

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Química**

**Análisis de los componentes del sector glucosa-  
ubiquinona reductasa del sistema respiratorio de  
*Acetobacter diazotrophicus***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO**

**PRESENTA**

**Jorge Jasso Aguirre**

**México, D.F.**

**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.

Jurado asignado:

Presidente      Profa. Ruth Elizabeth Román Palacios

Vocal            Profa. Alejandrina Acosta Huerta

Secretario      Prof. José Edgardo Escamilla Marván

1<sup>er</sup> suplente     Prof. Blas Flores Pérez

2<sup>o</sup> suplente      Profa. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Esta tesis se desarrolló en el departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

Dr. José Edgardo Escamilla Marván

Sustentante:

Jorge Jasso Aguirre

Aunque estuve a punto de omitir esta sección, en realidad sí quiero decir GRACIAS, más que respecto a esta tesis, por una etapa que está a punto de concluir; porque nada es para siempre, pero tampoco deja de existir del todo, al menos en lo subjetivo...

Por esta tesis, al doctor Edgardo Escamilla; porque me ayudó en ese momento a descubrir que la vida está contenida en sí misma, que hay un después.

A Dios por todo, por lo que me gusta, por lo que no me gusta , por lo que entiendo y lo que no. Mamá, te admiro. Mi hermana, te adoro, estemos juntos pase cual pase. A todo y a todos los que me han ayudado a crecer... A la sorpresa de qué haré mañana... A los que ya no están en este mundo y en mi vida... mi niña Samantha, siempre estaremos juntos, como quedamos... Pablo, fuiste crucial... Papi y Mami en mi corazón...A esos enfermos, los amé... a Ikram Antaki... A mis amigos... a la Guzmán...

A *Gluconacetobacter diazotrophicus*, ustedes son la semilla y el pretexto, Gracias... mi Universidad, los universitarios y a mi nación... A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio 101 oriente, por la suerte de conocerlos, por los momentos que no se olvidan, aunque parezca que sí...

Negro, Rocco, Sofía, Pandi, Cata (Catffer, o Scrat?) y mis personitas que ya no están tan cerca...

A mí, por ser imperfecto, por levantarme, por ser...

Al conocimiento...

Este trabajo le pertenece a la ciencia y a ella GRACIAS.

## Abreviaturas

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Trifosfato de adenosina
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Acetileno
CN <sup>-</sup>	Ion cianuro
CO	Monóxido de carbono
DeUQ	Decilubiquinona
FAD	Flavina adenina dinucleótido
GDH	Glucosa deshidrogenasa
HPLC	High performance liquid chromatography
mGDH	Glucosa deshidrogenasa membranal
N <sub>2</sub>	Dinitrógeno; nitrógeno elemental
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (estado oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (estado reducido)
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo.
PQQ	Quinona de pirroloquinolina
Q <sub>n</sub>	Ubiquinona-n
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
sGDH	Glucosa deshidrogenasa soluble
TCHQ	2,3,5,6-tetraclorohidroquinona
TLC	Thin layer chromatography
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina

---

---

## Tabla de contenido

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>7</b>
<i>Sistemas respiratorios bacterianos</i> .....	7
<i>Las bacterias acéticas</i> .....	8
<i>Fijación Biológica de Nitrógeno</i> .....	11
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>15</b>
<i>Hipótesis</i> .....	15
<i>Objetivo General</i> .....	15
<i>Objetivos Particulares</i> .....	15
<b>Antecedentes</b> .....	<b>16</b>
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	16
<i>Glucosa deshidrogenasa membranal</i> .....	17
<i>Quinonas respiratorias</i> .....	20
<i>Oxidasas terminales</i> .....	30
<b>Parte experimental</b> .....	<b>38</b>
<i>Material Biológico</i> .....	38
<i>Mantenimiento del organismo</i> .....	38
<i>Medio de cultivo líquido LGITA</i> .....	38
<i>Cultivos analíticos de G. diazotrophicus</i> .....	38
<i>Propiedades del crecimiento de G. diazotrophicus</i> .....	39
Demanda de oxígeno	39
Oxígeno disuelto	39
Medición del pH	40
Amonio residual	40
<i>Cultivo masivo</i> .....	40
<i>Lisis celular y preparación de membranas</i> .....	40
<i>Actividades respiratorias</i> .....	41
<i>Extracción y determinación de quinonas de membranas</i> .....	42
<i>Fotoinactivación y reconstitución de quinonas de membranas</i> ....	42
<i>Separación de quinonas por TLC</i> .....	43
<i>Revelado de TLC para identificar grupos funcionales</i> .....	43
Revelado con azul de metileno reducido para ubiquinonas	43
Revelado con hidroxilamina/cloruro férrico	44
<b>Resultados</b> .....	<b>45</b>
<i>Cinética de crecimiento</i> .....	45
<i>Acidificación del medio de cultivo</i> .....	45
<i>Cantidad de amonio residual</i> .....	45
<i>Cantidad de oxígeno disuelto</i> .....	51

## Contenido

---

---

<i>Actividades Respiratorias</i> .....	51
<i>Determinación de quinonas por HPLC</i> .....	53
<i>Inactivación por irradiación con luz UV</i> .....	53
<i>Cromatografía en capa fina de quinonas endógenas</i> .....	57
<i>Espectros de absorción ultravioleta</i> .....	61
<b>Discusión</b> .....	<b>66</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>72</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>73</b>

## **Introducción**

### ***Sistemas respiratorios bacterianos***

El proceso principal que utilizan las bacterias para generar energía es el acoplamiento del flujo de electrones en las membranas con la formación de un gradiente electroquímico de protones. Los electrones fluyen desde donadores primarios hasta aceptores terminales, a través de una serie de proteínas transportadoras de electrones y una clase de lípidos llamada quinonas. Al flujo de electrones a través de los transportadores membranales y al consumo de oxígeno u otro aceptor alternativo le llamamos respiración. En las bacterias aeróbicas el aceptor terminal de electrones es oxígeno, mientras que las bacterias anaerobias presentan un aceptor alternativo a oxígeno, el cual pertenece a una variedad de moléculas, tales como nitrato, fumarato, sulfato, entre otras. La translocación de protones ocurre en sitios específicos de acoplamiento. La energía necesaria para formar el potencial protónico se obtiene de la diferencia en los potenciales de oxidoreducción de los transportadores de electrones. El potencial desarrollado es empleado para llevar a cabo la síntesis de ATP (molécula portadora de energía de las células procariontes y eucariontes), transporte de solutos, rotación flagelar, entre otras acciones (82).

Las cadenas de transporte de electrones varían entre las diferentes bacterias, y también de acuerdo con las condiciones de crecimiento. En forma similar al transporte de electrones mitocondrial, las cadenas bacterianas están organizadas en complejos de deshidrogenasa y en complejos de oxidasa conectados por

quinonas. Las quinonas aceptan electrones de las deshidrogenasas y los transfieren a los complejos de oxidasas que reducen al aceptor terminal. Algunos de los complejos de deshidrogenasas son NADH y succinato deshidrogenasa, análogos a los complejos I y II en la mitocondria. Pero además de estas deshidrogenasas, hay muchas otras para una gran diversidad de sustratos. Por ejemplo: la glucosa deshidrogenasa (GDH) etanol deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa, metanol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, entre otras (46). Dependiendo de la fuente de electrones y del aceptor de electrones, las bacterias pueden sintetizar y sustituir un complejo de deshidrogenasa por otro, o uno de oxidasas por uno de reductasa. Hay dos características principales que marcan la diferencia entre la cadenas respiratorias bacteriana y mitocondrial: la primera consiste en que las rutas hacia el aceptor terminal en las bacterias están ramificadas, con el sitio de la ramificación a nivel de la quinona o de algún citocromo, y la segunda radica en que muchas bacterias pueden alterar sus cadenas respiratorias dependiendo de las condiciones de crecimiento, principalmente a la tensión prevalente de oxígeno. Bajo condiciones aerobias, frecuentemente existen dos o tres ramificaciones que conducen a diferentes oxidasas.

### ***Las bacterias acéticas***

Las bacterias acéticas (de ácido acético) son aerobios obligados, conocidos como productores de vinagre. Estas producen ácido acético a partir de etanol por medio de dos reacciones catalíticas subsecuentes de alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH) membranales. Las bacterias acéticas son capaces de oxidar varios azúcares y alcoholes tales como D-

glucosa, D-sorbitol y glicerol. Tales reacciones de oxidación son llamadas “fermentaciones oxidativas”, puesto que éstas involucran la oxidación incompleta de alcoholes o azúcares acompañada por la acumulación de los productos de oxidación en el medio de cultivo. Las bacterias capaces de efectuar fermentaciones oxidativas son llamadas “bacterias oxidativas”, de las cuales las más conocidas son las bacterias acéticas (64). Las bacterias acéticas se clasificaron originalmente en dos géneros: *Gluconobacter* y *Acetobacter*. En 1984 se introdujo el subgénero *Gluconoacetobacter* dentro del género *Acetobacter*, para clasificar a aquellas bacterias acéticas que oxidan acetato y que tienen Q<sub>10</sub> como quinona principal (88). En 1997 se elevó este subgénero a nivel de género, con base en un análisis de la secuencia parcial de genes del rRNA 16S de varios microorganismos de este grupo taxonómico (86). Posteriormente el nombre genérico fue validado y corregido como *Gluconacetobacter* (87). El género *Gluconacetobacter* se diferencia del género *Gluconobacter* por su capacidad de oxidar acetato y del género *Acetobacter* por su quinona endógena (Q<sub>10</sub> en *Gluconacetobacter* y Q<sub>9</sub> en *Acetobacter*) (85). El microorganismo estudiado en esta tesis es *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

La cadena respiratoria de *Gluconobacter* spp. consiste en una gran cantidad de citocromo *c*, ubiquinona, y una ubiquinol oxidasa terminal citocromo *o*; éste también posee una oxidasa alternativa insensible a cianuro. Las cadenas respiratorias de *Acetobacter* spp. y *Gluconacetobacter* spp. tienen una composición similar que consiste en ubiquinona, citocromo *b*, citocromo *c*, y una ubiquinol oxidasa terminal que es un citocromo *a*<sub>1</sub>, la diferencia entre ambos

géneros consiste en que *Gluconacetobacter* no contiene citocromo o (64).

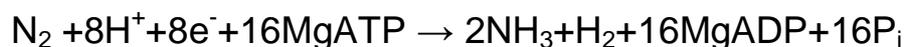
Las bacterias acéticas son Gram-negativas y por lo tanto, la fracción membranal consta de capas exterior e interior. En general, todos los componentes respiratorios de las bacterias Gram-negativas están localizados en la membrana citoplásmica, incluyendo a la mayoría de las deshidrogenasas primarias, tales como ADH, ALDH, GDH, las deshidrogenasas de lactato y NADH, así como los componentes citocrómicos. Las bacterias acéticas poseen varias deshidrogenasas que actúan en la oxidación de alcoholes y azúcares. Presentan deshidrogenasas dependientes de NAD(P)<sup>+</sup> localizadas en el citoplasma. Además presentan deshidrogenasas independientes de NAD(P)<sup>+</sup>, las cuales están localizadas en la membrana. Se sabe que casi todas las deshidrogenasas primarias involucradas en la oxidación de alcoholes y azúcares se localizan en las membranas de los organismos. Estas deshidrogenasas ancladas a la membrana han sido solubilizadas con detergente, purificadas y caracterizadas (2, 6, 3, 30, 35, 62, 64). Las deshidrogenasas membranales se dividen en quinoproteínas y flavoproteínas, que tienen grupos prostéticos de quinona de pirroloquinolina (PQQ) y dinucleótido de flavin adenina (FAD). Este último unido en forma covalente. Las deshidrogenasas que oxidan alcohol, aldehído, D-glucosa, D-fructosa y glicerol son quinoproteínas, mientras que D-gluconato, 2-ceto-D-gluconato, D-sorbitol y L-sorbosa son oxidados por flavoproteínas (64). Casi todas las deshidrogenasas de alcoholes y azúcares parecen tener el sitio activo orientado hacia el periplasma. Estas deshidrogenasas están vinculadas a la cadena respiratoria. También se ven involucradas

en la producción de ácidos carboxílicos (como ácido acético) y ácidos de azúcares (como ácido glucónico), por lo cual las bacterias acéticas son importantes para las industrias de fermentación que producen biomateriales (26). Algunas oxidasas bacterianas usan ferrocitocromo *c* como sustrato, el cual recibe los electrones del complejo *bc<sub>1</sub>* (78), en forma similar a la citocromo *c* oxidasa mitocondrial; otras utilizan ubiquinol como sustrato, o sea, funcionan como ubiquinol oxidasas (5). Las citocromo *c* oxidasas se encuentran en las bacterias “oxidasa positivas”, tales como *Paracoccus*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*, donde los citocromos *aa<sub>3</sub>*, *caa<sub>3</sub>* o *co* funcionan como oxidasa terminal. Las ubiquinol oxidasas están presentes en las bacterias “oxidasa negativas”, que incluyen a *E. coli* y bacterias acéticas; las cadenas respiratorias de dichas bacterias contienen citocromos *bo*, *ba*, *aa<sub>3</sub>* o *bd*. Hasta la fecha se conoce que todas las bacterias acéticas tienen ubiquinol oxidasa como oxidasa terminal, pero que son divergentes en cuanto al tipo de citocromo presente en cada especie (64). El citocromo *bo* se observa principalmente en *Gluconobacter* spp., tanto el citocromo *ba* como el citocromo *bd* se presentan en varias especies de *Acetobacter* y ocurre algo similar en el género *Gluconacetobacter*.

### ***Fijación Biológica de Nitrógeno***

El nitrógeno es un componente primordial de las proteínas, los ácidos nucleicos y muchas otras biomoléculas. Por ello, es indispensable que este elemento se encuentre en formas utilizables por el metabolismo de todos los organismos que habitan el planeta Tierra (14, 52). Al mismo tiempo la abundancia de nitrógeno atmosférico contrasta con la dificultad que hay en su asimilación

directa, ya que el nitrógeno elemental ( $N_2(g)$ ) es un gas inerte en condiciones habituales. Solamente un reducido número de microorganismos, llamados diazótrofos, son capaces de reducir el nitrógeno a su forma asimilable de amonio. Los diazótrofos aportan anualmente el 60 % del nitrógeno fijado de la tierra, siendo un porcentaje menor el que corresponde tanto al nitrógeno industrial como al que es fijado por radiación (52). La fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo por la nitrogenasa en los organismos diazótrofos. Esta enzima tiene el papel principal en el mantenimiento del ciclo biogeoquímico del nitrógeno. La nitrogenasa consiste en dos proteínas distintas: la dinitrogenasa (proteína MoFe o proteína I) y la dinitrogenasa reductasa (proteína Fe o proteína II)(14). Varios procariontes son capaces de fijar nitrógeno, los cuales pertenecen a grupos tales como cianobacterias fotosintéticas, bacterias fotosintéticas, arqueobacterias, bacterias aerobias y anaerobias, además de actinomicetos, de vida libre o en simbiosis con algunas plantas (14, 39). Bajo condiciones óptimas, la estequiometría de la reducción de dinitrógeno ( $N_2(g)$ ) por la nitrogenasa es la siguiente:



O sea, se requieren 2 MgATP por cada electrón transferido (52). Aunque bajo condiciones fisiológicas normales el requerimiento es cercano a 20 – 30 MgATP (14). El sustrato fisiológico de la nitrogenasa es  $N_2$ , sin embargo puede reducir una gran variedad de sustratos, tales como  $N_2O$ , cianuro, isocianuro de nitrilo, azida, acetileno, ciclopropeno, cianamida y diazirina. El sustrato alternativo más útil es el acetileno ( $C_2H_2$ ), ya que es apto para el ensayo con el cual se monitorea la actividad de nitrogenasa (25). La nitrogenasa

se ha encontrado en anaerobios estrictos, aerobios facultativos, organismos microaerobios y aerobios estrictos. En todos estos casos se ha comprobado que tanto la dinitrogenasa como la nitrogenasa son sensibles al oxígeno (14, 25, 39, 42, 52).

Dalton y Postgate propusieron que las bacterias aerobias deberían de poseer un mecanismo que proteja al sistema fijador de nitrógeno de la inactivación por oxígeno. Este mecanismo podría operar de dos maneras. Una de ellas consistiría en la “protección conformacional” de los componentes de la nitrogenasa, volviendo inaccesibles a sus sitios activos o estabilizando a los mismos de manera tal que la presencia del oxígeno no pudiera dañarla. El segundo mecanismo protector podría consistir en depurar el oxígeno en el ambiente circundante a la nitrogenasa por medio de la respiración. Este último recibe el nombre de “protección respiratoria” (25).

*Gluconacetobacter diazotrophicus* es un organismo microaerobio capaz de fijar nitrógeno en cultivo y es el único conocido de su género que posee esta característica (1, 19, 20, 38, 72, 73). Además se sabe que la nitrogenasa de *G. diazotrophicus* es más tolerante al oxígeno que la de otros diazótrofos microaeróbicos (73). Por ello se propone que la fijación de nitrógeno por *Gluconacetobacter diazotrophicus* puede operar junto con el mecanismo de “protección respiratoria”. Se ha demostrado que la concentración de amonio en el medio de cultivo influye fuertemente tanto en la actividad como en la composición del sistema respiratorio del organismo mencionado (33). La nitrogenasa en *G. diazotrophicus* es parcialmente inhibida por amonio en concentración 20 mM (73) y completamente inhibida por amonio 40

mM (33). *G. diazotrophicus* requiere una dosis inicial de amonio (por ejem. 1 mM) para crecer con fijación de nitrógeno en cultivo líquido (33, 73).

En el marco del estudio de la cadena respiratoria de *G. diazotrophicus*, en condiciones de diazotrofia, el objetivo de esta tesis fue demostrar que la ubiquinona-10 es el aceptor de electrones común para las deshidrogenasas membranales. Para tal propósito:

- 1) Se analizó la cinética de las propiedades de crecimiento de *G. diazotrophicus* para caracterizar a la bacteria en cultivo.
- 2) Se llevaron a cabo la purificación, y la determinación de las quinonas naturales de *G. diazotrophicus*.
- 3) Preparaciones membranales fueron sometidas a inactivación (selectiva para las quinonas) con luz UV<sub>360nm</sub>. Se determinó el porcentaje de pérdida de actividad respiratoria.
- 4) Las membranas irradiadas fueron reconstituidas con análogos de quinonas. Se determinó el porcentaje de restauración de actividad respiratoria para diferentes sustratos.

