



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EL SISTEMA RESPIRATORIO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus*.
Naturaleza y función de las vías resistente y sensible a cianuro.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A:

BERNARDO GONZÁLEZ LÓPEZ



Tutor: DR. EDGARDO ESCAMILLA MARVÁN.

MÉXICO, D. F.

Mayo 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la asignación de la beca doctoral con número de registro 92297.

Agradezco al proyecto CONACyT 34300-N y al proyecto PAPIIT-UNAM IN204605 por el financiamiento para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros del comité Tutorial por los conocimientos y aportaciones a este proyecto:

Dr. José Edgardo Escamilla Marván.

Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo.

Dra. Marina Gavilanes Ruíz.

Agradezco a los miembros del jurado por los conocimientos y aportaciones a este proyecto:

Dra. Marieta Tuena Sangri.

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo.

Dra. Marina Gavilanes Ruiz.

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres.

Dr. Mario Soberón Chávez.

Dr. Salvador Uribe Carvajal.

Dr. Alejandro Sosa Peinado.

DEDICATORIA

A:

Todos los que participaron de forma directa e indirecta en la realización de este proyecto.

A mis padres en especial a ti Raquel, por la comprensión y el apoyo brindado.

A Gustavo, Sandra, Mauricio, Sergio, Alonso y Servando por su comprensión y amistad incondicional.

ÍNDICE

ABSTRACT

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

1

1.1	Los sistemas respiratorios bacterianos	1
1.1.1	Las deshidrogenasas.	1
1.1.2	Las quinonas	2
1.1.3	El complejo bc_1	2
1.1.4	Citocromos c	2
1.1.5	Oxidasas terminales	3
1.2	Fosforilación oxidativa.	4
1.3	Control respiratorio.	5
1.4	Cadenas respiratorias simultáneas.	5
1.5	Radicales libres y cadena respiratoria.	6

II. ANTECEDENTES

7

2.1	Las bacterias del ácido acético	7
2.1.1	Sistema de deshidrogenasas	8
2.1.1.2	La alcohol deshidrogenasa III.	9
2.1.1.3	La aldehído deshidrogenasa	9
2.1.1.4	La glucosa deshidrogenasa	9
2.1.1.5	La gluconato deshidrogenasa	10
2.2.	Oxidasas terminales.	10
2.3	<i>Gluconobacter suboxydans</i> .	10
2.3.1.	La cadena respiratoria y el KCN.	11
2.4	<i>Acetobacter aceti</i>	12
2.5	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	12
2.6	Protección respiratoria.	15
2.6.1	<i>Azotobacter vinelandii</i> .	15
2.7	Las oxidasas terminales de <i>Ga. diazotrophicus</i>.	16

III. HIPÓTESIS.	18
IV. OBJETIVOS.	18
V. MATERIAL Y MÉTODOS	19
5.1 Material biológico.	19
5.1.1 Mantenimiento del microorganismo.	19
5.1.2 Cultivo masivo.	19
5.2 Ruptura celular y preparación de membranas.	20
5.3 Análisis espectral de citocromos.	20
5.4 Actividades respiratorias	21
5.4.1 Oxidasas.	21
5.4.2 Deshidrogenasas.	22
5.5 Análisis de los grupos hemo por HPLC-PR.	22
5.6 Fotoinactivación de membranas con luz UV _{360nm} .	23
5.7 Extracción de quinona con n-pentano.	23
5.8 Purificación parcial de las oxidasas terminales.	23
VI.RESULTADOS.	25
6.1 Quinona.	25
6.1.1 Papel en la cadena respiratoria.	26
6.1.1.2 Efecto de la fotoirradiación sobre las actividades de deshidrogenasas.	28
6.1.1.3Reconstitución de la actividad de oxidasa.	29
6.2 NADH deshidrogenasa.	31
6.3 Respiración resistente a KCN.	32
6.4 La respiración resistente a KCN y el Citocromo <i>c553</i> .	33
6.5 Oxidasas terminales.	36
6.5.1Citocromos reactivos con CO y fotodisociación de aductos.	37
6.5.2 Efecto del KCN sobre el nivel de oxidación de los Citocromos de la cadena respiratoria.	39
6.5.3Efecto hipercrómico inducido por KCN.	43

6.6 Purificación parcial de oxidasas.	44
6.6.1 Citocromo <i>bb</i> ₃ sensible a KCN.	45
6.6.2 Citocromo <i>ba</i> ₃ resistente a KCN.	47
6.7 Protección respiratoria.	48
6.7.1 Enzimas sometidas a control respiratorio.	49
6.7.1.1 Inhibición diferencial de Citocromo <i>bb</i> ₃ y Citocromo <i>ba</i> ₃	49
6.7.1.2 Citocromo <i>ba</i> ₃ y el efecto del desacoplante CCCP.	50
6.7.1.3 Citocromo <i>bb</i> ₃ y el efecto del desacoplante CCCP.	53
VII. DISCUSIÓN	54
7.1 Quinona.	54
7.2 NADH deshidrogenasa.	56
7.3 Respiración resistente a KCN.	57
7.4 La SII-ADH y la respiración resistente a KCN.	58
7.5 Oxidasas terminales.	58
7.6 Separación cromatográfica de Citocromo <i>bb</i> ₃ y Citocromo <i>ba</i> ₃ .	61
7.7 Control respiratorio.	62
7.8 Protección respiratoria.	64
VII. CONCLUSIONES	66
IX. BIBLIOGRAFÍA.	71

ABREVIATURAS

KCN	Cianuro de Potasio.
ATP	Adenosina trifosfato.
Q	Quinona.
Q _n	Quinona, n=número de unidades de isopreno.
MQ	Menaquinona
TMPD	Azul de Wuster's.
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal.
G-C	Guanina-citocina.
GDH	Glucosa deshidrogenasa.
ALDH	Aldehído deshidrogenasa.
NADH	Dinucleótido de niacina y adenina.
NDH-1	NADH deshidrogenasa tipo 1.
GLDH	Glicerol deshidrogenasa.
PQQ	Pirrolo quinolina quinona.
EMP	Emden Meyerhoff Parnas.

EP	Etner Doudoroff.
P:0 DCPIP	ATP sintetizado por Oxígeno consumido. 2,6- diclorofenol indofenol.
PMS	Metasulfato de fenazina.
NanoAt O ₂	Nano átomo gramo de oxígeno.
rpm	Revoluciones por minuto.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
CO	Monóxido de carbono.
UV ₃₆₀	Luz ultravioleta de 360 nm.
CCCP	Carbonilcianuro de p-trifluorometoxifenilhidrazona.

ABSTRACT.

In highly aerobic environments, *Gluconacetobacter diazotrophicus* uses a respiratory protection mechanism to preserve nitrogenase activity from deleterious oxygen. Here the respiratory system was examined in order to ascertain the nature of the respiratory components, mainly of the cyanide sensitive and resistant pathways. The membranes of *Ga. diazotrophicus* contain Q₁₀, Q₉ and PQQ in a 13:1:6.6 molar ratios. UV_{360nm} photoinactivation indicated that ubiquinone is the electron acceptor for the dehydrogenases of the outer and inner faces of the membrane. Strong inhibition by rotenone and capsaicin and resistance to flavone indicated that NADH-quinone oxidoreductase is a NDH-1 type enzyme. KCN-titration revealed the presence of at least two terminal oxidases that were highly sensitive and resistant to the inhibitor. Tetraclhorohydroquinol was preferentially oxidized by the KCN-sensitive oxidase. Neither the quinoprotein alcohol dehydrogenase nor its associated cytochromes *c* were instrumental components of the cyanide resistant pathway. CO-difference spectrum and photodissociation of heme-CO compounds suggested the presence of cytochrome *b*-CO and *a*₁-CO adducts. Air-oxidation of cytochrome *b* (432nm) was arrested by concentrations of KCN lower than 25 μM while cytochrome *a*₁ (442nm) was not affected. A KCN-sensitive (*I*₅₀=5 μM) cytochrome *bb*₃ and a KCN-resistant (*I*₅₀=450 μM) cytochrome *ba*₃ quinol oxidases were separated by ion exchange chromatography. Finally, preliminary assay of uncouplers like-CCCP suggested that cytochrome *bb*₃ is uncoupled and cytochrome *ba*₃ coupled to vectorial proton transport.

RESUMEN

Gluconacetobacter diazotrophicus es una bacteria del ácido acético capaz de fijar nitrógeno a elevadas tensiones de oxígeno, gracias a la protección respiratoria. En estas condiciones se investigó la naturaleza y función de las vías respiratorias resistente y sensible a KCN y se sugieren los componentes respiratorios de la protección respiratoria.

Las membranas de *Ga. diazotrophicus* contienen Q_{10} , Q_9 y PQQ en una relación molar de 13:1:6:6. Fotoinactivación con luz UV360 indicó que Q_{10} es el aceptor de electrones para las deshidrogenasas orientadas al interior y exterior membranal.

La inhibición potente con rotenona y la resistencia a flavona indican la presencia de una NDH-1 acoplada al bombeo de protones.

Las curvas de titulación con KCN indican la presencia de por lo menos dos cadenas respiratorias, una resistente y otra sensible a KCN. En las cuales GDH, ADH, ALDH y NADH deshidrogenasas participan de forma similar en ambas, por lo que la principal diferencia se da a nivel de oxidasa terminal. Ni citocromo *c*, ni la subunidad II de la ADH participan en la respiración resistente a KCN.

Espectros diferenciales con CO indican la presencia de aductos con hemo de alto espín A y O. La oxidación por aire de Cyt *b432* fue inhibida por concentraciones de KCN menores a 25 μ M, mientras que la oxidación de Cyt *a444* solo fue inhibida a concentraciones mayores a 200 μ M de KCN.

La purificación parcial de oxidasas por cromatografía de intercambio aniónico separó a una ubiquinol oxidasa terminal sensible a KCN ($I_{50}=5 \mu$ M) y una ubiquinol oxidasa terminal resistente a KCN ($I_{50}=450 \mu$ M).

Experimentos preliminares con desacoplantes (CCCP y FCCP), sugieren que Cyt *bb₃* y Cyt *ba3* están desacopladas y acopladas al bombeo de protones respectivamente.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Los sistemas respiratorios bacterianos.

Las bacterias son capaces de oxidar una amplia variedad de sustratos. Para cada sustrato existe una deshidrogenasa membranal específica que transfiere 2 electrones a una poza de quinona.

A partir de la quinona el sistema se ramifica en múltiples componentes citocrómicos que conducen los electrones hasta la enzima encargada de llevar a cabo la reducción de oxígeno a agua, la oxidasa terminal. Estas enzimas pueden dividirse en dos grupos:

- a) Las quinol oxidasas que reciben sus electrones directamente de un quinol.
- b) Las citocromo *c* oxidasas que reciben sus electrones a través de una vía más larga que incluye al citocromo *bc₁* y un citocromo *c* soluble.

El flujo de electrones a través de los componentes respiratorios en algunas ocasiones se acopla al bombeo de protones, el potencial de protones generado es consumido por la H^+ -ATPasa, para llevar a cabo la síntesis de ATP.

