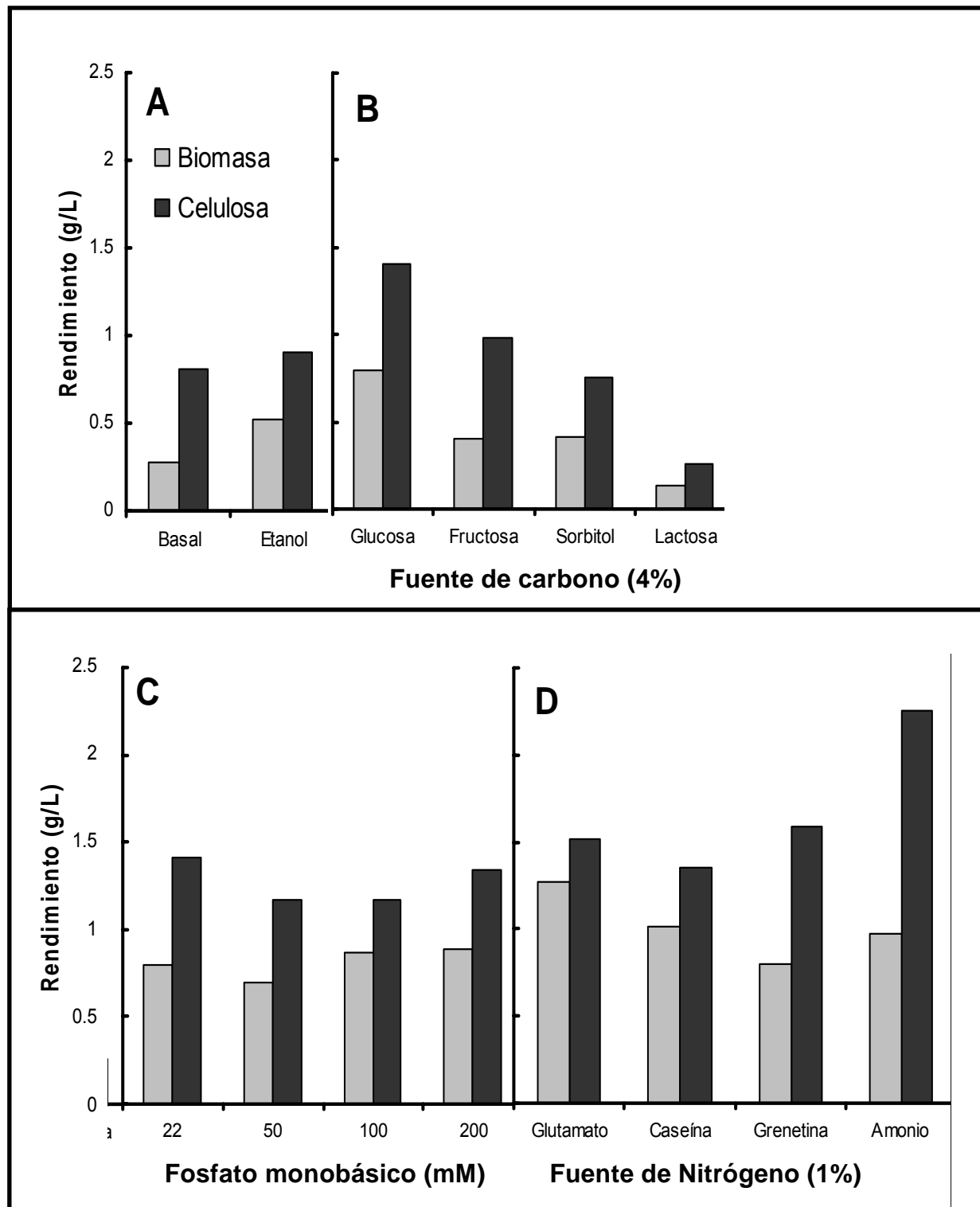


Figura 8. Optimización del medio de cultivo. Adición de etanol al 1.4% (A). Sustitución de sacarosa por otras fuentes de carbono (B). Incremento en la concentración de amortiguador de fosfatos (C). Adición de una fuente secundaria de nitrógeno (D).



---

### 6.1.1. Recuperación de biomasa de películas de celulosa

Las técnicas reportadas para liberar las células de las películas de celulosa son costosas ó ineficientes, dado que se basan en la desintegración de la película con enzima celulasa ó en la compresión de la película dejando una gran cantidad de células en la matriz de celulosa (Hwang *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2001), por lo tanto, decidimos desarrollar un procedimiento para recuperar la biomasa de cultivo estático. Las películas se procesaron en licuadora, la suspensión de celulosa se filtró a través de una malla de fieltro, el filtrado se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min, y el pellet celular se lavó con amortiguador de fosfatos como se describe en Materiales y Métodos. Este procedimiento duplica la recuperación obtenida por medio de compresión manual (Cuadro II).

Existía la posibilidad de que el tratamiento mecánico afectará de alguna manera a las células recuperadas. Para confirmar la integridad celular después del proceso de homogenización se utilizó la microscopía electrónica en muestras de celulosa nativa y procesada (Figura 9a, 7b); las micrografías mostraron a las células íntegras, sin embargo había una cantidad significativa de células liberadas formando agregados (Figura 9b), los cuales se retuvieron en la malla de fieltro.

Para prevenir la agregación observada se decidió probar la homogenización en presencia de detergente (Tween 20 al 0.1%, Figura 9c) para romper la agregación debida a interacciones de carácter hidrofóbico; así mismo, también se recurrió a un incremento en la fuerza iónica del amortiguador (NaCl 0.1 M, Figura 9d) para impedir las interacciones de naturaleza iónica. La adición de Tween 20 ó NaCl previno la formación de agregados e incrementaron la recuperación de biomasa mediante el procesamiento en licuadora. Las células recuperadas mediante amortiguador más NaCl 0.1 M presentan una morfología normal de acuerdo a la microscopía electrónica (Figura 9e) aunque se observaron pequeñas cantidades de celulosa no retiradas por la filtración.

---

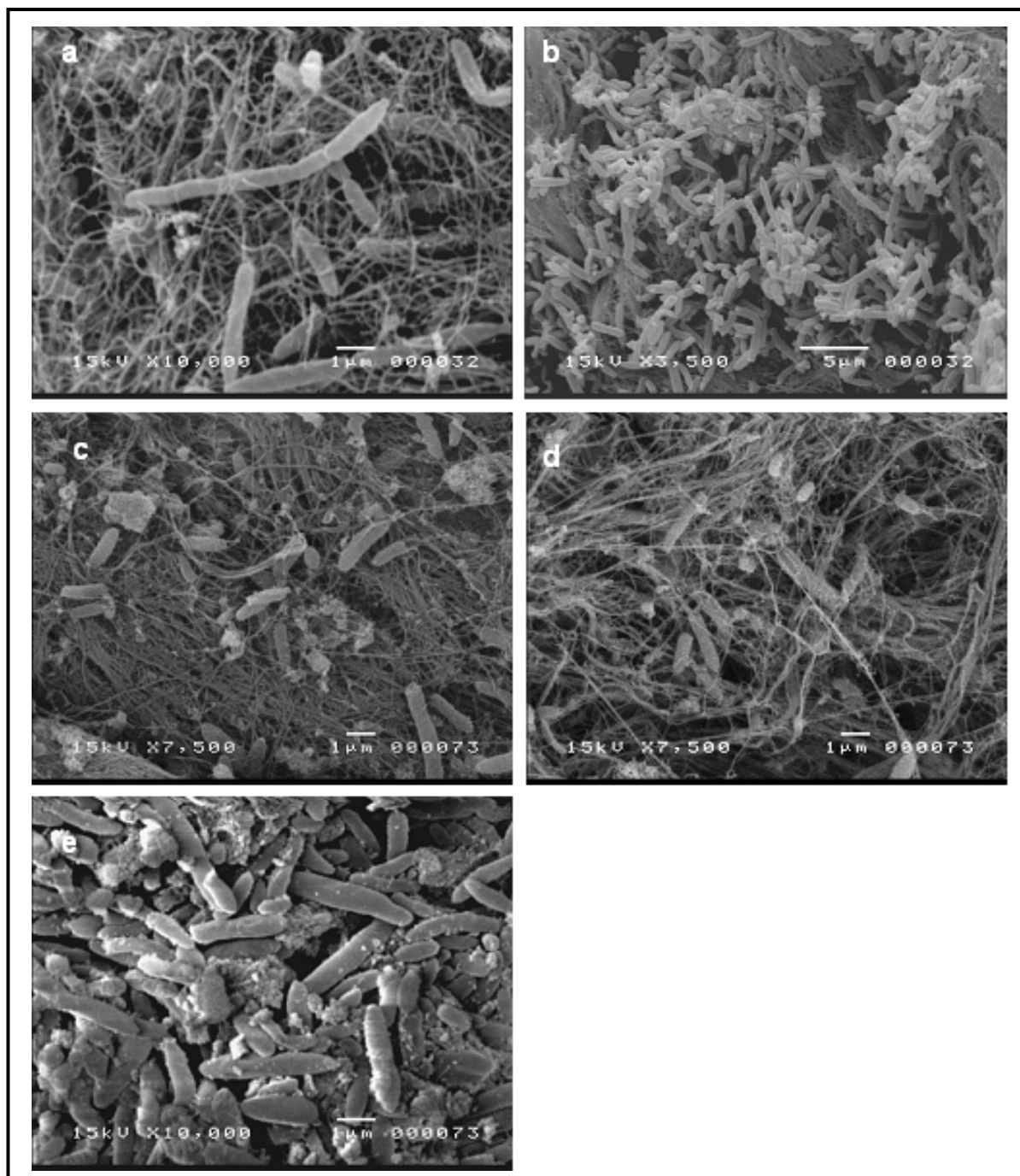


Figura 9. Microscopía electrónica de barrido de muestras de celulosa bacteriana y células liberadas de *G. xylinum*. (a) Micrografía de celulosa nativa y (b) de residuos obtenidos de la homogenización con amortiguador de fosfatos. (c) Residuos de celulosa obtenida después del tratamiento con amortiguador de fosfatos en presencia de Tween 20 al 0.1% ó con (d) NaCl 100 mM. (e) Células purificadas después del tratamiento en presencia de NaCl. La barra equivale a 1  $\mu\text{m}$  para todas las micrografías excepto en el panel (b) donde la barra equivale a 5  $\mu\text{m}$ .

Las células de *G. xylinum* obtenidas por los diferentes tratamientos se lavaron en amortiguador de fosfatos 100 mM y se determinó el consumo de O<sub>2</sub> estimulado por sustratos exógenos (acetaldehído, etanol y glucosa), los cuales son oxidados en el periplasma por enzimas deshidrogenasas dependientes de PQQ. Como se observa en el cuadro II, las células obtenidas por compresión manual mostraron mayor actividad de oxidasa, seguidas por el tratamiento mecánico en amortiguador de fosfatos y amortiguador más NaCl; las actividades determinadas en células obtenidas utilizando amortiguador suplementado con Tween 20 son ligeramente inferiores para todos los sustratos.

Como medida de integridad celular se midió el consumo de O<sub>2</sub> asociado a NADH, esta molécula es impermeable a la membrana plasmática y se oxida en el lado citoplásmico por el complejo I (Overkamp *et al.*, 2000). Los tratamientos de liberación mecánica mostraron un alto consumo de O<sub>2</sub> asociado a NADH, que podría deberse a un posible daño a la integridad membranal; sin embargo, la determinación de NADH oxidasa en células liberadas por compresión manual mostró un nivel de actividad similar a los observados en los tratamientos mecánicos (Cuadro II).

Tratamiento	Biomasa (g peso húmedo/l)	Consumo de O <sub>2</sub> (nmol O <sub>2</sub> /min mg)			
		Acetaldehído	Etanol	Glucosa	NADH
Compresión manual	1.1	80	23	8	30
Homogenización:					
Amortiguador	2.1	70	18	8	32
Amortiguador + NaCl	3.6	75	19	7	33
Amortiguador + Tween20	2.5	53	13	4	25

Cuadro II. Rendimiento de biomasa y respiración estimulada por sustrato en células liberadas de *G. xylinum* de películas de celulosa.

La oxidación de NADH por células enteras fue reportado previamente en *Methylophilus methylotrophus* (Patchet y Jones, 1986), donde resultó ser un artificio debido a que la bacteria oxidaba el etanol presente en el NADH comercial. Para descartar la oxidación del etanol contaminante se midió la oxidación específica de NADH mediante espectroscopia a 340 nm. La espectroscopia arrojó un valor de 52 nmol de NADH oxidado/ min mg de célula, valor ligeramente inferior a la actividad determinada por electrodo de Clark y permite identificar que la actividad de NADH oxidasa medida por oximetría es real.

---

La naturaleza de esta enzima es desconocida pudiéndose tratar de una NADH deshidrogenasa de tipo II, la cual no está acoplada a la cadena respiratoria y puede oxidar NADH exógeno.

Nuestros ensayos permitieron generar un método económico, confiable y práctico para la recuperación de *G. xylinum* a partir de películas de celulosa que supera a los métodos reportados en la literatura (Hwang *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2001).

Los resultados anteriores y la caracterización parcial de citocromos en células enteras se reportaron en el artículo **Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology**, el cual se publicó en el *Journal of Applied Microbiology* en Noviembre del 2005 (Anexo I).

## 6.2. Cinética de crecimiento de *G. xylinum* en condiciones estáticas y agitadas

El crecimiento de la bacteria en medio BEGG fue caracterizado bajo condición de cultivo estático (Figura 8A) y cultivo agitado (Figura 10B). En ambas condiciones de cultivo la bacteria presenta una cinética de crecimiento sigmoideal conteniendo fases lag, logarítmica y estacionaria de diferente duración. En condiciones estáticas y en congruencia con datos anteriormente reportados, se alcanzó la fase estacionaria en 7 días con un descenso de pH hasta 3.7, mientras en cultivo agitado la fase estacionaria se alcanzó a las 36 h con un pH final de 3.2. La abrupta disminución del pH es resultado de la excreción de ácido acético producto de la oxidación del etanol. La recuperación de biomasa de ambas condiciones de cultivo se practicó en fase estacionaria.

---

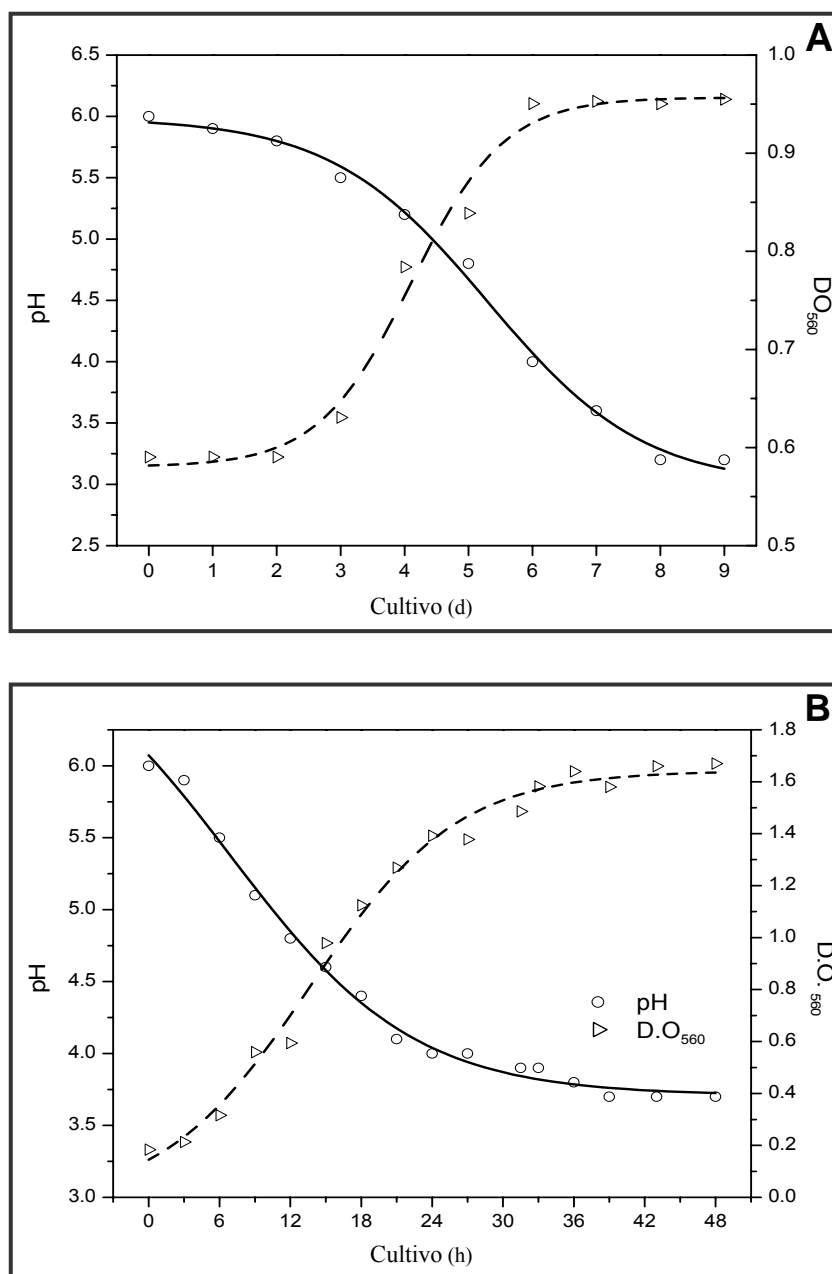


Figura 10. Cinética de crecimiento de *G. xylinum* en condición estática (A) y agitada (B). En ambas condiciones se determinó el crecimiento celular ( $DO_{560}$ ) y el pH ( $\circ$ ) del medio de cultivo.