Los resultados obtenidos demostraron que, en efecto, el aceptor común para las deshidrogenasas membranales es la ubiquinona, y que su función de acarreador de electrones es determinante en la cadena de transporte de electrones de *G. diazotrophicus*.

## **Hipótesis y Objetivos**

### ***Hipótesis***

La ubiquinona-10 es el aceptor de electrones común para las deshidrogenasas membranales de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

### ***Objetivo General***

Determinar el papel de la Ubiquinona-10 en la oxidación de sustratos en el espacio periplásmicos y en el citoplasma de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

### ***Objetivos Particulares***

- Determinar el efecto de la concentración de amonio sobre las propiedades de crecimiento y la expresión de quinonas membranales *G. diazotrophicus*.
- Aislamiento, purificación e identificación de quinonas endógenas de *G. diazotrophicus*.
- Identificación de los componentes enzimáticos del sistema oxidativo de la glucosa en *G. diazotrophicus*.

### **Antecedentes**

#### ***Gluconacetobacter diazotrophicus***

*Gluconacetobacter diazotrophicus* (inicialmente llamado *Acetobacter diazotrophicus*) es un diazótrofo aerotolerante (1, 19, 20, 31, 33, 38, 72, 73, 84) que fue aislado de diferentes muestras de raíces y tallos de caña de azúcar, en diversas regiones de cultivo en Brasil (19). *G. diazotrophicus* pertenece al grupo de las bacterias de ácido acético, dado que se trata de un aerobio obligado que produce ácido acético a partir de etanol. Debido a su capacidad para oxidar el ácido acético y el ácido láctico a CO<sub>2</sub>, la especie fue clasificada originalmente dentro del género *Acetobacter* (38). Como se mencionó anteriormente, se introdujo el subgénero *Gluconoacetobacter* para agrupar aquellos miembros del género *Acetobacter* que oxidan acetato y tienen ubiquinona-10 (Q<sub>10</sub>) como quinona principal, como en el caso de *G. diazotrophicus* (88). *Gluconoacetobacter* se convirtió en género (86) y posteriormente se corrigió su nombre a *Gluconacetobacter* (87). Por estos motivos el nombre genérico actual del organismo en estudio es *Gluconacetobacter diazotrophicus*, siendo este último utilizado a lo largo del presente manuscrito.

La quinona presente en la bacteria es Q<sub>10</sub> y también existe una pequeña cantidad de Q<sub>9</sub> (menor al 3 %). Las células son bacilos Gram-negativos rectos con extremos redondos; de 0.7 a 0.9 por 2 μm; estos son móviles por la presencia de 1 a 3 flagelos laterales (38). *G. diazotrophicus* fija nitrógeno del aire en medio semisólido y en medio líquido requiere una dosis inicial de amonio. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C. Crece en medios

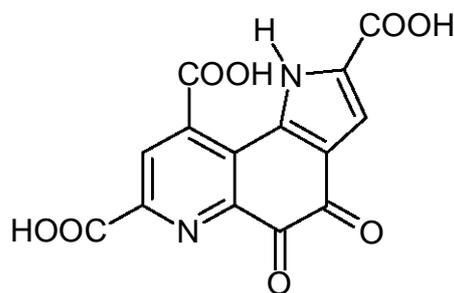
minerales que contienen amonio. Su mejor fuente de carbono es la sacarosa al 10%, aunque también se emplean glucosa, fructosa, galactosa, etanol (1%), manitol y glicerol. El crecimiento y la fijación de N<sub>2</sub>(g) también ocurren en sacarosa al 30% y glucosa al 30%. La cepa tipo es PAL 5 (ATCC 49037), la cual posee todas las características de la especie. *G. diazotrophicus* también ha sido aislado de caña azucarera en Australia (38), a partir de la planta de café (47), de la piña, del pasto elefante enano y de la papa dulce (75).

### ***Glucosa deshidrogenasa membranal***

Casi todas las deshidrogenasas primarias que forman parte de los sistemas oxidativos de alcoholes y de azúcares se localizan en las membranas celulares de las bacterias que las contienen (64). La GDH es una quinoproteína, con quinona de pirroloquinolina (PQQ) como grupo prostético. Esta enzima presenta actividad de oxidoreductasa (62), llevando a cabo la catálisis de la oxidación de una amplia gama de hexosas y pentosas, pero rara vez oxida disacáridos (6). La GDH membranal ha sido estudiada en una gran variedad de microorganismos, tales como *Acinetobacter* (28), bacterias entéricas, pseudomonadas y bacterias acéticas (64). En todos los casos el aceptor fisiológico de electrones es una ubiquinona (6, 59). Se han descrito dos tipos de GDH. Las enzimas del tipo I tienen un punto isoeléctrico bajo, por lo cual la actividad de GDH se pierde completamente después de dializar la enzima contra disoluciones amortiguadoras que contienen EDTA, debido a la eliminación de PQQ (como el caso de la GDH de *K. pneumoniae* y *Pseudomonas* sp.) y las enzimas del tipo II, que presentan un punto isoeléctrico alto, por lo que no puede eliminarse el grupo PQQ por

diálisis contra amortiguadores con EDTA (35). Se conocen dos tipos de glucosa deshidrogenasa: la forma unida a la membrana celular, (mGDH o GDH-A), y la forma soluble, (sGDH o GDH-B). El grupo prostético tanto de la mGDH, como de la sGDH es quinona de pirroloquinolina (PQQ), también llamado 2,7,9-tricarboxi-PQQ (ver **Figura 1**). La PQQ se ha aislado por desnaturalización de metanol deshidrogenasa. La mGDH es una enzima dimérica  $\alpha_2$ . Cada subunidad posee una molécula de PQQ y un ion  $\text{Ca}^{2+}$ . La enzima muestra cooperatividad negativa. Asimismo puede eliminarse el PQQ de la mGDH y esta puede reactivarse con PQQ en presencia de calcio (65).

En *E. coli* la GDH es una proteína monomérica de 88 kDa que contiene cinco dominios hidrofóbicos en la región N-terminal, y consta de 145 residuos de amino ácido, los cuales le sirven como ancla a la membrana, mientras que la región C-terminal tiene una estructura de superbarril con pliegues de hélices  $\beta$ -laminares; este es el dominio catalítico que porta los sitios de unión de PQQ, de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Mg}^{2+}$  (30, 64, 65, 84).



**Figura 1** Quinona de pirroloquinolina (PQQ), el grupo prostético de la glucosa deshidrogenasa membranal

Esta mGDH dona electrones directamente a la ubiquinona-8 (Q<sub>8</sub>), la cual los transfiere a una ubiquinol oxidasa terminal, ya sea el complejo citocromo o o el complejo citocromo *d* (29, 57). La mGDH es capaz de transferir electrones a análogos de la ubiquinona, así como a diversos pigmentos (65).

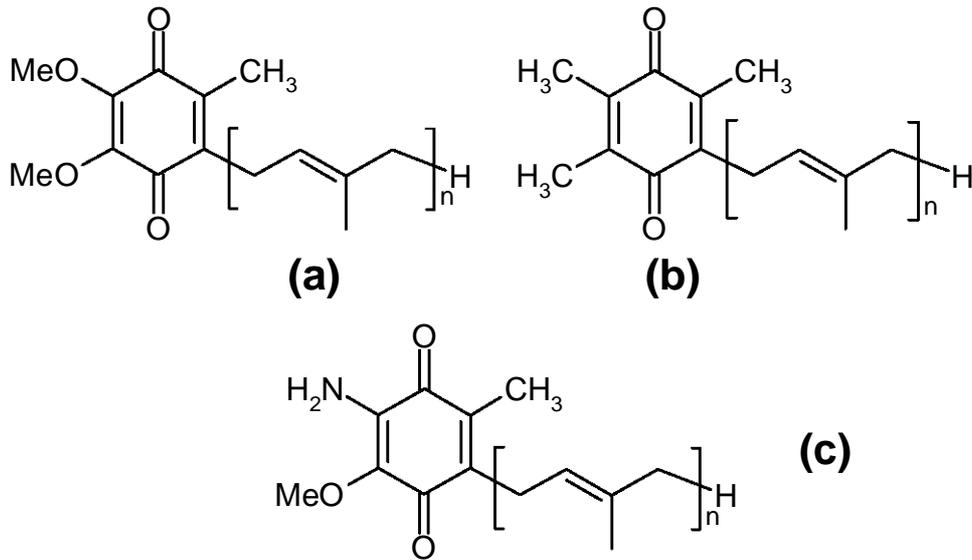
En cuanto a la mGDH en bacterias acéticas, ha sido demostrado que en *Gluconobacter oxydans* la producción de ácido glucónico se debe principalmente a mGDH, con una actividad 30 veces mayor que la GDH dependiente de NADP<sup>+</sup> (sGDH citoplásmica). La mGDH cataliza la oxidación del sustrato directamente en el periplasma (64). Se reportó que en *G. suboxydans* la mGDH es un polipéptido sencillo de 87 kDa, la cual une tan fuertemente a PQQ que la diálisis con EDTA no puede eliminarlo. La enzima puede donar electrones a ubiquinonas de cadena larga (Q<sub>6</sub> o Q<sub>9</sub> y a su quinona nativa Q<sub>10</sub>), homólogos de cadena corta y varios pigmentos artificiales, además es prácticamente idéntica a la mGDH de *G. oxydans* y es homóloga a las enzimas tanto de *Acinetobacter calcoaceticus* como de *E. coli* (62). Se conoce que *G. diazotrophicus* posee una GDH dependiente de PQQ, que pertenece al tipo II de GDH debido a que su diálisis contra EDTA a pH de 8.5 no disminuye su actividad y a que dicha actividad sí se pierde con diálisis contra EDTA a pH 6.0 y no se puede reconstituir por incubación con PQQ. La síntesis de esta enzima es estimulada cuando *G. diazotrophicus* crece en condiciones de fijación de nitrógeno (35). Los extractos membranales de este organismo presentan altas actividades de GDH vinculada a PQQ. Además *G. diazotrophicus* ha mostrado tener actividad de D-gluconato deshidrogenasa, hecho al cual se atribuye el consumo de ácido

glucónico en cultivo, después de haber consumido la mayor parte de glucosa. Los extractos de esta especie también poseen una GDH dependiente absolutamente de  $\text{NAD}^+$  (vía fosforilativa del metabolismo de glucosa), lo cual marca una diferencia notable con la enzima proveniente de *G. oxydans*, la cual depende de  $\text{NADP}^+$ , aunque la actividad de la quinoproteína muestra una cierta ventaja en la conversión de glucosa en ácido glucónico (7). *G. diazotrophicus* secreta al medio de cultivo una levansacarasa, enzima que cataliza la transfructosilación desde la sacarosa hacia varios aceptores, como el agua (hidrólisis de sacarosa). El crecimiento de esta bacteria en sacarosa como fuente de carbono se atribuye a la ruptura del disacárido por la catálisis de dicha enzima. Se ha reportado que esta enzima también conduce la síntesis de un exopolisacáridos del tipo de las levanas (45).

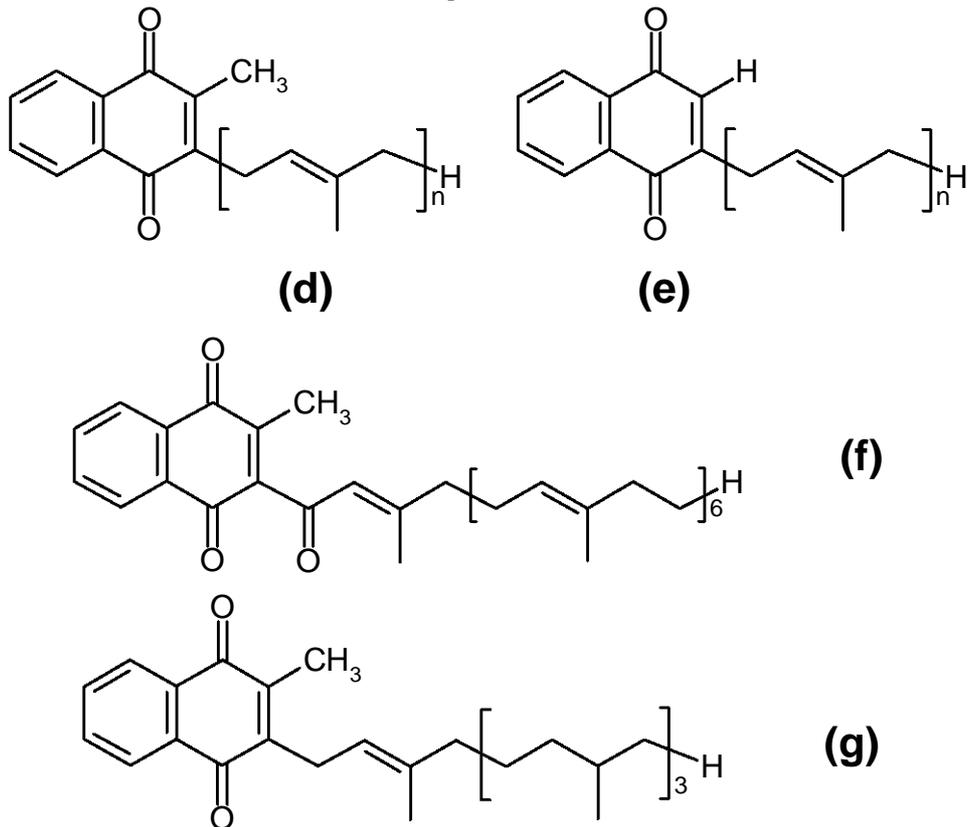
### ***Quinonas respiratorias***

Las quinonas isoprenoides respiratorias son compuestos lipídicos terpenoides que forman parte de la cadena respiratoria de los seres vivos, cuya función es transportar electrones en el interior de la membrana. Se conoce una gran diversidad de tipos de quinonas bacterianas (49). Hay dos grupos principales de quinonas isoprenoides bacterianas: las naftoquinonas y las benzoquinonas. Las naftoquinonas se dividen en filoquinonas y menaquinonas. Por su parte las benzoquinonas se dividen en ubiquinonas y plastoquinonas (**Figura 2**) (21). C.W. Jones propuso una clasificación en tres grupos para las bacterias aerobias según su tipo de quinona respiratoria; dos grandes grupos de bacterias que poseen o menaquinona (MK) o ubiquinona (Q) únicamente y un

**Benzoquinonas**



**Naftoquinonas**



**Figura 2** Las principales quinonas respiratorias bacterianas: benzoquinonas (a, ubiquinona-n; b, plastoquinona-n; y c, rodoquinona-n) y naftoquinonas (d, menaquinona-n; e, demetilmenaquinona; f, clorobiumquinona; g, filoquinona)

grupo pequeño que contiene ambos tipos de quinona (49). Hasta 1963 no se habían encontrado ninguna clase de quinonas en microorganismos anaerobios (13); sin embargo, estudios posteriores han revelado que las bacterias anaerobias aparentemente sólo producen menaquinonas (22).

Las menaquinonas (derivados de vitamina K<sub>2</sub>) conforman una clase de moléculas con un núcleo de 2-metil-1,4-naftoquinona con una cadena lateral que presenta de 1 a 15 unidades de isopreno, en su posición tres (21). Algunos organismos que contienen menaquinona en su cadena respiratoria son: *Mycobacterium phlei*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Bacillus subtilis*, y *B. stearotermophilus*. Por su parte *E. coli* presenta un sistema mixto de quinonas (menaquinona y ubiquinona) (49). La filoquinona (vitamina K<sub>1</sub>) (9), se asocia con los tejidos verdes de las plantas. En los procariontes, aparentemente se limita sólo a las cianobacterias. Se han reportado varios grados de saturación en la cadena lateral de diferentes menaquinonas. Algunas menaquinonas dihidrogenadas están dispersas entre las corinebacterias y las micobacterias, mientras que las menaquinonas más saturadas (desde tetra- hasta octahidrogenadas) son comunes en ciertos actinomicetos. Se han reportado menaquinonas desmetiladas en el carbono 2 y son llamadas demetilmenaquinonas han sido encontradas en muchas bacterias Gram-negativas, mientras que estas quinonas sólo se han encontrado en una sola especie Gram-positiva (*Streptococcus faecalis*). Otra menaquinona reportada es la clorobiumquinona, la cual es producida por ciertas bacterias fotosintéticas. La clorobiumquinona contiene un grupo carbonilo en su cadena lateral; se trata de la 1'-oxomenaquinona-7 (21). La ubiquinona o coenzima

Q se ha aislado de la mitocondria de diversos tejidos animales, de los cloroplastos de muchas plantas superiores y de la membrana citoplásmica de una gran variedad de microorganismos (bacterias aeróbicas, bacterias facultativas en aerobiosis y hongos) (13, 56). Las ubiquinonas contienen un núcleo de 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona con una cadena lateral poliisoprenica en su posición 6 (21) (Ver **Figura 2**). La comisión sobre nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB, en 1965, recomendó la nomenclatura ubiquinona-n (n es el número de unidades de isopreno), en lugar de la hasta entonces usada coenzima  $Q_n$  y ubiquinona-5n (5n corresponde al número de átomos de carbono de la cadena lateral) (23). Sin embargo, por simplicidad, en este texto se empleará  $Q_n$  para la ubiquinona-n.