1.1.1 Las deshidrogenasas.

Las deshidrogenasas primarias asociadas a sistemas respiratorios bacterianos constituyen un grupo muy diverso, capaz de oxidar, en su conjunto, decenas de sustratos, con o sin la mediación de NADH. La mayoría de las deshidrogenasas convergen en una quinona, la cual utilizan como aceptor de electrones. Se presentan como un número variable de deshidrogenasas que se expresan de acuerdo a los sustratos disponibles en el medio ambiente.

1.1.2 Las quinonas

Las quinonas respiratorias bacterianas se clasifican en:

- a) Ubiquinona (Q). También llamada CoQ, es una benzoquinona que contiene unidades de isopreno como cadena lateral de longitud variable. La cadena isoprenoide ha sido utilizada como perfil para la quimiotaxonomía, esto debido a la diversidad de estructuras y a la facilidad para su identificación y caracterización (Collins 1981). Este criterio ha sido aplicado a las bacterias del

ácido acético para diferenciar los géneros que las constituyen (Yamada 1997).

b) Menaquinona (MQ). Son naftoquinonas que comprenden a las menaquinonas (MQ) y a las dimetilmenaquinonas (DMK). Contiene unidades de isopreno como cadenas laterales de longitud variable. Al ser las menaquinonas estructuralmente más complejas que las ubiquinonas son de mayor utilidad en la quimiotaxonomía (Collins 1981).

1.1.3 El complejo bc_1

Complejo bc_1 . Oxida quinol y reduce metaloproteínas, usualmente citocromos de tipo c solubles. Es una proteína integral de membrana formada por tres subunidades, que constituyen la unidad funcional mínima capaz de llevar a cabo el bombeo de protones.

1.1.4 Citocromos c

Los citocromos c libres son de bajo peso molecular que actúan como acarreadores móviles entre el complejo bc_1 y la oxidasa terminal.

1.1.5 Oxidasas terminales

Enzimas que catalizan la reducción de oxígeno a agua. Se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo al donador de electrones. Si es el ubiquinol se denominan ubiquinol oxidasa y si es el citocromo c se llaman citocromo c oxidasa. Además con base a perfiles estructurales y funcionales se clasifican en:

- a) La superfamilia de las oxidasa terminales hemo-cobre, que contiene tanto ubiquinol oxidasa así como citocromo c oxidasa, se caracterizan por contener un centro bimetálico Fe:Cu en su sitio activo.
- b) Oxidasa d . Sólo contiene ubiquinol oxidasa y no bombean protones, presenta un centro bimetálico integrado por citocromo b_{595} y citocromo d .

Las oxidasa terminales de la superfamilia hemo-cobre son proteínas transmembranales formadas por al menos 3 subunidades (García-Horsman *et al* 1994). La subunidad I contiene doce segmentos transmembranales y los sitios de enlace al hemo de bajo spin, H102, H421; al hemo de alto spin, H419 y sitios de unión al cobre A, H284, H288, H333 y H334.

Los centros metálicos se encuentran cerca del lado periplásmico,

favoreciendo la captación de O_2 . Los dos hemos son ligados a residuos en lados opuestos de la hélice X, a la misma profundidad de la membrana, facilitando la transferencia de electrones.

La hélice VIII es anfipática y los residuos polares dentro de ésta son importantes para facilitar la translocación de protones del citoplasma al centro bimetálico. Mutaciones en las hélices II y III causan desacoplamiento en la transferencia de electrones y el bombeo de protones. Las hélices IX y X forman parte de una cubierta sobre los tres centros bimetálicos (Hosler et al 1993).

La subunidad II contiene el sitio de interacción al Cu_A con una sola hélice transmembranal y la región de unión al citocromo *c* (E126, E128, D193, E218), altamente conservada en citocromo *c* oxidasas pero no en ubiquinol oxidasas aunque mantienen similitud topológica (Hosler et al 1993).

La subunidad III tiene 7 segmentos transmembranales, sin sitios de unión a centros metálicos y solo sirve de enlace a las otras dos subunidades (Hosler et al 1993).

Morgan en 1994 planteó un modelo para la translocación de protones, el ciclo de la histidina, postulando un papel mecanístico directo en el bombeo de protones, del oxígeno y de sus diversos radicales originados en el centro bimetálico (Morgan et al 1994).

Sobre los complejos respiratorios acoplados al bombeo de protones se ejerce un control respiratorio (Nicholls & Butko 1993).

Citocromo *bd* es una ubiquinol oxidasa integrada por dos proteínas integrales de membrana, la subunidad I contiene 7 hélices transmembranales, el sitio de oxidación del quinol y a citocromo b_{558} , la subunidad II está integrada por 8 hélices transmembranales en donde se encuentran el sitio de oxidación a TMPD, los residuos de aminoácidos involucrados en la unión a citocromo b_{595} y citocromo *d*, integrando estos dos últimos, el sitio catalítico. Esta oxidasa participa en la formación del potencial de membrana pero no bombea protones (Borisov 1996).

1.2 Fosforilación oxidativa.

El transporte de electrones en la cadena respiratoria en algunas ocasiones esta acoplado al transporte de protones (H^+) del citoplasma bacteriano hacia el exterior, generándose una diferencia de potencial electroquímico para los protones (Fuerza protón-motriz p). La fuerza protón-motriz empuja los protones de regreso al

citoplasma a través de la ATP-sintasa, resultando en la síntesis de ATP (Brand *et al* 1994).

La fosforilación oxidativa es la síntesis de ATP asociado a la membrana citoplasmática a partir de ATP, fosfato inorgánico y p .

1.3 Control Respiratorio

El factor que controla la velocidad de la respiración es el grado de desequilibrio entre el potencial redox desarrollado en las regiones transportadoras de H^+ de la cadena respiratoria y p . Entonces todas las reacciones que disminuyan p (por ejemplo: síntesis de ATP) estimularán la velocidad de la respiración.

La regulación de la velocidad de la fosforilación oxidativa por el nivel de ADP se denomina control respiratorio (Brand *et al* 1994).

1.4 Cadenas respiratorias simultáneas

La presencia de diversas rutas de transferencia de electrones al oxígeno permite el aprovechamiento de los diversos donadores y aceptores de electrones presentes en el medio y el ajuste de la eficiencia en la transducción de energía de acuerdo a las necesidades fisiológicas de la bacteria. Para esto es necesario regular la distribución del flujo de electrones entre las múltiples cadenas respiratorias, la distribución de electrones entre las diversas cadenas respiratorias depende de las propiedades cinéticas y del estado redox de los integrantes de la cadena respiratoria.

En *Paracoccus denitrificans* se presentan 3 oxidasas terminales:

1. Citocromo *cbb₃*. Es una citocromo *c* oxidasa con alta afinidad por oxígeno que se expresa a bajas presiones de oxígeno.
2. Citocromo *aa₃*. Es una citocromo *c* oxidasa con baja afinidad por oxígeno se expresa a concentraciones elevadas de oxígeno.
3. Citocromo *ba₃*. Es una ubiquinol oxidasa que se activa cuando el nivel de reducción de la poza de quinona aumenta, actuando como disipador de poder reductor (De Gier *et al* 1994).

Es importante resaltar que no necesariamente se utiliza la cadena respiratoria con la relación H^+/e^- más alta, aunque la función primaria sea la generación de un gradiente protón-motriz, también es necesaria la eliminación del exceso de poder reductor ó disminución de la tensión de oxígeno (García-Horsman *et al* 1994).

1.3 Radicales libres y cadena respiratoria.

Para que la respiración asociada a la fosforilación oxidativa se lleve a cabo a gran velocidad, se requiere ADP. Cuando el consumo de energía es bajo, la concentración de ADP disminuye, así que, la respiración disminuye su velocidad, resultando en el aumento en la concentración intracelular de oxígeno y un incremento en el nivel de reducción de la cadena respiratoria, que potencialmente puede llevar a la generación de especies tóxicas del oxígeno, como superóxido y H_2O_2 , aumentando el daño oxidativo a componentes celulares.

Las bacterias presentan diversos mecanismos para el control en la producción de radicales libres (Skulachev 1996).

- 1) Enzimático. Síntesis de enzimas encargadas de eliminar superóxido y agua oxigenada como la superóxido dismutasa y la catalasa.
- 2) Química. Producción de antioxidantes (como tocoferoles, carotenoides, ácido ascórbico, tioles) que interrumpen la reacción de generación de radicales libres.
- 3) Respiratorio. Abatimiento de la concentración de oxígeno y disminución del nivel de reducción de la cadena respiratoria.

II. Antecedentes

2.1 Las bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético son aerobios estrictos Gram-negativos, capaces de llevar a cabo la oxidación incompleta del etanol (y otros alcoholes) acumulando en el medio grandes cantidades de ácido acético provocando así, la acidificación del medio a valores de pH que pueden ser menores que 3.0. Oxidan, también, de manera incompleta, una diversidad de azúcares, principalmente glucosa, cuyos ácidos resultantes también acidifican el medio, son bacterias oxidasa-negativa (no oxidan el azul de Wurtz) y no reducen NO_3^- . Son incapaces de metabolizar proteínas o de hidrolizar lactosa o almidón (Swings 1992).

Se encuentran clasificadas con base a secuencias parciales del RNAr *16s* en cuatro géneros dentro de la familia *Acetobacteriaceae* (Yamada *et al* 1997).

Acetobacter. Son móviles por flagelación peritrica, o aflageladas inmóviles, Q_9 es la quinona principal en membranas, y tienen un contenido de G-C del 53-63 %. Como cepas tipo tenemos a *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*.

Gluconobacter. Son móviles por flagelación polar o aflageladas inmóviles, Q_{10} es la quinona principal en membranas y su contenido G-C es del 54-63 %. Presentan a *Gluconobacter oxydans* y *Gluconobacter cerinus* como sus cepas tipo.

Gluconacetobacter. Inmóvil o móvil por flagelos peritricos, Q_{10} es su quinona principal, y su contenido G-C es del 55- 66%. *Gluconacetobacter liquefaciens* es su cepa tipo.

Acidomonas. Capaz de utilizar metanol como fuente de energía y carbono, inmóviles, Q_{10} como quinona principal, con 63-66% de G-C. La cepa tipo es *Acidomonas methanolica*.

2.1.1 Sistema de deshidrogenasas

Las bacterias del ácido acético son capaces de oxidar un amplio rango de azúcares y alcoholes, dichas reacciones están asociadas a la cadena respiratoria y se llevan a cabo a una gran velocidad provocando la acumulación de gran cantidad de ácidos resultantes (Stanier *et al* 1986). Las bacterias del ácido acético son capaces de oxidar un amplio rango de azúcares y alcoholes, dichas reacciones están asociadas a la cadena respiratoria y se llevan a cabo a una gran velocidad provocando la acumulación de gran cantidad de ácidos resultantes (Stanier *et al* 1986).