---

### 6.3. Composición citocrómica del sistema respiratorio de *G. xylinum*

Con el incremento en el rendimiento celular y un método eficiente para recuperar la biomasa de cultivo estático, fue factible la obtención de una cantidad adecuada de membranas. Para efectos comparativos se cultivó a *G. xylinum* en condiciones agitadas empleando un bioreactor de 60 l. Las membranas de ambos cultivos se obtuvieron por ruptura con perlas de vidrio (ver Materiales y Métodos).

La determinación de componentes citocrómicos se realizó en preparaciones membranales de células crecidas en las dos condiciones mencionadas. Los espectros diferenciales realizados a 77K mostraron que *G. xylinum* expresa los mismos componentes citocrómicos en ambas condiciones de cultivo, sin embargo se observa un diferente nivel de reducción dependiente del sustrato empleado (Figura 11A, 9D), la reducción total de citocromos se alcanzó con ditionita de sodio.

Los diferenciales de reducción (con ditionita ó sustrato) menos el oxidado con persulfato, de membranas de cultivo estático y de cultivo agitado (Figura 11A y 9D, respectivamente), muestran la presencia de citocromos de tipo *b* (picos a 426, 532 y 562 nm) y *c* (picos a 423, 524 y 554 nm), así como de citocromos tipo *a* (hombro a 442 nm) y *d* (pico 635 nm, valle 654 nm). La adición de KCN 5 mM (diferencial de cianuro) mostró un claro efecto hipercrómico sobre el pico a 590 nm, indicando un aducto *a*-CN; mientras la ausencia de señal a 635 denota un aducto *d*-CN (Figura 11B, 9E).

El diferencial de monóxido de membranas de cultivo estático mostró señales para aductos *a*-CO (443 nm, valle; 593 nm, pico, Fig. 9C) y *d*-CO (625 nm, valle; 640 nm, pico, Figura 11C). El complejo *a*-CO fue disociado por luz (Figura 11C) como lo muestran las señales a 443 nm (pico) y 593 nm (valle); la fotodisociación del aducto *d*-CO no fue observada, probablemente debido a que las oxidasas *bd* no poseen Cu<sub>B</sub>, lo cual permite una rápida reasociación del monóxido al citocromo *d* reducido. Las mismas señales se observan en los diferenciales de monóxido y fotodisociación (Figura 11F) en membranas de cultivo agitado. Los diferenciales de monóxido también poseen señales de aductos *b*-CO (422, 556 nm) y *c*-CO (416, 523, 551 nm) (Figura 11C, 9F) aunque estos complejos no fueron disociados por luz.

Los hemos presentes en las membranas de cultivo estático y agitado fueron extraídos con acetona ácida (Puustinen y Wikström, 1991). La preparación extraída fue sometida a HPLC en columna C18 fase reversa y se eluyó mediante un gradiente de acetonitrilo. Los extractos obtenidos de cultivo estático y agitado mostraron un perfil cromatográfico similar; se observó la presencia de hemos de tipo D, B y A con trazas de hemo O (Figura 12). Los

---

tiempos de retención para los diferentes hemos fueron: hemo D, 22.09 min; hemo B, 23.2 min; hemo A, 27.9 min y hemo O, 31.9 min; la presencia en trazas del hemo O probablemente se debe a que es el precursor en la biosíntesis del hemo A.

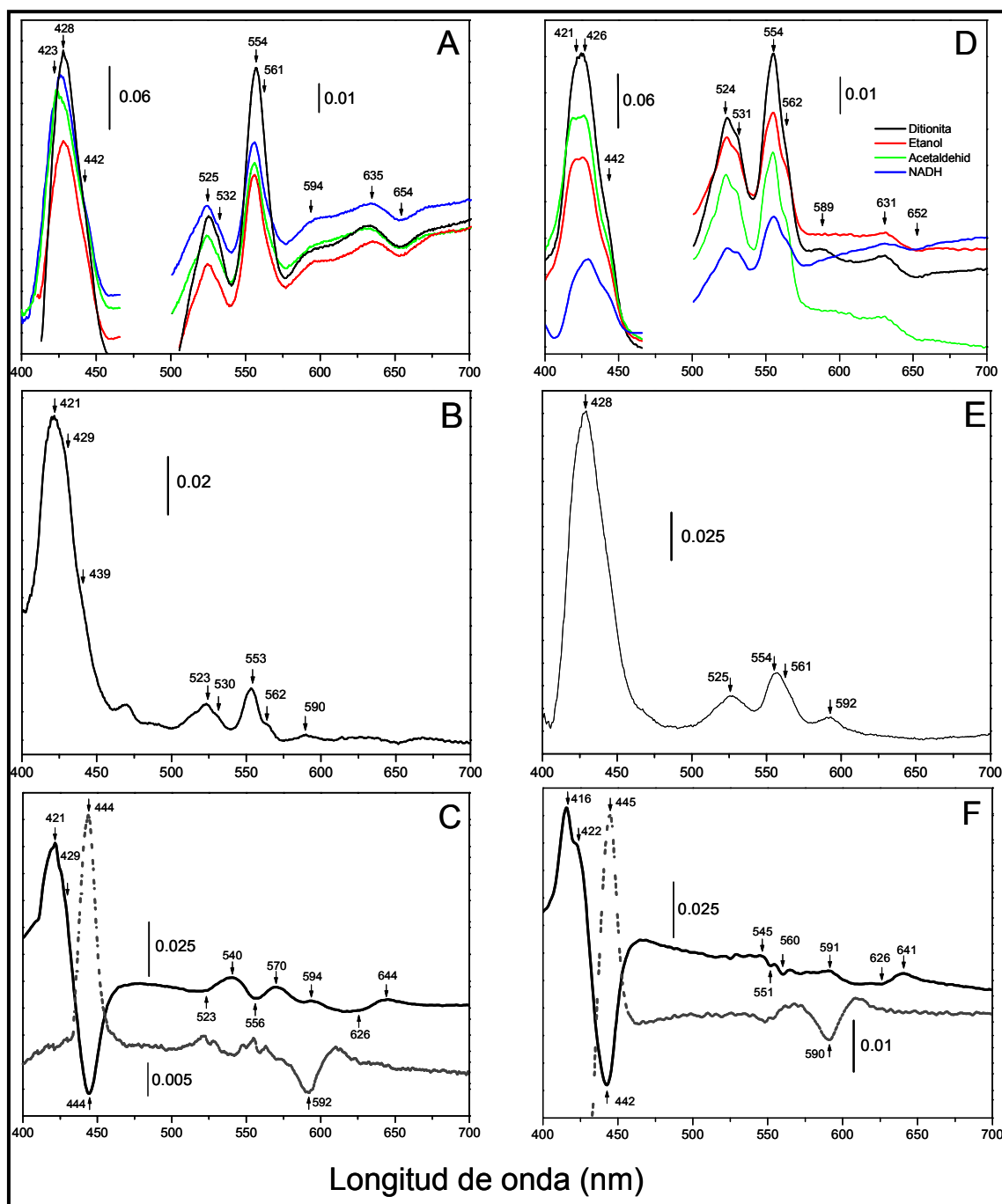


Figura 11. Espectros diferenciales a 77K en membranas de *G. xylinum* de cultivo estático (A-C) y cultivo agitado (D-E). Panel A y D, diferenciales reducido menos oxidado; B y E; diferenciales de monóxido (—) y fotodisociación (----). Panel C y F, diferencial reducido con ditionita más cianuro (5 mM) menos oxidado.

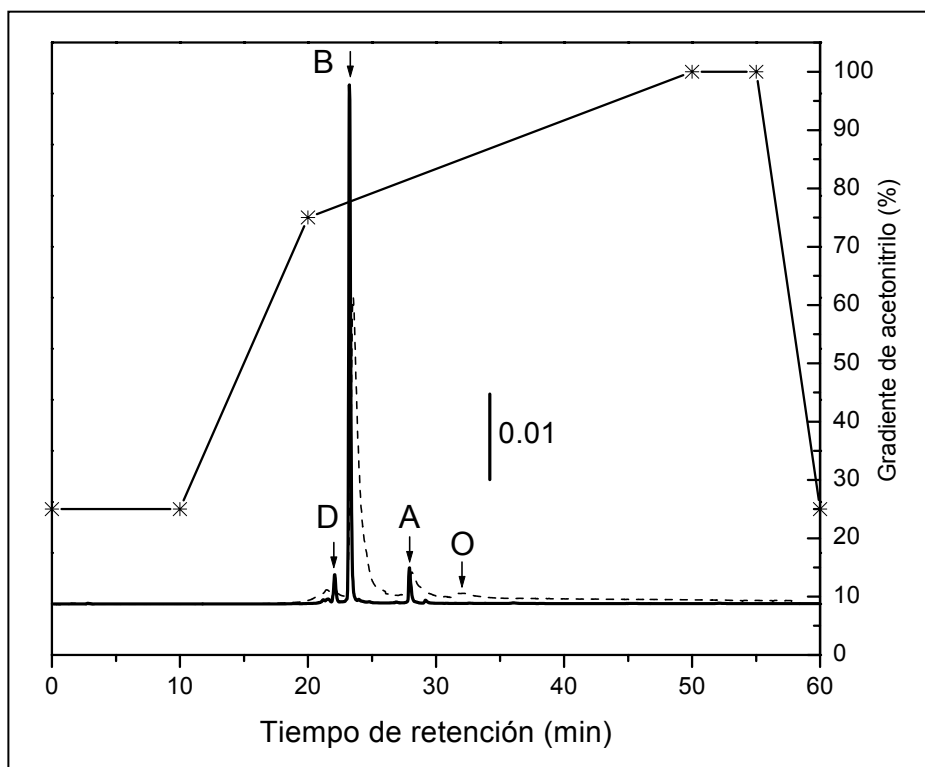


Figura 12. Determinación de hemos por HPLC. Identificación de hemos en membranas de *G. xylinum* de cultivo estático (—) y agitado (- -) mediante HPLC bajo gradiente de acetonitrilo (-\*).

Para corroborar los resultados obtenidos mediante HPLC, los hemos contenidos en el extracto y en el precipitado residual del proceso de extracción con acetona ácida, fueron conjugados con piridina básica (piridin hemocromos). Los piridin hemocromos se analizaron mediante espectros diferenciales reducidos con ditionita de sodio menos oxidados con persulfato de amonio.

Los piridin hemocromos del extracto de acetona de cultivo estático (Figura 13A) y agitado (Figura 13B) presentaron señales para hemocromo B (426, 528, 558 nm) y hemocromo A (437, 587 nm); los piridin hemocromos del residuo membranal de acetona ácida mostraron señales únicas para hemocromo C (420, 524, 552 nm; Figura 13B). No se observaron señales de hemocromos O y D, el primero debido a su baja concentración en las membranas mientras que el hemo D no es detectable mediante el complejo de piridina.



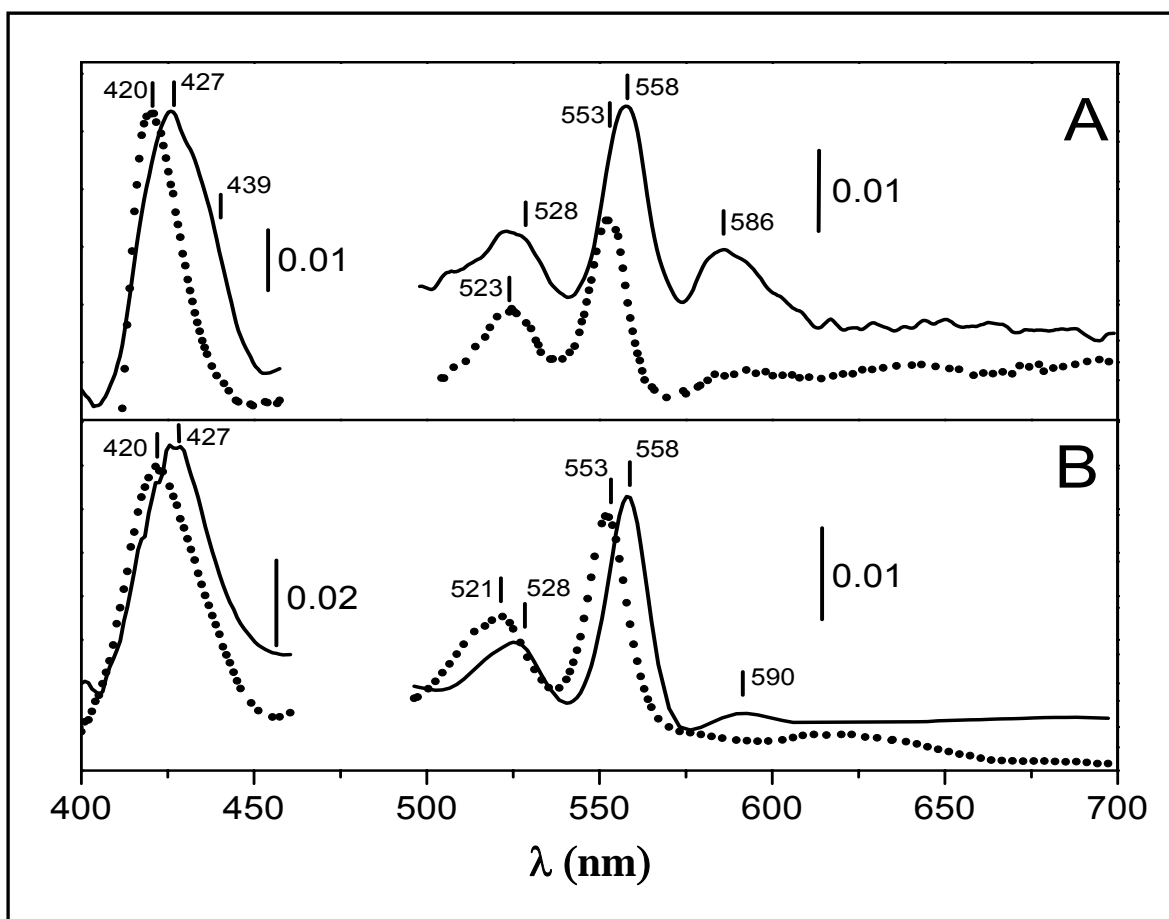


Figura 13. Espectros diferenciales reducidos con ditionita menos oxidados con persulfato de piridinhemocromos de extractos de acetona ácida (—) y de residuo membranal (- - -) de membranas de cultivo estático (A) y de cultivo agitado (B).

Los resultados anteriores permiten definir que *G. xylinum* expresa el mismo tipo de citocromos cuando se cultiva bajo condiciones estáticas ó agitadas; los citocromos encontrados corresponden a los tipos *b*, *c*, *a* y *d*; la cuantificación de citocromos a temperatura ambiente mostró pequeñas diferencias en los niveles de todos los citocromos (Cuadro III).

El citocromo *d* es expresado en múltiples bacterias como oxidasa de alta afinidad por oxígeno y se requiere para llevar a cabo procesos que demandan energía bajo condiciones de microaerofilia y para proteger procesos anaeróbicos de la inhibición por oxígeno (Hill *et al.*, 1990; Junemann, 1997); así mismo, su expresión se ha asociado como resultado del cambio a fase estacionaria. En *G. xylinum* se conoce que el crecimiento provoca un gradiente de concentración de  $O_2$  y que a profundidades superiores a 200  $\mu M$ , las células se encuentran en condición de microaerofilia (Verschuren *et al.*, 2000), condición que podría

inducir la expresión del citocromo *d*. La cinética de expresión de citocromos con respecto al tiempo de cultivo indica que el citocromo *d* está presente en todas las fases de cultivo. En consecuencia su expresión es constitutiva y no el resultado del cambio a fase estacionaria ni de microaerofilia; la relación citocromo *a:d* es constante en el curso temporal del cultivo.

Citocromo	Estático <sup>A</sup>	Agitado <sup>A</sup>	E/A
<b>c</b>	0.565	0.437	1.29
<b>b</b>	0.529	0.430	1.23
<b>d</b>	0.063	0.044	1.43
<b>a</b>	0.055	0.049	1.12

Cuadro III. Cuantificación de citocromos en membranas de *G. xylinum* de cultivo estático y agitado. <sup>A</sup> nanomol citocromo mg<sup>-1</sup> proteína.