Las especies microbianas presentan frecuentemente las ubiquinonas con cadenas de 6 a 10 unidades de isopreno, (de  $Q_6$  a  $Q_{10}$ ) (10), aunque entre los procariontes, las ubiquinonas tienen una distribución más limitada que las menaquinonas; puesto que están en muchas eubacterias Gram-negativas (21). La ubiquinona se ha encontrado en el sistema de transporte de electrones tanto de *A. vinelandii* un aerobio fijador de nitrógeno, como en *E. coli*, un facultativo (aunque la ubiquinona sólo se expresa en aerobiosis) (23). La ubiquinona no ha sido encontrada en anaerobios estrictos, tales como *Clostridium perfringens*, ni en anaerobios facultativos, con sistema citocrómico convencional, (p. ej. *Lactobacillus*). Aquellos microorganismos que poseen sistemas citocrómicos terminales pero que carecen de ubiquinona, (p. ej. *Mycobacterium* y *Bacillus*) presentan quinonas del tipo vitamina-K (naftoquinonas) (23, 56). La plastoquinona es una benzoquinona primordial, que fue aislada

originalmente de alfalfa y posteriormente se identificó en las cianobacterias, grupo que se caracteriza por la posesión de este tipo de quinona. Se trata de una 2,3-dimetilbenzoquinona con una cadena de nueve isoprenos. Tanto en *Rhodospirillum rubrum* como en *Euglena* spp. (16) se ha aislado la rodoquinona, una aminoquinona derivada de la Q<sub>10</sub>, con un grupo amino en lugar del grupo metoxilo en posición *para* con respecto a la cadena lateral (**Figura 2**). También existe una quinona azufrada, poco usual, llamada caldarielaquinona, encontrada en *Caldariella acidophila* una arqueobacteria acidófila termofílica (21). La quinona endógena de *Gluconacetobacter xylinum* es Q<sub>10</sub>; al igual que todos los de su género, incluyendo *G. diazotrophicus*, la bacteria estudiada aquí (10).

Por su parte, las cianobacterias, con una actividad respiratoria menor que la de la mayoría de los aerobios, aparentemente puede respirar en ausencia tanto de menaquinona como de ubiquinona (15). *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) puede respirar con varios homólogos de ubiquinona, aunque muestra preferencia por la natural (Q<sub>6</sub>) (66). En eucariontes superiores la ubiquinona está contenida en la mitocondria de cada uno de los siguientes tejidos: corazón de res, hígado de rata, corazón de cerdo, corazón de caballo y coliflor (23, 56). La cantidad de ubiquinona reportada en animales (en  $\mu\text{mol/g}$  proteína) oscila entre 2.9 y 4.0 en mitocondria cardiaca de vaca; entre 0.66 y 1.7 en mitocondria hepática de rata. En plantas verdes (en  $\mu\text{mol/g}$  peso seco de tejido) de 0.012 a 0.068. En el reino de las bacterias (en  $\mu\text{mol/g}$  peso seco de células): *vinelandii*, diazótrofo con una gran velocidad de respiración,

contiene de 2.6 a 6.0, *E. coli* en aerobiosis tiene 0.24; *S. cerevisiae* (levadura facultativa) con 0.35 se asemeja al anterior, mientras que en anaerobios la cantidad existente es despreciable (23, 56). Para *G. xylinum* se ha reportado un contenido de 0.6 a 0.8  $\mu\text{mol}$  de ubiquinona/g de células secas, el cual excede al triple la cantidad de citocromos individuales y equivale a la de las flavoproteínas (10). En *A. vinelandii*, la  $Q_8$ , excede 6 veces la concentración de sus componentes citocrómicos individuales (49). Cabe destacar que en mitocondria de corazón de res el contenido de  $Q_{10}$  es entre 10 y 20 veces mayor al contenido de citocromo *c* (43, 80).

Dada la facilidad con la que son extraídas por disolventes para lípidos, se ha propuesto que las quinonas no están unidas en forma covalente con alguna enzima, sino que se mantienen asociadas a lípidos o proteínas de la membrana mediante interacciones hidrofóbicas (23). Las quinonas isoprénicas son foto-oxidadas rápidamente en presencia de oxígeno y luz intensa. Son susceptibles a condiciones alcalinas, por lo cual la extracción con disolventes es más adecuada que la saponificación. La purificación de esta clase de compuestos debe realizarse lo más pronto posible después de su aislamiento. La extracción se ha realizado con disolventes comunes de lípidos, tales como éter de petróleo, cloroformo, acetona, éter dietílico, entre otros. La extracción puede llevarse a cabo con un solo disolvente o con la mezcla de dos de éstos (21). También se han diseñado procedimientos de extracción de quinonas a semimicroescala (53). Se ha demostrado que el procedimiento de extracción con disolventes seguida por purificación con cromatografía en capa fina (TLC, thin layer chromatography) ofrece una recuperación cuantitativa a partir de

células tanto bacterianas como animales, siendo suficientes tres extracciones sucesivas para agotar las quinonas de las membranas (21, 54, 74). Las quinonas se purifican mediante procedimientos cromatográficos comunes, tales como TLC normal y TLC de fase inversa (RPTLC, reverse phase thin layer chromatography). Se han reportado algunos valores de  $R_f$  para diferentes quinonas con diferentes fases móviles (disolventes puros y mezclas de ellos) (9). Las quinonas purificadas por TLC se pueden observar bajo luz ultravioleta de 254 nm; éstas se observan como bandas de colores café o violeta, con el trasfondo verde fluorescente dado por la placa cromatográfica. Con el sistema hexano/éter (85:15, v/v) se han reportado valores de  $R_f$  para las menaquinonas y para las ubiquinonas de aproximadamente 0.7 y 0.3, respectivamente. Por su parte la metilmenaquinona y la caldarielaquinona tienen unos  $R_f$  de aproximadamente 0.8 y 0.6, respectivamente en el mismo sistema (21, 23). En los cromatogramas de capa fina, las ubiquinonas en particular, son identificadas por revelado con disolución de azul de metileno reducido (incoloro), el cual vira a color azul al ser oxidado por la ubiquinonas; éstas se observan como manchas de color azul (23). Aunque la plastoquinona y la tocoferilquinona también dan positivo a esta prueba, es importante considerar que las bacterias no fotosintéticas por lo general no contienen plastoquinonas, por su parte la reducción de la menaquinona es muy lenta (9). Por otro lado, han sido caracterizados los compuestos intermediarios producidos durante la biosíntesis de la ubiquinona en *E. coli*. Estos fueron aislados y purificados con los métodos descritos arriba (37).

Mediante espectroscopia ultravioleta-visible es posible establecer la clase o categoría a la cual pertenece una quinona isoprenoide desconocida (9, 13, 21, 23) (ver **Tabla 1**). El espectro de absorción característico de las benzoquinonas exhibe un pico singular a 275 nm en etanol y a 272 en ciclohexano. En el estado reducido el espectro de la benzohidroquinona difiere del espectro del estado oxidado en la posición del pico de absorción (290 nm) y en intensidad (13) (los coeficientes de absorción molares ( $\epsilon$ ) se presentan en la parte experimental). La diferencia de absorbancia a 275 nm permite calcular la cantidad de quinona en la celda.

Con el  $\Delta\epsilon$ (oxidado-reducido) correspondiente se determinan los micromoles de ubiquinona (23). Para determinar el índice de pureza de una quinona por este método de análisis se utilizan los puntos isobéuticos, es decir, valores puntuales de longitud de onda (nm), donde la línea reducida se entrecruza con la línea oxidada en el espectro combinado; la ubiquinona-10 tiene puntos isobéuticos en 294 y 231 nm (9). Las ubiquinonas extraídas a partir de células en condiciones de ayuno por lo general se encuentran en estado oxidado (54). La quinona encontrada en *G. xylinum* fue  $Q_{10}$ , dadas las características de su espectro de absorción y su movilidad cromatográfica (idéntica a  $Q_{10}$ ) (10). La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, high performance liquid chromatography) es otra herramienta útil para la determinación de quinonas isoprenoides (12, 44) ya que han sido determinados los niveles de oxidación de ubiquinona en ciertas clases de tejidos por la cuantificación de ubiquinona y ubiquinol mediante esta técnica (79). Sin embargo, la técnica que permite determinar con mayor certeza la estructura de las quinonas isoprenoides es la espectrometría de masas.

Esta técnica proporciona pesos moleculares muy exactos, además de reflejar tanto la naturaleza del sistema anular como la longitud y grado de saturación de la cadena lateral poliisoprénica (21).

Las quinonas funcionan como transportadores redox móviles en el interior de la membrana, entre las deshidrogenasas membranales y las enzimas que catalizan la reducción de los aceptores terminales de electrones. La fosforilación oxidativa con oxígeno o nitrato como aceptores terminales es llevada a cabo por las bacterias poseedoras de cualquiera las quinonas respiratorias conocidas. En contraste, las especies que poseen menaquinona pueden reducir sulfato y no otro aceptor, como fumarato. Esta diferencia de función entre la ubiquinona y las naftoquinonas puede explicarse con base en sus potenciales redox (55). Ha sido demostrada la participación de las quinonas en el metabolismo oxidativo tanto con la pérdida de actividad que ocurre después de agotar estos lípidos en las células como con la restauración de actividad por adición de la quinona o de sus homólogos cercanos. El agotamiento de quinonas se ha realizado por fotoinactivación selectiva (luz UV de 360 nm) y por extracción con disolventes. Cabe mencionar, sin embargo, que la destrucción de las benzoquinonas por irradiación ocurre más lentamente que con las menaquinonas, hecho que determina el uso de la extracción por disolventes como la técnica más adecuada para el agotamiento de las benzoquinonas (13). Con base en pruebas de inactivación-restauración se ha demostrado cuál es la quinona respiratoria principal de diferentes microorganismos (67).

**Tabla 1** Características de absorción en ultravioleta de menaquinonas, ubiquinonas y compuestos relacionados (tomada de Collins, M.D. (21)).

Quinona	Disolvente	$\lambda_{\max}$ (nm)
Menaquinona	Isooctano	242, 248, 260, 269, 326, 238 (inf) <sup>1</sup>
Filoquinona	Isooctano	242, 248, 260, 269, 326, 238 (inf)
Demetilmenaquinona	Isooctano	242, 248, 254, 263, 326, 238 (inf)
Clorobiumquinona	Etanol	254, 256 (inf)
Termoplasmaquinona	Isooctano	242, 248, 259, 269, 337
Ubiquinona	Etanol	275
Rodoquinona	Ciclohexano	251, 280, 320, 500 (inf)
	Etanol	253, 283, 320, 500 (inf)
Plastoquinona	Isooctano	254, 262
Caldarielaquinona	Metanol	241, 283, 333
	Isooctano	237, 272, 278, 322
Metionaquinona	Etanol	238, 262, 310

---

<sup>1</sup> Inf. Punto de inflexión

En *G. xylinum* la actividad de malato oxidasa fue restaurada con vitamina K<sub>3</sub> (una menaquinona), después de someter los extractos de la bacteria acética a radiación, a pesar de no ser su quinona endógena (10); además, se ha podido restaurar exitosamente la actividad respiratoria de diversos organismos con homólogos de cadena corta (Q<sub>1</sub> y Q<sub>2</sub>) (81), hechos que nos permiten proponer que la actividad respiratoria de *G. diazotrophicus* pudiera ser restaurada por quinonas diferentes a la natural. Por su parte, en la mitocondria se ha restaurado la actividad de NADH y de succinato oxidasa (23), entre otros sistemas (74), lo cual ha demostrado que la ubiquinona juega un papel clave en la ruta principal de transporte de electrones. Por último, cabe mencionar que en los veinte años recientes se ha dado énfasis al papel que representan las quinonas como criterios taxonómicos parciales (22, 55), en consideración de que los diferentes grupos taxonómicos de bacterias no solo se diferencian por los tipos diferentes de quinonas que poseen, sino que también existe divergencia en cuanto al número de unidades de isopreno, tal como ocurre en el caso de las bacterias acéticas (34, 85, 86, 87, 88).

### ***Oxidasas terminales***

Los citocromos son hemoproteínas especializadas que consisten en un grupo hemo unido a una proteína. El grupo hemo (**Figura 3**) está constituido por una porfirina coordinada con un ion Fe<sup>2+</sup> (reducido) o Fe<sup>3+</sup> (estado oxidado), transportando un electrón. Las citocromo oxidasas catalizan la transferencia de electrones al oxígeno molecular, el cual se coordina con el centro metálico de estas enzimas. Los sustituyentes de la porfirina confieren las propiedades

de absorbancia y los potenciales redox estándar de los diferentes citocromos.

Generalmente, el espectro diferencial de un citocromo del estado reducido menos el estado oxidado muestra tres bandas principales de absorción en la región visible: la banda  $\alpha$  (aproximadamente 545 – 650 nm), la banda  $\beta$  (aproximadamente 520 – 530 nm), y la banda  $\gamma$  o de Soret (aproximadamente 410 – 450 nm). Las excepciones corresponden a los citocromos tipo *a*, que no presentan bandas  $\beta$  notables, y los citocromos tipo *d*, que muestran bandas de Soret muy débiles. El  $E_m$ (pH 7.0) de los citocromos se observa en el intervalo de -100 a 500 mV, aunque algunos citocromos *c* tienen valores más negativos, mientras que el  $E_m$ (pH 3.2) de la citocromo oxidasa  $a_1$  posee un valor elevado, de 725 nm (48, 77).

Los valores de los diferentes tipos de citocromos guardan el siguiente orden general:

Bajo  $E_m$   $c < b < d$  o alto  $E_m$   $c < a a_3$

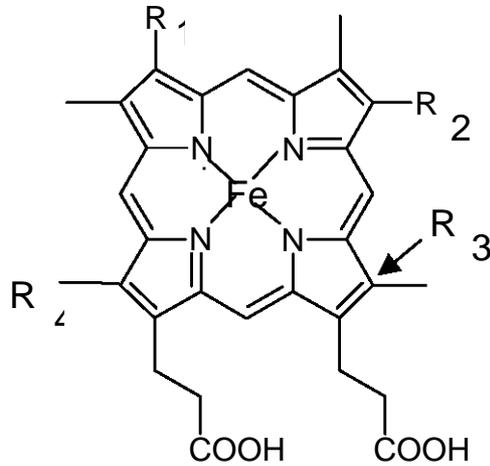
Las citocromo oxidasas *o* y  $a_1$  tienen  $E_m$  variables en el extremo superior de este intervalo.

Con respecto al análisis de los citocromos, los espectros diferenciales proporcionan datos sobre la identidad de los tipos de citocromos y la cantidad presentes en una muestra. Dichos espectros se obtienen de diferentes tipos de preparaciones. Se tienen datos bien conocidos a cerca de tanto los perfiles de las bandas de absorción  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , como de los coeficientes de absorción para cada tipo de citocromo (48).

La capacidad de ciertos citocromos a enlazar ligantes como el monóxido de carbono (CO) y el cianuro (CN<sup>-</sup>) ha sido aprovechada de forma extensa. La reacción de los citocromos respiratorios se ha

tomado como evidencia de que se trata de oxidasas funcionales o potenciales.

Sin embargo, esta suposición debe confirmarse mediante la identificación de espectros de acción e intercambio de ligandos CO/O<sub>2</sub> (33). El CO se une a la forma reducida de las oxidasas, actuando como inhibidor competitivo con respecto al oxígeno. Los complejos respectivos tienen un máximo de absorción característico, además de ser fotodisociables (77). Por su parte, las reacciones del cianuro con los citocromos son más complejas que las de CO. El cianuro reacciona con ambas formas, oxidada y reducida; la afinidad para la forma oxidada es alta, pero la reacción es lenta, mientras que para la enzima reducida ocurre lo contrario. Los espectros más viables para identificar citocromos tipo *aa*<sub>3</sub>, reactivos con cianuro y otras oxidasas supuestas, son los reducidos, unidos a cianuro menos reducidos, de forma similar a los espectros de CO. También son empleados otros ligantes, tales como monóxido de nitrógeno, el cual debe generarse constantemente dada su reactividad con el oxígeno; otros ligantes empleados son azida, fluoruro, isonitrilos y sulfuro, los cuales generalmente provocan cambios espectrales menos notables. La luz disocia el complejo de CO de diversas oxidasas. Los espectros de fotodisociación presentan la forma de un espectro diferencial de CO invertido, con la diferencia en absorbancia entre una muestra reducida, ligada con CO que ha sido fotolisada y una muestra idéntica no irradiada (48). Por otro lado, los citocromos tipo *c* se identifican por electroforesis, con base en la actividad de peroxidasa



<u>Hemo</u>	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>R<sub>3</sub></u>	<u>R<sub>4</sub></u>
<b>A</b>			-H	
<b>B</b>			-H	-CH <sub>3</sub>
<b>C</b>			-H	-CH <sub>3</sub>
<b>D</b>			-OH	-CH <sub>3</sub>
<b>O</b>			-H	-CH <sub>3</sub>

**Figura 3** Las estructuras de los grupos prostéticos hemo de los citocromos. El hemo *d* es una dihidroporfirina en la cual el enlace C5-C6 está saturado

de su grupo hemo (zimografía), dado que en los citocromos *c* el hemo está unido covalentemente, son los únicos que retienen cuantitativamente su hemo durante la electroforesis en gel con SDS (40).

A pesar de las diferencias observadas entre las oxidasas bacterianas, con respecto a sus sustratos, afinidades por oxígeno, tipos de hemos y composición metálica, la mayoría de ellas son integrantes cercanos de una sola familia llamada la superfamilia de las oxidasas hemo-cobre, con base en la homología de la subunidad I (36). Algunas oxidasas bacterianas usan citocromo *c* como sustrato (citocromo *c* oxidasas), en forma similar a las oxidasas mitocondriales; otra utilizan ubiquinol como sustrato (quinol oxidasas) (5). Como se explicó anteriormente, en el caso de las citocromo *c* oxidasas, el sustrato recibe los electrones del complejo citocrómico  $bc_1$ . La actividad protón motriz de este complejo convierte la energía libre de la transferencia de electrones en un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana (78).