La oxidación la realiza un conjunto de deshidrogenasas que se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática con su sitio activo orientado hacia el periplasma, como la glucosa deshidrogenasa (GDH), alcohol deshidrogenasa (ADH), aldehído deshidrogenasa (ALDH). En cambio, la NADH deshidrogenasa (NADH-DH) y succinato deshidrogenasa (SDH) tienen su sitio catalítico orientado hacia el citoplasma; además se han reportado otras deshidrogenasas solubles, como la metanol deshidrogenasa (Matsushita *et al* 1994).

Las deshidrogenasas se pueden clasificar de acuerdo a su grupo prostético (Matsushita *et al* 2001):

- 1). Flavoproteínas. Tienen como grupo prostético a una flavina como el FMN o el FAD, tal y como sucede en la NADH-DH y la SDH, respectivamente.
- 2). Quinoproteínas. El grupo prostético presente es una *orto*-quinona como la pirrolo quinolina quinona (PQQ), entre ellas tenemos a la glucosa deshidrogenasa (GDH) y glicerol deshidrogenasa (GLDH), entre otras.
- 3). Quinohemoproteínas. Además de PQQ, también poseen uno o varios citocromos *c* como grupos prostéticos, como ejemplos tenemos a alcohol deshidrogenasa (ADH) tipo III y aldehído deshidrogenasa (ALDH, Matsushita *et al* 2001).

La gran mayoría de las deshidrogenasas primarias involucradas en los sistemas que oxidan alcoholes y azúcares están embebidas en la membrana citoplasmática con su sitio activo orientado hacia el periplasma (Matsushita *et al* 1994).

2.1.1.2 La alcohol deshidrogenasa III

Consisten de 2 a 3 subunidades distintas, la subunidad I de 78-80 kDa tiene como grupos prostéticos a PQQ y citocromo *c*, la subunidad II de 48-53 kDa, contiene 3 citocromos *c* y el sitio de reducción de la quinona y la subunidad III de 14-17 kDa, cuya función es desconocida. La enzima oxida alcoholes alifáticos primarios (C₂-C₆). No oxida metanol (Gomez-Manzo *et al* 2007, Ameyama *et al* 1981).

2.1.1.3 La aldehído deshidrogenasa

Es un heterodímero, la subunidad I de 75-86 kDa que contiene el sitio activo y

el PQQ como grupo prostético, la subunidad II de 45-55 kDa, presentando el sitio de oxidación de la quinona y al citocromo *c* como grupo prostético. Esta enzima es clave en la producción de vinagre y es capaz de oxidar un amplio rango de aldehídos alifáticos, excepto formaldehído (Adachi *et al* 1980, Gómez Manzo *et al* 2007).

2.1.1.4 La glucosa deshidrogenasa

Es una quinoproteína monomérica de 87 kDa, PQQ es su grupo prostético, y oxida la glucosa para producir ácido glucónico (Ameyama *et al* 1981).

2.1.1.5 D-gluconato deshidrogenasa

Es un heterotrímero, que cataliza la oxidación de D-gluconato a 2-cetogluconato, la subunidad I de 64 kDa con FAD unido covalentemente, la subunidad II de 45 kDa con citocromo *c* como grupo prostético y la subunidad III de 21 kDa (Shinagawa *et al* 1984).

2.2.OxidasaS terminales

En la familia *Acetobacteriaceae* sólo se han reportado ubiquinol oxidasaS y únicamente benzoquinonaS del tipo Q₁₀ y Q₉ como mediadoraS entre deshidrogenasaS y oxidasaS terminales. Entre las ubiquinol oxidasaS reportadaS se presentan Citocromo *bo*₃, Citocromo *ba*₃ y Citocromo *bd* (Matsushita *et al* 1994). Aunque en *Acidomonas methanolica* (*Acetobacter methanolicus*) se ha reportado una oxidasa tipo *co* la cual es reducida por dos citocromos *c* (*c_L* y *c_H*), estos no son reducidos por el complejo *bc₁*, sino por la metanol deshidrogenasa (Matsushita *et al* 1994).

2.3. *Gluconobacter suboxydans*.

Se han detectado en membranaS actividadeS de oxidasa para D-glucosa, D-gluconato, glicerol, D-sorbitol, etanol, acetaldehído y lactato. TodaS deshidrogenasaS donan electrones a una poza de Q₁₀, el quinol generado es oxidado por Citocromo *bo*₃, que fue identificada como una oxidasa sensible a KCN (Ameyama *et al* 1987, Matsushita *et al* 1994). Pero el quinol además puede ser oxidado por una oxidasa resistente a KCN cuya naturaleza no ha sido definida. De acuerdo con Matsushita (Matsushita *et al* 1991,1994) la subunidad II de la alcohol

deshidrogenasa (Citocromo c_{553}) actuaría como intermediario en el transporte de electrones hacia la oxidasa terminal resistente a KCN.

Se han reportado en las bacterias del ácido acético únicamente ubiquinol oxidasas, por lo que, los citocromo c presentes son de bajo potencial y forman parte estructural del sistema de deshidrogenasas, como el citocromo c_{553} de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y el citocromo c_{551} de la aldehído deshidrogenasa (ALDH).

2.3.1 La cadena respiratoria y el KCN.

La respiración resistente a KCN está relacionada positivamente a la expresión de citocromo c_{553} (SII de la ADH), situación que es favorecida por ciertas condiciones de crecimiento, como el cultivo a pH 3 constante o con etanol como única fuente de carbono (Matsushita *et al* 1989).

La extracción de citocromo c_{553} con tritón X-100 0.2%, provoca la pérdida de la respiración resistente a KCN (Ameyama *et al* 1987). Además una cepa conocida como *G. suboxydans*, presenta bajos niveles de expresión de citocromo c , nula presencia de citocromo c_{553} , (la subunidad II de la ADH) y es incapaz de oxidar etanol a pesar de oxidar azúcares y polialcoholes, presentando una respiración sensible a KCN (Matsushita *et al* 1991).

El papel estructural de la SII-ADH (Citocromo c_{553}) se ha evidenciado en *G. suboxydans* por:

- 1.) Reconstitución *in situ*. La alcohol deshidrogenasa ó SII de *G. suboxydans* se ha integrado en membranas de *G. suboxydans*. La reintegración de ambas opciones provoca el restablecimiento de la respiración KCN-resistente y una actividad de etanol oxidasa vigorosa (Matsushita *et al* 1991).
- 2.) Complementación genética. El gen que codifica para Citocromo c_{553} complementa el fenotipo de *G. suboxydans*, presentando el fenotipo silvestre, niveles de Citocromo c_{553} normales, actividad de etanol oxidasa vigorosa y recuperación de la respiración resistente a KCN (Takeda *et al* 1991, 1992a, 1992b).

La alcohol deshidrogenasa III está integrada por tres subunidades, la subunidad I contiene PQQ, 1 Citocromo c (c_{II}) y el sitio de oxidación del etanol, la subunidad II contiene 3 Citocromos c (c_{II_1} , c_{II_2} , c_{II_3}) y el sitio de reducción de la quinona. La subunidad III parece no tener grupo prostético, ni función conocida (Gomez-Manzo *et al* 2007, Toyama *et al* 2004, Matsushita *et al* 1996).

La transferencia intramolecular de electrones implica la transferencia de

II. Antecedentes

2.1 Las bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético son aerobios estrictos Gram-negativos, capaces de llevar a cabo la oxidación incompleta del etanol (y otros alcoholes) acumulando en el medio grandes cantidades de ácido acético provocando así, la acidificación del medio a valores de pH que pueden ser menores que 3.0. Oxidan, también, de manera incompleta, una diversidad de azúcares, principalmente glucosa, cuyos ácidos resultantes también acidifican el medio, son bacterias oxidasa-negativa (no oxidan el azul de Wurtz) y no reducen NO_3^- . Son incapaces de metabolizar proteínas o de hidrolizar lactosa o almidón (Swings 1992).

Se encuentran clasificadas con base a secuencias parciales del RNAr *16s* en cuatro géneros dentro de la familia *Acetobacteriaceae* (Yamada *et al* 1997).

Acetobacter. Son móviles por flagelación peritrica, o aflageladas inmóviles, Q_9 es la quinona principal en membranas, y tienen un contenido de G-C del 53-63 %. Como cepas tipo tenemos a *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*.

Gluconobacter. Son móviles por flagelación polar o aflageladas inmóviles, Q_{10} es la quinona principal en membranas y su contenido G-C es del 54-63 %. Presentan a *Gluconobacter oxydans* y *Gluconobacter cerinus* como sus cepas tipo.

Gluconacetobacter. Inmóvil o móvil por flagelos peritricos, Q_{10} es su quinona principal, y su contenido G-C es del 55- 66%. *Gluconacetobacter liquefaciens* es su cepa tipo.

Acidomonas. Capaz de utilizar metanol como fuente de energía y carbono, inmóviles, Q_{10} como quinona principal, con 63-66% de G-C. La cepa tipo es *Acidomonas methanolica*.

2.1.1 Sistema de deshidrogenasas

Las bacterias del ácido acético son capaces de oxidar un amplio rango de azúcares y alcoholes, dichas reacciones están asociadas a la cadena respiratoria y se llevan a cabo a una gran velocidad provocando la acumulación de gran cantidad de ácidos resultantes (Stanier *et al* 1986).

electrones del etanol a PQQ, produciendo acetaldehído y PQQred que transfiere electrones al cI , en un segundo paso se transfieren electrones a cII_1 , entonces a cII_2 y de ahí al sitio de reducción de la quinona (Matsushita *et al* 1996).

Se ha sugerido que cII_3 pudiera no estar involucrado en la transferencia de electrones intramolecular de PQQ a Q_{10} sino que su función es la transferencia no fisiológica de electrones a ferricianuro y posiblemente actúe como donador de electrones para la vía resistente a KCN (Frebortova *et al* 1998).

2.4 Acetobacter aceti

Presenta actividades vigorosas de oxidasa para D-glucosa, etanol, acetaldehído y lactato. A diferencia de *G. suboxydans* no presenta actividad de oxidasa para glicerol, sorbitol o gluconato. Este conjunto de deshidrogenasas están embebidas en la membrana plasmática, con su sitio activo orientado al periplasma, donando electrones exclusivamente a Q_9 , la cuál es oxidada por 2 oxidasas terminales, citocromo ba_3 y citocromo bo_3 , ambas sensibles a KCN. Al parecer se trata de la misma enzima con hemos diferentes. En cultivo agitado la enzima se ensambla ba_3 y en cultivo estático bo_3 (Matsushita *et al* 1992).

2.5 Gluconacetobacter diazotrophicus

Gluconacetobacter diazotrophicus es un bacilo Gram-negativo, móvil por la presencia de flagelos peritricos, capaz de usar como fuente de carbono única a la glucosa, arabinosa, manosa, inositol, manitol, glicerol, fructosa o etanol (Cavalcante *et al* 1988). Es tolerante a altas concentraciones de azúcar, siendo el óptimo, 10% de glucosa o de sacarosa, pero puede crecer con glucosa hasta una concentración del 30 % (sacarotolerante, Stephan *et al* 1991).