Los resultados obtenidos permiten postular la presencia de dos oxidasas terminales del tipo quinol oxidasa; una quinol oxidasa *bd* y una quinol oxidasa *ba*<sub>3</sub>. La alta concentración del citocromo *c* (citocromo predominante en el diferencial reducido menos oxidado) está vinculada a la presencia de las PQQ-deshidrogenasas periplásmicas de alcohol (PQQ-ADH) y aldehído (PQQ-ALDH), ambas enzimas contienen citocromo de tipo *c* como centros redox.

## 6.4. Actividades respiratorias en membranas

### 6.4.1. Oxidasas y deshidrogenasas membranales

Para identificar qué enzimas constituyen al sistema respiratorio de *G. xylinum* se determinaron las actividades de oxidasas y deshidrogenasas; la bacteria posee una amplia variedad de deshidrogenasas asociadas a la membrana plasmática, que donan electrones vía la ubiquinona-10 a las quinol oxidasas terminales postuladas de acuerdo a los análisis espectroscópicos (Cuadro IV).

Los sustratos acetaldehído, etanol y NADH son oxidados con alta eficiencia mientras que glucosa y succinato son sustratos pobres. Las actividades de oxidasa con ascorbato más

TMPD ó ascorbato más TCHQ demuestran que estos donadores de electrones no son adecuados para las oxidasas terminales de *G. xylinum*.

El análisis de deshidrogenasas en cultivo estático y agitado muestra que no existe diferencia notable en la actividad de las enzimas estudiadas con excepción de la succinato deshidrogenasa, la cual posee el doble de actividad de deshidrogenasa en membranas de cultivo agitado con respecto a los valores determinados en membranas de cultivo estático; sin embargo, si hubo diferencias apreciables en las actividades de oxidasas, las actividades determinadas en membranas de cultivo estático poseen de dos a cuatro veces mayor actividad que las evaluadas en cultivo estático (Cuadro IV).

Sustrato	Oxidasas <sup>A</sup>			Deshidrogenasas <sup>B</sup>		
	E	A	E/A	E	A	E/A
Acetaldehído	952	241	<b>3.95</b>	1,170	1,136	<b>1.03</b>
Etanol	625	220	<b>2.84</b>	430	413	<b>1.04</b>
NADH	471	283	<b>1.66</b>	240	228	<b>1.05</b>
Glucosa	183	63	<b>2.90</b>	220	277	<b>0.79</b>
Succinato	167	68	<b>2.46</b>	100	216	<b>0.46</b>
Ascorbato + TMPD	58	50	<b>1.16</b>	n. d.	n. d.	<b>n.d.</b>
Ascorbato + TCHQ	87	67	<b>1.30</b>	n. d.	n. d.	<b>n.d.</b>

Cuadro IV. Actividades de oxidasa y deshidrogenasa en membranas de cultivo estático (E) y agitado (A). <sup>A</sup> nanomol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína; <sup>B</sup> μmol DCPIPH<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. n.d. No determinado

### 6.4.2. Inhibición de oxidasas con KCN

Las oxidasas de membranas de cultivo estático y agitado fueron caracterizadas por la inhibición con KCN; se tituló la actividad de oxidasa asociada a una enzima periplásmica (alcohol deshidrogenasa) y a una citoplásmica (NADH deshidrogenasa). Los ensayos mostraron una cinética bifásica, indicando la presencia de dos componentes respiratorios (Figura 14).

El primer componente es minoritario (20% de la respiración) y se inhibe a baja concentración de KCN (Figura 14, inserto); el segundo componente es el predominante (80% de la respiración) y tiene baja sensibilidad al inhibidor ( $I_{50} = 1.5$  mM).

De acuerdo a los análisis espectroscópicos, donde se identificó a las oxidasas  $ba_3$  y  $bd$ , se postula que el componente sensible se encuentra asociado a la quinol oxidasa  $ba_3$  mientras la quinol oxidasa  $bd$  es responsable de la resistencia a cianuro y por lo tanto la oxidasa predominante en membranas de *G. xylinum*; esto debido a que las oxidasas  $bd$  son por su naturaleza resistentes a KCN. Los resultados generados hasta ese momento permiten definir que la bacteria expresa la misma cadena respiratoria cuando se cultiva en condición estática ó agitada. Por tal motivo, la caracterización de deshidrogenasas membranales y los análisis posteriores se realizaron sólo en membranas de cultivo estático.

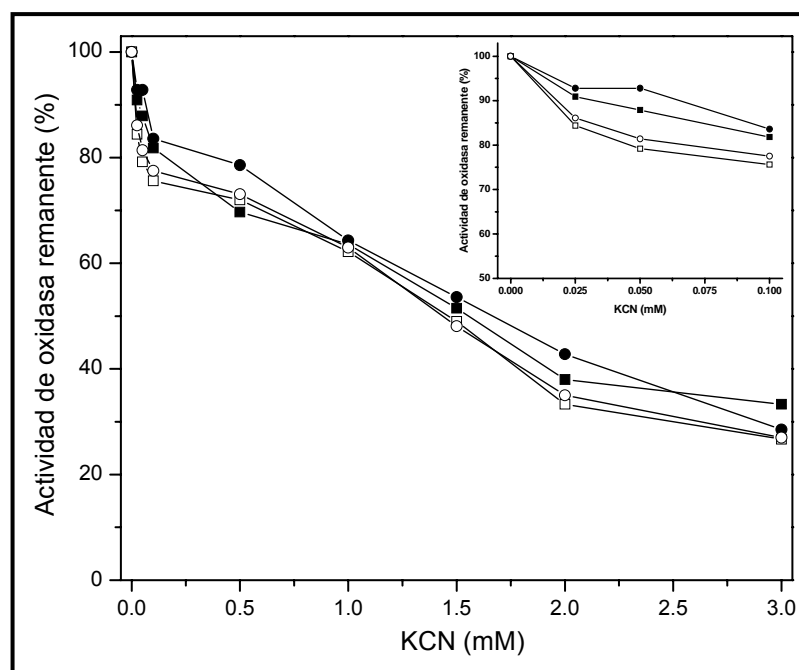


Figura 14. Efecto del KCN sobre las actividades de oxidasa. Actividad de aldehído (■) y NADH (●) oxidasas de membranas de cultivo estático; actividad de aldehído (□) y NADH (○) oxidasas de membranas de cultivo agitado.

### 6.4.3. Inhibidores de complejo $bc_1$ afectan la actividad de oxidasa

De acuerdo a reportes anteriores (Flores-Encarnación, 2001; Matsushita *et al.*, 1994), se sabe que las bacterias del género *Acetobacter* no poseen citocromo  $bc_1$ ; sin embargo, se conoce que inhibidores de este complejo como antimicina, mixotiazol y estigmatelina afectan la actividad de oxidasa, tal es el caso de *G. diazotrophicus* (Martínez-Yee, 2005), posiblemente al afectar el sitio de unión a ubiquinona. Para corroborar este efecto, se tituló la actividad de NADH, alcohol y aldehído oxidasa con los inhibidores antes mencionados (Figura 15).

Los resultados muestran que los inhibidores causan fuerte disminución de las actividades de alcohol y aldehído oxidasa mientras la NADH oxidasa muestra sensibilidad diferencial, siendo sumamente sensible a estigmatelina (Figura 15A) y con mayor resistencia a antimicina y mixotiazol (Figura 15B, 13C). Las concentraciones de inhibidor necesarias para disminuir el 50% de la actividad inicial ( $I_{50}$ ) se presentan en el cuadro V. Es notorio que estigmatelina es el inhibidor más potente de todas las oxidasas mientras antimicina y mixotiazol muestran efecto diferencial entre las oxidasas dependientes de PQQ y la NADH oxidasa.

Como se mencionó anteriormente, el sitio de acción de los inhibidores debe ser el sitio de unión a quinona y con base en la inhibición diferencial sobre las actividades de oxidasa se deduce que existen sitios homólogos en las enzimas pero cada sitio tiene diferente afinidad por el inhibidor.

Actividad de oxidasa	Inhibidor ( $I_{50}$ $\mu$ M)		
	Estigmatelina	Antimicina	Mixotiazol
Etanol	0.1	0.05	0.5
Acetaldehído	0.75	0.5	5
NADH	0.75	25	>20

Cuadro V. Concentración media inhibitoria para las actividades de oxidasa en membranas de *G. xylinum*.

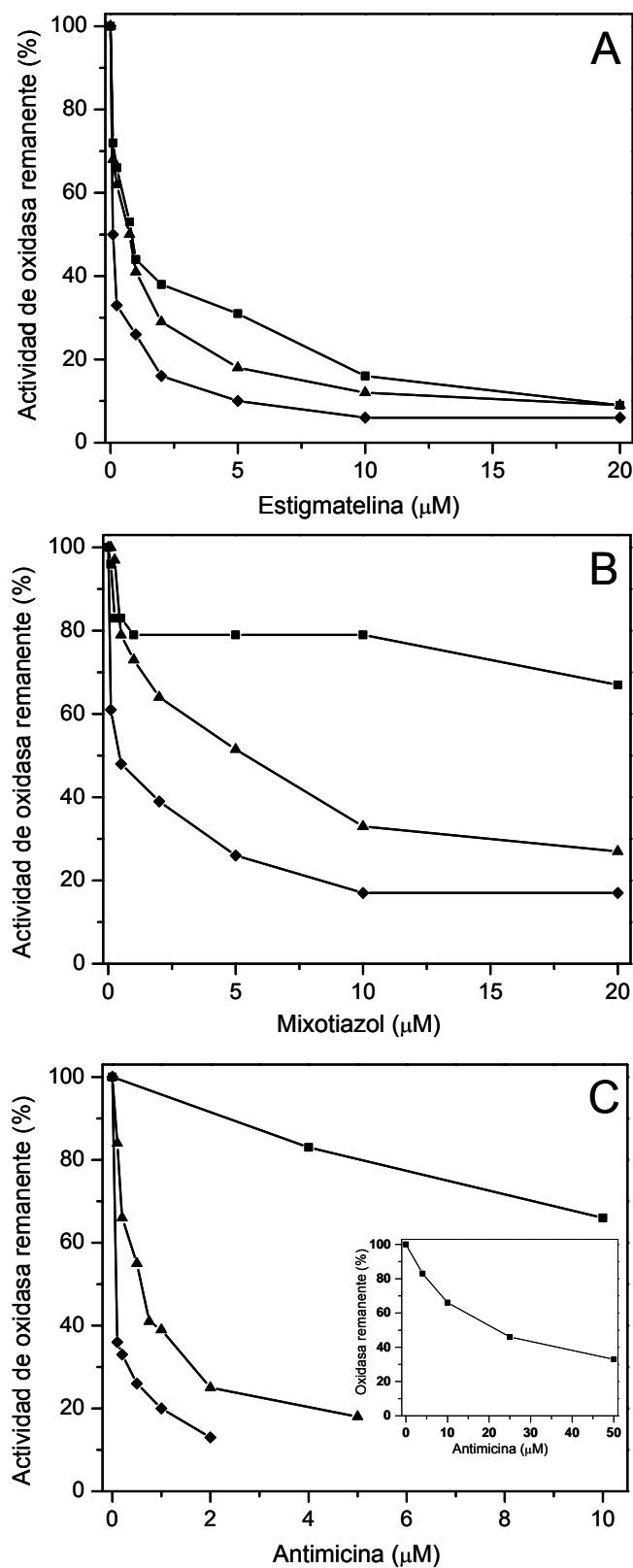


Fig. 13. Inhibición de la actividad de oxidasa por estigmatelina, mixotiazol y antimicina. Titulación de la actividad de NADH oxidasa (■); alcohol oxidasa (◆) y aldehído oxidasa (▲), en membranas de cultivo estático.

## 6.5. El sistema de oxidación de alcoholes de *G. xylinum*

### 6.5.1. Las deshidrogenasas periplásmicas de alcohol y aldehído

*G. xylinum* presentó una alta actividad respiratoria asociada a las enzimas encargadas de la oxidación de alcoholes, la PQQ-ALDH y la PQQ-ADH (Cuadro IV, deshidrogenasas). La actividad dio pauta a estudiar a las PQQ deshidrogenasas del sistema oxidativo de alcoholes.

Las PQQ-ADH y PQQ-ALDH son proteínas periféricas de membrana (González-Valdez, 2004) las cuales pueden ser removidas con un tratamiento con baja concentración de Tritón X100. Por lo tanto, membranas de *G. xylinum* fueron tratadas por 2 h con el detergente al 0.5%; los residuos membranales del tratamiento perdieron un 95% de la actividad de alcohol y aldehído oxidasa, lo cual indicó una remoción selectiva de las enzimas.

El solubilizado fue analizado espectroscópicamente, el espectro diferencial reducido con ditionita menos oxidado con persulfato mostró señales únicas para citocromos de tipo c (417, 520, 552 nm; Figura 16A), lo cual corrobora la remoción selectiva del detergente. La fracción solubilizada fue analizada por electroforesis nativa, el gel mostró la presencia dominante de una banda en el solubilizado con una Mr de 119 kDa, esta banda tuvo tanto actividad de alcohol como de aldehído deshidrogenasa (Figura 16B).

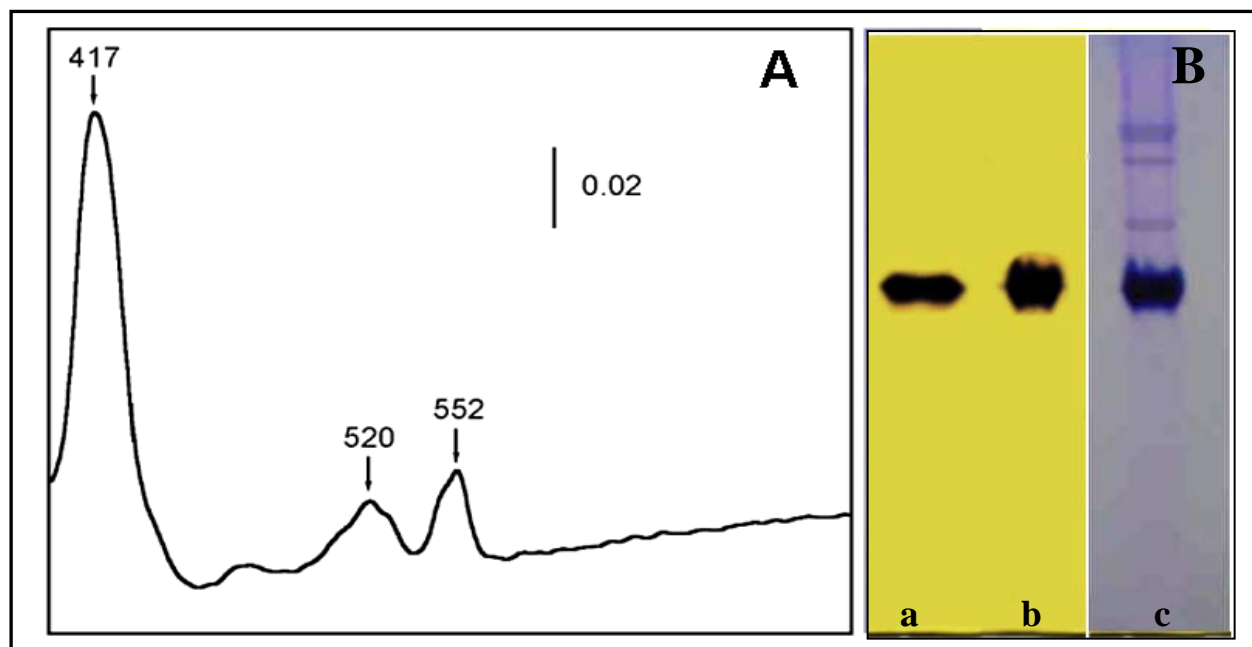


Figura 16. Espectroscopía y electroforesis nativa del solubilizado. (A) Espectro diferencial reducido con ditionita menos oxidado con persulfato. (B) Zimograma de actividad de PQQ-ADH (a); de PQQ-ALDH (b) y tinción de azul de Coomassie (c).

El resultado indicó la presencia de una sola banda para la oxidación de etanol y acetaldehído; sin embargo existía la posibilidad de que ambas enzimas tuviesen una movilidad electroforética similar. El análisis en gel desnaturalizante (Figura 17) mostró la presencia de tres bandas proteicas con citocromo *c* asociado. Las bandas A (70 kDa) y C (41 kDa) están asociados a la subunidad I y II de la alcohol deshidrogenasa en bacterias acéticas mientras la banda B (53 kDa) se asocia a la subunidad II de la aldehído deshidrogenasa (Ameyama y Adachi, 1982a; Ameyama y Adachi, 1982b; González-Valdez, 2004).