Hasta ahora es sabido que las bacterias acéticas tienen ubiquinol oxidasa como oxidasa terminal y que contienen citocromos de tipo *c* de bajo potencial asociados a las deshidrogenasas periplásmicas que presentan PQQ como grupo prostético; pero que divergen en cuanto al tipo de oxidasa terminal para cada especie. Estos citocromos tipo *c* son diferentes a los citocromos *c* libres de la mitocondria, los cuales funcionan como intermediarios entre el complejo  $bc_1$  y el citocromo  $aa_3$ . Con respecto a *G. diazotrophicus*, se ha reportado que esta bacteria carece de complejo  $bc_1$  (84). El citocromo *bo* se observa principalmente en *Gluconobacter* spp.; en

tanto que el citocromo *ba* como el citocromo *bd* se presentan en varias especies de *Acetobacter* spp. y de *Gluconacetobacter* (64). Se conoce que el citocromo *bo* está relacionado estructural y funcionalmente con la citocromo *c* oxidasa de la mitocondria y de algunas bacterias (69). El citocromo *bo* se detectó en *G. suboxydans*, *A. acetii* y en *A. methanolica* y se identificó como una ubiquinol oxidasa con alta actividad. Las oxidasas purificadas de diferentes especies consisten de cuatro subunidades no idénticas y dos citocromos tipo *b*, uno de los cuales se une a monóxido de carbono, demostrando con ello que se trata de un citocromo *o*. La actividad quinol oxidativa de la oxidasa es inhibida por cianuro o análogos de quinona. El citocromo *bo* es generador de energía, puesto que establece un gradiente electroquímico de aproximadamente -140 mV durante la oxidación de ubiquinol en liposomas (64).

El citocromo *a<sub>1</sub>* se encontró inicialmente en *A. pasteurianum*. Muestra una banda débil a 589 nm, la cual es intensificada por cianuro y que se desplaza a 592 nm en presencia de monóxido de carbono. El citocromo *a<sub>1</sub>* se identifica de acuerdo con los siguientes criterios: 1) La oxidasa contiene hemo *a*, además de hemo *b*. 2) La banda  $\alpha$  se observa débil y ancha, la cual es notablemente intensificada y afinada en una banda estrecha a 589 nm, después de añadir cianuro. 3) El citocromo *a* que presenta la enzima reacciona con CO, lo cual se observa claramente en su espectro diferencial de monóxido de carbono. *A. acetii* expresa citocromo *a<sub>1</sub>* en cultivo agitado. La enzima purificada se comporta de forma similar a otras ubiquinol oxidasas, como citocromo *o* o citocromo *d* en términos cinéticos y es generadora de energía. Reacciona

directamente con el ubiquinol nativo, Q<sub>9</sub> (63). *A. acetii* cambia su oxidasa terminal de citocromo *a*<sub>1</sub> a citocromo *o* cuando cambia de cultivo agitado a cultivo estático, aunque en ambos casos su cadena respiratoria es casi la misma (61). En este microorganismo el citocromo *a*<sub>1</sub> es una ubiquinol oxidasa *ba* y el citocromo *o* es una ubiquinol oxidasa citocromo *bo*, con gran semejanza en su estructura proteica y en sus grupos prostéticos, en los cuáles sólo un hemo *a* en el centro hemo-cobre del citocromo *a*<sub>1</sub> es reemplazado por un hemo *o* en el centro correspondiente al citocromo *o* (60); cabe mencionar que en *A. acetii* los citocromos *c* no donan electrones a la oxidasa terminal, sino que forman parte de las deshidrogenasas de alcohol y de aldehído (61). Las especies *Gluconobacter* poseen una quinol oxidasa de tipo *bo*<sub>3</sub> (26).

La oxidasa terminal citocromo *bd* es la quinol oxidasa de *G. suboxydans* (64). La citocromo *bd* quinol oxidasa de *E. coli* tiene una afinidad por oxígeno extremadamente alta, con dos hemos que se unen a oxígeno (24).

Por su parte, *Bacillus cereus* expresa altos niveles de citocromos *b* y *o*, en cualquier condición de cultivo. En bajas tensiones de O<sub>2</sub> y en anaerobiosis expresa citocromo *d* y este no se detecta en cultivos muy aereados, o en cultivos anaerobios añadidos con nitrato. Asimismo se ha propuesto que en este bacilo los citocromos *bo* y *bd* están involucrados en la respiración resistente a cianuro (32). En contraste, en *G. diazotrophicus* la oxidasa *bd* es expresada en condiciones de alta aereación (33), al igual que en *A. vinelandii* (diazótrofo) (11). La oxidasa *bd* de *A. vinelandii* genera un potencial protónico competente, pero es menos eficiente que la oxidasa tipo *bo* (51).

*Azotobacter vinelandii* es capaz de fijar nitrógeno en un amplio intervalo de concentraciones de oxígeno. Esta capacidad se relaciona con los cambios en la síntesis y actividades de los componentes de la cadena respiratoria. A menores concentraciones de oxígeno, expresa una oxidasa alternativa de tipo hemo-cobre, con una mayor afinidad por oxígeno, además de una tercera oxidasa no identificada con una afinidad aparentemente mayor por oxígeno (51). El citocromo *bd* también se ha encontrado en *Rhizobium* spp. (8).

### **Parte experimental**

#### ***Material Biológico***

*Gluconacetobacter diazotrophicus* cepa PAL 5.

#### ***Mantenimiento del organismo***

*G. diazotrophicus* se mantuvo en el medio de cultivo LGITAF gelificado pH 5.5 (73), el cual contenía (g/L): 50 g de azúcar refinada comercial, 4 g de  $K_2HPO_4$ , 5 g de  $KH_2PO_4$ , 0.2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.002 g de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.01 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.1321 g de  $(NH_4)_2SO_4$ , 13 g de agar bacteriológico y 12 mL de azul de bromotimol al 0.5 %. El pH se ajustó a 5.5.

#### ***Medio de cultivo líquido LGITA***

Para todos los ensayos se empleó el medio de cultivo líquido LGITAF para crecimiento con fijación de nitrógeno y LGITA para crecimiento en condiciones de no fijación, con pH 5.5 (73), el cual contenía (g/L): 50 g de azúcar refinada comercial, 4 g de  $K_2HPO_4$ , 5 g de  $KH_2PO_4$ , 0.2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.002 g de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.01 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  y 0.1321 g de  $(NH_4)_2SO_4$ . El pH se ajustó a 5.5.

#### ***Cultivos analíticos de G. diazotrophicus***

Se realizaron cultivos de *G. diazotrophicus* en los que la aereación fue controlada y la disponibilidad de amonio fue variable. Para ello se empleó el medio de cultivo LGITA pH 5.5 (73) suplementado con  $(NH_4)_2SO_4$ . Los cultivos de *G. diazotrophicus* se realizaron a 30 °C en un fermentador Aplikkon con capacidad de 1 L, durante 36 a 60 h. Se partió de un precultivo en crecimiento activo de 24 h, del cual se tomaron alícuotas de 25 – 30 mL para inocular los cultivos de 1 L; con este inóculo se alcanzó una absorbancia a 560 nm ( $Abs_{560nm}$ )

de 0.07. Los ensayos se realizaron con la condición de máxima aereación: 4.0 L de aire  $\text{min}^{-1}$ . Esta condición de aereación fue generada por el paso de aire a través del medio de cultivo. La aereación y la agitación (2000 g) se mantuvieron constantes durante todo el cultivo. En todos los cultivos se midieron: la  $\text{Abs}_{560\text{nm}}$ , la demanda de oxígeno de los cultivos, el pH del medio de cultivo, la concentración del amonio residual, así como la cantidad del oxígeno disuelto.

### ***Propiedades del crecimiento de G. diazotrophicus***

Las propiedades del crecimiento de *G. diazotrophicus* fueron evaluadas mediante la determinación de la absorbancia a 560 nm y del pH del medio de cultivo. Las determinaciones se realizaron a diferentes intervalos.

### **Demanda de oxígeno**

Las demandas de oxígeno fueron determinadas polarográficamente empleando un electrodo de Clark (Yellow Springs Instruments) de acuerdo al método descrito por Escamilla *et al.*, 1987 (32) Para ello, se emplearon alícuotas del cultivo en pleno crecimiento. La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 1.8 mL conteniendo medio de cultivo líquido LGITAF fresco y estéril y 250  $\mu\text{L}$  del cultivo en pleno crecimiento.

### **Oxígeno disuelto**

La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo fue determinada *in vivo* empleando un electrodo de Clark. Para ello, se tomaron alícuotas de 1.8 mL del cultivo en crecimiento activo y fueron colocados en la cámara del oxímetro. La actividad respiratoria de las células fue inhibida instantáneamente con  $\text{HgCl}_2$  a una concentración final de 1.5 mM.

### **Medición del pH**

Se determinó el valor de pH en los cultivos de *G. diazotrophicus* empleando un electrodo de pH Corning Co. Para ello se tomaron alícuotas de 10 mL del cultivo.

### **Amonio residual**

La cantidad de amonio residual presente en el medio de cultivo fue valorado empleando un electrodo de amonio (Orion Co.). Para ello, se tomaron alícuotas de 10 mL del cultivo en crecimiento activo y se adicionaron 100  $\mu$ L de KOH 10 M. La muestra fue llevada directamente al electrodo de amonio para cuantificar el amonio residual presente.

### ***Cultivo masivo***

El cultivo masivo de *G. diazotrophicus* se realizó utilizando el medio de cultivo LGITA (73), conteniendo 1 ó 40 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Los cultivos se llevaron a cabo a 30 °C en un biofermentador de 25 L manteniendo las condiciones de más alta aereación y agitación de 100 r.p.m. Tanto el cultivo bajo limitación de amonio como el cultivo en exceso de amonio fueron iniciados con 4 L de un inóculo en crecimiento activo. Los inóculos fueron crecidos en medio LGIP durante 24 h. Ambos cultivos fueron suspendidos al inicio de la fase estacionaria. Las células fueron cosechadas con una centrífuga de flujo continuo (Sharpless Co.). Después las células fueron lavadas con solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 conteniendo  $\text{CaCl}_2$  0.5 mM y  $\text{MgCl}_2$  0.5 mM y fueron almacenadas a – 80 °C hasta su uso.

### ***Lisis celular y preparación de membranas***

Las células fueron rotas empleando perlas de vidrio (0.1-0.2 mm) en una licuadora (Bead-Beater). Se aplicaron 4 a 5 pulsos con

descansos de 5 min para evitar el calentamiento de las células. Todo el proceso se llevó a cabo en frío y se empleó PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) para evitar la degradación por proteasas (32). Las perlas fueron separadas con ayuda de un filtro y bomba de vacío. La suspensión de células rotas fue centrifugada a 10,000 × g durante 15 min (a 4 °C) para separar los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y luego se centrifugó a 144,000 × g durante 40 min a 4 °C. Las membranas recuperadas se lavaron con solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 conteniendo CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM y MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM y fueron almacenadas a –80 °C hasta su uso. La cantidad de proteína en las membranas fue determinada por el método modificado de Lowry (58).

### ***Actividades respiratorias***

Las actividades de las oxidasas fueron determinadas polarográficamente a 30 °C de acuerdo con método descrito por Escamilla (32). Para ello se empleó el oxímetro provisto de un electrodo de Clark (Yellow Springs Instruments). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 2 mL y contenía: solución reguladora de fosfatos 50 mM pH 6.0 ó 7.4 y suspensión membranal (0.1 mg de proteína membranal). La reacción fue iniciada con la adición del sustrato donador de electrones. Así las concentraciones finales de los sustratos fueron: NADH 3 mM, glucosa 10mM, succinato 50 mM, gluconato 10 mM, etanol 10 mM, acetaldehído 10 mM, ascorbato 10 mM más TMPD 2 mM, o ascorbato 10 mM más TCHQ 1.5 mM.

Las actividades de las deshidrogenasas membranales fueron determinadas espectrofotométricamente empleando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones, siguiendo la metodología

empleada por Ameyama y Adachi (2, 3). Brevemente, la mezcla de reacción se ajustó a 1 mL y contenía solución reguladora de citrato, suspensión membranal (0.05 mg de proteína membranal) y 10 mM de ferricianuro de potasio. Las membranas fueron inhibidas previamente con KCN 2 mM. La reacción se inició con la adición de glucosa 10 mM, etanol 10 mM, acetaldehído 10 mM, NADH 1.0 mM, gluconato 10 mM y succinato 50 mM. La actividad fue cuantificada por el cambio en la absorbancia a 660 nm.

### ***Extracción y determinación de quinonas de membranas***

Las quinonas se extrajeron de membranas liofilizadas, de acuerdo al método de Ding (27). El extracto seco se guardó bajo nitrógeno y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Mediante HPLC de fase reversa y una columna analítica Waters C18 Spherisorb S5 OD52 (4.6 × 150 mm) se realizaron la separación y la identificación de las quinonas de la membrana celular (16). La columna se equilibró con etanol-metanol (3:2 v/v) depurado con nitrógeno; la misma mezcla de disolventes se utilizó como fase móvil, con una rapidez de flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Las quinonas eluidas fueron detectadas a 275 nm y su concentración fue estimada a partir de las áreas bajo los picos correspondientes, usando estándares comerciales de Q<sub>6</sub>, Q<sub>9</sub>, Q<sub>10</sub> y PQQ.

### ***Fotoinactivación y reconstitución de quinonas de membranas***

La ubiquinona de *G. diazotrophicus* fue destruida por luz ultravioleta de región cercana (360 nm), con el empleo de una lámpara Chromato-Vue modelo cc-20. Las suspensiones membranales (concentración final de proteína de 10 mg mL<sup>-1</sup>) distribuidas en el fondo de una caja Petri, colocada sobre hielo y con agitación

magnética, a 10 centímetros de distancia de la lámpara, fueron irradiadas hasta por 120 minutos.

La restauración de las actividades respiratorias después de la fotoinactivación de las quinonas se llevó a cabo con la adición de los análogos de ubiquinona siguientes: Q<sub>0</sub>, Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub> y De, a una concentración final de 4 nmol mg<sup>-1</sup> de proteína.

### ***Separación de quinonas por TLC***

El extracto seco se disolvió en un 300 µL de n-pentano a temperatura ambiente y se aplicó en manchas sucesivas de 10 µL cada una a lo largo de la base de una placa de sílica gel 60 F (Merck & Co.) de 10 cm x 20 cm., en presencia de un estándar de ubiquinona-10 (Q<sub>10</sub>). Cada placa se corrió en n-heptano/acetato de etilo 9:1 (v/v) durante 45 – 60 minutos, con el frente de 2 cm antes del extremo superior, se secó y se reveló con luz UV de 254 nm. El área que contenía la mancha con un R<sub>f</sub> similar al de Q<sub>10</sub> (0.23) fue raspada y extraída tres veces con 500 µL metanol. La suspensión de sílica en metanol se centrifugó 5 min a 10,000 g y el botón resultante se resuspendió en 500 µL de metanol. Se combinaron los sobrenadantes y se eliminó el disolvente con una corriente suave de nitrógeno. El extracto seco se disolvió en 1 mL de etanol para su análisis posterior. Este procedimiento se utilizó tanto para la condición de fijación de nitrógeno (amonio 1.0 mM) como para la condición de no fijación de nitrógeno (amonio 40 mM).

### ***Revelado de TLC para identificar grupos funcionales***

#### **Revelado con azul de metileno reducido para ubiquinonas**

*Disolución de azul de leuco metileno (23).* Se disolvieron 0.5 g de azul de metileno en 50 mL de agua deionizada, se agregaron 3.0 g

## ***Parte experimental***

---

---

polvo de zinc y diez minutos antes de usar la disolución se agregaron 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (97% p/v). Mientras tanto, se agitó esporádicamente la mezcla (con desprendimiento de H<sub>2</sub>). Inmediatamente antes de usar la disolución se filtró a través de fibra de vidrio.

*Revelado.* El cromatograma seco del extracto de membranas fue rociado con la disolución de azul de metileno. La prueba es positiva para ubiquinonas si se observan manchas de color azul.

### **Revelado con hidroxilamina/cloruro férrico**

*Disolución de hidroxilamina alcalina (83).* Se mezclaron 10 mL de disolución etanólica de clorhidrato de hidroxilamina al 10 % con 20 mL de disolución etanólica de hidróxido de sodio al 12%. Se filtró la mezcla resultante y se descartó el precipitado de NaCl.

*Reactivo de cloruro férrico.* Se mezcló 1.0 g de cloruro férrico con 2 mL de ácido clorhídrico concentrado, en un mortero. La disolución resultante se agitó con éter etílico para preparar una disolución etérea del reactivo.

*Revelado.* La placa cromatográfica de las quinonas fue rociada con el reactivo de hidroxilamina; se dejó secar por cinco minutos y posteriormente se roció con cloruro férrico etéreo. Los lípidos con grupos éster se observan como puntos de color púrpura, sobre el fondo amarillo de la placa.