Originalmente se le aisló como endófito de la caña de azúcar donde es muy posible que actúe como diazótrofo, (Sevilla *et al* 1998) hasta la fecha no se le ha podido aislar del suelo. En tanto que su actividad diazótrofa *in planta* no ha sido inequívocamente confirmada, esta actividad es claramente demostrable en cultivo, donde requiere de un ambiente plenamente aerobio para la fijación óptima de N_2 (Flores-Encarnación *et al* 1999).

El metabolismo de la glucosa se da exclusivamente por la vía colateral de las hexosas-fosfato, ya que las enzimas clave de las rutas de Embden Meyerhoff Parnas (EMP) y Etner Doudoroff (ED) no han sido detectadas (Attwood, 1991). El ciclo de los ácidos tricarboxílicos completa la oxidación de la glucosa para producir CO_2 . La entrada de glucosa a la célula se da preferentemente en forma de

gluconato.

Los rendimientos de biomasa de *G. diazotrophicus* son bajos, debido a su alta tasa de mantenimiento (1mmol de glucosa/h. *g. de peso seco) y su baja eficiencia en la asimilación de biomasa (0.235 mol de carbono-biomasa/mol de ATP, Luna *et al* 2000). Gracias a la expresión de cadenas respiratorias ramificadas integradas por componentes parcialmente acoplados o desacoplados al bombeo de protones, este diazótrofo presenta diversos grados de acoplamiento. Así por ejemplo, si hay una fuente simple de nitrógeno como el NH_4^+ , la oxidación de glucosa se da con baja eficiencia (P:O=0.58), siendo el fin metabólico el consumir cantidades importantes de glucosa y acidificar el medio para eliminar la competencia nutricional de otros microorganismos. Si no se presenta fuente de nitrógeno, entonces sólo se competirá con otros diazótrofos y se favorece una cadena respiratoria mas eficiente (P:O = 0.78) siendo ahora la principal función el aporte de ATP para la fijación biológica del nitrógeno (Luna *et al* 2000).

La actividad respiratoria (tasa respiratoria en cultivo) de esta bacteria es muy alta en condiciones de fijación de nitrógeno, entre 10 y 20 veces mayor que en otras bacterias aerobias, no diazótrofes, investigadas y similar a la tasa respiratoria de *Azotobacter vinelandii*, diazótrofo aerobio de vida libre (Flores-Encarnación *et al* 1999, D'mello *et al* 1996). La capacidad para fijar nitrógeno fue directamente proporcional a la tensión de oxígeno en el cultivo (Flores-Encarnación *et al* 1999) y esto se explica por la gran cantidad de ATP que se va a invertir en la fijación de N_2 y que tiene que ser proporcionada por la fosforilación oxidativa. Así, la enorme tasa respiratoria de esta bacteria tiene el doble propósito de activar la fosforilación oxidativa y, al mismo tiempo, abatir la concentración de oxígeno disuelto hasta niveles permisibles para que la nitrogenasa pueda funcionar (protección respiratoria de la nitrogenasa, Bertsova *et al* 1998; Flores-Encarnación *et al* 1999).

Las enzimas con mayor nivel de expresión en condiciones de fijación de nitrógeno, 3 a 4 veces con respecto al crecimiento no-diazótrofo, fueron: la GDH y el citocromo ba_3 . La NADH-DH y la ALDH presentan una actividad importante y ADH, succinato deshidrogenasa (SDH) y gluconato deshidrogenasa (GADH) fueron menos activas (Flores-Encarnación *et al* 1999).

Aunque los niveles de citocromo *c* en membranas son altos, se ha demostrado únicamente la presencia de oxidasas tipo ubiquinol oxidasa (Flores-Encarnación *et al* 1999, Matsushita *et al* 1994); entonces, los citocromos *c* de 67, 56, 52 y 45 kDa reportados son citocromos de tipo-*c* de bajo potencial y son componentes estructurales de la ADH, ALDH y otras hemoproteínas respiratorias no caracterizadas, por su correspondencia en el peso molecular.

La inhibición por amonio (40mM) de la actividad diazótropa en cultivos, bien aireados, afecta negativamente la actividad respiratoria y los niveles de expresión de la glucosa deshidrogenasa (GDH) y citocromo *ba*₃, disminuyen de 7-10 veces, siendo ahora la oxidasa dominante otra ubiquinol oxidasa citocromo *bd*. (Flores Encarnación *et al* 1999).

2.6 Protección respiratoria.

La fijación biológica del nitrógeno es inhibida a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional por concentraciones elevadas de oxígeno. La tensión de oxígeno cobra mayor importancia en la actividad diazótropa llevada a cabo en vida libre o en cultivo, donde no existen barreras que afecten la difusión libre del oxígeno. Para contender con este problema algunos diazótrofos de vida libre del genero *Azotobacter*, expresan un sistema respiratorio muy activo, integrado por componentes desacoplados que le permiten mantener niveles de oxígeno permisibles para la actividad de la nitrogenasa y disminuir el nivel redox de la cadena respiratoria, mecanismo conocido como protección respiratoria (Drozd *et al* 1970)

Además de cumplir con esta función, también se deben de satisfacer los requerimientos de ATP para la fijación de N₂ (16 ATP /mol N₂ fijado), esto se logra por componentes respiratorios capaces de bombear protones. Así, la manifestación simultanea de los diversos componentes respiratorios, permite llevar a cabo la fijación en un amplio rango de tensión de oxígeno (Kuhla *et al* 1988).

2.6.1 *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es un diazótrofo aerobio de vida libre. Presenta un conjunto de deshidrogenasas para malato, succinato y NADH que alimentan una poza común de Q₈, generando ubiquinol, que es oxidado por 2 quinol oxidasas citocromo *bo*₃ y citocromo *bd*.

Se han identificado dos tipos de NADH deshidrogenasas en *Azotobacter vinelandii*. La NDH-1 una enzima multimérica (14 subunidades), que tiene como grupos prostéticos a FMN, Fe-S. Es una proteína integral de membrana capaz del traslado vectorial de protones y sensible a rotenona y capsaicina.. La NDH 2 es una proteína monomérica que tiene al FAD como grupo prostético, Es una proteína periférica de membrana que funciona de manera desacoplada y es sensible a flavona (Bertsova *et al* 1997).

Azotobacter vinelandii posee al menos dos cadenas respiratorias, una de ellas funciona acoplada y muestra un cociente $H^+ / e^- = 5$; integrada por NDH-1 y Citocromo *bo*₃ y otra que funciona en forma desacoplada; formada por NDH-2 y Citocromo *bd* con un cociente $H^+ / e^- = 1$ (Bertsova *et al* 1997. 1998).

La importancia de la vía desacoplada en la fijación de N₂ está apoyada por evidencias genéticas, ya que un mutante citocromo *bd* *bo* es incapaz de fijar nitrógeno a elevadas tensiones de oxígeno, (Kelly *et al* 1990) sin embargo, el mutante citocromo *bd*, citocromo *bo* presenta actividad diazótrofa a concentraciones elevadas de oxígeno (Mc Inerney *et al* 1984).

2.7 Las oxidasas terminales de *Ga. diazotrophicus*

La curva de titulación con KCN de la respiración dependiente de glucosa en membranas de *Ga. diazotrophicus* muestra la presencia de al menos dos oxidasas terminales, una resistente a concentraciones de KCN mayores a 100 M y otra sensible que se inhibe a concentraciones menores a 10 M. Cada tipo de respiración contribuye con aproximadamente el 50% de la respiración celular. Basados en diversas técnicas espectroscópicas, nuestro laboratorio identificó la presencia de citocromo *ba*₃ como la única oxidasa detectable en membranas de células crecidas bajo condiciones de fijación de N₂. Se propuso que esta oxidasa podría ser la enzima terminal de la vía sensible a KCN, esto en analogía con propuestas previas en *A. aceti* (Flores-Encarnación 1999). Quedando así pendiente la identificación de la oxidasa terminal resistente a KCN y el definir la posible participación de la SII de ADH como componente obligado de esta vía.

En mi trabajo de tesis se aborda el estudio sobre la naturaleza y función de los componentes del sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* involucrados en las vías resistente y sensible a KCN, con especial énfasis en la identificación de las oxidasas terminales sensible y resistente a KCN. Se identifican los tipos de quinona presente y se define su función como intermediarios en el transporte de electrones entre las deshidrogenasas y las oxidasas terminales. Así mismo, se evalúa el papel de la ADH-SII (citocromo *c*₅₅₃) en la vía de respiración resistente a KCN. Finalmente, se presentan resultados preliminares que sugieren que la oxidasa resistente a KCN representa un sitio de acoplamiento energético.

Con base a los resultados obtenidos se propone un nuevo esquema para la organización y función del sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* crecido bajo condiciones de fijación de N₂.

III. HIPÓTESIS.

Si el sistema respiratorio de *Gluconacetobacter diazotrophicus* posee al menos, dos cadenas de transporte de electrones, una sensible y otra resistente al KCN, entonces estas vías podrán ser identificadas por la naturaleza y función de sus componentes, especialmente las oxidasas terminales involucradas en cada cadena.

IV. OBJETIVOS.

- 1) Definir la naturaleza de los componentes respiratorios de las vías resistente y sensible a KCN de células crecidas en condiciones de fijación de nitrógeno.
- 2) Establecer la secuencia funcional de los componentes identificados en cada vía.
- 3) Distinguir las oxidasas terminales por sus propiedades cinéticas y grupos prostéticos presentes.
- 4) Definir el papel de la ADH-SII (*Citocromo c553*) en la respiración resistente a KCN.
- 5) Establecer un protocolo para la purificación parcial de las oxidasas terminales.

V. MATERIAL Y METODOS.

5.1 Material biológico.

Gluconacetobacter diazotrophicus cepa Pal5 ATCC 49037

Gluconacetobacter diazotrophicus MAd22 derivada de Pal5, *ccmC3::*(Str)^R, derivada de PAL5. Carece de citocromos *c*, por interrupción de los genes de maduración de citocromos *c* (*ccmC3*) con casete omega de resistencia a estreptomycin.

5.1.1 Mantenimiento del microorganismo.

Para todos los ensayos se empleó el medio de cultivo líquido LGIP pH 5.5 (cantidades por litro de medio): 50 g de azúcar refinada comercial, 4 g de K₂HPO₄, 5g de KH₂PO₄, 0.2g de MgSO₄-7H₂O, 0.02g de CaCl₂-2H₂O, 0.002 g de Na₂MoO₄ y 0.01g de FeCl₃-6H₂O y 0.1321 g de (NH₄)₂SO₄.

5.1.2 Cultivo masivo.

El cultivo masivo de *Ga. diazotrophicus* se realizó utilizando el medio de cultivo LGIP, conteniendo (NH₄)₂SO₄ 1mM. Los cultivos se llevaron a cabo a 30° C en un biofermentador de 80 L (Bioflo 2000 New Brunswick) con capacidad de trabajo de 60 L de medio, manteniendo un flujo de aire de 4L de aire/L de medio/min y agitación de 100 rpm. El cultivo fue iniciado con 4 litros de inóculo en fase de crecimiento activo. Los 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 amortiguadora de fosfatos 50mM pH 6.0 conteniendo CaCl₂ 0.5 mM y MgCl₂ 0.5mM y fueron almacenadas a -80° C hasta su uso.