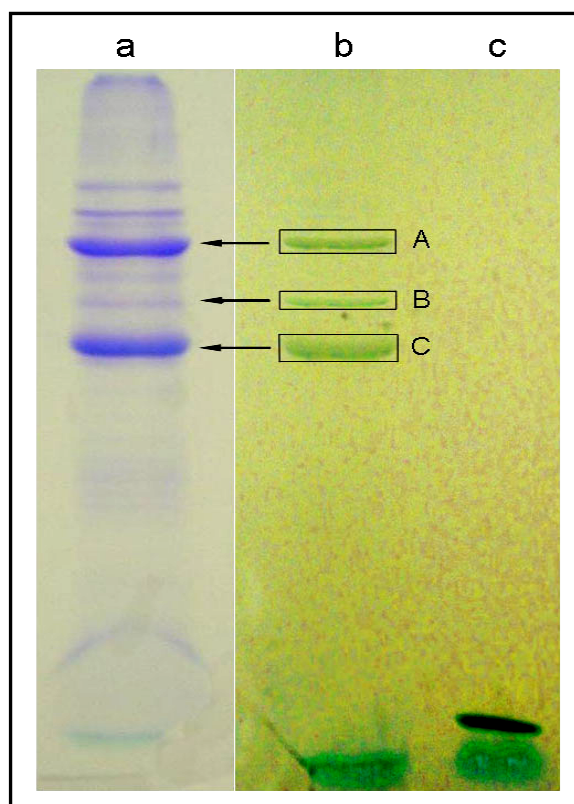


Figura 17. Electroforesis desnaturalizante del solubilizado de Tritón X100 al 0.5%. Carril a, solubilizado de Triton teñido con azul de Coomassie; carril b, solubilizado de Tritón X100 teñido con tetrametilbencidina, carril c, citocromo *c* de caballo. Subunidades A (70 kDa) y C (41 kDa) asociadas a la PQQ-ADH; subunidad B (53 kDa) asociada a la PQQ-ALDH.



### 6.5.2. Purificación de la PQQ alcohol deshidrogenasa

La enzima se purificó con el protocolo desarrollado para la PQQ alcohol deshidrogenasa de *G. diazotrophicus* (Gómez-Manzo, comunicación personal). Después del proceso de solubilización con Tritón X100 al 0.5% y los procesos de cromatografía a través de QAE Toyopearl, DEAE Toyopearl, HA Ultrogel y Sephacryl S200 (ver Materiales y Métodos), se obtuvo una enzima purificada a homogeneidad. La enzima fue purificada 45 veces con un rendimiento del 10.1 % (Cuadro VI).

	Proteína total (mg)	Actividad específica <sup>A</sup>	Actividad total <sup>B</sup>	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Membranas	2000.0	5.7	11400.0	1	100.0
Solubilizado	307.0	33.7	10345.9	5.9	90.7
QAE Toyopearl	51.2	45.3	2319.4	7.9	20.3
DEAE Toyopearl	18.0	174.0	3132.0	30.5	27.4
HA Ultrogel	8.3	312.0	2589.0	54.7	22.7
Sephacryl S200	4.5	256.0	1152.0	44.9	10.1

Cuadro VI. Tabla de purificación de la PQQ alcohol deshidrogenasa. <sup>A</sup>Actividad de deshidrogenasa específica en Unidades de ferricianuro mg<sup>-1</sup> proteína; <sup>B</sup>actividad total en Unidades de ferricianuro.

La enzima consta de dos subunidades (Figura 18a), la primera subunidad posee una Mr de 68 kDa (S1) y la segunda una Mr de 41 kDa (S2); ambas bandas poseen citocromo c; el análisis en gel nativo muestra una banda con Mr de 119 kDa con actividad para alcohol y aldehído deshidrogenasa (Figura 18b). Por isoelectroenfoque se determinó un pI de 5.7 para la enzima.

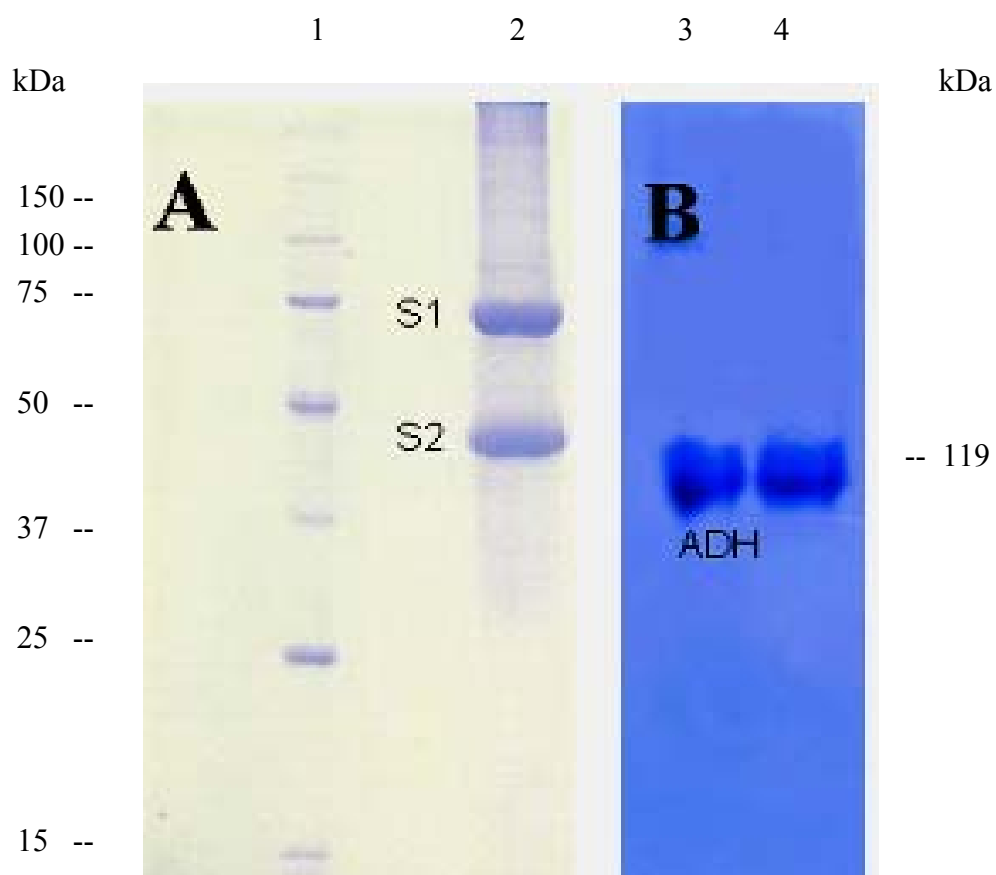


Figura 18. Electroforesis de la PQQ alcohol deshidrogenasa purificada. A. SDS PAGE teñido con azul de Coomassie: carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, enzima purificada. B. Zimograma en gel nativo: carril 3, actividad de alcohol deshidrogenasa; carril 4, actividad de aldehído deshidrogenasa.

### 6.5.3. Caracterización de la enzima alcohol deshidrogenasa

Se probó la capacidad de la enzima para oxidar diferentes sustratos; los resultados mostraron que la PQQ-ADH purificada oxida alcoholes y aldehídos, pero no azúcares alcoholes ni cetonas. La enzima oxida con alta eficiencia los alcoholes: butanol, alcohol alílico y etanol y con menor eficiencia los aldehídos: acetaldehído, formaldehído, propionaldehído y glutaraldehído (Cuadro VII). Los resultados anteriores claramente muestran que la PQQ-ADH de *G. xylinum* es una enzima bifuncional similar a la enzima PQQ-ADH de *G. diazotrophicus* (Gómez-Manzo, comunicación personal).

Sustrato	Actividad Relativa <sup>A</sup> (%)	
	Ferricianuro	Diclorofenol
Metanol	0	4
Etanol	91	88
Butanol	100	100
Alcohol alílico	96	91
Formaldehído	34	38
Acetaldehído	13	42
Glutaraldehído	8	18
Propionaldehído	24	33

Cuadro VII. Oxidación de sustratos por la PQQ alcohol deshidrogenasa purificada. <sup>A</sup> Actividad de butanol: ferricianuro reductasa = 1,350 U mg<sup>-1</sup> enzima; diclorofenol reductasa = 11.22 mmoles de DCPIPH<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> enzima.

La caracterización espectroscópica de la enzima purificada mostró la presencia de citocromos de tipo *c* (picos a 415, 523 y 553 nm) y de PQQ (picos a 318 y 352 nm) como grupos prostéticos (Figura 19A). La concentración de citocromo *c* a temperatura fue de 18 nanomoles de citocromo por mg de proteína; estos resultados concuerdan con lo reportado para diferentes PQQ alcohol deshidrogenasas.

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad enzimática; se encontró que la actividad de deshidrogenasa fue dependiente de pH. La enzima fue activa en un amplio rango de pH (4.0 - 8.0); cuando se empleó ferricianuro de potasio como aceptor de electrones se encontró la actividad máxima a pH de 5.5; sin embargo, la determinación con diclorofenol indofenol como aceptor final de electrones presentó la máxima actividad a pH 6.5 (Figura 19B). La diferencia de pH observada es función del pH en el cual cada compuesto funciona como aceptor de electrones.

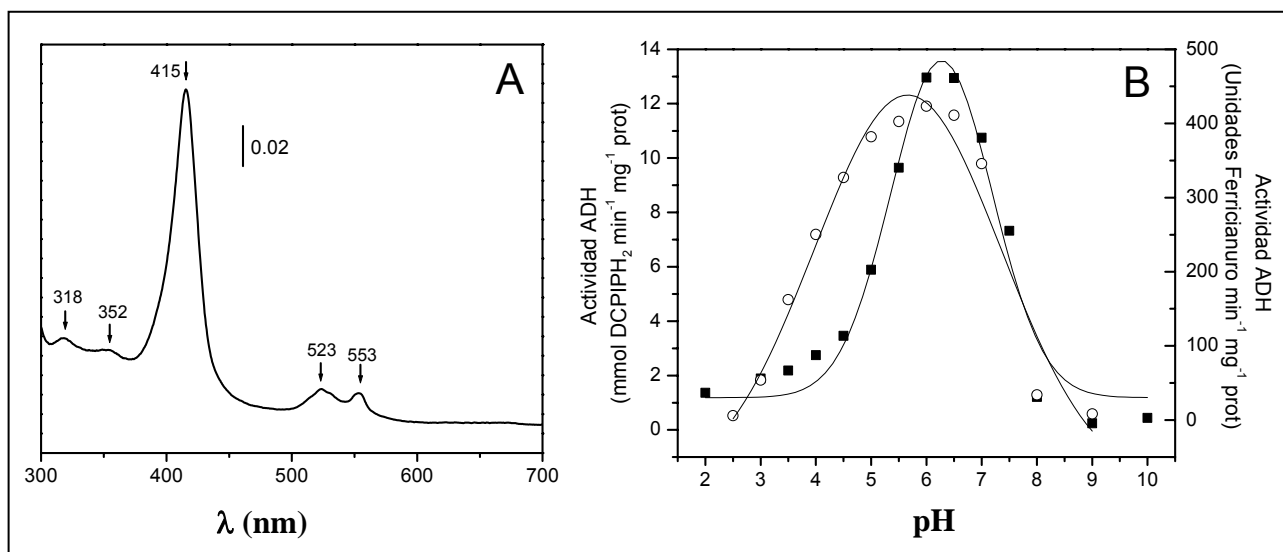


Figura. 17. Caracterización espectroscópica y actividad dependiente de pH de la enzima purificada. A) Espectro diferencial reducido con etanol menos oxidado con ferricianuro de potasio. B) Actividad dependiente de pH determinada con diclorofenol indofenol (■) y ferricianuro de potasio (○) como aceptores de electrones.

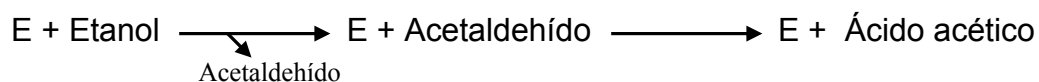
La caracterización cinética de la enzima se realizó para los sustratos etanol, butanol, alcohol alílico y acetaldehído. Se determinó la actividad de deshidrogenasa empleando diclorofenol indofenol como aceptor de electrones; los parámetros cinéticos para cada sustrato fueron determinados con base en la gráfica de Lineweaver Burk. Las constantes de afinidad y velocidad máxima se muestran en el Cuadro VIII; así mismo, se determinó la cinética de reducción de un análogo de la quinona endógena, la ubiquinona-1, empleando etanol como sustrato donador de electrones. Los resultados de la actividad de deshidrogenasa en gel nativo (zimograma), el ensayo de sustratos oxidables y la caracterización cinética confirman que la PQQ alcohol deshidrogenasa de *G. xylinum* es una enzima bifuncional, capaz de oxidar alcoholes y aldehídos.

Sustrato	Km (mM)	Vmax
Etanol	0.71	7.63 <sup>a</sup>
Alcohol alílico	0.45	7.26 <sup>a</sup>
Butanol	0.36	5.52 <sup>a</sup>
Acetaldehído	12.48	2.37 <sup>a</sup>
Ubiquinona-1 (Etanol)	0.057	3.03 <sup>b</sup>

Cuadro VIII. Parámetros cinéticos para sustratos de la enzima PQQ-ADH purificada. Velocidad máxima reportada en: <sup>a</sup> mmol de DCPIPH<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> enzima; <sup>b</sup> mmol de ubiquinona-1 reducida min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> enzima.

La oxidación de etanol por la PQQ-ADH genera acetaldehído, el cual puede posteriormente ser oxidado por la misma enzima liberando ácido acético. Existen dos alternativas para llevar a cabo la oxidación del etanol hasta ácido acético:

- 1) La enzima podría realizar un primer evento de deshidrogenación liberando acetaldehído al medio y posteriormente tomar este compuesto para un segundo evento de deshidrogenación.



- 2) La PQQ-ADH podría realizar los dos eventos de deshidrogenación sin la previa liberación del acetaldehído con la formación de un intermediario de PQQ-ADH-acetaldehído.



Para determinar si el acetaldehído es un intermediario de reacción se recurrió a secuestrar el acetaldehído con el compuesto tiosemicarbazida formando una tiosemicarbazona. La enzima se incubó en presencia de etanol (20 mM) como sustrato y diclorofenol indofenol como aceptor de electrones; si la reacción liberaba acetaldehído éste difundiría hasta otra celda conteniendo tiosemicarbazida (5 mM) formando una tiosemicarbazona de acetaldehído detectable a 260 nm (ver Materiales y Métodos).

Los resultados de los ensayos mostraron que la enzima oxida etanol a una tasa de 16.9 mmoles de sustrato/min mg de enzima (Figura 20). Se observó una lenta formación de la tiosemicarbazona, con una tasa de 0.3 mmoles de tiosemicarbazona de acetaldehído  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  enzima (1.8% de la tasa de consumo de etanol). El resultado anterior apunta a que el etanol se oxida hasta acetato sin liberación de acetaldehído. El mismo ensayo fue practicado con butanol obteniendo resultados similares.

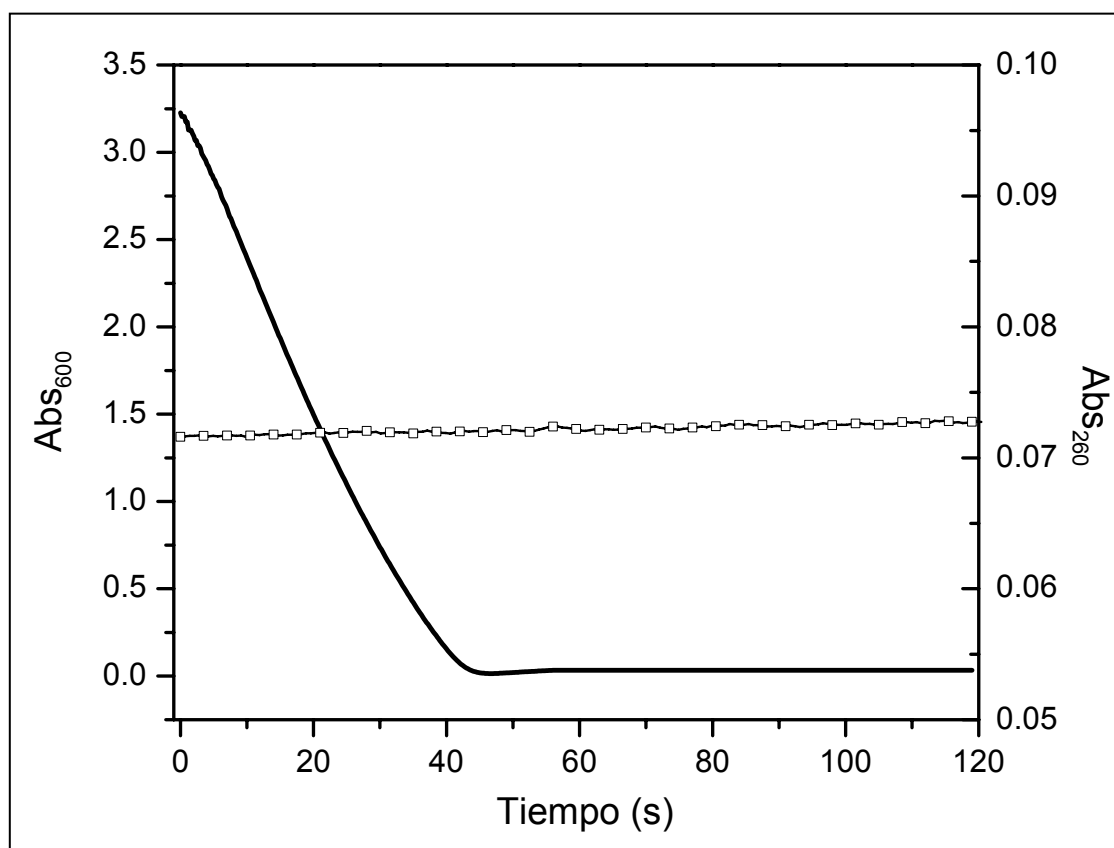


Figura 20. Cinética de oxidación de etanol y liberación de acetaldehído. La actividad de alcohol deshidrogenasa se determinó con diclorofenol indofenol a 600 nm (—); la formación de tiosemicarbazona de acetaldehído se determinó a 260 nm (--□--□--).