### **Resultados**

#### ***Cinética de crecimiento***

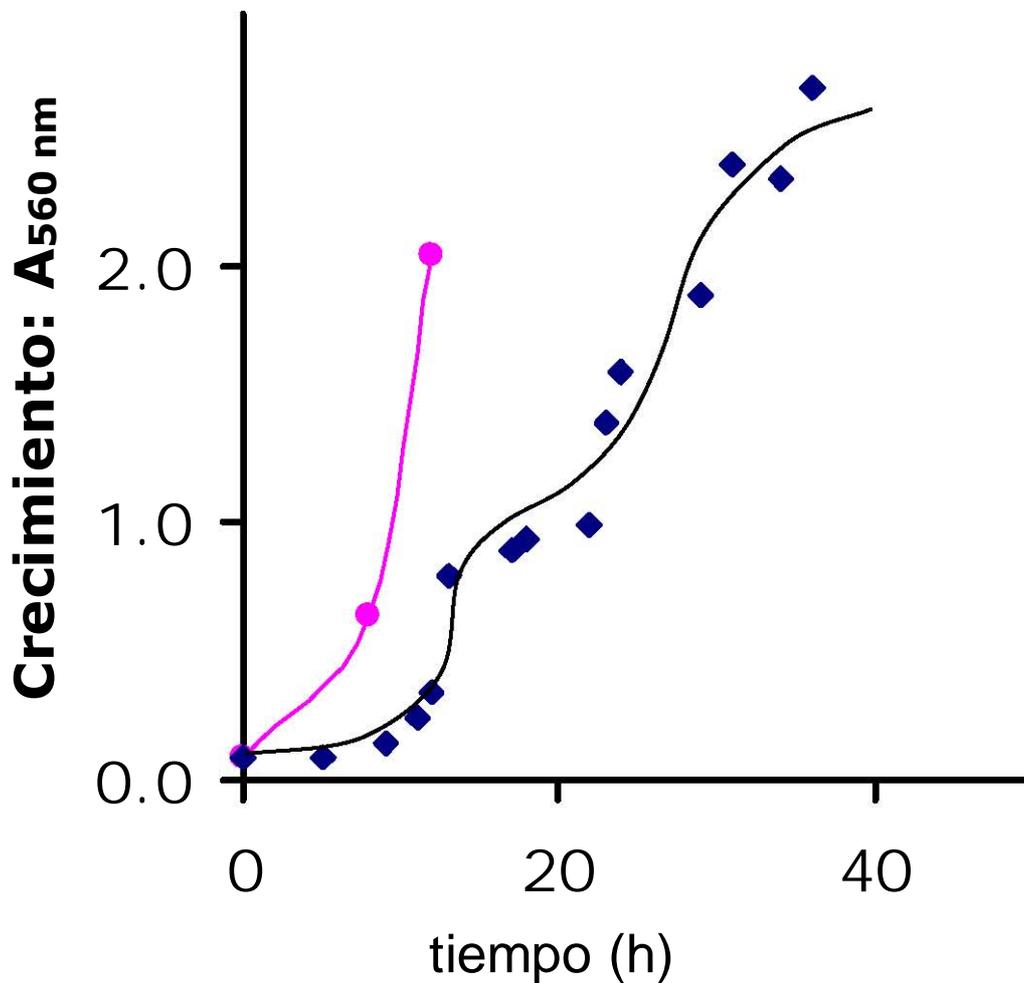
Para la condición limitada de amonio, las curvas de crecimiento mostraron un comportamiento paralelo y de tipo bifásico, mientras que para la condición de exceso de amonio, tanto la cinética de crecimiento (Figura 4), como la demanda de oxígeno (Figura 6) presentaron una sola fase

#### ***Acidificación del medio de cultivo***

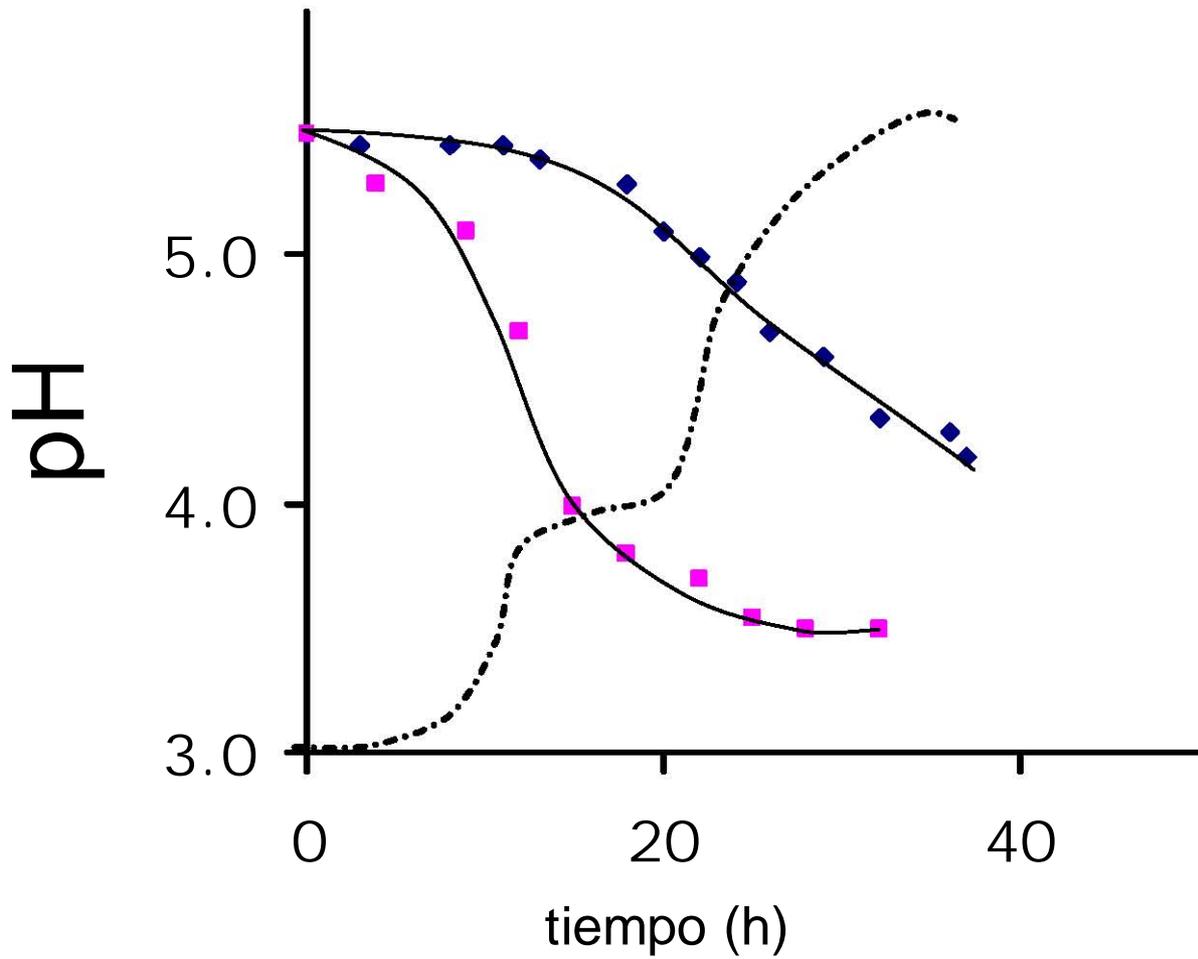
El pH decayó lentamente de 5.5 a 3.8 en la condición limitada de amonio, mientras que en la condición de cultivo en exceso de amonio, la acidificación fue algo más rápida desde las primeras horas de crecimiento, con un pH final de 3.5. Se esperaba que en exceso de amonio la acidificación fuera menor, puesto que la respiración está ligada a la oxidación de glucosa. Al no requerir de actividad diazotrófica para crecer, la bacteria no requeriría consumir la misma cantidad de glucosa que si fijara nitrógeno; por lo tanto produciría menor cantidad de ácido glucónico, sin embargo, el crecimiento mayor que se observa en exceso de amonio, requeriría mayor actividad metabólica y por tanto, demandaría mayor cantidad de glucosa, produciendo entonces mayor cantidad de ácido glucónico (Figura 5).

#### ***Cantidad de amonio residual***

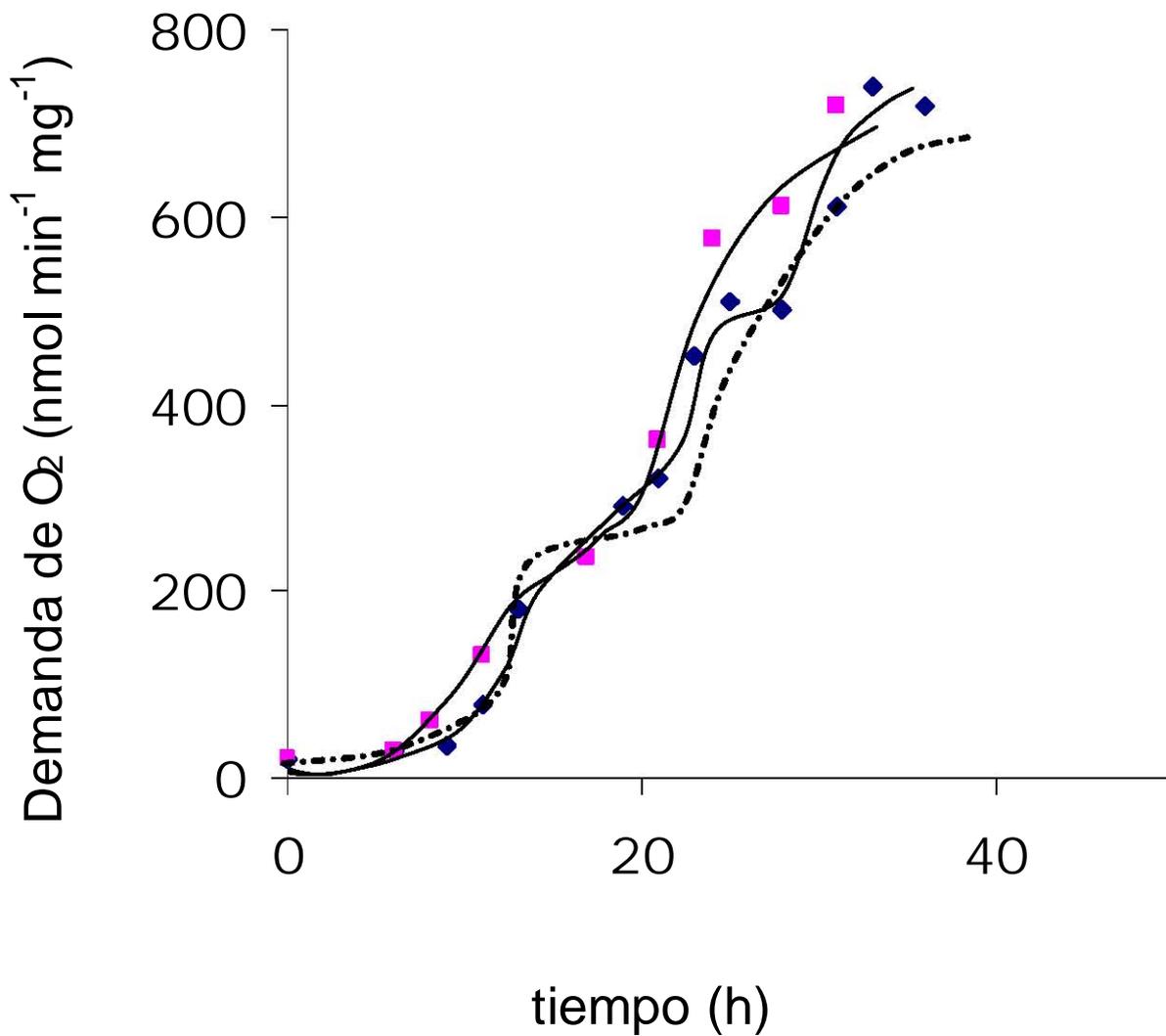
La dosis de amonio en la condición limitada se agotó del medio a las 10 horas, después de haber iniciado el cultivo, resultado que coincide con el desarrollo de la primera fase de crecimiento.



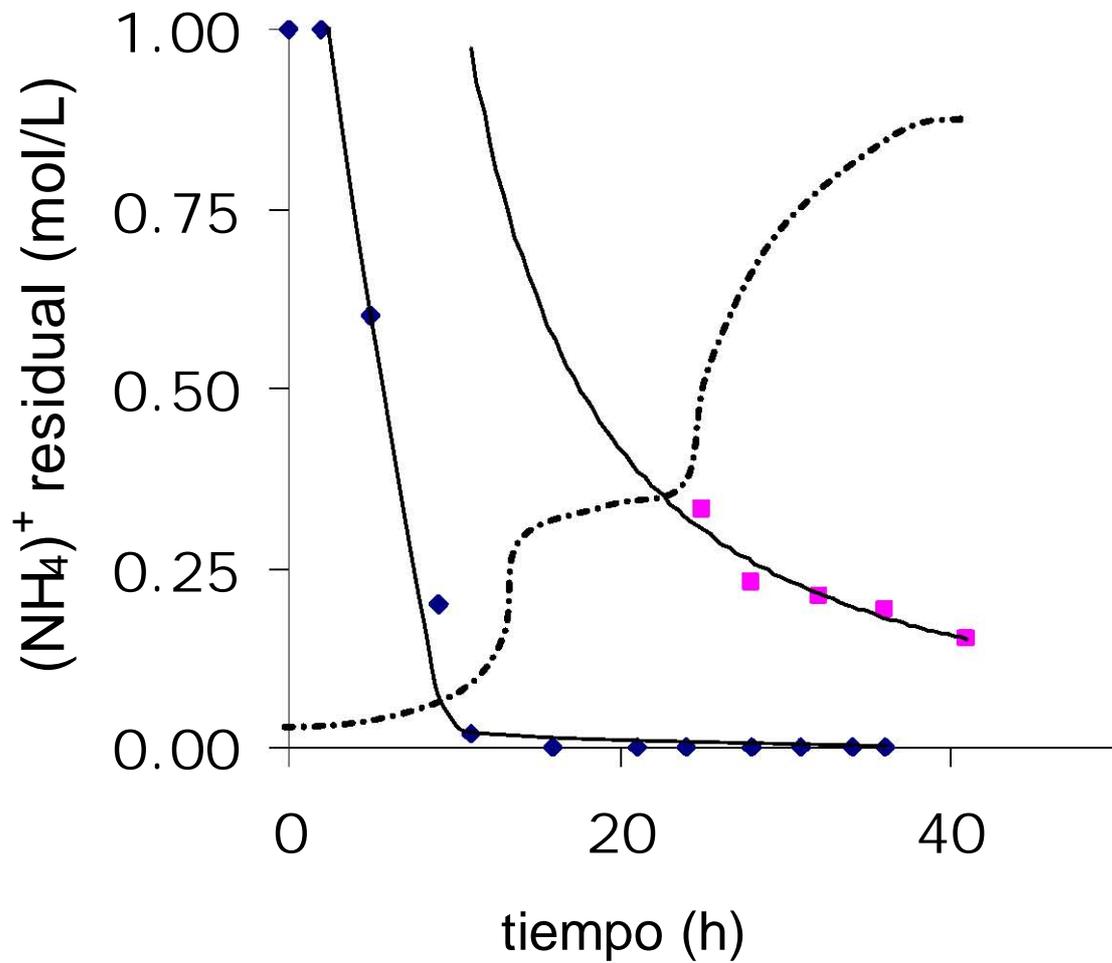
**Figura 4** Crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Los cultivos se realizaron a 30 °C en un biofermentador de 1 L, en el medio de cultivo LGITA con aereación de 4.0 L de aire/min. Se emplearon dos concentraciones de sulfato de amonio: 1 mM (◆) y 40 mM (■).



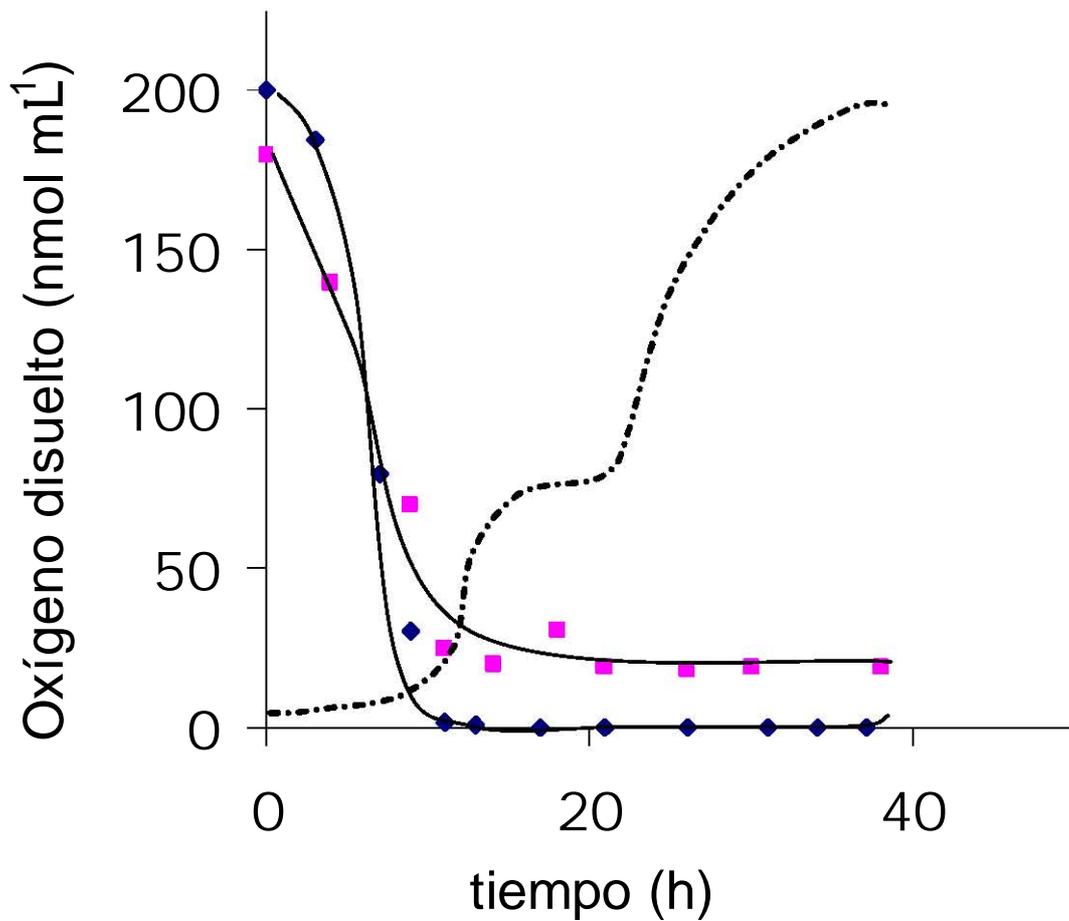
**Figura 5** Acidificación del medio de cultivo por *G. diazotrophicus* en función del tiempo. Se emplearon dos concentraciones de sulfato de amonio: 1 mM (♦) y 40 mM (■). La línea discontinua indica el crecimiento de *G. diazotrophicus*.



**Figura 6** Consumo de oxígeno por *G. diazotrophicus* en función del tiempo de cultivo. Se emplearon dos concentraciones de sulfato de amonio: 1 mM (◆) y 40 mM (■). La línea discontinua indica el crecimiento de *G. diazotrophicus*.



**Figura 7** Concentración de amonio en el medio de cultivo en función del tiempo. Se emplearon dos concentraciones de sulfato de amonio: 1 mM (♦) y 40 mM (■). La línea discontinua indica el crecimiento de *G. diazotrophicus*.



**Figura 8** Cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo en función del tiempo de crecimiento de *G. diazotrophicus*. Se emplearon dos concentraciones de sulfato de amonio: 1 mM (◆) y 40 mM (■). La línea discontinua indica el crecimiento de *G. diazotrophicus*.