5.2 Ruptura celular y preparación de membranas.

Las células fueron rotas empleando perlas de vidrio (0.1-0.2mm) en un licuadora (Bead-Beater). Se aplicaron de 4 a 5 pulsos de 2 min con descansos de 5 min, para evitar el calentamiento. Todo el proceso se llevó a cabo en frío y se empleó fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF: $15 \mu\text{g ml}^{-1}$) para evitar la degradación por proteasas. Las perlas fueron separadas con ayuda de un filtro y bomba de vacío. La suspensión de células rotas fue centrifugada a $10,000\text{g}$ durante 10 min a 4°C para separar los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y luego se centrifugó a $144,000\text{g}$ durante 40 min a 4°C . Las membranas recuperadas se lavaron con solución reguladora de fosfatos 50mM , pH 6.0 conteniendo CaCl_2 0.5mM y MgCl_2 , 0.5mM , se alicuotaron y almacenaron a -80°C . La concentración de proteína en las membranas fue determinada por el método modificado de Lowry.

5.3 Análisis espectral de citocromos.

Los análisis de citocromos se llevaron a cabo espectrofotométricamente a temperatura de nitrógeno líquido (77K) y a temperatura ambiente, de acuerdo a la metodología establecida por Escamilla et al. (1987). Para ello se empleó un espectrofotómetro SLM-Aminco DW 200 y usaron cubetas con paso de luz de 0.2cm (77K). Los espectros diferenciales reducidos menos oxidados se obtuvieron resuspendiendo las membranas de *Ga. diazotrophicus* en solución amortiguadora de fosfatos 50mM , pH 6 adicionado de DMSO al 30% (anticongelante). En la mayoría de los casos la concentración final de proteína fue de 5mg/ml . Las membranas fueron reducidas durante 10-20 min empleando pocos granos de ditionita, glucosa 10mM , NADH 3mM y oxidadas con persulfato de amonio. Los espectros diferenciales reducido+KCN menos oxidado se obtuvieron adicionando a

la muestra reducida 1mM de KCN. Los espectros diferenciales de CO se obtuvieron burbujeando CO a la muestra reducida, durante 1-3 min. Los espectros de fotodisociación fueron realizados a 77K en membranas. Para ello a las muestras congeladas, conteniendo el aducto de CO, se les aplicó 3-4 pulsos consecutivos de luz blanca con un flash fotográfico, pegado a la ventana de la cubeta. El espectro obtenido después de irradiar luz blanca fue sustraído del espectro de CO para generar el espectro de fotodisociación. Las membranas fueron reducidas con ditionita; se emplearon 5 mg de proteína membranaral ml^{-1} .

Las concentraciones de citocromos fueron calculadas a partir de los espectros diferenciales reducido menos oxidado o reducido + CO menos reducido obtenidos a temperatura ambiente con las preparaciones membranales de *Ga. diazotrophicus*. Los coeficientes de extinción milimolar empleados (Flores-Encarnacion *et al* 1999) fueron: citocromo *b* (562-575 nm) = $22/\text{mM cm}^{-1}$; citocromo *c* (553-540nm) = 19.1 mM cm^{-1} y citocromo *a*₃ (427-440nm) = 60 mM cm^{-1} .

5.4 Actividades respiratorias.

5.4.1 Oxidasas.

Las actividades de oxidasa fueron determinadas por polarografía a 30° C de acuerdo al método descrito por Escamilla *et al.* (1987) 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 2ml y contenía: solución reguladora de fosfatos 50 mM, pH 6 y suspensión membranaral (0.1 mg de proteína). La reacción fue iniciada con la adición del sustrato donador de electrones. Así las concentraciones finales de los sustratos fueron: NADH 3mM, glucosa 10mM, etanol 10mM y acetaldehído 10mM.

5.4.2 Deshidrogenasas.

Las actividades de deshidrogenasas membranales fueron determinadas espectrofotométricamente empleando ferricianuro de potasio como aceptor de electrones, siguiendo la metodología establecida por Ameyama y Adachi. Brevemente, la mezcla de reacción se ajustó a 1ml y contenía solución reguladora de fosfatos (MacIlvaine), suspensión membranal (0.05 mg de proteína membranal) y ferricianuro de potasio 10 mM. 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 mM. La actividad fue cuantificada por el cambio de absorbencia a 660 nm. y se reporto en nmol de DCPIPH₂ /min.x mg. de proteina(DCPIP:0.08mM, PMS:0.2mM). Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que tiene la capacidad de oxidar 1 micromol de sustrato /minuto bajo estas condiciones de ensayo (Adachi *et al* 1978).

5.5 Análisis de los grupos hemo por HPLC de fase reversa.

La composición de grupos hemo presentes en el sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* fue determinada por cromatografía de HPLC de fase reversa. De esta forma, los grupos hemo extraídos y purificados de acuerdo al método descrito por Puustinen et al (1991) fueron disueltos en una solución de acetonitrilo conteniendo ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5 %. La solución fue aplicada a la columna de un cromatógrafo de líquidos (Waters Chromatography System). Los grupos hemo fueron eluidos por un gradiente de acetonitrilo-agua como ha sido descrito por Lubben y Morand. El sistema fue calibrado usando los siguientes estándares: grupos hemo B y O extraídos de membranas de *E coli*, hemos B y A extraídos de partículas submitocondriales de corazón de bovino.

5.6 Fotoinactivación de membranas con luz UV360nm.

Las membranas fueron suspendidas en solución reguladora de fosfatos 50 mM, pH 6 hasta una concentración final de proteína de 10 mg ml^{-1} . La suspensión membranal fue colocada en una placa de Petri y agitada suavemente con ayuda de una barra magnética. La placa permaneció en hielo y se mantuvo destapada durante el proceso de irradiación con la lámpara de UV (Vue lamp, Ultraviolet products).

5.7 Extracción de quinona con n-pentano.

Las membranas fueron extraídas con solvente n-pentano de acuerdo al método descrito por Peschek (1980). Se partió de una preparación membranal (5mg de proteína membranal), previamente liofilizada. Las membranas liofilizadas fueron transferidas a un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón. Se adicionaron 5-10 ml de n-pentano y las membranas se homogenizaron con ayuda de un émbolo, Las membranas extraídas fueron lavadas con solución reguladora de fosfatos 50 mM, pH 6 y se almacenaron en congelación a -80°C .

5.8 Purificación parcial de las oxidasas terminales.

Se obtuvieron membranas de células crecidas en condiciones estándar:

1) Extracción con Tritón X-100 al 1%. Se resuspendió el paquete membranal con amortiguador de fosfatos 50mM, pH 6.5 al cual se le añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1%, la concentración de proteína final fue de 10 mg ml^{-1} . Se incubó por 30 min en hielo y con agitación. Al cabo de la incubación, la preparación fue centrifugada por 60 minutos a 144,000 g. En este paso se rasuran las membranas, eliminándose el conjunto de deshidrogenasas periplásmicas.

2) Solubilización con octilglucopiranosido. El precipitado conteniendo los residuos membranales fue resolubilizado con octilglucopiranosido al 1.25%. Se incubó por 30 minutos en hielo en agitación y entonces fue centrifugado por 60 minutos a 144,000 g.

3) Columna de intercambio aniónico. Al sobrenadante anterior se le agregó buffer de K-fosfatos 50mM, pH 6.5 hasta tener una concentración de 1mg de proteína por ml, esta suspensión fue absorbida a una columna de dietilaminoetil-toyopearl (DEAE-T) previamente equilibrada con una solución de fosfatos 50 mM, pH 6.5 conteniendo octilglucopiranosido al 0.5%.

VI. RESULTADOS

6.1 Quinona.

Las bacterias del ácido acético están integradas por cuatro géneros: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*, dicha clasificación está basada en secuencias parciales de RNAr *16s* (Yamada *et al* 1997). Uno de los perfiles distintivos de género es la presencia de Quinona, siendo Q₉ para *Acetobacter* y Q₁₀ para *Acidomonas*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*. En ambos casos el subíndice indica el número de unidades de isopreno presentes en la cadena lateral de la quinona.

Extractos con n-pentano de membranas de *Ga. diazotrophicus* fueron analizadas por HPLC de fase reversa para determinar el tipo de quinona (Figura 1a). Los estándares utilizados fueron Q₁₀, Q₉, Q₆ y PQQ con tiempos de retención de 13.3, 11, 6.9 y 4.2 minutos respectivamente.

El cromatograma mostró la presencia de Q₁₀ como la quinona predominante y pequeñas cantidades de Q₉ siendo la relación de Q₁₀/Q₉ = 13, además también se detectó la presencia de PQQ, esto se explica por la presencia de GDH y ADH, que contienen como grupo prostético PQQ que se libera durante el tratamiento con n-pentano, ya que éste solo interacciona por enlaces no covalentes con la apoenzima (Figura 1b).

La determinación de la concentración de las sustancias detectadas se realizó por el cálculo del área bajo la curva de los picos del cromatograma siendo de 4.0, 0.3 y 0.6 nmol/mg proteína, para Q₁₀, Q₉ y PQQ respectivamente (Figura 1b).

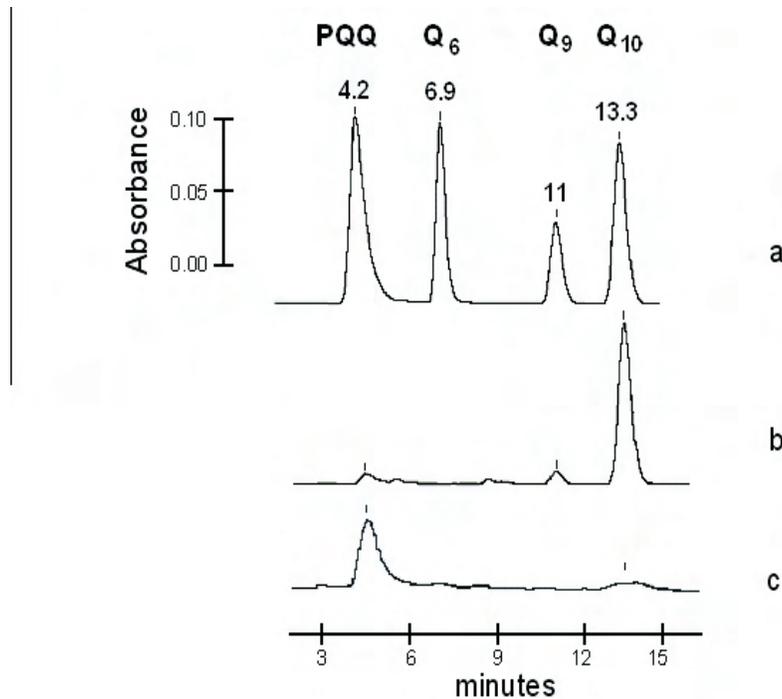


Fig. 1. Quinonas de la membrana de *Gluconoacetobacter diazotrophicus*. Cromatogramas HPLC-RP.
 (a) Estándares de quinonas usados como calibración, PQQ (Tr=4.2min), Q₆ (Tr=6.9), Q₉(Tr=11), Q₁₀(Tr=13.3).
 (b) Quinonas extraídas con n-pentano de membranas nativas
 (c) Quinonas extraídas con n-pentano de membranas irradiadas con luz UV_{360nm}/1hr. Este cromatograma fue amplificado 10 veces

6.1.1 Papel en la cadena respiratoria.

En *G. suboxydans* se ha demostrado que la quinona membranal Q₁₀ tiene un papel esencial en el enlace funcional entre deshidrogenasas y oxidasas terminales. Además se ha sugerido la presencia exclusiva de quinol oxidasas en las bacterias del ácido acético (Matsushita *et al* 1994).