---

La presencia de una enzima específica para la oxidación de aldehídos hace redundante la capacidad de la PQQ-ADH para oxidar estos sustratos; la naturaleza de la bifuncionalidad es incierta, aunque se ha postulado para la enzima purificada de *G. diazotrophicus* que la diferencia en el pH óptimo para las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasa (6.0 y 4.5, respectivamente; Gómez-Manzo, comunicación personal) podría ser muy importante para la funcionalidad a nivel fisiológico de una u otra enzima.

Con el conocimiento de que las PQQ alcohol deshidrogenasas de las bacterias ácido acéticas son enzimas con múltiples citocromos de tipo *c* asociados; fue de particular interés determinar el número de citocromos unidos a la PQQ-ADH de *G. xylinum* y el potencial redox ( $E_m$ ) de cada uno de ellos. La titulación potenciométrica se realizó con un electrodo de combinación Ag/AgCl platino empleando a diversas quinonas como mediadores de potencial redox; la enzima fue oxidada con ferricianuro de potasio y reducida por adición gradual de una solución de ditionita de sodio.

La cinética de reducción de citocromos permitió identificar la presencia de cuatro citocromos tipo *c* asociados a la PQQ-ADH (Figura 21). El citocromo *c*<sub>1</sub> tuvo un potencial redox de -51 mV, el citocromo *c*<sub>2</sub> de +20 mV y los citocromos *c*<sub>3</sub> y *c*<sub>4</sub> tuvieron un valor de +82 mV y +246 mV, respectivamente.

Con base en los resultados anteriores se puede inferir que aunque la PQQ-ADH posee cuatro citocromos *c*, solo tres de ellos participan en la transferencia de electrones del sustrato hacia la ubiquinona-10. La transferencia de electrones de los citocromos *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub> y *c*<sub>3</sub> hacia la quinona ( $E_m^7 = +90$  mV) es favorable debido a que poseen un potencial redox más electronegativo con respecto a la quinona endógena; sin embargo, el paso de electrones del citocromo *c*<sub>4</sub> hacia la quinona es una reacción sumamente desfavorable ( $\Delta E = -156$  mV).

La titulación de la actividad de alcohol oxidasa en membranas con inhibidores del complejo *bc*<sub>1</sub> mostró que bajas concentraciones de antimicina y mixotiazol abatían notablemente el consumo de O<sub>2</sub> (antimicina,  $I_{50} = 0.05$   $\mu$ M; mixotiazol,  $I_{50} = 0.5$   $\mu$ M). Se postuló que estos compuestos afectaban la transferencia de electrones del sitio activo hacia la ubiquinona.

---

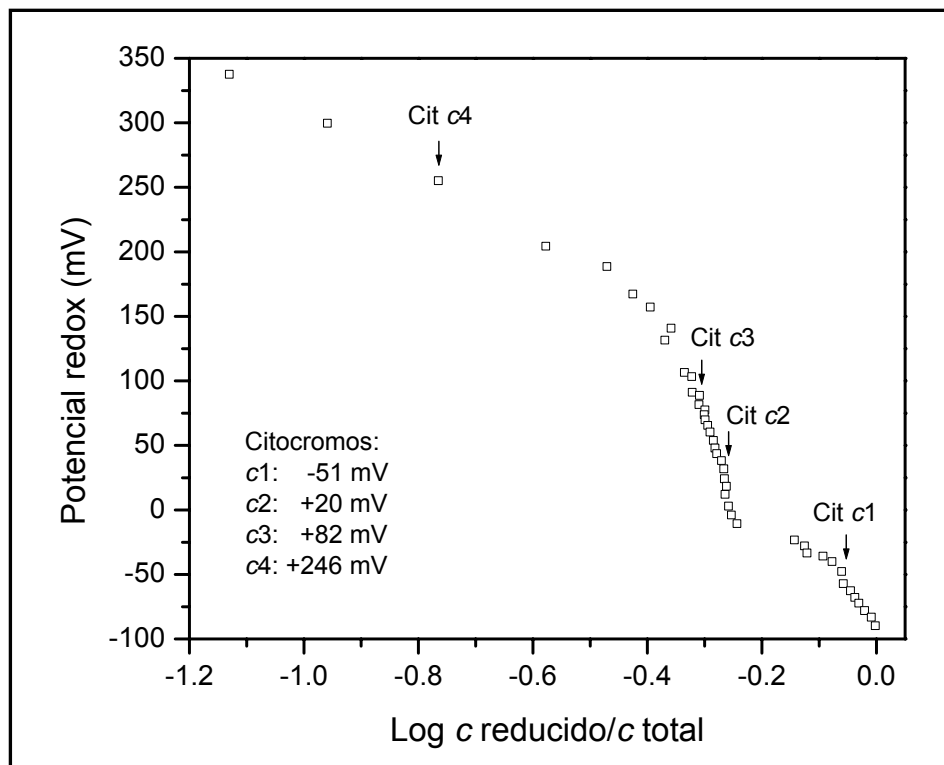


Figura 21. Titulación potenciométrica de la PQQ-ADH.

Se empleó a la PQQ alcohol deshidrogenasa purificada para identificar el sitio de acción de la antimicina y el mixotiazol. Estos inhibidores pueden afectar a la enzima en diferentes sitios:

- a) Afectar al grupo PQQ e impedir la catálisis.
- b) Alterar la transferencia de electrones del PQQ hacia los citocromos *c*.

Si el inhibidor afecta la catálisis ó el paso de electrones del PQQ a los citocromos, entonces ningún citocromo tipo *c* será reducido.

- c) Alterar la transferencia de electrones entre los citocromos *c*.

Si el inhibidor interrumpe el flujo de electrones entre los citocromos, entonces se obtendrá una reducción parcial con respecto a la observada en ausencia de inhibidor.

- d) Inhibir el flujo de electrones del citocromo *c* hacia la ubiquinona.

Si el inhibidor afecta la transferencia de electrones hacia la ubiquinona, entonces todos los citocromos que participan fisiológicamente serán reducidos.



Con base en lo anterior, la cinética de reducción de citocromos en presencia de inhibidores y su porcentaje de reducción permiten definir el sitio de inhibición.

Se empleó un ensayo de reducción fisiológica de citocromos; brevemente: la enzima fue oxidada con ferricianuro (2 mM) e incubada con inhibidor (100  $\mu$ M) por 10 min; se adicionó etanol (10 mM) y se determinó la reducción de citocromos mediante el diferencial de absorbancia 554 – 540 nm (Figura 22). Se cuantificó el porcentaje de reducción relativa de citocromos con respecto a la reducción total generada con ditionita (Figura 23).

Los resultados mostraron que los inhibidores no impiden la reducción de los citocromos tipo c en la enzima purificada; el patrón de reducción de citocromos en presencia de antimicina ó mixotiazol es similar al observado para la reducción con etanol en ausencia de los inhibidores (Figura 22). El resultado indica que la antimicina y el mixotiazol no afectan al grupo PQQ ni la catálisis y tampoco impide el flujo de electrones del PQQ hacia el primer citocromo c (c1).

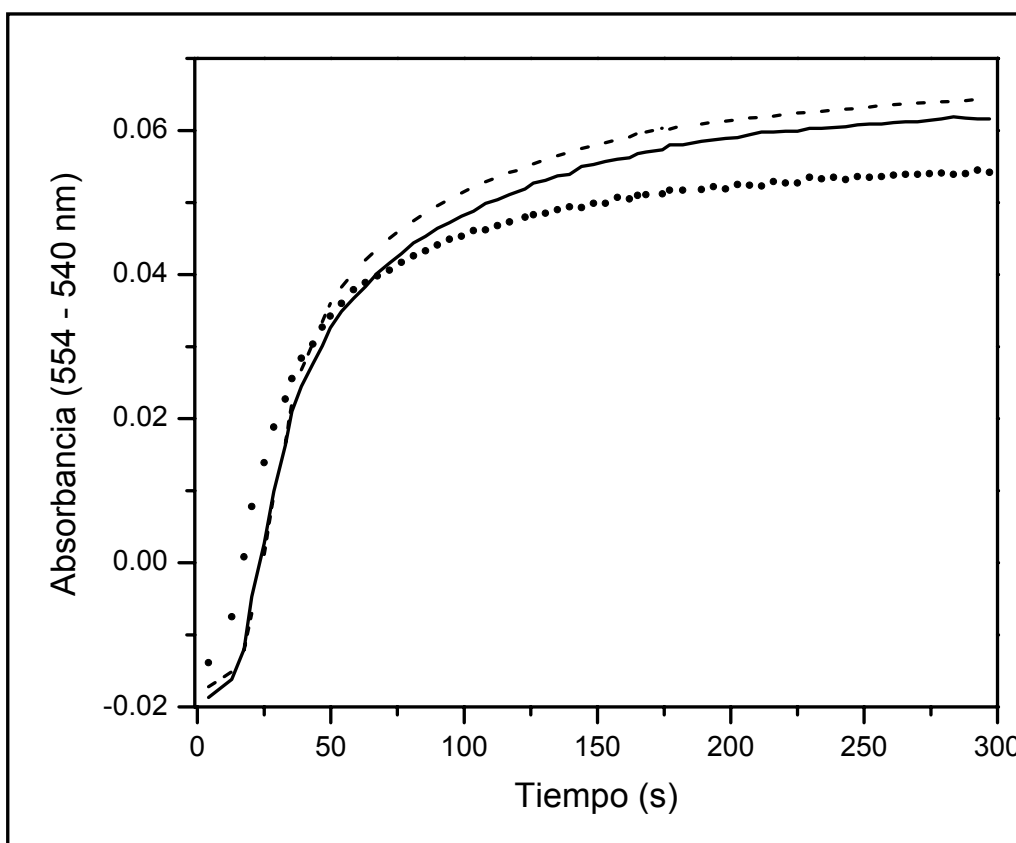


Figura 22. Cinética de reducción de citocromos de la PQQ alcohol deshidrogenasa en presencia de inhibidores. La enzima se incubó con antimicina (- - -) y mixotiazol (●●●); control de reducción sin inhibidores (—).

---

La determinación del porcentaje de reducción fisiológica con etanol en ausencia de inhibidores mostró que aproximadamente un 77% de los citocromos son reducidos (Figura 23A); esto indica que solo tres de los cuatro citocromos de la PQQ alcohol deshidrogenasa participan en el flujo de electrones del sustrato hacia la ubiquinona. Esta cuantificación concuerda con la titulación potenciométrica, en donde los citocromos *c*1, *c*2 y *c*3 debido a sus potenciales redox ( $E_m = -51$ ,  $+20$  y  $+82$  mV, respectivamente) si pueden transferir sus electrones a la ubiquinona-10 ( $+90$  mV); el citocromo *c*4 está impedido energéticamente para ceder electrones a la quinona.

Cuando se evaluó el porcentaje de reducción en presencia de antimicina y mixotiazol, valores cercanos a la reducción fisiológica fueron observados. El resultado anterior mostró que los inhibidores del complejo *bc*<sub>1</sub> no interfieren con el flujo de electrones entre los citocromos; para corroborarlo se realizó un ensayo cinético de reducción de ubiquinona-1, un análogo de la quinona endógena. La enzima se incubó con el inhibidor (100  $\mu$ M) y etanol (10 mM) por 10 min, posteriormente se adicionó ubiquinona-1 (100 mM) y se midió la reducción de la quinona a 275 nm (Figura 23B). El ensayo control en ausencia de inhibidores mostró que la PQQ-ADH reduce rápidamente a la quinona (trazo a); sin embargo, cuando la enzima se incubaba con mixotiazol (trazo b) ó antimicina (trazo c), se inhibe la reducción de la ubiquinona-1.

Los resultados generados permiten concluir que los inhibidores típicos de citocromo *bc*<sub>1</sub>, antimicina y mixotiazol, tienen un mismo sitio de acción sobre la PQQ alcohol deshidrogenasa: el sitio de unión a quinona, impidiendo la transferencia de electrones de los citocromos *c* a la ubiquinona-10.

---

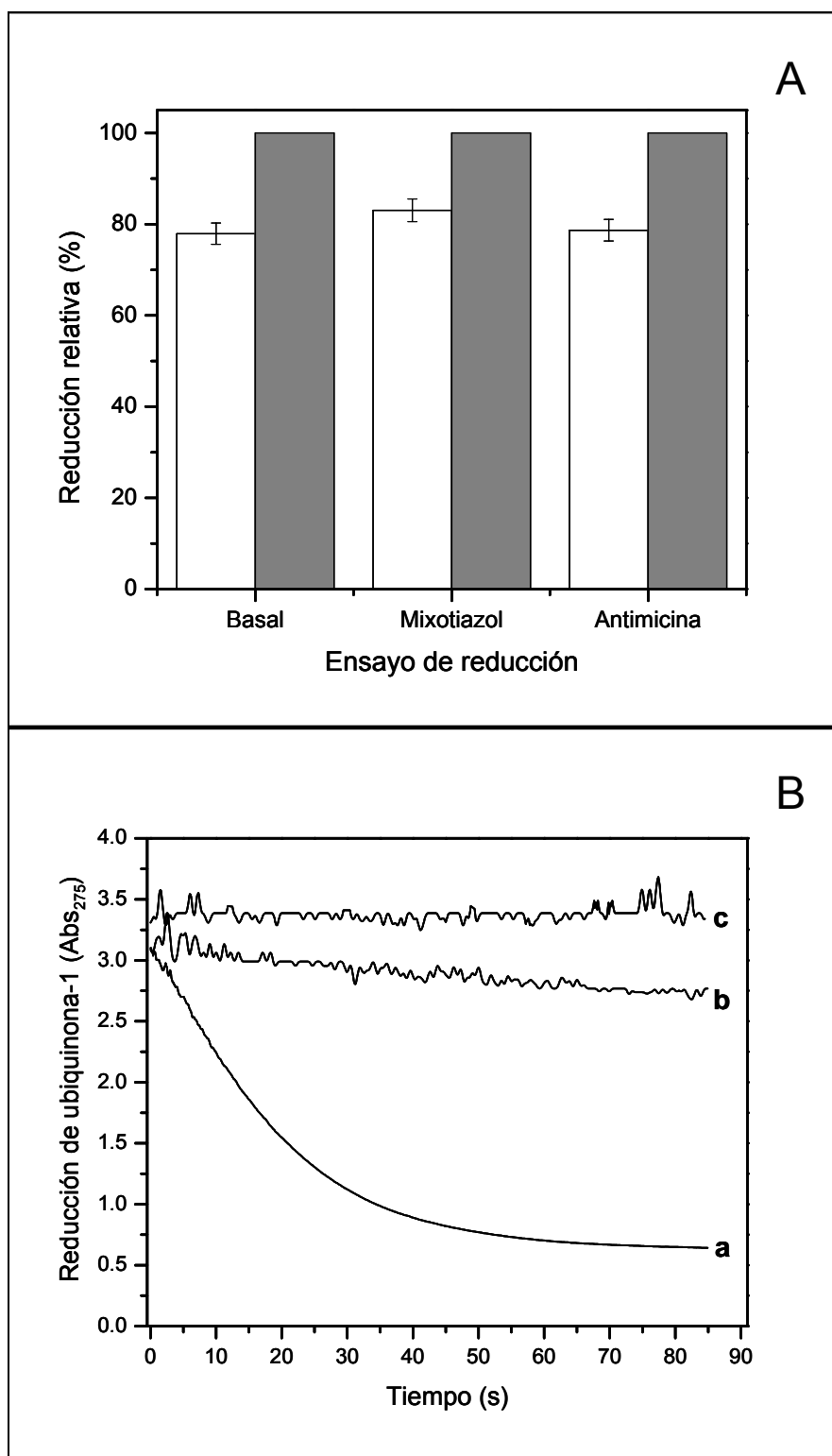


Figura 23. Inhibición de la PQQ alcohol deshidrogenasa. A) Porcentaje de reducción relativa de citocromos *c* con etanol (□) en ausencia (basal) ó en presencia de mixotiazol y antimicina; reducción total de citocromos con ditionita (■). B) Cinética de reducción de ubiquinona-1 en ausencia de inhibidores (a) ó en presencia de mixotiazol (b) y antimicina (c).