En la condición de exceso, después de las primeras 25 horas de crecimiento, la concentración de amonio decayó a 0.25 mM y se mantuvo así hasta las 60 horas (Figura 7).

### ***Cantidad de oxígeno disuelto***

Después de las 10 horas de crecimiento, la concentración de oxígeno disuelto decayó hasta niveles no detectables, en condición limitada de amonio, esta curva coincidió con el desarrollo de la primera fase de crecimiento y con el consumo del amonio inicial. En el caso de la condición de exceso de amonio, el oxígeno disuelto disminuyó hasta en un 90% pero no llegó a niveles no detectables. Su cinética fue muy similar a la del amonio residual (Figura 8).

### ***Actividades Respiratorias***

Las membranas de *G. diazotrophicus* crecido en el medio de cultivo con bajo amonio presentaron actividades respiratorias específicas mayores que las de las células crecidas en alta concentración de amonio (Tabla 2). NADH y glucosa fueron los mejores sustratos para ambos tipos de células. Las actividades de oxidasa con NADH, acetaldehído y glucosa fueron 2.2, 2.9 y 5.5 veces mayores, respectivamente, en las preparaciones de membranas crecidas en bajo amonio que aquellas provenientes de cultivos con alto amonio. El incremento observado para la glucosa oxidasa fue ocasionado por un incremento de 6.8 veces en la actividad de glucosa deshidrogenasa. El gluconato, el etanol y el succinato fueron donadores de electrones menos eficientes, en ambas preparaciones celulares.

**Tabla 2** Efecto de la concentración de amonio en el medio LGITA sobre las actividades respiratorias asociadas a membranas de *G. diazotrophicus*

Sustrato	Bajo amonio			Alto amonio			Relación bajo/alto para oxidasa
	Actividad de oxidasa (ng-átomos de O <sub>2</sub> )	Actividad de deshidrogenasa (nmol de ferricianuro)	Actividad de oxidasa (ng-átomos de O <sub>2</sub> )	Actividad de deshidrogenasa (nmol de ferricianuro)	Actividad de deshidrogenasa (nmol de ferricianuro)		
NADH	2,824	2,563	1,293	1,693	2.2		
Glucosa	2,085	2,180	379	319	5.5		
Acetaldehído	1,082	1,633	364	130	2.9		
TCHQ-							
ascorbato	750		363		2.0		
Etanol	235	826	141	84	1.6		
TMPD-							
ascorbato	141		108		1.3		

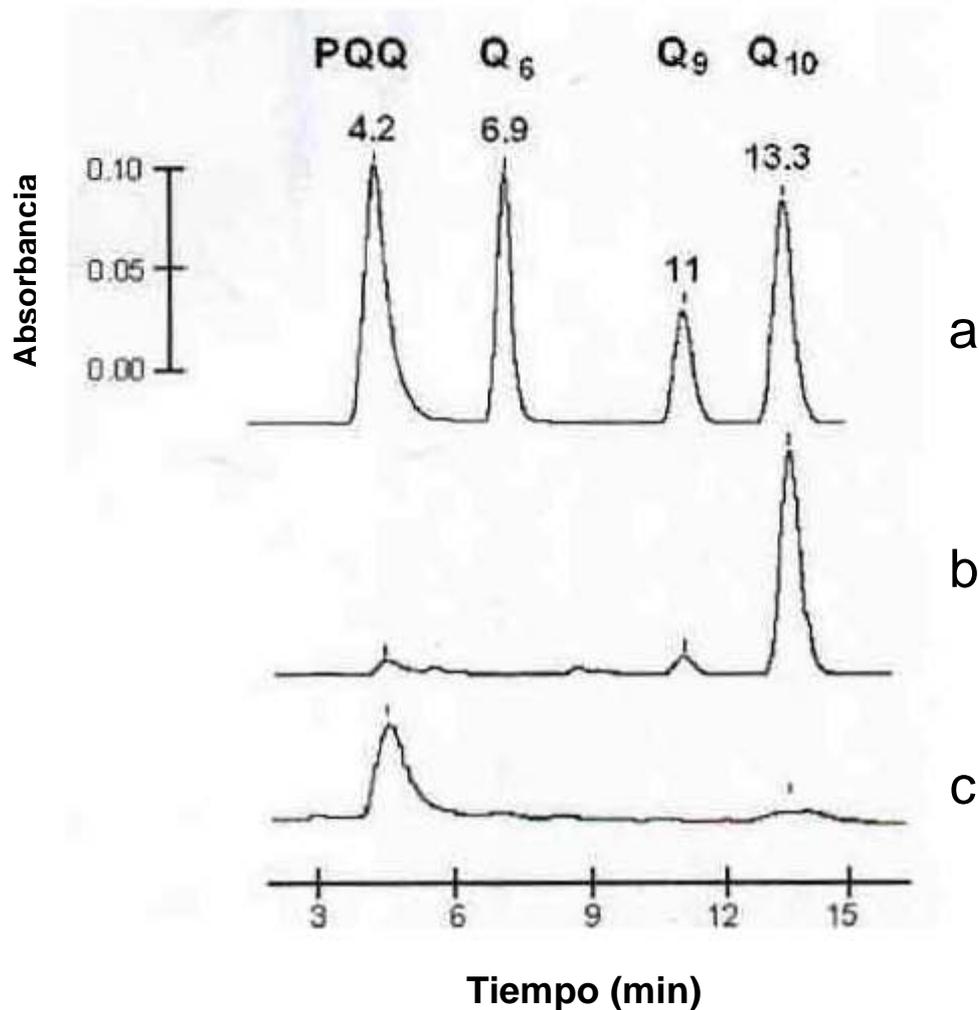
El quinol THQ fue oxidado a altas velocidades en ambos tipos de membranas, mientras que la mezcla TMPD-ascorbato fue el donador de electrones más pobre, lo cual sugiere que las oxidasas terminales en ambas membranas pertenecen al grupo de las quinol oxidasas (36).

### ***Determinación de quinonas por HPLC***

La ubiquinona Q<sub>10</sub> es característica del género *Gluconacetobacter* (86, 88). En coincidencia, las quinonas extraídas de membranas de *G. diazotrophicus* PAL 5, que fueron analizadas por HPLC (**Figura 9**) presentaron un pico que eluyó en la posición de la Q<sub>10</sub> (13.3 min) y un pico menor correspondiente a la Q<sub>9</sub> (11 min). También se observó un pico a un tiempo menor (4.2 min), el cual se pudo relacionar con PQQ (**Figura 9** b). Para ello se emplearon estándares de diferentes quinonas (**Figura 9** a). Las concentraciones calculadas a partir de las áreas bajo los picos fueron: 4, 0.3 y 1.2 nmol (mg de proteína)<sup>-1</sup>, para Q<sub>10</sub>, Q<sub>9</sub> y PQQ, respectivamente. No se observó ninguna señal al tiempo de elución de Q<sub>6</sub>. La irradiación de las membranas con luz ultravioleta cercana (360nm) durante una hora, causó una destrucción casi total de Q<sub>9</sub> y Q<sub>10</sub> y una pérdida parcial del PQQ (i.e. 20-30 %) (**Figura 9** c). La proporción de Q<sub>9</sub> : Q<sub>10</sub> : PQQ, con respecto a Q<sub>9</sub>, fue de 13 : 1 : 3.3 (**Tabla 3**).

### ***Inactivación por irradiación con luz UV***

En la literatura se ha propuesto que en las bacterias acéticas todas las deshidrogenasas membranales ligadas a la cadena respiratoria usan una ubiquinona como aceptor de electrones (64).



**Figura 9** Cromatograma en HPLC de: (a) Estándares de Q<sub>6</sub>, Q<sub>9</sub>, Q<sub>10</sub> y PQQ. (b) Perfil de elución obtenido a partir de las membranas de *G. diazotrophicus*, crecido en condiciones de fijación de nitrógeno. (c). Perfil obtenido a partir de las membranas de *G. diazotrophicus* irradiadas con luz UV<sub>360nm</sub>, durante 1 hora. Las cantidades de quinonas fueron 4, 0.3 y 1.2 nmol (mg de proteína)<sup>-1</sup>, para Q<sub>10</sub>, Q<sub>9</sub> y PQQ, respectivamente. No se detectó Q<sub>6</sub>.

## Resultados

En concordancia, la irradiación de las membranas con luz UV<sub>360</sub> provocó una pérdida progresiva de la actividad respiratoria del transporte de electrones (**Figura 10**), con todos los sustratos probados (NADH, glucosa, etanol y acetaldehído); al cabo de una hora de exposición, se perdió de 80 a 90 % de las actividades de oxidasa.

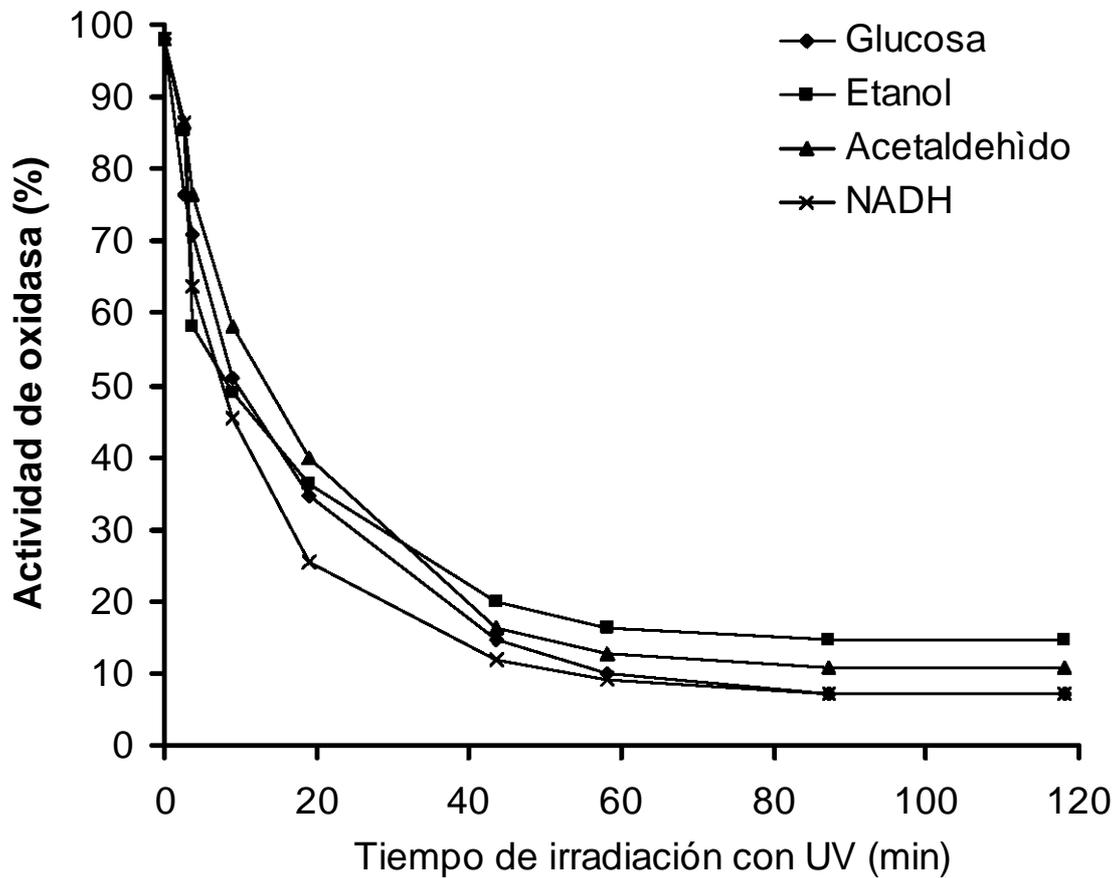
**Tabla 3** Contenido molar de quinonas en membranas de *G. diazotrophicus*

	Quinona		
	Q <sub>10</sub>	Q <sub>9</sub>	PQQ
Concentración (nmol/mg de proteína)	4	0.3	1.2
Proporción relativa a Q <sub>9</sub>	13	1	3.3

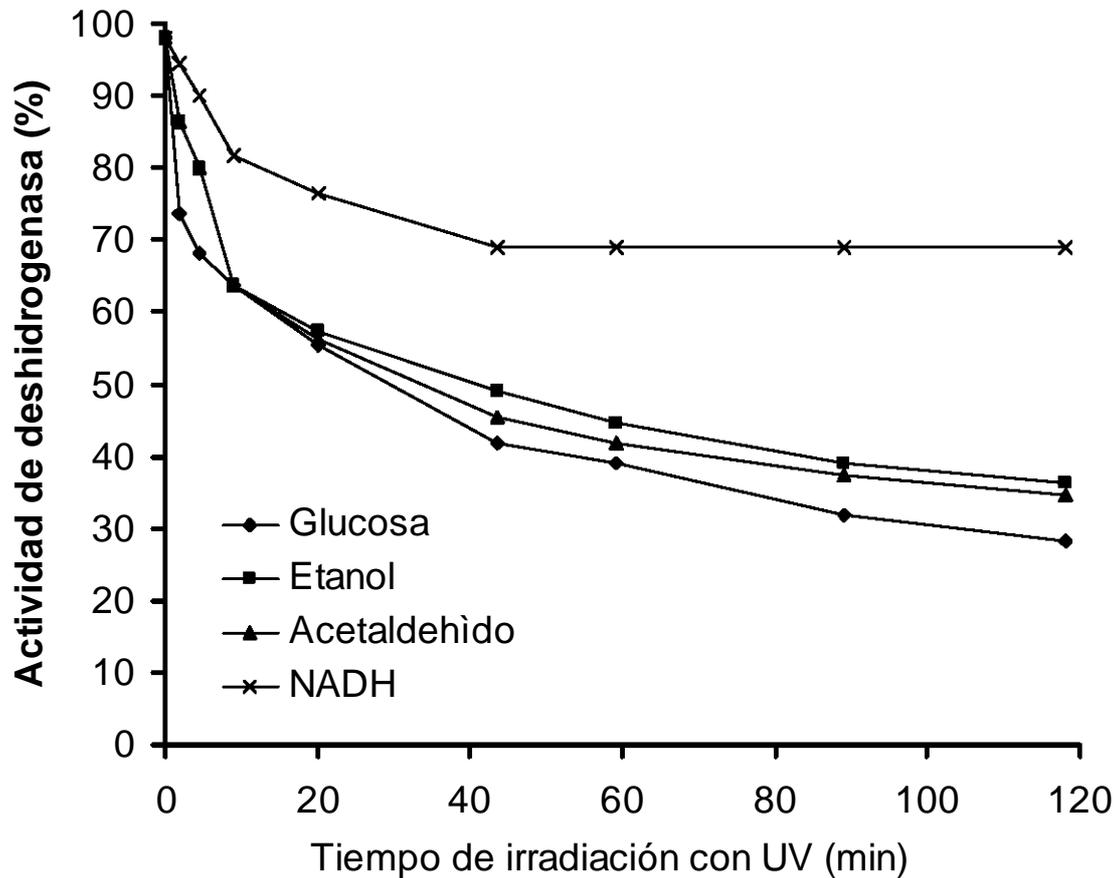
La irradiación también provocó pérdida parcial de las actividades de deshidrogenasa correspondientes (**Figura 11**), más marcada para las deshidrogenasas que contienen PQQ como grupo prostético que para la deshidrogenasa de NADH, que no lo contiene. Diversos análogos de quinonas respiratorias son capaces de reconstituir las actividades del transporte de electrones en membranas agotadas de quinonas (67). A partir de las pruebas de reconstitución realizadas, el orden observado en la eficiencia de restauración fue  $Q_2 > Q_1 > dUQ > Q_0$  (**Figura 12**). En el caso de  $Q_2$ , fue restaurado el 80 % de las actividades originales de oxidasa con NADH o glucosa y sólo de 30 - 40 % de las actividades con etanol y acetaldehído. La diferencia observada se podría explicar en parte, por la inactivación parcial de las PQQ-deshidrogenasas ocasionada por la irradiación, aunque también es posible que los análogos de ubiquinona probados, sean mejores aceptores de electrones para las deshidrogenasas de NADH y de glucosa, que para con las deshidrogenasas de etanol y acetaldehído.

### ***Cromatografía en capa fina de quinonas endógenas***

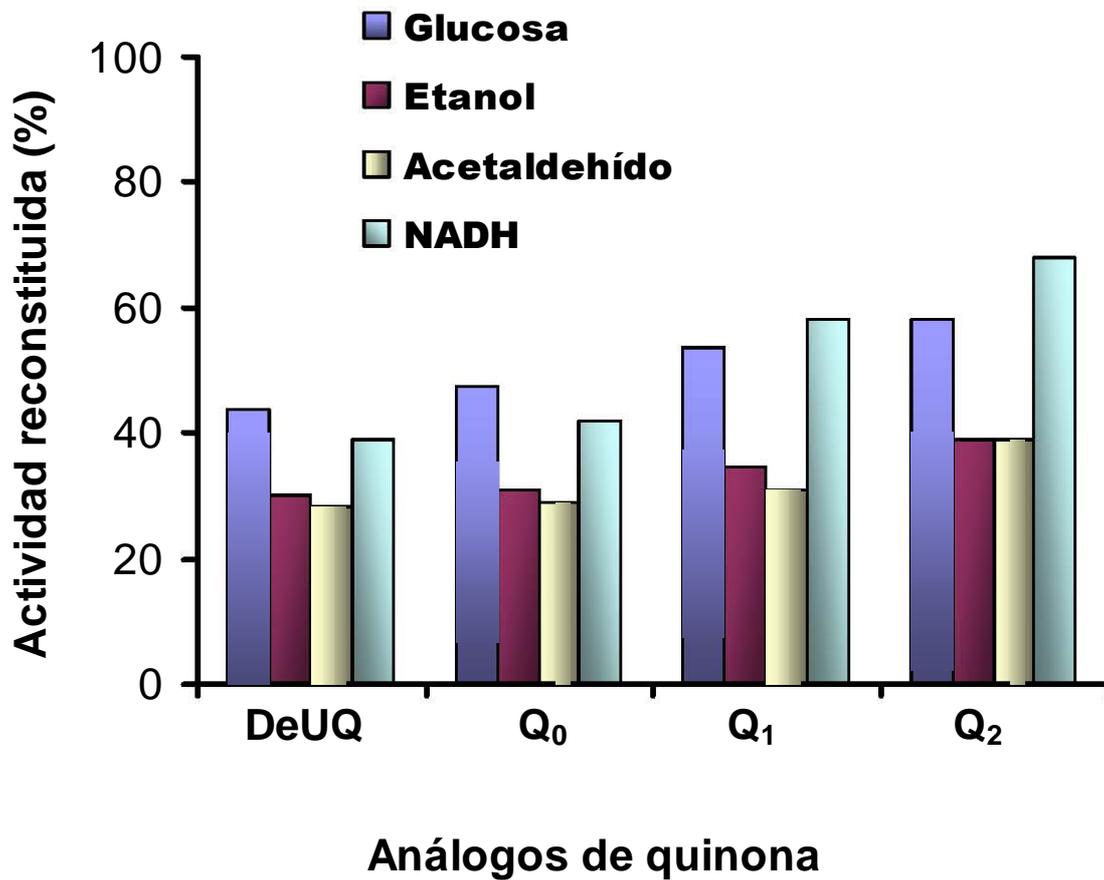
Los extractos fueron sometidos a cromatografía en capa fina (TLC) en presencia de estándares químicos de diferentes quinonas y de extractos de células de especies bacterianas conocidas. Los extractos de *G. diazotrophicus* presentaron el patrón de separación mostrado en la **Figura 13**. Hubo tres componentes principales, según lo observado: una mancha en la región inferior de la placa ( $R_f \sim 0.06$ ), la cual no se identificó; una mancha con un  $R_f$  de 0.21-0.23, semejante al de  $Q_{10}$  y una mancha no caracterizada la cual presentó un  $R_f$  de 0.64-0.66 (**Figura 13**).