Para demostrar el papel de Q₁₀ como mediador en el transporte de electrones entre las deshidrogenasas y oxidasas terminales en membranas de *Ga. diazotrophicus*, se destruyó a la

membranas de *Ga. diazotrophicus*, se destruyó a la

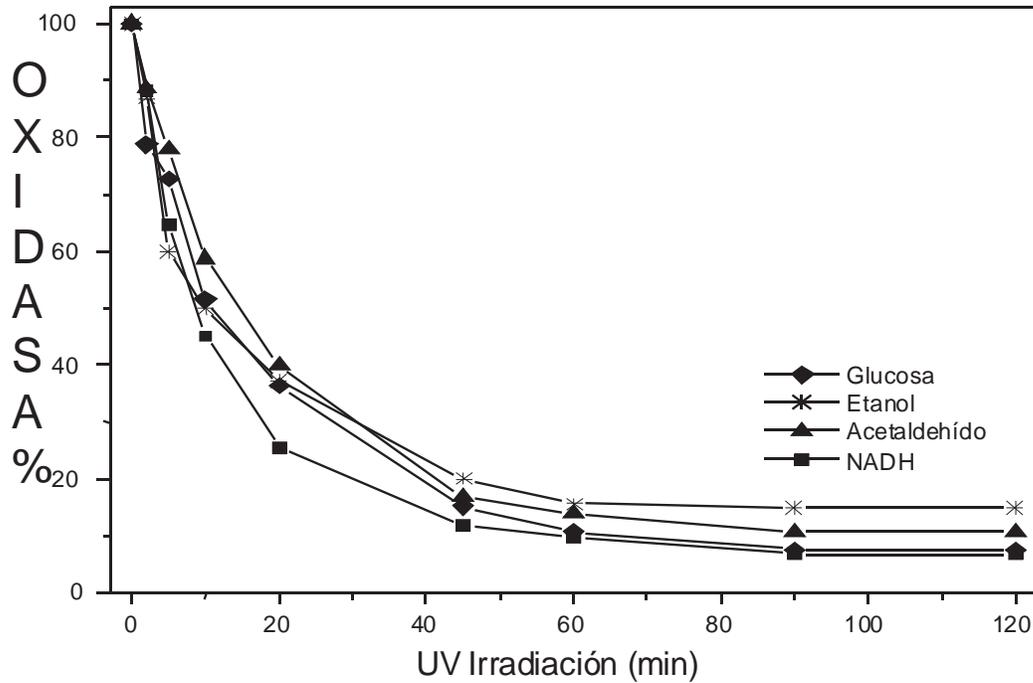


Figura 2. Fotoinactivación con luz UV360nm de las actividades de oxidasas respiratorias en membranas de *Ga. diazotrophicus*.

Q_{10} por la irradiación con luz UV_{360nm}. La destrucción de Q_{10} abatió las actividades de oxidasa para todos los sustratos ensayados y el daño fue directamente proporcional al tiempo de irradiación, con un 10% de la actividad de oxidasa remanente. Dado que todas las actividades de oxidasas decaen con pendientes semejantes, podemos asegurar que para todas las vías ensayadas existe un mismo componente fotosensible, posiblemente la Q_{10} (Figura 2). Para corroborar cual es el elemento fotosensible, se realizó una extracción de quinonas con n-pentano de membranas fotoirradiadas por 60 minutos y se analizó por HPLC de fase reversa, resultando en la desaparición de los picos correspondientes a Q_{10} , Q_9 y una caída del 30% en el contenido de PQQ (Figura 1c).

6.1.1.2. Efecto de la fotoirradiación sobre las actividades de deshidrogenasas.

El análisis de la actividad de oxidasa representa el impacto sobre la cadena respiratoria en su conjunto. De esta manera, también decidimos examinar el impacto de la fotoirradiación sobre las deshidrogenasas individuales, usando para esto un ensayo de actividad con colorantes redox (PMS-DCPIP) que sólo mide la actividad de deshidrogenasa ensayada. Este ensayo fue necesario pues hay que recordar que varias de las deshidrogenasas contienen PQQ como grupo prostético y por tanto son susceptibles a la fotoinactivación, como fue demostrado por la disminución de la concentración de PQQ del 30 % por el efecto de la fotoirradiación (Figura 3).

La evaluación de las actividades de deshidrogenasa de membranas fotoirradiadas mostró 2 tipos de curvas de inactivación:

- 1) Deshidrogenasas fotosensibles. Son aquellas enzimas que contienen a PQQ como grupo prostético como la alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y glucosa deshidrogenasa. Presentan una tasa de inactivación elevada a tiempos cortos de irradiación con un 40 % de inactivación 10 minutos. Después, la tasa de inactivación disminuye gradualmente hasta llegar a un 60-70% de inactivación acumulada después de 120 minutos de irradiación (Figura 3).
- 2) Deshidrogenasa fotorresistente. La NADH deshidrogenasa contiene FMN como grupo prostético y su sensibilidad a la luz UV₃₆₀ es menor que las deshidrogenasas que contienen PQQ, ya que mantiene un 70 % de la actividad inicial después de 120 minutos de irradiación (Figura 3).

A 45 minutos de fotoirradiación para las actividades de oxidasa de los 4 sustratos ensayados tengo del 10-20% de actividad

inicial, pero para las actividades de deshidrogenasas es del 70 %

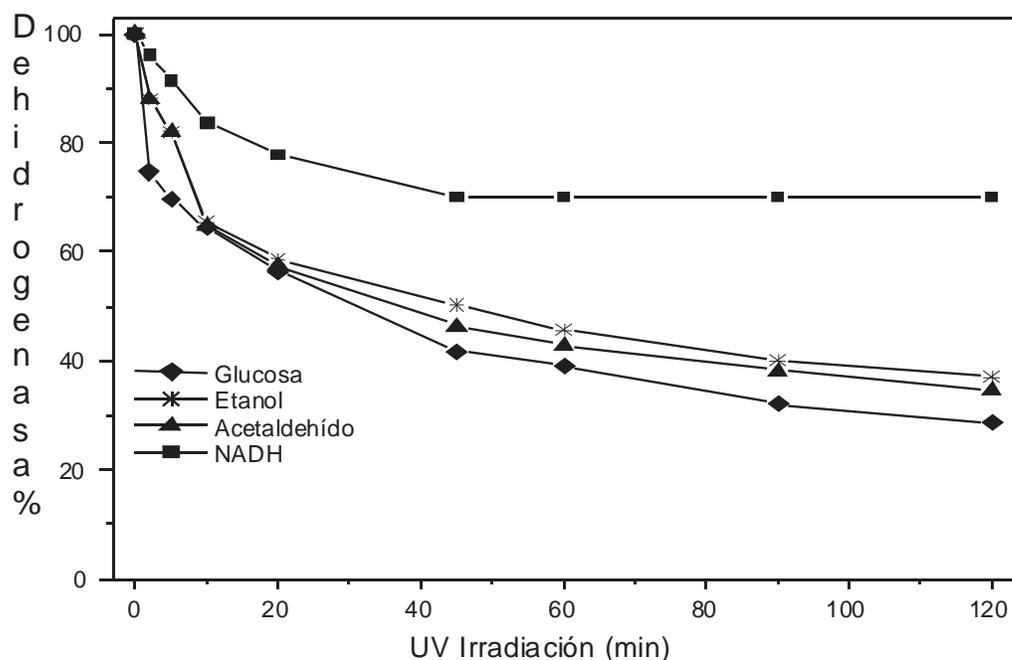


Figura 3. Fotoinactivación con luz UV360nm de las actividades de deshidrogenasas respiratorias en membranas de *Ga. diazotrophicus*. Las actividades de deshidrogenasas fueron medidas con PMS-DCPIP como aceptores de electrones y de acuerdo a la técnica descrita en Materiales y Métodos.

para NADH y del 50-40 % para los demás sustratos, indicando que el efecto principal de la luz UV_{360nm} es sobre la quinona y en menor medida afecta a PQQ y FMN.

6.1.1.3 Reconstitución de la actividad de oxidasa.

Para corroborar que el efecto de fotoinactivación se da principalmente a nivel de quinona se propuso reconstituir la actividad de oxidasa con análogos de quinona para los 4 sustratos ensayados.

Los experimentos de reconstitución de la actividad de oxidasa

fueron llevados a cabo en membranas irradiadas por 60 minutos y que conservaban sólo el 10 % de actividad residual.

Se presentó una recuperación limitada (30-38%) para la actividad de oxidasa con acetaldehído y etanol, independientemente de la quinona ensayada (Figura 4).

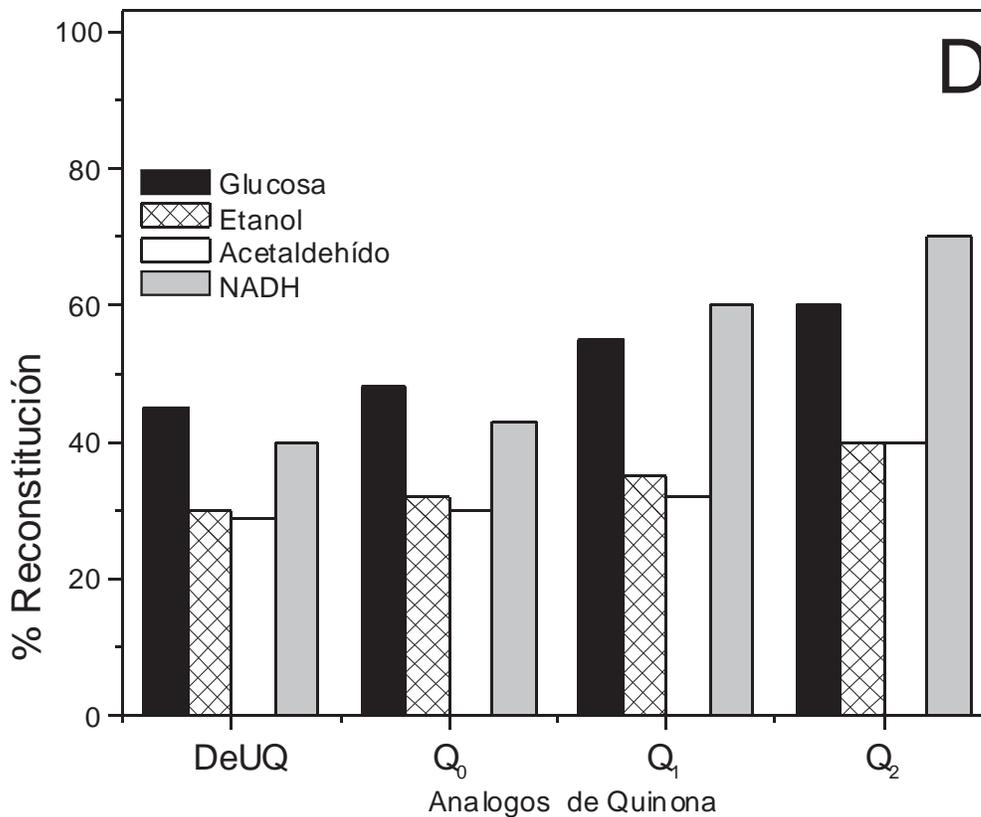


Figura 4.Reactivación de la actividades de oxidasa con análogos de quinona. Membranas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* fotoirradiadas con luz UV_{360nm}/1hr.