---

## VII. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios realizados en *G. xylinum* se han enfocado a optimizar el proceso de producción de celulosa, mediante la adaptación del medio y las condiciones de cultivo (Naritomi *et al.*, 1998a,b; Ramana *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Krystynowicz *et al.*, 2002); utilizando diferentes diseños de fermentación y presión de oxígeno (Kouda *et al.*, 1997; Chao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Mormino y Bungay, 2003; Wook *et al.*, 1999) y mediante el empleo de cepas con alta producción de celulosa ó modificadas genéticamente (Toyosaki *et al.*, 1995; Nakai *et al.*, 1999).

Un factor que obstaculiza el estudio del metabolismo de *G. xylinum*, es la dificultad para recuperar las células crecidas en cultivo estático, debido a que la bacteria vive íntimamente asociada a la matriz de celulosa (Ross *et al.*, 1991). Estudios previos han reportado una metodología ineficiente de liberar a *G. xylinum* de las películas de celulosa, los cuales están basados en la compresión manual de la película y la digestión de la misma por la enzima celulasa (Swissa *et al.*, 1980; Son *et al.*, 2001).

En el presente estudio realizamos la optimización de un medio de cultivo para aumentar la obtención de biomasa (medio BEGG) en cultivo estático. La fuente de carbono del medio basal (sacarosa) fue sustituida por otras fuentes de carbono, dentro de las cuales, la utilización de glucosa incrementó significativamente la producción de biomasa y celulosa (1.5 veces, ambos parámetros). Una razón para este efecto es la rápida integración del azúcar a las rutas catabólicas (vía de pentosas fosfato) y anabólicas (síntesis de celulosa) en *G. xylinum*. El resultado anterior concuerda con lo reportado para *Acetobacter* sp. A9 (Son *et al.*, 2001) donde glucosa al 2% fue la mejor fuente de carbono con una productividad de 2.7 g de celulosa/l y para *Acetobacter* sp. V6 donde glucosa al 1.5% es la concentración óptima para la producción de celulosa (Son *et al.*, 2003), aunque discrepa de lo obtenido para *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* donde fructosa fue la mejor fuente de carbono bajo condiciones de cultivo agitado (Tonouchi *et al.*, 1996); para la misma cepa se reporta lactato de sodio como una excelente fuente de carbono (Matsuoka *et al.*, 1996) superando por cuatro veces la producción de celulosa (3.2 g de celulosa/l).

A diferencia de lo reportado para la mayoría de las especies de *Acetobacter*, (Flores-Encarnación, 2001; Matsushita *et al.*, 1992a), *G. xylinum* no utiliza la glucosa como sustrato respiratorio, como lo muestra la baja actividad de glucosa oxidasa (7 nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> célula). La función principal del carbohidrato es la síntesis de metabolitos intracelulares y de celulosa (Matsuoka *et al.*, 1996).

---

---

En contraste, el etanol adicionado al medio BEGG no se emplea como fuente de carbono; las altas tasas de etanol y acetaldehído oxidasa (23 y 80 nmoles O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de células, respectivamente), indican que la bacteria utiliza el alcohol como fuente de energía. El empleo de etanol como fuente de energía con la consecuente excreción de ácido acético es una característica de los *Acetobacter* (Matsushita *et al.*, 1994). Naritomi y colaboradores (1998a) mostraron que la adición de etanol (1.0% v/v) incrementa tres veces el contenido de ATP intracelular de *G. xylinum* con poco efecto sobre la síntesis de celulosa; postulan que el etanol es un activador del ciclo de Krebs mediante el incremento de acetil-CoA, el cual se sintetiza a partir del acetaldehído y acetato generados por la oxidación del etanol.

De las fuentes de nitrógeno probadas, glutamato monosódico tuvo un impacto positivo sobre el crecimiento celular (1.45 veces) y la producción de celulosa (1.3 veces) con respecto al medio previamente modificado, lo cual concuerda con los datos obtenidos por Ramana y colaboradores (2000). El glutamato parece funcionar en forma similar al etanol, activando al ciclo de Krebs mediante el incremento de  $\alpha$ -cetoglutarato, el cual se produce por la desaminación del glutamato (Lehninger *et al.*, 1993).

Las modificaciones realizadas al medio basal favorecen el crecimiento celular, aumentando 4.5 veces la generación de biomasa; la producción de celulosa también se favoreció aumentando en un factor de 1.8 veces. El medio BEGG por tanto, es un medio que privilegia el crecimiento bacteriano sobre la producción de celulosa.

La recuperación celular empleando homogenización mecánica duplicó el rendimiento obtenido por compresión manual; sin embargo, este tratamiento provocó la formación de agregados celulares. La agregación se evitó por adición de NaCl ó Tween 20, lo cual indica que es un fenómeno provocado por interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. Las células liberadas en presencia de NaCl poseen una morfología normal, con actividades de oxidasa para sustratos exógenos (glucosa, etanol, acetaldehído) similares a las obtenidas en células recuperadas por compresión manual.

En forma inesperada, encontramos oxidación de NADH exógeno por células enteras de *G. xylinum*; este resultado se asoció a daño en la integridad celular que permite al NADH alcanzar la cara citoplásmica de la NADH deshidrogenasa (Complejo I). Los ensayos de NADH oxidasa en células liberadas por compresión manual mostraron valores similares a los obtenidos en células recuperadas en presencia de NaCl, lo cual indicó que esta actividad es una propiedad de la bacteria; la actividad de NADH oxidasa se corroboró mediante la medición del consumo específico de NADH a 340 nm obteniendo valores cercanos a las mediciones realizadas por oximetría. Así mismo, la cadena respiratoria se reduce por adición de NADH exógeno (Anexo I), indicando un papel fisiológico para esta actividad.

---

---

El consumo de NADH exógeno está asociado a deshidrogenasas de NADH tipo II reportadas en diferentes microorganismos (Melo *et al.*, 2004). En las bacterias acéticas se ha reportado que el genoma de *G. suboxydans* indica ausencia de los genes que codifican para la NADH deshidrogenasa tipo I, conteniendo únicamente una NADH deshidrogenasa tipo II (Prust *et al.*, 2005). Es factible que *G. xylinum* posea una NADH deshidrogenasa periplásmica de tipo II, la cual la capacita para oxidar al sustrato de manera exógena.

El sistema respiratorio de *G. xylinum* no había sido estudiado a detalle anteriormente; estudios previos en cultivo estático con células recuperadas de películas cultivadas por 40 h muestran la presencia de ubiquinona-10 (1.33 nanomoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína) y de flavoproteínas (1.18 nanomoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína); se determinó la presencia de citocromos de tipo *a*, *b* y *c* en cantidades equimolares (0.35, 0.45 y 0.42 nanomoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína) (Benziman y Goldhamer, 1968).

Los resultados que obtuvimos en membranas de células recuperadas después de 10 días de cultivo estático fueron diferentes a los estudios previos. El análisis espectroscópico y de HPLC en membranas de *G. xylinum* IFO 13693 mostró la presencia de citocromos tipo *a*, *b*, *c* y *d*. Los citocromos *b* y *c* fueron predominantes (0.565 y 0.529 nanomoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína, respectivamente), estos datos concuerdan con las determinaciones de Benziman y Goldhamer (1968). A diferencia de lo observado en el reporte anterior, la concentración de citocromo *a* es notablemente inferior (0.055 nanomoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína vs. 0.35 nanomoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína); pero aún más, no reportan evidencia de citocromo tipo *d* (0.063 nanomoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína vs. no determinado). Las condiciones de cultivo de Benziman y Goldhamer (1968), al crecer a *G. xylinum* en succinato y con agitación quizás puedan responder a las diferencias observadas.

La presencia de citocromo *a* y *d* fue confirmada debido a las propiedades de estos citocromos de formar aductos con cianuro. El complejo *a*-CN se demostró por el efecto hipercrómico a 590 nm, mientras que el “blanqueamiento” de la señal a 635 nm fue evidencia del complejo *d*-CN; ambos citocromos fueron reactivos a monóxido de carbono (*a*-CO: valle a 443 nm, pico a 593 nm; *d*-CO: valle a 624 nm, pico a 640 nm); solo el espectro de disociación del aducto *a*-CO fue detectado (pico a 443nm; valle 593 nm) ya que el complejo *d*-CO se reasocia muy rápidamente después del proceso de fotodisociación debido a la ausencia del  $\text{Cu}_B$ . Las características espectrales confirman la presencia de al menos dos oxidasas terminales en *G. xylinum*; una oxidasa *bd* y otra *ba*<sub>3</sub>. La ausencia de citocromo *bc*<sub>1</sub> y citocromo *c* soluble indica que las dos oxidasas son del tipo quinol oxidasa.

La ubiquinol oxidasa *ba*<sub>3</sub> se identificó originalmente en *Acetobacter pasteurianus* como citocromo *a*<sub>1</sub> (Chance, 1953a, 1953b) y posteriormente se purificó en *Acetobacter aceti*

---

---

(Matsushita *et al.*, 1992c; Fukaya *et al.*, 1993). La oxidasa  $ba_3$  de *A. acetii* IFO 3284 consta de cuatro subunidades con Mr de 55, 35, 32 y 18 kDa, respectivamente; la relación estequiométrica de hemo *b* y hemo *a* de 1:1. La enzima oxida ubiquinol pero no citocromo *c* de caballo ni TMPD, tiene un Km por O<sub>2</sub> de 4.4 μM y una constante de inhibición por cianuro de 74 μM (Matsushita *et al.*, 1994).

La enzima purificada de *A. acetii* 1023 consta de cuatro subunidades con Mr de 72, 34, 21 y 13 kDa, respectivamente; contiene un mol de hemo *b* por mol de hemo *a*. La enzima posee actividad de ubiquinol oxidasa (ubiquinol-2, Km= 93.5 μM) pero no oxida citocromo *c* de levadura ó caballo, exhibe baja actividad de oxidasa con el par Ascorbato + TMPD. La enzima tiene una afinidad por oxígeno de 2.1 μM y una constante de inhibición por cianuro de potasio de 25 μM (Fukaya *et al.*, 1993).

La ubiquinol oxidasa  $ba_3$  de *G. xylinum* estudiada en membranas comparte características con la de *A. acetii*; oxida ubiquinol con alta eficiencia (ubiquinona-1) pero no oxida citocromo *c* de caballo y posee baja actividad de Ascorbato + TMPD. Esta oxidasa se inhibe a bajas concentraciones de cianuro (< 100 μM).

La ubiquinol oxidasa *bd* ha sido ampliamente estudiada en *Escherichia coli* y *Azotobacter vinelandii*, en las bacterias acéticas se ha reportado su presencia en *A. pasteurianus* y *G. diazotrophicus* (Williams y Poole, 1987; Flores-Encarnación, 2001); la reciente secuenciación del genoma de *Gluconobacter oxydans* mostró la presencia de genes que codifican para una ubiquinol oxidasa *bd* aunque su presencia espectroscópica no ha sido confirmada (Prust *et al.*, 2005).

Se ha postulado que en *E. coli* y en otras bacterias la quinol oxidasa *bd* se utiliza como oxidasa de alta afinidad por oxígeno, lo que les permite realizar procesos que demandan energía bajo condiciones de microaerofilia (Junemann, 1997); sin embargo, para *A. vinelandii* y *Azorhizobium caulinodans*, la oxidasa *bd* funciona para eliminar el oxígeno del medio y proteger a la enzima nitrogenasa de efecto inhibitorio del O<sub>2</sub>.

La expresión de la oxidasa *bd* depende de la tensión de O<sub>2</sub>; sin embargo, los modelos más estudiados aportan datos contrastantes, mientras en *E. coli*, el citocromo *bd* se expresa a baja tensión de O<sub>2</sub> y posee una alta afinidad (Km = 5 – 8 nM; D'mello *et al.*, 1996), para *A. vinelandii* sucede lo contrario, la síntesis del citocromo *bd* se incrementa conforme se aumenta la aereación del medio de cultivo y es una oxidasa de baja afinidad (Km = 4.5 μM; D'mello *et al.*, 1994). En contraste, en *G. diazotrophicus* los resultados indican que la expresión diferencial de las ubiquinol oxidasas  $ba_3$  y *bd* depende de la concentración de amonio (condición de fijación o no fijación de nitrógeno, Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

---

---

La quinol oxidasa *bd* de *E. coli* es un dímero con Mr de 58 y 43 kDa, respectivamente; contiene un hemo *d* y dos hemos tipo *b*: el *b*<sub>558</sub> y el *b*<sub>595</sub> por molécula, no contiene Cu ni Fe de naturaleza no hémica. La enzima oxida quinonas con eficiencia, no posee actividad de citocromo *c* oxidasa. La enzima posee una alta resistencia a KCN ( $K_i = 0.1$  a  $1$  mM) y a otros inhibidores típicos de oxidasas terminales (azida, nitrito, etc.) (Junemann, 1997).

En *G. xylinum*, la quinol oxidasa *bd* es la oxidasa predominante en cualquier condición de cultivo, su expresión no parece estar regulada por la concentración de oxígeno, en forma similar a lo observado para *G. diazotrophicus* (Flores-Encarnación, 2001); la expresión del citocromo *d* fue constante a lo largo del cultivo en condiciones estáticas ó agitadas por lo que tampoco parece estar asociada su expresión a fase estacionaria. Es una enzima que oxida quinonas pero no citocromo *c* ni Ascorbato + TMPD. En congruencia con lo que se ha reportado, *G. xylinum* posee una respiración resistente a cianuro, con una  $I_{50}$  de  $1.5$  mM, similar a la encontrada para *Brochothrix thermosphacta* ( $I_{50} \approx 1$  mM; Gil *et al.*, 1992) y para la enzima purificada de *E. coli* ( $I_{50} = 2$  mM; Kita *et al.*, 1984).

Nuestros datos confirman que el sistema respiratorio de *G. xylinum* presenta una cadena de transporte de electrones ramificada típica de los *Acetobacter* (Matsushita *et al.*, 1994). La bacteria posee deshidrogenasas membranales de alta actividad para los sustratos alcohol, acetaldehído y NADH, así como enzimas deshidrogenasas de baja actividad para los sustratos glucosa y succinato. El aceptor de electrones de todas las deshidrogenasas es la ubiquinona-10; la cual a su vez cede los electrones a las dos oxidasas terminales: la quinol oxidasa *bd* y la quinol oxidasa *ba*<sub>3</sub>.

La titulación con cianuro de potasio demuestra que ambas oxidasas son alimentadas por igual por todas las deshidrogenasas membranales vía la ubiquinona-10; así mismo, no existen mecanismos alternos de transporte de electrones hacia las oxidasas terminales como se ha reportado con la PQQ- alcohol deshidrogenasa de *G. suboxydans* (Matsushita *et al.*, 1994).

El análisis espectroscópico y de actividad respiratoria de *G. xylinum* crecido en condición de cultivo estático aportó resultados similares a los obtenidos cuando la bacteria se cultivo en condiciones de agitación; con excepción de un incrementó en las actividades de oxidasas para algunos sustratos, no se observó algún cambio relevante en la expresión de citocromos ni en las actividades de deshidrogenasas. Bajo ambas condiciones se expresaron las dos quinol oxidasas, siendo predominante la oxidasa *bd* sobre la oxidasa *ba*<sub>3</sub>.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio permiten elaborar una propuesta de la organización y composición del sistema respiratorio en *G. xylinum* (Figura 24).