**Figura 10** Pérdida de la actividad de oxidasa para glucosa, etanol, acetaldehído y NADH, en función del tiempo de irradiación de las membranas de *G. diazotrophicus*, con luz UV<sub>360nm</sub>.



**Figura 11** Pérdida de la actividad de deshidrogenasa para los sustratos glucosa, etanol, acetaldehído y NADH, en función del tiempo de irradiación de las membranas de *G. diazotrophicus*, con luz UV<sub>360nm</sub>.



**Figura 12** Reconstitución de la cadena de transporte de electrones de membranas tratadas con luz UV<sub>360nm</sub>, utilizando diferentes análogos de ubiquinona

El componente identificado como Q<sub>10</sub> pudo ser observado tanto con luz UV<sub>254nm</sub> como con vapores de yodo.

Los resultados para la condición limitada de amonio como para la condición de exceso fueron muy similares, sin embargo se observó (de manera muy sutil), mayor cantidad de quinona en la condición limitada de amonio.

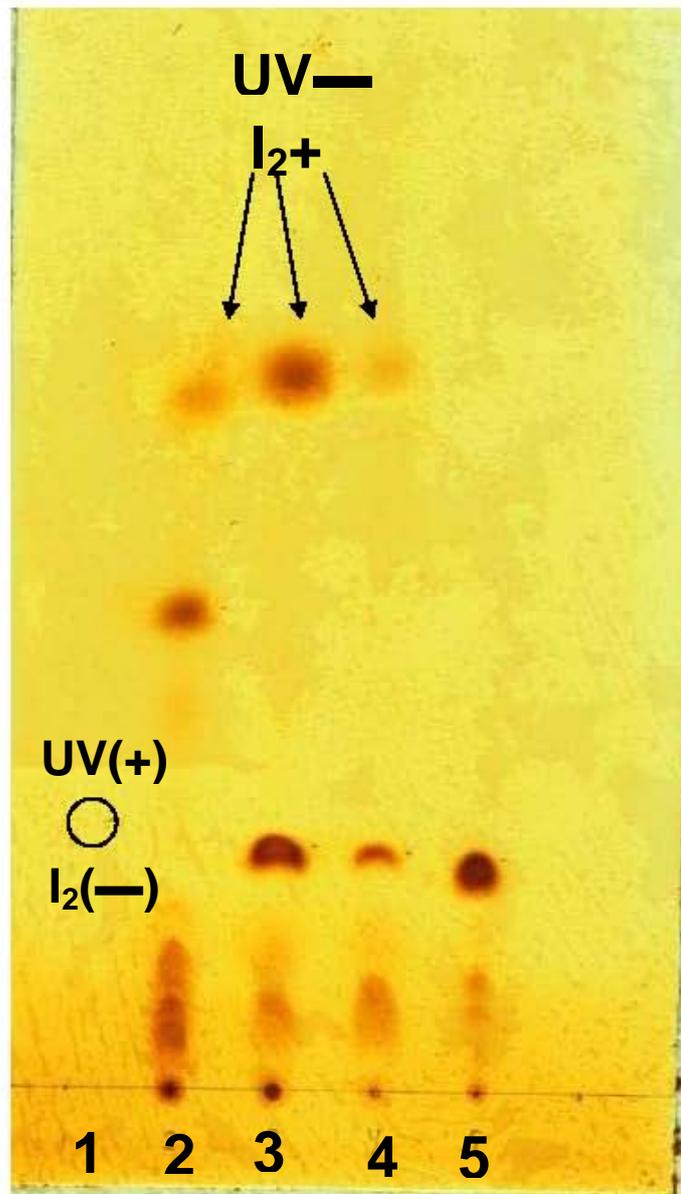
Diferentes cromatogramas del extracto membranal de *G. diazotrophicus* en presencia de los extractos de *B. cereus* y de *G. xylinum* fueron revelados mediante técnicas de identificación de lípidos (83) con la finalidad de identificar las quinonas presentes.

La Q<sub>10</sub> aislada de *G. diazotrophicus* dio resultado positivo a la prueba de azul de metileno y dio resultado negativo a la prueba para ésteres (no se muestran resultados).

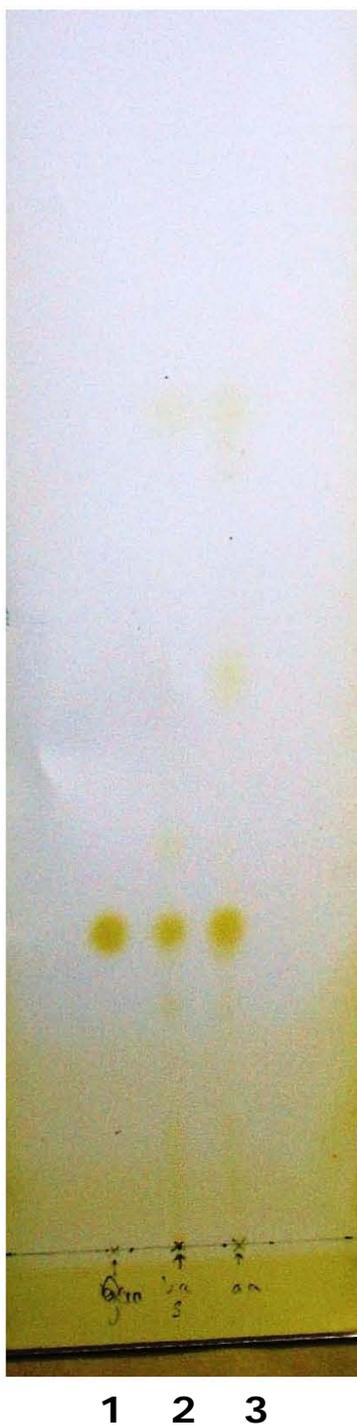
Los compuestos no identificados en las separaciones podrían ser intermediarios biosintéticos de la ubiquinona o lípidos neutros de membrana (37, 83). No se observó diferencia en la quinona expresada en función de la concentración de amonio en el medio de cultivo (**Figura 15**).

### ***Espectros de absorción ultravioleta***

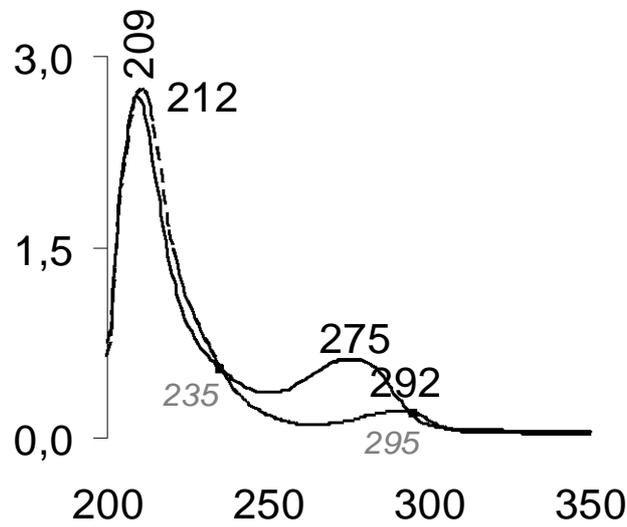
Se obtuvieron los espectros de ultravioleta de las quinonas aisladas de *G. diazotrophicus*, tanto de células crecidas en la condición limitada de amonio (i.e. 1.0 mM) como de células crecidas en la condición de exceso de amonio (i.e. 40 mM). Se muestran las  $\lambda_{\max}$  en 275 nm (oxidado), 290 (reducido), y los puntos isosbéticos de la muestra, con 295 y 235 nm (ver **Figura 16**), contra 294 y 231 reportados por Barr, *et al* (9). Las características de los espectros obtenidos corresponden a las de las ubiquinonas.



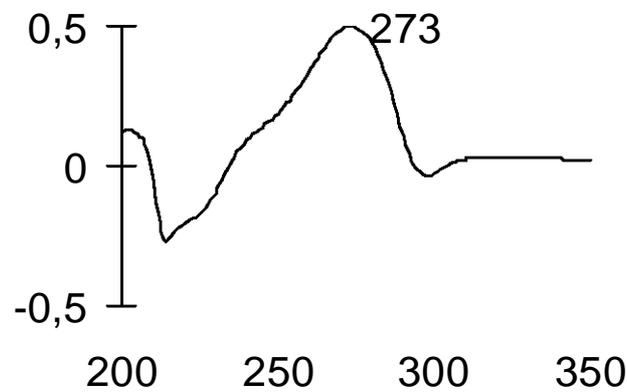
**Figura 1** Cromatograma de extractos hechos con n-pentano a membranas enteras de *G. diazotrophicus* en presencia de diferentes quinonas estándar. 1. Menadiona; 2. Membranas enteras de *B. cereus* (menaquinona-7); 3. Membranas enteras de *G. diazotrophicus*; 4. Extractos de células completas de *G. xylinum* IFO. 5. Q<sub>10</sub>. En la figura se muestran las técnicas de revelado. Las manchas que no tienen descripción fueron detectables con lámpara de luz UV de 254 nm. Eluyente: n-heptano/acetato de etilo 90:10 (v/v).



**Figura 2** Cromatograma de extractos hechos con n-pentano a: membranas enteras de *G. diazotrophicus* crecido en medio LGITA con sulfato de amonio 1 mM (2); membranas enteras de *G. diazotrophicus* crecido en medio LGITA con sulfato de amonio 40 mM (3); en presencia de Q<sub>10</sub> estándar (1). Eluyente: n-heptano/acetato de etilo 90:10 (v/v); revelado con yodo.



**A**



**B**

**Figura 16** Espectros UV de la quinona aislada y purificada a partir de membranas de *G. diazotrophicus*, en estado oxidado (línea continua) y en estado reducido (línea discontinua); b) Espectro diferencial del estado reducido menos el estado oxidado. En la parte a, se indican las longitudes de onda de los puntos isosbéticos para el compuesto analizado: 235 y 295 nm; también se indica la longitud de onda de absorción máxima ( $\lambda_{max}$ )

### Discusión

La dosis inicial óptima de amonio para obtener células de *G. diazotrophicus* que fijen nitrógeno es 1 mM (73). Una concentración de amonio 40mM inhibe completamente la actividad de la nitrogenasa (33). De esta manera, la baja concentración de amonio (1 mM) se emplea como dosis inicial para que *G. diazotrophicus* pueda comenzar su crecimiento; sin el amonio inicial, la bacteria no puede crecer. En concordancia con Stephan et al., (73), los datos obtenidos permitieron proponer que el amonio incrementa el número de células de *G. diazotrophicus*, de tal manera que la concentración de oxígeno en el medio disminuye y se hace factible la actividad de la nitrogenasa. Nosotros apoyamos tal propuesta dado que durante la primera etapa de crecimiento, *G. diazotrophicus* fue dependiente de amonio y al mismo tiempo, la concentración de oxígeno disuelto disminuyó hasta un nivel no detectable por el electrodo de oxígeno. Esas condiciones facilitaron el desarrollo de la segunda etapa de crecimiento de *G. diazotrophicus*, en la cual la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en un nivel no detectable. *G. diazotrophicus* posee una de las actividades respiratorias más altas, entre los organismos aeróbicos, y se ha propuesto que esta característica se encuentra involucrada en un mecanismo de protección respiratoria hacia la nitrogenasa (33). Las velocidades de actividad respiratoria de *G. diazotrophicus* son similares a las reportadas en *A. vinelandii*, donde se ha descrito el mecanismo de protección respiratoria (25). Entre los diferentes organismos existe una gran diversidad de quinonas respiratorias (49). Las ubiquinonas tienen una distribución

más limitada que las menaquinonas, entre las especies bacterianas (21); sin embargo, la coenzima Q ha sido aislada de una gran variedad de eubacterias Gram-negativas, tanto aeróbicas como facultativas en aerobiosis (13, 21, 56). Por su parte, es conocido que los anaerobios no presentan ubiquinona, sino quinonas del tipo vitamina K (menaquinonas). La mayor parte de las ubiquinonas aisladas de diferentes especies presentan de 6 a 10 unidades de isopreno en su cadena lateral (10). *E. coli* posee un sistema mixto de quinonas (ubiquinona-8 y menaquinona-8) *A. vinelandii*, un fijador de nitrógeno, posee ubiquinona-8 (49). Todas las bacterias acéticas conocidas hasta ahora, presentan ubiquinona como quinona natural. Las especies bacterianas pertenecientes a este grupo han sido clasificadas con base en la diferencia de su actividad oxidativa hacia diferentes alcoholes y azúcares, secuencias parciales de su rRNA 16S y el número de unidades isoprénicas de la cadena lateral de su quinona endógena. Las especies *Acetobacter* poseen  $Q_9$ , como quinona principal, como en el caso de *A. aceti* (64); tanto *Gluconobacter* spp., (p. ej. *G. suboxydans*), como *Gluconacetobacter* spp. presentan  $Q_{10}$ , como en *G. diazotrophicus*. Es necesario aclarar que a pesar de que *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* contienen  $Q_{10}$ , ambos géneros se diferencian entre sí en la secuencia de su rRNA 16S.

En este trabajo se demuestra que *G. diazotrophicus* contiene la  $Q_{10}$ , característica de su género, al igual que *Gluconacetobacter xylinum* (10); mientras que se diferencia del género *Gluconobacter* en su capacidad oxidativa de sacarosa (86).

La quinona expresada tanto en condiciones de fijación de nitrógeno, como en condiciones de no fijación, fue la misma, de acuerdo con la

separación por TLC; lo cual nos permite suponer que la ubiquinona resulta ser funcional para la bacteria en ambas condiciones de crecimiento y esto a pesar de que la expresión de los otros componentes de la cadena respiratoria cambian notablemente. Cuantitativamente la actividad respiratoria se eleva notablemente (i.e. 4-5 veces) durante el crecimiento  $N_2$ -dependiente. Cualitativamente, las oxidasas terminales se expresan diferencialmente: La oxidasa *ba* asociada al crecimiento  $N_2$ -dependiente y la oxidasa *bd*, asociada al crecimiento  $NH_4$ -dependiente reportada por Flores- Encarnación et al, 1999 (33).

En *A. vinelandii*, la ubiquinona excede 6 veces la concentración de los citocromos *b* y *c* individuales (49). En *G. xylinum* la concentración de la  $Q_{10}$  es tres veces mayor que la de los citocromos individuales (10). En comparación con los datos reportados para *G. diazotrophicus* la concentración de ubiquinona en condiciones de fijación de nitrógeno equivale a aproximadamente 30 veces la concentración de citocromo *c*, y aproximadamente 16 veces de la concentración de citocromo *b* (33). En mitocondria, la concentración molar de ubiquinona-10 es aproximadamente 10 veces la de citocromo *c*. La proporción determinada para  $Q_{10}$ ,  $Q_9$  y PQQ fue de 13:1:3.3, lo que hace evidente la predominancia de  $Q_{10}$  sobre  $Q_9$ , característica del género *Gluconacetobacter*. Por otro lado, la concentración de  $Q_{10}$  es aproximadamente 4 veces mayor que la concentración de PQQ. El tamaño de la molécula de ubiquinona es varias veces menor al de una deshidrogenasa membranal; esto, aunado a su papel de transportador móvil de electrones entre dos complejos de la cadena respiratoria a través de la membrana, requeriría un número de

unidades de ubiquinona mayor al de las deshidrogenasas, las cuales tienen como grupo prostético al PQQ. Los resultados anteriores muestran coincidencia con el papel de acarreador móvil de electrones que desempeñan las quinonas en la cadena respiratoria (43, 80).