DeUQ:Decilubiquinona; Q_n, n=0,1,2, donde n es el número de unidades de isopreno.

Para NADH la reconstitución de la actividad de oxidasa fue del 60-70 % de la actividad inicial con Q₁ y Q₂ y sólo del 40% con DeUQ y Q₀.

Para glucosa la reconstitución de la actividad de oxidasa fue del 50-60 % de la actividad inicial con Q₁ y Q₂ y sólo del 40-50%

con DeUQ y Q₀.

Sugiriendo la importancia del parecido estructural del análogo de quinona, en especial del tamaño de la cadena isoprenoide, en la reconstitución de las actividades de oxidasa (Figura 4).

6.2 NADH deshidrogenasa

La determinación de la sensibilidad a inhibidores específicos es uno de los primeros acercamientos para definir el tipo de NADH-DH presente.

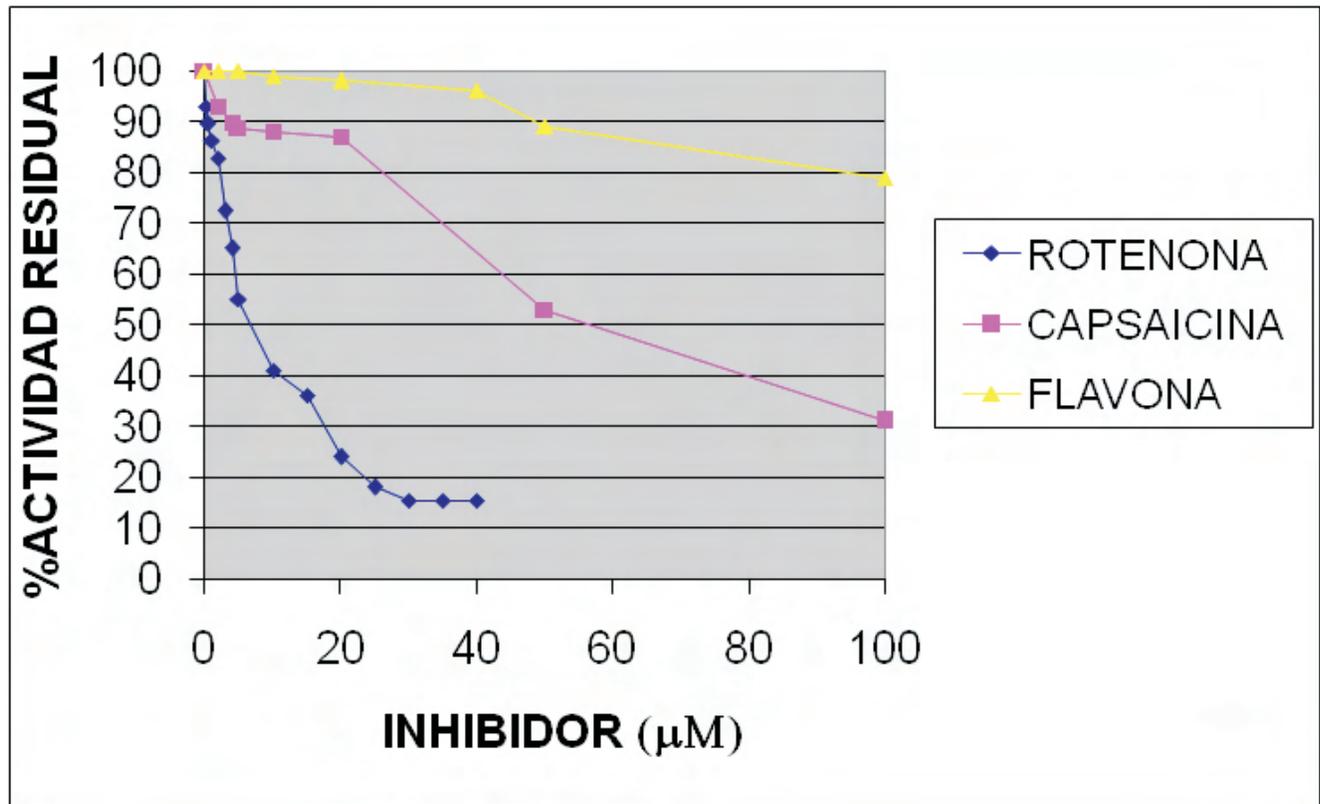


Figura 5. Inhibición de la actividad de NADH oxidasa en membranas de *Ga. diazotrophicus*. Titulación con inhibidores de NDH-I: rotenona y capsaicina e inhibidor de NDH-II: flavona.

La curva de inhibición para la actividad de NADH oxidasa sugiere la presencia de una NDH-1, porque la inhibición con

rotenona es potente y monofásica con una $I_{50} = 2.5 \text{ M}$. La capsaicina tuvo un efecto intermedio ($I_{50} = 50 \text{ M}$) pero semejante a otras NDH-1 reportadas en la literatura (Sato *et al* 1996), y por otro lado, la flavona como inhibidor típico de NDH-2 solo produjo una inhibición marginal del 20% a 100 M (Figura 5).

6.3 Respiración resistente a KCN.

En *G. suboxydans* se presentan dos cadenas respiratorias una sensible y otra resistente a KCN. Ambas rutas comparten un sistema de quinoproteínas y flavoproteínas que reducen una poza común de Q_{10} ; ésta a su vez, alimenta a dos oxidasas terminales, una ubiquinol oxidasa bo_3 sensible a KCN, y otra resistente a KCN, no caracterizada aún. La vía resistente a KCN tiene como componente esencial al citocromo c_{553} de la subunidad II de la alcohol deshidrogenasa (ADH), ya que la eliminación del citocromo c provoca la pérdida de la sensibilidad a KCN y la sobreexpresión de citocromo c , el aumento de la resistencia a KCN.

Para determinar los componentes involucrados en la respiración resistente y sensible a KCN se titularon con KCN la actividad de oxidasa para glucosa, etanol, acetaldehído y NADH, de membranas de *Ga. diazotrophicus*. Las curvas de titulación mostraron dos componentes cinéticos: uno resistente y otro sensible a KCN. Una caída del 50 % de la respiración a una concentración de 10 M de KCN y mantenimiento de la respiración (50% de la actividad inicial) aún a concentraciones de 100 M . Las curvas de inhibición son muy parecidas lo que implica que todas las vías de oxidación hacen uso parecido de las oxidasas terminales. Sin embargo, se observó una diferencia importante cuando se utilizó tetraclorohidroquinona (TCHQ) más ascorbato como mezcla donadora de electrones. En este caso, el KCN mostró un fuerte

efecto inhibitorio y una cinética monofásica lo que sugiere que el TCHQ es oxidado, casi exclusivamente, por la oxidasa sensible a KCN (Figura 6).

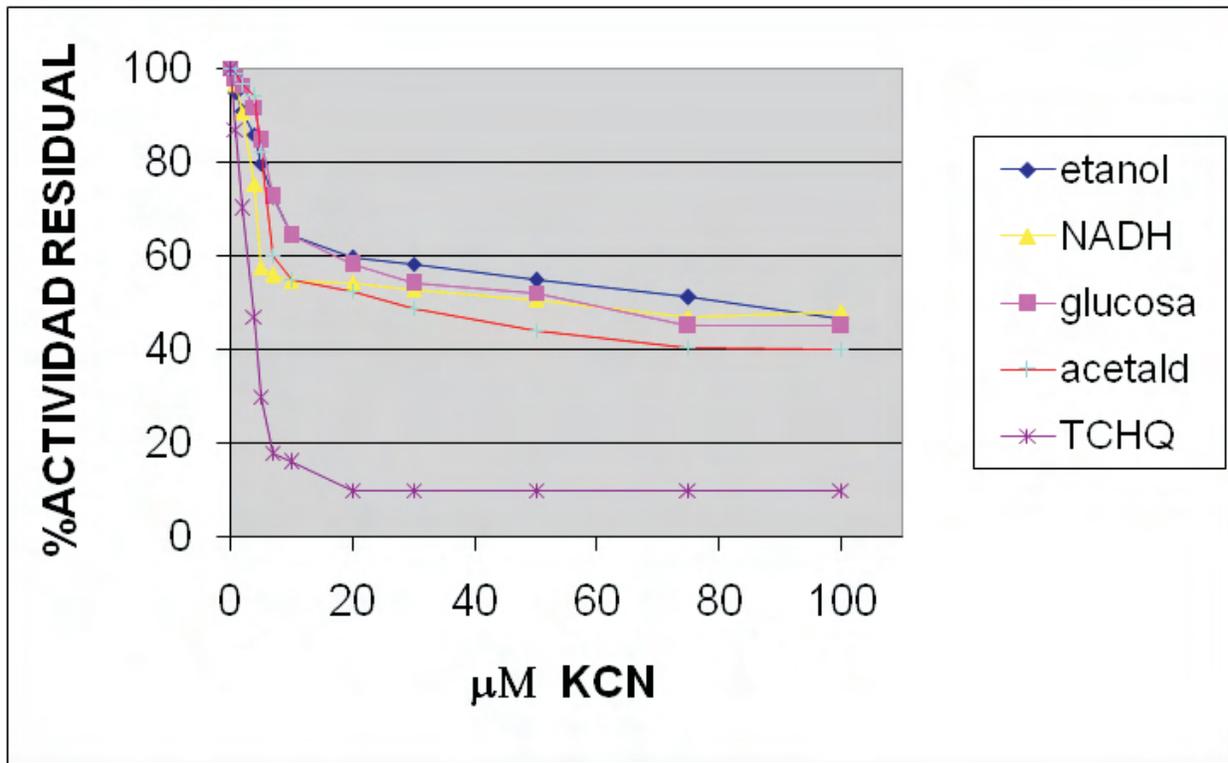


Figura 6. Efecto del KCN sobre las actividades de oxidasa de membranas obtenidas de células de *Ga. diazotrophicus* crecidas en condiciones de fijación de nitrógeno (sacarosa 10% y amonio 1 mM).