---



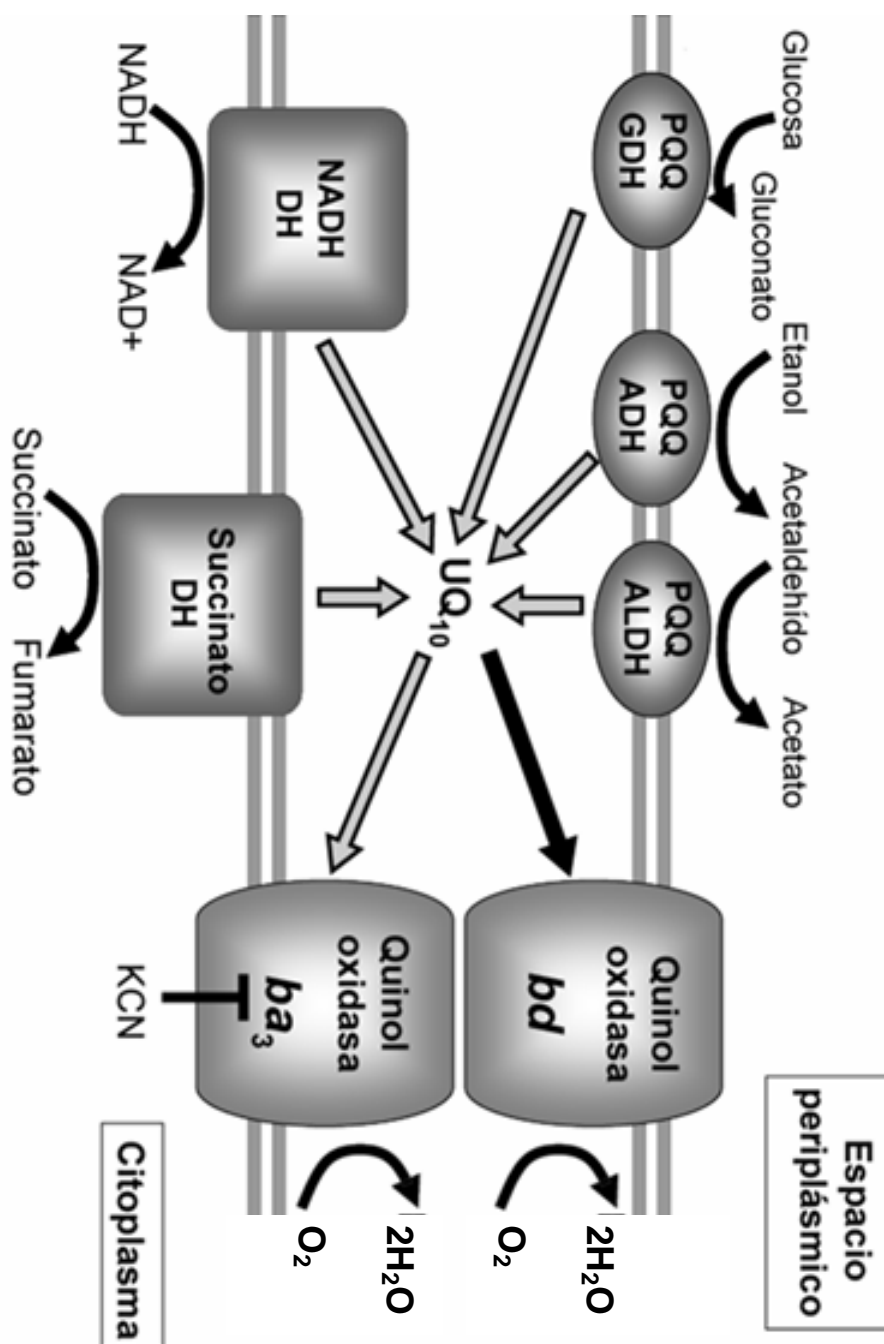


Figura 24. Composición del sistema respiratorio de *G. xylinum*. Las PQQ deshidrogenasas periplásmicas para glucosa (PQQ-GDH), alcohol (PQQ-ADH), aldehído (PQQ-ALDH) y las deshidrogenasas membranales para NADH (NADH-DH) y succinato (Succinato-DH) entregan electrones a la ubiquinona-10 (UQ-10). La ubiquinona-10 es el donador de electrones único para las quinol oxidasas *bd* y *ba*<sub>3</sub>. La oxidasa *bd* es predominante y responsable de la resistencia a KCN; la oxidasa *ba*<sub>3</sub> es la oxidasa minoritaria y sensible a cianuro.

Aunque nuestros estudios descartaron la presencia de citocromo *bc<sub>1</sub>*; las actividades de oxidasa asociadas a los sustratos etanol, acetaldehído y NADH fueron sensibles a antimicina y mixotiazol, inhibidores típicos del citocromo *bc<sub>1</sub>*. Este comportamiento había sido previamente reportado en *G. diazotrophicus* (Flores-Encarnación, 2001) y se postuló que el sitio de acción sobre las PQQ deshidrogenasas membranales era precisamente el grupo prostético PQQ. Estudios posteriores en *G. diazotrophicus* demostraron que el grupo PQQ no es afectado por antimicina, mixotiazol ó estigmatelina y se planteó que los inhibidores impiden el flujo de electrones de las deshidrogenasas hacia la ubiquinona-10 (Martínez-Yee, 2005; Gómez-Manzo, comunicación personal).

En general, las concentraciones medias inhibitorias determinadas en ambas bacterias son similares (Cuadro IX). Los ensayos realizados con la PQQ-ADH de *G. xylinum* comprobaron que el sitio de acción de mixotiazol y antimicina era la unión a quinona; los inhibidores no afectan al grupo PQQ ni la transferencia de electrones hacia los citocromos *c* de la enzima, sin embargo, si impiden la transferencia de electrones de los citocromos *c* hacia la ubiquinona-2.

Actividad de oxidasa	Inhibidor (I <sub>50</sub> μM)		
	Estigmatelina	Antimicina	Mixotiazol
Etanol	0.10 (n.d.)	0.05 (0.3)	0.5 (0.25)
Acetaldehído	0.75 (0.75)	0.5 (5.0)	5 (2.70)
NADH	0.75 (2.00)	25 (30)	>20 (2.0)

Cuadro IX. Concentración media inhibitoria para las actividades de oxidasa en membranas de *G. xylinum* y *G. diazotrophicus*. Los valores para *G. xylinum* se presenta fuera de paréntesis, los datos para *G. diazotrophicus* (Martínez-Yee, 2005) se encuentran entre paréntesis.

Con base en los resultados de nuestro estudio, postulamos que las deshidrogenasas membranales tienen una alta homología estructural en el sitio de unión a ubiquinona-10; sin embargo, estos sitios poseen una afinidad diferencial para los inhibidores.

---

Las bacterias ácido acéticas poseen múltiples deshidrogenasas primarias unidas a membrana (Matushita *et al.*, 1985), las cuales contienen como grupos prostéticos PQQ, citocromo *c* ó FAD (Prust *et al.*, 2005; Gómez-Manzo *et al.*, 2005). *G. xylinum* posee un conjunto de deshidrogenasas típico de los *Acetobacter*: un eficiente sistema oxidativo de alcoholes compuesto por las PQQ-alcohol y aldehído deshidrogenasas; una NADH deshidrogenasa membranal con buena actividad y una PQQ- glucosa deshidrogenasa de pobre actividad enzimática.

La identidad de la NADH deshidrogenasa de *G. xylinum* es incierta, los estudios en células enteras y membranas con inhibidores no permiten identificar con certeza el (los) tipo(s) de deshidrogenasa(s) presentes en la cadena respiratoria de esta bacteria. La oxidación de NADH exógeno y la resistencia a rotenona apuntan hacia una NADH- DH tipo II con sitio activo orientado hacia el periplasma y no acoplada a la cadena respiratoria, similar a lo que se ha reportado para *G. oxydans* (Prust *et al.*, 2005).

La actividad de glucosa deshidrogenasa determinada en *G. xylinum* no concuerda con las altas actividades previamente reportadas para otras bacterias acéticas. En *G. diazotrophicus* se ha reportado que la PQQ-GDH es una enzima con alta actividad de deshidrogenasa, la cual participa activamente en el mecanismo de protección respiratoria a la nitrogenasa (Flores-Encarnación *et al.*, 1999); para *G. suboxydans*, la PQQ-GDH es la enzima principal para la disimilación de glucosa (Matsushita *et al.*, 1994). En nuestro estudio, la baja actividad de la PQQ-GDH puede deberse a la utilización de la glucosa como fuente de carbono para la síntesis de celulosa y no como fuente de energía, como lo demuestran las bajas actividades de glucosa oxidasa en membranas y células enteras (Chávez-Pacheco *et al.*, 2005). En congruencia con esta hipótesis, una cepa de *G. xylinum* carente de actividad de glucosa deshidrogenasa fue capaz de producir 1.7 veces más celulosa que la cepa silvestre con actividad de PQQ-GDH (Shigematsu *et al.*, 2005).

La acidificación del medio de cultivo debido a la excreción de ácido acético es una estrategia de los *Acetobacter* para colonizar sus nichos; esto explica la gran actividad del sistema oxidativo de alcoholes de *G. xylinum* y el abrupto descenso de pH del medio de cultivo (pH final de 3.2). Comportamientos similares se observan en *A. aceti*, *A. pasteurianus* y *A. polyoxogenes* (Matsushita *et al.*, 1994). La alta actividad de oxidación de etanol y acetaldehído indican que en nuestras condiciones de cultivo, *G. xylinum* emplea al alcohol como fuente principal de energía (Chávez-Pacheco *et al.*, 2005).

---

Para ahondar en el conocimiento del sistema oxidativo de alcoholes, se purificó y caracterizó la PQQ- alcohol deshidrogenasa. La enzima de *G. xylinum* es una PQQ- alcohol deshidrogenasa de clase III, unida débilmente a la membrana plasmática y con su sitio activo orientado hacia el periplasma.

La enzima purificada en este estudio presenta una composición típica de las PQQ-ADHs de los *Acetobacter*. la subunidad I contiene PQQ y citocromo *c* como grupos prostéticos; la subunidad II posee 3 citocromos *c*; la subunidad III no contiene grupos prostéticos y se asume que su función es estructural; esta subunidad está ausente en las enzimas de *A. polyoxogenes*, *G. diazotrophicus* y *G. xylinum* (Cuadro X).

Subunidad	Organismo					
	<i>A.</i> <sup>1</sup> <i>aceti</i>	<i>A.</i> <sup>2</sup> <i>methanolicus</i>	<i>G.</i> <sup>3</sup> <i>oxydans</i>	<i>A.</i> <sup>4</sup> <i>polyoxogenes</i>	<i>G.</i> <sup>5</sup> <i>diazotrophicus</i>	<i>G.</i> <i>xylinum</i>
I	72.0	80.0	78.0	72.0	71.0	68.0
II	50.0	54.0	48.0	44.0	44.0	41.0
III	15.0	8.0	14.0	n.d.	n.d.	n.d.
Holoenzima	137.0	142.0	140.0	116.0	115.0	109.0

Cuadro X. Composición oligomérica de PQQ-ADH purificadas en bacterias ácido acéticas. <sup>1</sup> *Acetobacter aceti* (Matsushita *et al.*, 1992d); <sup>2</sup> *Acetobacter methanolicus* (Frebortová *et al.*, 1997b); <sup>3</sup> *Gluconobacter oxydans* (Matsushita *et al.*, 1995); <sup>4</sup> *Acetobacter polyoxogenes* (Tamaki *et al.*, 1991); <sup>5</sup> *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gómez-Manzo, comunicación personal).

Además de la homología en composición oligomérica, las PQQ-ADHs de *G. diazotrophicus* y *G. xylinum* comparten la peculiaridad de ser enzimas bifuncionales con capacidad de oxidar alcoholes y aldehídos (Gómez-Manzo, comunicación personal).

Existen reportes de alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD<sup>+</sup> que poseen actividad de alcohol/aldehído deshidrogenasas, estas enzimas en condiciones de crecimiento anaeróbico convierten acetil-CoA a acetaldehído y en una reacción posterior el acetaldehído es reducido a etanol (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000). En condiciones aeróbicas, las NAD<sup>+</sup> alcohol deshidrogenasas oxidan etanol para producir acetaldehído y posteriormente acetil-CoA; sin embargo, las reacciones en esta dirección son impedidas por dos factores: la síntesis de la proteína es disminuida en aerobiosis y la enzima sufre de oxidación catalizada por metal que disminuye severamente su actividad (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000).

---

Las NAD<sup>+</sup> alcohol deshidrogenasas descritas en *Clostridium acetobutylicum* (Nair *et al.*, 1994); *Escherichia coli* (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000); *Polytomella sp.* (Atteia *et al.*, 2003) y *Leuconostoc mesenteroides* (Koo *et al.*, 2005) muestran que su actividad bifuncional proviene de la fusión de los genes que codificaban para las actividades de alcohol y aldehído deshidrogenasa; el carboxilo terminal contiene un dominio de alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> y un centro metálico de Fe<sup>+2</sup>, el amino terminal posee un dominio homólogo al de las aldehído deshidrogenasas dependientes de NAD<sup>+</sup> (Chen *et al.*, 2004); ambos dominios se encuentran enlazados por una secuencia de unión ó “linker”.

El mecanismo de reacción de las alcohol deshidrogenasas NAD<sup>+</sup> dependientes implica que el dominio de aldehído deshidrogenasa cataliza la reducción del acetyl-CoA a acetaldehído; este compuesto se libera del dominio de aldehído y se canaliza al dominio de alcohol deshidrogenasa para su reducción a etanol; las reacciones se llevan a cabo en la misma enzima en dos sitios activos.

Dentro de las PQQ-ADHs de clase III no existen reportes previos de enzimas bifuncionales. Dentro la clase II, la quinohemoproteína PQQ-ADH de *Comamonas testosteroni* (anteriormente *Pseudomonas testosteroni*) oxida una amplia gama de alcoholes primarios, secundarios y aldehídos (Groen *et al.*, 1986); esta proteína es un monómero de 65 kDa, posee 1 mol de PQQ, 1 mol de hemo C y de Ca<sup>+2</sup> como grupos prostéticos por mol de enzima. La participación de esta enzima en la oxidación de aldehídos *in vivo* es cuestionable, dado que *C. testosteroni* posee otra aldehído deshidrogenasa NAD<sup>+</sup> dependiente con mayor afinidad por estos compuestos; aunque la enzima oxida alcoholes y aldehídos se desconoce si puede llevar a cabo la oxidación de alcoholes hasta ácidos carboxílicos sin previa liberación del intermediario aldehído.

Así mismo, la actividad de aldehído deshidrogenasa de la PQQ-ADH de *G. xylinum in vivo* es cuestionable, la bacteria posee una aldehído deshidrogenasa dependiente de PQQ que oxida aldehídos con eficiencia y podría cubrir las necesidades metabólicas; sin embargo, la enzima de *G. xylinum* cataliza la oxidación de etanol a ácido acético sin liberar acetaldehído (Figura 20), lo cual aumenta la posibilidad de que la bifuncionalidad si tenga un papel activo en el metabolismo. Otro factor que favorece doble actividad de esta enzima es la diferencia de pH óptimo para las PQQ-ADH y PQQ-ALDH, la primera es altamente activa a pH de 6.0 y su actividad decrece conforme el pH se acidifica; mientras la segunda enzima posee mayor actividad a pH ácidos (pH de 4.5); así el factor pH podría determinar que enzima se encarga de oxidar al acetaldehído *in vivo*.

---

---

## VIII. CONCLUSIONES

La optimización del medio de cultivo (medio BEGG) y la innovación de un procedimiento de recuperación celular permiten la obtención de una gran cantidad de biomasa (3.6 g/l de medio) de *G. xylinum*.

La cinética de crecimiento bacteriano en condiciones de cultivo estático y agitado presenta un comportamiento típico con fases de adaptación (fase lag), de crecimiento exponencial (fase logarítmica) y fase estacionaria.

La bacteria expresa citocromos de tipo **a**, **b**, **c** y **d**, la expresión es constitutiva e independiente del sistema de cultivo y de la fase de crecimiento. El nivel de reducción de citocromos es dependiente del sustrato empleado, sin embargo, el perfil espectral fue similar para todos los sustratos analizados.

El análisis espectral confirma la presencia de al menos dos oxidasas terminales: la quinol oxidasa **ba<sub>3</sub>** y la quinol oxidasa **bd**. Las dos oxidasas terminales se encuentran en el sistema respiratorio de cultivo estático y agitado y poseen igual participación.

La inhibición de oxidasas con KCN presenta una curva bifásica, donde el componente sensible a cianuro es minoritario y se asocia a la oxidasa **ba<sub>3</sub>** y el componente resistente corresponde la oxidasa dominante **bd**.

*G. xylinum* posee capacidad para oxidar NADH exógeno *in vivo*; esta actividad podría estar asociada a una NADH deshidrogenasa de tipo II. Nuestros resultados con inhibidores específicos no permiten dilucidar la naturaleza de esta enzima.

Las PQQ deshidrogenasas membranales son sensibles a inhibidores del complejo **bc<sub>1</sub>** (mixotiazol, antimicina y estigmatelina); los resultados sugieren la presencia de sitios homólogos de inhibición con afinidades diferentes. Se postula que el sitio de unión a quinona es el punto de acción de los inhibidores.

*G. xylinum* posee un sistema oxidativo de alcoholes compuesto por una PQQ alcohol deshidrogenasa bifuncional que oxida alcoholes y aldehídos con preferencia por los alcoholes; también posee una PQQ aldehído deshidrogenasa específica para aldehídos.