El sistema respiratorio de *G. diazotrophicus* posee una serie de deshidrogenasas, las cuales se encuentran unidas a la membrana citoplásmica (33). De acuerdo al pH óptimo reportado la mGDH (pH 5.5), ADH (pH 6.2) y la ALDH (pH 3.5), tienen sus sitios catalíticos orientados hacia el espacio periplásmico, mientras que la NDH (pH 7.4) y la SDH (pH 7.4) están orientadas hacia el citoplasma de la bacteria (54, 61, 63). Las deshidrogenasas encontradas en *G. diazotrophicus* son muy similares a las reportadas en *A. aceti* (61). Estas enzimas periplásmicas oxidan parcialmente alcoholes y azúcares (64), en la superficie externa de su membrana citoplásmica (4), acumulando los productos de oxidación en el medio de cultivo (19, 33, 35, 73). En lugar de NAD o FAD, el grupo prostético de estas deshidrogenasas es una quinona, la quinona de pirroloquinolina (PQQ). Este grupo participa en los procesos de oxidación y se ha localizado en el sitio catalítico de la enzima (65). El PQQ, al ser una quinona es susceptible de ser destruido por la irradiación con luz UV, lo cual pudo ser la causa de la pérdida de actividad observada en las deshidrogenasas dependientes de PQQ. También se ha descrito que las deshidrogenasas para etanol y acetaldehído poseen citocromos de tipo c, los cuales son de alto peso molecular y pueden ser solubilizados con gran facilidad en presencia de bajas concentraciones de detergente (Triton X-100 al 0.2 %). A su vez, es notable que tanto *G. diazotrophicus*, como el

resto de las bacterias acéticas conocidas hasta ahora (exceptuando *A. methanolica*) poseen grandes cantidades de citocromos tipo *c* asociados a las deshidrogenasas que tienen PQQ como grupo prostético. Estos citocromos de tipo *c* son diferentes a los citocromos *c* de la mitocondria, puesto que se encuentran en el lado de bajo potencial de la cadena de transporte de electrones y no funcionan como intermediarios entre el complejo  $bc_1$  y el citocromo  $aa_3$ , tal como ocurre para las bacterias que cuentan con citocromo *c* oxidasa (64). Además, se ha reportado que *G. diazotrophicus* carece de complejo  $bc_1$  (33).

La presencia de PQQ como grupo prostético en las deshidrogenasas periplásmicas a la membrana, podría hacer más susceptibles a estas enzimas a la inactivación por irradiación, lo que podría explicar el menor porcentaje de restauración de las actividades de oxidasa con etanol y acetaldehído, en comparación con la actividad de NADH, ya que ésta no posee grupo PQQ. En el caso de la GDH, la mayor restauración de la actividad de oxidasa con análogos de quinona podría explicarse por una mayor reactividad de la enzima con los análogos de ubiquinona utilizados. Con respecto a las actividades respiratorias, la de glucosa fue incrementada notablemente en condiciones de fijación de nitrógeno. Alvarez y Martínez Drets (1) sugirieron que el sitio catalítico de esta enzima está orientado hacia el espacio periplásmico, lo que permitiría la oxidación de la glucosa sin que ésta requiriera permear hacia el citoplasma. El incremento en la actividad respiratoria de glucosa en condiciones limitadas de amonio proporcionaría el transporte de electrones suficiente para la síntesis de ATP

requerida para sostener el mecanismo de protección respiratoria que se llevará a cabo durante la diazotrofia.

El quinol THQ fue oxidado a altas velocidades en ambos tipos de membranas, mientras que la mezcla TMPD-ascorbato fue el donador de electrones más pobre, lo cual sugiere que las oxidasas terminales en ambas membranas pertenecen al grupo de las quinol oxidasas (36).

Los resultados anteriores permiten concluir que la ubiquinona es el aceptor común de electrones para las deshidrogenasas probadas.

Este hecho podría ser válido para otras deshidrogenasas vinculadas a la cadena de transporte de electrones.

### **Conclusiones**

- *G. diazotrophicus* requiere una dosis inicial de amonio para poder iniciar su crecimiento cuando la fuente de nitrógeno está limitada; cuando el amonio se agota, la cantidad de oxígeno no es detectable por el electrodo de oxígeno.
- La quinona endógena mayoritaria de *G. diazotrophicus* es la ubiquinona-10.
- La ubiquinona-10 es aceptor común de electrones de las deshidrogenasas periplásmicas de *G. diazotrophicus*.

### **Bibliografía**

1. **Alvarez, B., Martínez-Drets, G. (1995).** Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol* **41**, 918-924.
2. **Ameyama, M, Adachi, O.** Methods in Enzymology. Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds) Vol 89, p.491-497, Academic Press, New York, 1982
3. **Ameyama, M., Adachi, O. (1982).** Methods in Enzymology. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds) Vol 89, p.450-457, Academic Press, New York.
4. **Ameyama, M., Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. (1987).** Sugar-oxidizing respiratory chain of *Gluconobacter suboxydans*. Evidence for a branched respiratory chain and characterization of respiratory chain-linked cytochromes. *Agric Biol Chem* **51**, 2943-2950.
5. **Anraku, Y., Gennis, R.B. (1987).** The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* **12**, 262-266.
6. **Anthony C. (2004).** The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Arch Biochem Biophys* **428**, 2-9.
7. **Attwood, M.M., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1991).** Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J Ferment Bioeng* **72**, 101-105.

8. **Barquera, B., García-Horsman, A., Escamilla, J.E. (1991).** Cytochrome *d* expression and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch Microbiol* **155**, 114-119.
9. **Barr, R., Crane, F.L.** Methods in Enzymology. Quinones in algae and higher plants. (San Pietro, A., ed.). Vol. XXIII, p. 372-408. Academic Press, New York, 1971.
10. **Benziman, M., Goldhamer, H. (1968).** The role of ubiquinone in the respiratory chain of *Acetobacter xylinum*. *Biochem J* **108**, 311-316.
11. **Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V., Skulachev, V.P. (1997).** Generation of protonic potential by the *bd*-type quinol oxidase of *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Lett* **414**, 369-372.
12. **Braun, B.S., Benbow, U., Lloyd-Williams, P., Bruce, J.M., Dutton, L.** Methods in Enzymology. Determination of partition coefficients of quinones by high-performance liquid chromatography. (Fleischer, S. and Fleischer, B., eds.). Vol. 125, p. 119-129. Academic Press, New York, 1986.
13. **Brodie, A.F.** Methods in Enzymology. Isolation and photoinactivation of quinone coenzymes (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds). Vol. VI, p. 295-308. Academic Press. New York, 1963
14. **Burris, R.H. (1991).** Nitrogenases. *J Biol Chem* **266**, 9339-9342.
15. **Carr, N.G., Exell, G., Flynn, V., Hallaway, M., Talukdar, S. (1967).** Minor quinones of some *Myxophyceae*. *Arch Biochem Biophys* **120**, 503-507.

16. **Castro-Guerrero, N.A., Krab, K., Moreno-Sánchez, R. (2004).** The alternative respiratory pathway of euglena mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 459-469.
17. **Castro-Guerrero, N. A.** Caracterización bioquímica de los componentes resistentes a cianuro y antimicina de la cadena respiratoria de *Euglena gracilis*. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; 2002.
18. **Casu, A., Cottalasso, D., Pronzato, M.A., Rolla, C., Marinari, U.M., Nanni, G. (1986).** Investigation of the role of ubiquinone in rat liver subcellular compartments. *Cell Biochem Funct* **4**, 37-42.
19. **Cavalcante, V.A., Döbereiner, J. (1988).** A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant soil* **108**, 23-31.
20. **Cojho, E.H., Reis, V.M., Schenberg, A.C., Döbereiner, J. (1993).** Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol Lett* **106**, 341-346.
21. **Collins, M.D.** Methods in microbiology. Analysis of isoprenoid quinones. (Gottschalk, ed.). Vol. 18, p. 329-366. Academic Press, London, 1985.
22. **Collins, M.D., Jones, D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol Rev* **45**, 316-354.
23. **Crane, F.L., Barr, R.** Methods in Enzymology.

- Determination of ubiquinones (Mc Cormick, D.B. and Wright, L.D. ed.). Vol. XVIII p. 137-165. Academic Press, New York, 1971.
24. **D'mello, R., Hill, S., Poole, R.K. (1996).** 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. *Microbiol* **142**, 755-763.
25. **Dalton, H., Postgate, J.R. (1969).** Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. *J Gen Microbiol* **54**, 463-473.
26. **Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C. (2002).** Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 233-242.
27. **Ding, H., Robertson, D.E., Daldal, F., Dutton, P.L. (1992).** Cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex [2Fe-2S] cluster and its interaction ubiquinone and ubihydroquinone at the Q<sub>0</sub> site: a double-occupancy Q<sub>0</sub> site model. *Biochemistry* **31**, 3144-3158.
28. **Dokter, P., Frank, J., Duine, A. (1986).** Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41. *Biochem J* **239**, 163-167.
29. **Elias, M.D., Tanaka, M., Sakai, M., Toyama, H., Matsushita, K., Adachi, O., Yamada, M. (2001).** C-terminal periplasmic domain of *Escherichia coli* quinoprotein glucose

- dehydrogenase transfers electrons to ubiquinone. *J Biol Chem* **276(51)**, 48356-48361.
30. **Elias, MD., Nakamura, S., Migita, C.T., Miyoshi, H., Toyama, H., Matsushita, K., Adachi, O., Yamada, M. (2004).** Occurrence of a bound ubiquinone and its function in *Escherichia coli* membrane-bound quinoprotein glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* **279(4)**, 3078-3083.
31. **Escamilla, E., Contreras, M., Flores-Encarnación, M., Flores, L.M., Martínez, F., Juárez, M.A., Pardo, J.P., Morales, S. (Eds.),** Mensaje Bioquímico, vol. XXIII Los sistemas respiratorios bacterianos, UNAM, Facultad de Medicina; México, **1999**, p. 67-103.
32. **Escamilla, J.E., Ramirez, R., Del Arenal, I.P., Zarzoza, G., Linares, V. (1987).** Expression of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*: effects of oxygen tension and carbon source. *J Gen Microbiol* **133**, 3549-3555.
33. **Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzuá, L., Aguilar, G.R., Baca, B.E., and Escamilla, J.E. (1999)** The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J Bacteriol* **181**, 6987-6995.
34. **Franke, I.H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E. and Sly, L.I. (1999).** Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1681-1693.

35. **Galar, M.L., Boiardi, J.L. (1995).** Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**, 713-716.
36. **García-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R.B. (1994).** The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* **176**, 5587-5600.
37. **Gibson, F., Young, I. A.** Methods in Enzymology . Isolation and characterization of intermediates in ubiquinone biosynthesis (Fleischer, S. and Packer, L., eds.). Vol. LIII, p. 600-609. Academic Press, New York, 1978.
38. **Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, B., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Döbereiner, J., De Ley, J. (1989).** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 361-364.
39. **Goldberg, I., Nadler, V., Hochman, A. (1987).** Mechanism of nitrogenase switch-off by oxygen. *J Bacteriol* **169**, 874-879.
40. **Goodhew, C.F., Brown, K.R., Pettigrew, G.W. (1986).** Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes. *Biochim Biophys Acta* **852**, 288-294.
41. **Goodwin, P.M., Anthony, C. (1998).** The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol* **40**, 1-80.

42. **Gordon, J.K., Shah, V.K., Brill, W.J. (1981).** Feedback inhibition of nitrogenase. *J Bacteriol* **148**, 884-888.
43. **Hatefi, Y.; Galante, Y. M.; Stiggall, D. L.; Ragan, C. I.** Methods in Enzymology. Proteins, Polypeptides, Prosthetic Groups and Enzymic Properties of Complexes I, II, III, IV and V of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System. (Fleischer, S. and Packer, L., eds.). Vol. LIII, p. 591-599. Academic Press, New York, **1979**.
44. **Hemming, H.** Análisis de Lípidos, Acribia, Madrid, 2001, p. 97-102.
45. **Hernández, L., Arrieta, J., Menéndez, C., Vázquez, R., Coego, A., Suárez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M., Chambert, R. (1995).** Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J* **309**, 113-118.
46. **Ingledeu, W., Poole, R.K. (1984).** The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**, 222-271.
47. **Jiménez-Salgado, T., Fuentes-Ramírez, L.E., Tapia-Hernández, A., Mascarua-Esparza, M.A., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. (1997).** *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing *Acetobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3676-3683.
48. **Jones, C.W.** Methods in Microbiology. The analysis of cytochromes. (Gottschalk, ed.). Vol. 18, p. 285-328, Academic

- Press , London, 1985.
49. **Jones, C.W., Redfearn, E. R. (1966).** Electron transport in *Azotobacter vinelandii*. *Biochim Biophys Acta* **113**, 467-481.
  50. **Jünemann, S. (1997).** Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1321**, 107-127.
  51. **Kavanagh, E.P., Callis, J.B., Edwards, S.E., Poole, R.K., Hill, S. (1998).** Redox poise and oxygenation of cytochrome *bd* in the diazotroph *Azotobacter vinelandii* assessed *in vivo* using diode-array reflectance spectrophotometry. *Microbiology* **144**, 2271-2280.
  52. **Kim, J., Rees, D.C. (1994).** Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* **33**, 389-397.
  53. **Krivankova, L., Dadak, V.** Methods in Enzymology. Semimicro extraction of ubiquinone and menaquinone from bacteria. (Mc Cormick, D.B. and Wright, L.D., ed.). Vol. 67, p. 111-114. Academic Press, New York, 1980.
  54. **Kröger, A. (1978).** Methods in Enzymology. Determination of contents and redox states of ubiquinone and menaquinone (Fleischer, S. and Packer, L., eds.). Vol. LIII, part D; p.579-590. Academic Press, New York, 1978.
  55. **Kröger, A., Uden, G.** Coenzyme Q. The function of menaquinone in bacterial electron transport (Lenaz, G., ed.), p. 600-609. John Wiley and Sons, London, 1985.
  56. **Lester, R.L., Crane, F.L. (1959).** The natural occurrence of coenzyme Q and related compounds. *J Biol Chem* **234**, 2169-2175.

57. **Lorente, R.M., Carter, K., Green, G. N., Gennis, R.B. (1987).** Cytochrome  $b_{558}$  monitors the steady state redox state of the ubiquinone pool in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262(22)**, 10532-10536.
58. **Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
59. **Matsushita, K., Ameyama, M. (1982).** Methods in Enzymology. D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds.). Vol 89, p. 149-154. Academic Press. New York, 1982.
60. **Matsushita, K., Ebisuya, H., Adachi, O. (1992).** Homology in the structure and the prostetic groups between two different terminal ubiquinol oxidases, cytochrome  $a_1$  and cythocrome  $o$ , of *Acetobacter Aceti*. *J Biol Chem* **267**, 24748-24753.
61. **Matsushita, K., Ebisuya, H., Ameyama, M., Adachi, O. (1992).** Change of the terminal oxidase from cytochrome  $a_1$  in shaking cultures to cytochrome  $o$  in static cultures of *Acetobacter acetii*. *J Bacteriol* **174**, 122-129.
62. **Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. Ameyama, M. (1989).** Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-Glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *J Biochem* **105**, 633-637.

63. **Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. Ameyama, M. (1990).** Cytochrome  $a_1$  of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *ba* functioning as ubiquinol oxidase. *Proc Natl Acad Sci* **87**, 9863-9867.
64. **Matsushita, K., Toyama, H., Adachi, O. (1994).** Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv Microb Physiol* **36**, 247-301.
65. **McIntire, W. (1994).** Quinoproteins. *FASEB J* **8**, 513-521.
66. **Okada, K., Kainou, T., Matsuda, H., Kawamukai, M. (1998).** Biological significance of the side chain length of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **431**, 241-244.
67. **Peschek, G.A. (1980)** Restoration of respiratory electron-transport reactions in quinone-depleted particle preparations from *Anacystis nidulans*. *Biochem J* **186**, 515-523.
68. **Poole, R.K. (1983).** Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins. *Biochim Biophys Acta* **726**, 205-243.
69. **Puustinen, A., Wikström, M. (1991).** The heme groups of cytochrome *o* from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 6122-6126.
70. **Quastel, J.H.** Methods in Enzymology. Use of artificial electron acceptors in the study of dehydrogenases (Colowick,

- S.P. and Kaplan, N.O., eds.). Vol IV, p.329-336. Academic Press, New York 1957.
71. **Reis, V.M., Döbereiner, J. (1998).** Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* **171**, 13-18.
72. **Reis, V.M., Olivares, F. L., Döbereiner, J. (1994).** Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World j microbiol biotechnol* **10**, 401-405.
73. **Stephan, M.P., Oliveira, M., Teixeira, K.R.S., Martinez-Drets, G., Döbereiner, J. (1991).** Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* **77**, 67-72.
74. **Szarkowska, L. (1966).** The restoration of DPNH oxidase activity by coenzyme Q (ubiquinone). *Arch Biochem Biophys* **113**, 519-525.
75. **Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M.R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L.E. (2000).** Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple Plants. *Microb Ecol* **39**, 49-55.
76. **Thomas, P. E., Ryan, D., Levin, D. (1976).** An improved staining procedure for the detection of peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **75**, 168-176.

77. **Thöny-Meyer, L. (1997).** Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 337-376.
78. **Trumpower, B.L., (1990).** Cytochrome *bc*<sub>1</sub> complexes of microorganisms. *Microbiol Rev* **54**, 101-129.
79. **Wagner, A.M., Wagner, J.W. (1995).** Measurements of in vivo ubiquinone reduction levels in plant cells. *Plant Physiol* **108**, 277-283.
80. **Wainio, W. W. .** The Mammalian Mitochondrial Respiratory Chain. Molecular Biology Series; p. 66-76. Academic Press, New York and London, **1970**.
81. **Wan, Y., Folkers, K.** Methods in Enzymology . Coenzyme Q and analogs for coenzymic activity (Fleischer, S. and Packer, L., eds.). Vol. LIII, p. 591-599. Academic Press, New York, **1978**.
82. **White, D.** The physiology and biochemistry of prokaryotes. Oxford University Press. New York, 1995; p. 83-90.
83. **Work, T. S. and Work, E.** Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol 3, p.504-505, North Holland Publishing Company, 1962
84. **Yamada, M., Sumi, K., Matsushita, K., Adachi, O., Yamada, Y. (1993).** Topological analysis of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and its ubiquinone-binding site. *J Biol Chem* **268(17)**, 12812-12817.
85. **Yamada, Y. (2000)** Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek *et al.* 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch *et al.*

- 1998 to the genus *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 823-829.
86. **Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997).** The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci Biotech Biochem* **61**, 1244-1251.
87. **Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1998).** *Gluconacetobacter* corrig. (*Gluconoacetobacter* [sic]). In validation of publication of new names and new combination previously effectively published outside the IJSB. List No. 64. *Int J Syst Bacteriol*, **48**, 327-328.
88. **Yamada, Y., Kondo, K., (1984).** *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *J Gen Appl Microbiol* **30**, 297-303.