La redundancia en la oxidación de aldehídos por las enzimas PQQ alcohol y aldehído deshidrogenasas puede explicarse en función de su actividad dependiente de pH, la PQQ

---

---

ADH posee un pH óptimo de 6.0 mientras que para la PQQ ALDH es de 4.5. De esta manera, el pH regula la enzima participante en la oxidación de aldehídos.

Estudios con la enzima PQQ alcohol deshidrogenasa purificada muestran que tiene la capacidad de oxidar el etanol hasta acetato en dos eventos que ocurren en la misma enzima, no existe previa liberación del subproducto acetaldehído.

---

## IX. REFERENCIAS

1. Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K., y Ameyama, M. Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 2331-2340 (1978).
  2. Ameyama, M., y Adachi, O. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* **89**: 450-457 (1982a).
  3. Ameyama, M., y Adachi, O. Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. *Methods Enzymol.* **89**: 491-497 (1982b).
  4. Ameyama, M., Matsushita, K., Shanagawa, E., y Adachi, O. Sugar oxidizing respiratory chain of *Gluconobacter suboxydans*. Evidence for a branched respiratory chain and characterization of respiratory chain linked cytochromes. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2943-29450 (1987).
  5. Anraku, Y., y Gennis, B. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 262-266 (1987).
  6. Anthony, C., Ghosh, M., y Blake, C. C. F. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrrolo-quinoline quinone. *Biochem. J.* **304**: 665-674 (1994).
  7. Atteia, A., van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Henze, K., Martin, W., Riveros-Rosas, H. y González-Halphen, D. Bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase (ADHE) in chlorophyte algal mitochondria. *Plant Mol. Biol.* **53** 175-188 (2003).
  8. Benziman, M., y Galanter, Y. Flavine adenine dinucleotide-linked malic dehydrogenase from *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **88**: 1010-1018 (1964).
  9. Benziman, M., y Goldhamer, H. The role of ubiquinone in the respiratory chain of *Acetobacter xylinum*. *Biochem. J.* **108**: 311-316 (1968).
  10. Brown, A. J. On acetic ferment which forms cellulose *J. Chem. Soc.* **49**: 432-439 (1886).
  11. Cannon, R. E. y Anderson, S. M. Biogenesis of bacterial cellulose. *Crit. Rev. Microbiol.* **17**: 435-447 (1991).
-



- 
12. Chao, Y., Sugano, Y. y Shoda, M. Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal loop airlift reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 673–679 (2001).
  13. Chávez-Pacheco, J. L., Martínez-Yee, S., Contreras, M. L., Gómez-Manzo, S., Membrillo-Hernández, J., y Escamilla, J. E. Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 1130-1140 (2005).
  14. Chance, B. The carbon monoxide compounds of the cytochrome oxidases. I. Difference spectra. *J. Biol. Chem.* **202**: 383-396 (1953a).
  15. Chance, B. The carbon monoxide compounds of the cytochrome oxidases. II. Photodissociation spectra. *J. Biol. Chem.* **202**: 397-406 (1953b).
  16. Chen, M., Li, E. y Stanley, S. L. Jr. Structural analysis of the acetaldehyde dehydrogenase activity of *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2), a member of the ADHE enzyme family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **137**: 201-205 (2004).
  17. Cheng, H. P., Wang, P. M., Chen, J. W. y Wu, W. T. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35**: 125–132 (2002).
  18. Delmer, P. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 245-276 (1999).
  19. Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., y Prust, C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 233-242 (2002).
  20. Djurdjić, V., y Stojanović, S. A method for spectrophotometric determination of acetaldehyde with thiosemicarbazide in blood. *Facta Universitatis* **1**: 129–134 (1998).
  21. D’mello, R., Hill, S., y Poole, R. K. Determination of the oxygen affinities of the terminal oxidases in *Azotobacter vinelandii* using the deoxygenation of oxyleghaemoglobin and oxymyoglobin: cytochrome *bd* is a low-affinity oxidase. *Microbiology* **140**: 1395-1402 (1994).
-

- 
22. D'mello, R., Hill, S., y Poole, R. K. The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity *in vivo* by oxygen inhibition. *Microbiology* **142**: 755-763 (1996).
  23. Englehardt, J. Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose. *Carbohydr. Eur.* **12**: 514 (1995).
  24. Escamilla, E., Contreras, M., Flores-Encarnación, M., y García-Flores, L. M. Los sistemas respiratorios bacterianos. UNAM *Mensaje Bioquímico*. **XXIII**: 67-103 (1999).
  25. Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzúa, L., Aguilar, G. R., Baca, B. E., y Escamilla, J. E. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.* **181**: 6987-6995 (1999).
  26. 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 Doctoral (2001).
  27. Frebortová, J., Matsushita, K., y Adachi, O. Effect of growth substrates on formation of alcohol dehydrogenase in *Acetobacter methanolicus* and *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Bioeng.* **83**: 21-25 (1997a).
  28. Frebortová, J., Matsushita, K., Yakushi, T., Toyama, H., y Adachi, O. Quinoprotein alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: kinetic study on the enzyme purified from *Acetobacter methanolicus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 459-465 (1997b).
  29. Fukaya, M., Tayama, K., Tamaki, T., Ebisuya, H., Okumura, H., Kawamura, Y., Horinouchi, S., y Beppu, T. Characterization of a cytochrome *a<sub>1</sub>* that functions as a ubiquinol oxidase in *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* **175**: 4307-4314 (1993).
  30. Gil, A., Kroll, R. G., y Poole, R. K. The cytochrome composition of the meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*: identification of cytochrome *a<sub>3</sub>* and *d*-type terminal oxidases under various conditions. *Arch. Microbiol.* **158**: 226-233 (1992).
  31. Gilles-González, M. A. Oxygen signal transduction. *IUBMB Life* **51**: 165-173 (2001).
  32. González-Valdez, A. La PQQ- acetaldehído deshidrogenasa periplásmica de *Acetobacter diazotrophicus*. UNAM. Instituto de Fisiología Celular. Tesis de Licenciatura (2004).
-

- 
33. Gómez-Manzo, S., Arreguín-Espinosa, R., Contreras-Zentella, M., y Escamilla-Marván, E. Las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos: distribución, clasificación, estructura y función. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* **8**: 28-37 (2005).
  34. Groen, B. W., van Kleef, M. A. G., y Duine, J. A. Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.* **234**: 611-615 (1986).
  35. Gromet, Z., Schramm, M., y Hestrin, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. *Biochem. J.* **67**: 679-689 (1957).
  36. Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., y Kumar, A. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 445-456 (2001).
  37. Hagerhall, C., Magnitsky, S., Sled, V. D., Schroder, I., Gunsalus, R. P., Cecchini, G., y 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**: 26157-26164 (1999).
  38. Hill, S., Viollet, S., Smith, A., y Anthony, C. Roles for enteric *d*-type cytochrome oxidase in N<sub>2</sub> fixation and microaerobiosis. *J. Bacteriol.* **172**: 2071-2078 (1990).
  39. Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, R. R., y Kim, Y. S. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated cultures. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 183-188 (1999).
  40. Jongejan, A., Jongejan, J. A., y Duine, J. A. Homology model of the quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *Protein Eng.* **11**: 185-198 (1998).
  41. Jünemann, S. (1997) Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1321**: 107-127.
  42. Kelly, D. P., Lu, W. P., y 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).
-

- 
43. Kita, K., Konishi, K., y Anraku, Y. Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II Purification and properties of cytochrome *b<sub>558</sub>-d* complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electron carrying systems. *J. Biol. Chem.* **259**: 3375-3381 (1984).
44. Klemm, D., Schmauder, H., y Heinz, T. **Biopolymers** Vol. 5 Polysaccharides from prokaryots (Alexyer Steinbüchel Ed.) Wiley (2002).
45. Koo, O. K., Jeong, D. W., Lee, J. M., Kim, M. J., Lee, J. H., Chang, H. C., Kim, J. H., y 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).
46. Kouda, T., Naritomi, K., Yano, H., y Yoshinaga, F. Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated cultures. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 124–127 (1997).
47. Krystynowicz, A., y Bielecki, S. Biosynthesis of bacterial cellulose and its potential application in the different industries (2003). *Polish Biotechnology News* consultado en [www.biotechnology-pl.com/science/krystynowicz.html](http://www.biotechnology-pl.com/science/krystynowicz.html).
48. Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska, A., Goncalvez, M., Turkiewicz, M., y Bielecki, S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 189-195 (2002).
49. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680- 685.
50. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M. M. **Principles of Biochemistry** 2<sup>nd</sup>. Edition Capítulo 18, Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. Worth Publishers United States of America (1993).
51. Lubben, M., y Mory, K. Novel prenylated hemes and cofactors of cytochrome oxidases. Archea have modified heme A and O. *J. Biol. Chem.* **269**: 21473-21479 (1994).
52. Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Tolber, N. E., y Bieber, L. L. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods Enzymol.* **72**: 296 – 303 (1981).
-

- 
53. 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).
  54. Matsuoka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O., y Yoshinaga, F. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 575- 579 (1996).
  55. Matsushita, K., Nonobe, M., Shinagawa, E., Adachi, O., y Ameyama, M. Isolation and characterization of outer and cytoplasmic membranes from spheroplasts of *Acetobacter acetii*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 3519-3526 (1985).
  56. Matsushita, K., Ebisuya, H., Ameyama, M., y Adachi, O. Change of the terminal oxidase from cytochrome *a*<sub>1</sub> in shaking cultures to cytochrome *o* in static cultures of *Acetobacter acetii*. *J. Bacteriol.* **174**: 122-129 (1992a).
  57. Matsushita, K., Takahashi, K., Takahashi, M., Ameyama, M., y Adachi O. Methanol and ethanol oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium *Acetobacter methanolicus*. *J. Biochem. (Tokyo)* **111**: 739-747 (1992b).
  58. Matsushita, K., Ebisuya, H., y Adachi, O. Homology in the structure and the prosthetic groups between two different terminal ubiquinol oxidases, cytochrome *a*<sub>1</sub> and cytochrome *o*, of *Acetobacter acetii*. *J. Biol. Chem.* **267**(34): 24748-24753 (1992c).
  59. Matsushita, K., Takaki, Y., Shinagawa, E., Ameyama, M., y Adachi, O. Ethanol oxidase respiratory chain of acetic acid bacteria. Reactivity with ubiquinone of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenases purified from *Acetobacter acetii* and *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 304-310 (1992d).
  60. Matsushita, K., Toyama, H., y Adachi, O. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **36**: 247-301(1994).
  61. Matsushita, K., Yakushi, T., Takaki, Y., Toyama, H., y 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).
  62. McIntire, W. S. Quinoproteins. *FASEB J.* **8**: 513-519 (1994).
-

- 
63. Melo, A. M., Bandejas, T. M., y Teixeira, M. New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 603-616 (2004).
64. Membrillo-Hernández, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J., y Lin E. C. C. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J. Biol. Chem.*, **275**: 33869-33875 (2000).
65. Méndez-Ortiz, M. M., y Membrillo-Hernández, J. Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* **7**: 26-34 (2004).
66. Mitchell, P., y Moyle, J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*. **213**:137-139 (1967).
67. Molinari, J. L., Tato, P., Rodríguez, D., Solano, S., Rubio, M., y Sepúlveda, J. Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study. *Parasitol. Res.* **84**: 173–180 (1998).
68. Mormino, R., y Bungay, H. Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 503–506 (2003).
69. Nair, R. V., Bennett, G. N., y Papoutsakis, E. T. Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **176**: 871-885 (1994).
70. Nakai, T., Tonouchi, N., Konishi, T., Kojima, Y., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Sakai, F., y Hayashi, T. Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**: 14-18 (1999).
71. Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., y Yoshinaga, F. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J. Ferment. Bioeng.* **85**: 598–603 (1998a).
72. Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., y Yoshinaga, F. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J. Ferment. Bioeng.* **85**: 89–95 (1998b).
73. Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kotter, P., van Tuijl, A., De Vries, S., van Dijken, J. P., y Pronk, J. T. *In vivo* analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Bacteriol.* **182**: 2823-2830 (2000).
-

- 
74. Patchett, R. A., y Jones, C. W. The apparent oxidation of NADH by whole cells of the methylotrophic bacterium *Methylophilus methylotrophus*. A cautionary tale. *Antonie Van Leeuwenhoek* **52**: 387-392 (1986).
75. Poole, R. K., y Hill, S. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* – roles of the terminal oxidases. *Biosci. Rep.* **17**: 303-317 (1997).
76. Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., y Deppenmeier, U. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnol.* **23**: 195-200 (2005).
77. Puustinen, A., y Wikström, M. The heme groups of cytochrome *o* from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6122-6126 (1991).
78. Ramana, K., Tomar, A., y Singh, L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 245-248 (2000).
79. Ross, P., Mayer, R., y Benziman, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**: 35-58 (1991).
80. Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikan, D., y Benziman, M. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *J. Biol. Chem.* **265**: 18933-18943 (1990).
81. Saxena, I., Kudlika, K., Okuda, K., y Brown, M. Characterization of genes in the cellulose synthesizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: Implications for cellulose crystallization *J. Bacteriol.* **176**: 5735-5752 (1994).
82. Saxena, I., y Brown, M. Identification of a second cellulose synthase gen (*acsII*) in *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **177**: 5276-5283 (1995).
83. Schramm, M., y Hestrin, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* **11**: 123-129 (1954).
84. Shigematsu, T., Takamine, K., Kitazato, M., Morita, T., Naritomi, T., Morimura, S., y Kida, K. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (*gdh*)-deficient mutant of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp. *J. Biosci. Bioeng.* **99**: 415-422 (2005).
-

- 
85. Son, J. H., Heo, M. S., Kim, Y. G., y Lee, S. J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking culture. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **33**: 1-5 (2001).
  86. Son, H. J., Kim, H. G., Kim, K. K., Kim, H. S., Kim, Y. G., y Lee, S. J. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresour. Technol.* **86**: 215-219 (2003).
  87. Swissa, M., Aloni, Y., Weinhouse, H., y Benziman, M. Intermediary steps in *Acetobacter xylinum* cellulose synthesis: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant. *J. Bacteriol.* **143**: 1142-1150 (1980).
  88. Tamaki, T., Fukaya, M., Takemura, H., Tayama, K., Okumura, H., Kawamura, Y., Nishiyama, M., Horinouchi, S., y Beppu, T. Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Biochim Biophys Acta.* **1088**: 292-300 (1991).
  89. Tayama, K., Fukaya, M., Kawamura, Y., y Beppu, T. Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 181-185 (1989).
  90. Thomas, P. E., Ryan, D., y Levin W. An improved staining procedure for the detection of peroxidase activity of cytochrome P450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **75**: 168-176 (1976).
  91. Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., y Horinouchi S. Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 1377-1379 (1996).
  92. Toyama, H., Mathews, F. S., Adachi, O., y Matsushita, K. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structures, function, and physiology. *Arch. Biochem. Biophys.* **428**: 10-21 (2004).
  93. Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M., Tsuchida, T., y Yoshinaga, F. Screening of bacterial cellulose producing *Acetobacter* strains suitable for agitation culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 1498–1502 (1995).
-



- 
94. Verschuren, P. G., Cardona, T. D., Nout M. J. R., De Gooijer, K. D., y Van de Heuvel, J. C. Location and limitation of cellulose production by *Acetobacter xylinum* established from oxygen profiles. *J. Biosci. Bioeng.* **89**: 414-419 (2000).
  95. Watanabe, K., y Yamanaka, S. Effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 65-68 (1995).
  96. Weinhouse, H., y Benziman, M. Regulation of hexose phosphate metabolism in *Acetobacter xylinum*. *Biochem. J.* **138**: 537-542 (1974).
  97. Williams, W. S., y Cannon, R. E. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2448-2452 (1989).
  98. Williams, H. D., y Poole, R. K. The cytochromes of *Acetobacter pasteurianus* NCIB 6428. Evidence of a role for a cytochrome  $a_1$ -like haemoprotein in electron transfer to cytochrome oxidase *d*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2461-2472 (1987).
  99. Wook, J., Kook, Y., Kwan, J., Ryang, Y., y Kim, Y. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 183-188 (1999).
  100. Yamada, Y., Hoshino, K., e Ishikawa, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1244-1251 (1997).
  101. Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., y Iguchi, M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J. Mater. Sci.* **24**: 3141-3145 (1989).
  102. Yamanaka, S., Ishihara, M., y Sugiyama, J. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose* **7**: 213-225 (2000).
  103. Yamanaka, S., y Watanabe, K. **Applications of Bacterial Cellulose in Cellulosic Polymers**. Chapter 11. Gilbert, R., Ed., Hanser Publishers Inc., Cincinnati, OH. (1994).
-

**ANEXO I.**

**ARTÍCULO:**

**Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology**

**Juan L. Chávez Pacheco, Suri Martínez Yee, Martha L. Contreras, Saúl Gómez Manzo, Jorge Membrillo Hernández, J. Edgardo Escamilla.**

---