6.4 La respiración resistente a KCN y el Citocromo *c553*.

En *G. suboxydans* se ha demostrado que ciertas condiciones (pH 3 ó etanol como única fuente de carbono) aumentan los niveles de expresión de citocromo *c*, causando que la respiración sea mayormente resistente a KCN. En cambio, la extracción de *citocromo c* de la membrana con Tritón X-100, da como resultado que la respiración sea sensible a KCN. Además, en la cepa de *G. suboxydans*, carente de alcohol deshidrogenasa activa (SII disfuncional), la respiración también es sensible a KCN (Ameyama *et al* 1987, Matsushita *et al* 1994).

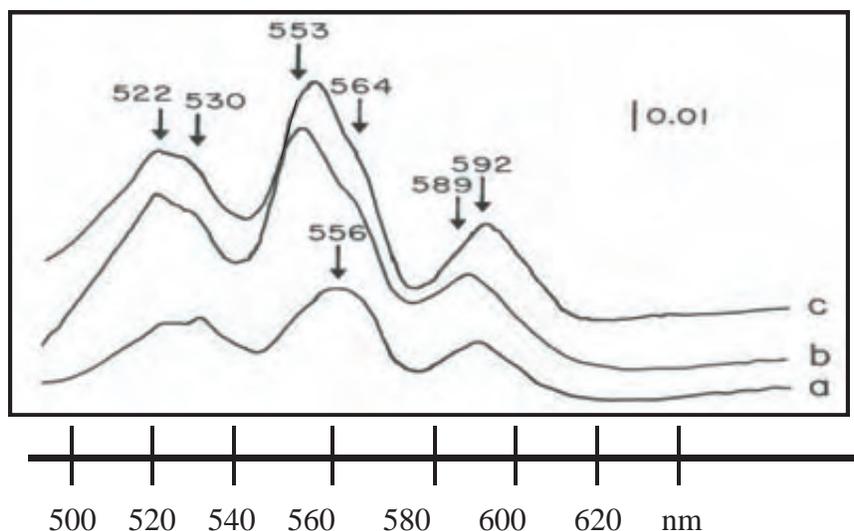


Figura 7. Niveles de expresión de citocromo *c*. Espectros diferenciales reducido-ditionita menos oxidado-persulfato a 77 K de membranas de *Ga. diazotrophicus* crecido en:
 (a) Condición estándar, sacarosa 10%, pH 5.5.
 (b) Condición ácida, pH 3 constante, sacarosa 10%,.
 (c) Etanol como única fuente de carbono. Etanol al 0.75%, pH 5.5.

Los espectros diferenciales, reducido menos oxidado, de membranas de *Ga. diazotrophicus* crecido a pH 3 constante o con etanol como única fuente de carbono, mostraron un aumento en el nivel de *citocromo c*₅₅₃ de 4 veces con respecto a la condición estándar de cultivo. La señal a 553 nm corresponde al citocromo *c* contenido en la subunidad II de la alcohol deshidrogenasa (Figura 7).

Para evaluar si el nivel de expresión de *citocromo c* afecta la respiración KCN-resistente en *Ga. diazotrophicus* se tituló la actividad de glucosa oxidasa en membranas con diversos niveles de expresión de citocromo *c*:

1) Niveles elevados de citocromo *c*. Se utilizaron membranas de células crecidas en etanol (0.75%) o a pH 3 constante (Figura 7)

2) Niveles normales de citocromo *c*. *Ga. diazotrophicus* PAL5 cultivado en condiciones estándar (sacarosa 10%, pH 5.5).

3) Niveles nulos de citocromo *c*. La cepa mutante de *Ga. diazotrophicus* MAd22, no expresa citocromo *c* por tener interrumpido con un casete de resistencia a estreptomycin el gen *ccmC* involucrado en la biogénesis de citocromos tipo-*c* (Lee 2004).

4) Actividad nula de ADH. El mutante espontáneo C6 fue aislado por carecer de actividad de ADH y presentar actividades normales de ALDH, GDH y otras deshidrogenasas.

Las curvas de titulación con KCN de la actividad de glucosa oxidasa para las 4 condiciones fueron semejantes, mostrando nuevamente un componente sensible a concentraciones menores a 10⁻⁵ M de KCN (50 % de la respiración inicial) y un componente resistente activo aún a 100⁻⁵ M de KCN (Figura 8). Estos resultados indican que el citocromo *c*₅₅₃ asociado a la ADH no es parte funcional de la cadena respiratoria resistente al KCN ya que su sobreexpresión (crecimiento en etanol o a pH 3, constante), ni tampoco su ausencia (mutantes C6 y MAd22), modifican de manera significativa la curva bifásica de titulación de la actividad de

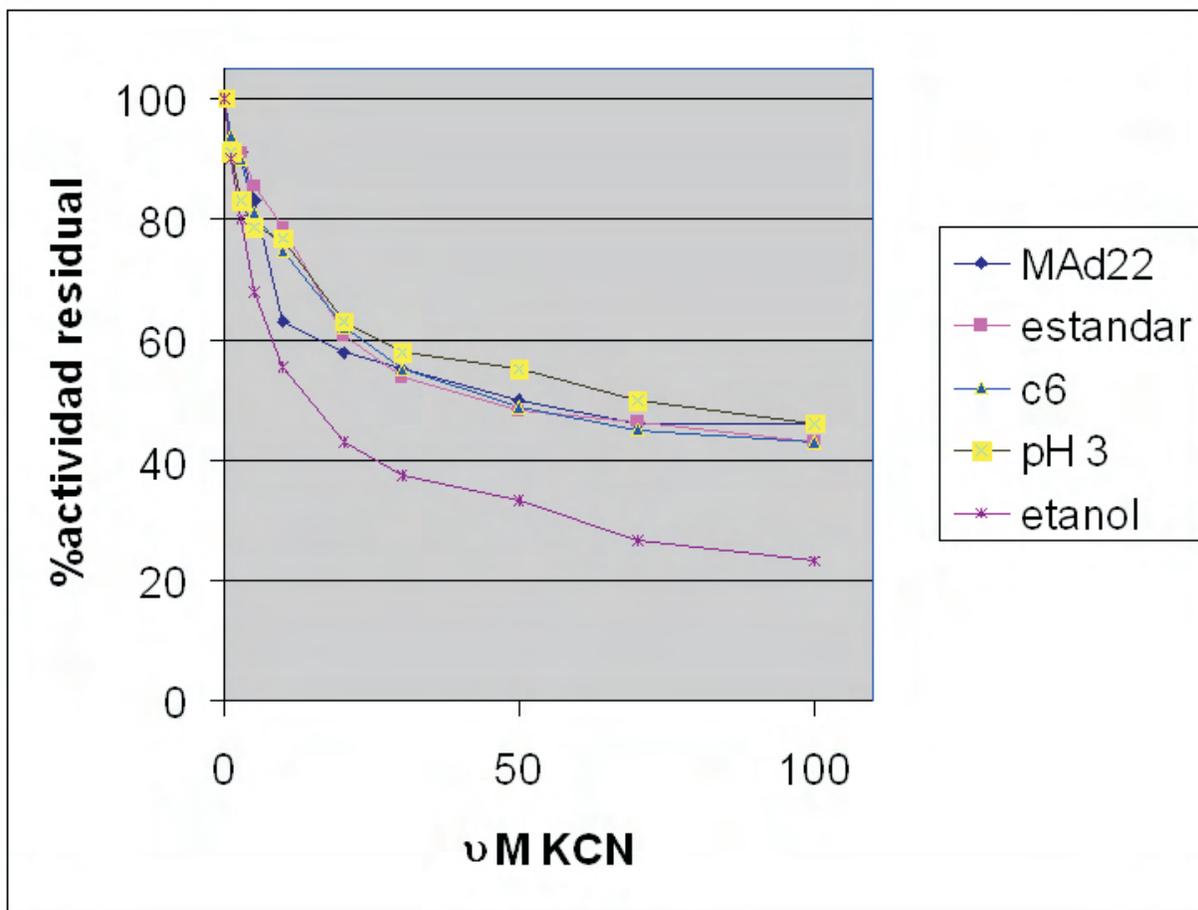


Figura 8. Expresión de citocromo *c* y la respiración resistente a KCN. Titulación con KCN de la actividad de glucosa oxidasa de membranas de *Ga. diazotrophicus silvestre* crecido en sacarosa 10% (pH 5.5) ó etanol 0.75%(pH 5.5) ó sacarosa 10 % pH 3 constante; *Ga. diazotrophicus* MAd22 (citocromo *c*⁻); *Ga. diazotrophicus* C6 (ADH).

glucosa oxidasa, característica de la cepa silvestre, crecida bajo condiciones estándar. Todo esto demuestra que la SII-ADH no es un componente instrumental de la vía resistente a KCN en *Ga. diazotrophicus*, tal y como se propuso en *G. suboxydans*. (Takeda et al 1991,1992)

6.5 Oxidasas terminales.

En *G. suboxydans* se presentan, al menos, dos oxidasas terminales. Así, la ubiquinol oxidasa *bo*₃ fue purificada a

homogeneidad y es responsable de la respiración sensible a KCN. En cambio la naturaleza de la oxidasa resistente a KCN no ha sido definida (Matsushita *et al* 1989).

En *Ga. diazotrophicus* la curva de titulación con KCN de la actividad de glucosa oxidasa, es bifásica, sugiriendo la presencia de al menos dos oxidasas terminales, una de ellas sensible a KCN, responsable del 50% de la respiración. Por analogía con *G. suboxydans*, nuestro grupo había sugerido que la ubiquinol oxidasa *ba*₃ era la responsable de la actividad sensible a KCN (Flores Encarnación *et al* 1999). Por otro lado, la oxidasa responsable de la respiración resistente a KCN quedaba por identificar.

6.5.1 Citocromos reactivos con CO y fotodisociación de sus aductos

La capacidad de una hemoproteína para formar aductos con CO que resulten fotodisociables es un criterio confiable para su identificación como una oxidasa terminal (Jones and Poole 1985). Las señales espectrales resultantes son características del tipo de citocromo presente. Así, el CO reacciona con nuestras membranas

reducidas para formar un aducto que da la firma espectral de un complejo citocromo *a*-CO, con picos a 422 nm y 591 nm además de los valles a 444 nm y 610 nm. Aunque las señales son típicas, la forma del espectro no lo es, ya que en la región Soret (400 a 500 nm) el espectro muestra interferencia que causa un ensanchamiento de la señal, esto puede ser consecuencia de la presencia de un citocromo tipo-*o* ó tipo-*b* reactivo con CO. Esta sugerencia es fortalecida por la presencia de pequeños valles a 530nm y 560nm y los picos a 440nm y 570nm (Figura 9 a), que son típicos de aductos *o*-CO o *b*-CO (Wood 1984). El análisis de hemos por HPLC

profundo, sugiriendo nuevamente interferencia por la fotodisociación limitada de un aducto de CO con un citocromo tipo-*o* o tipo-*b* (por ejemplo *b-CO* o *o-CO*), lo anterior sugerido por el pico a 416 nm y el pequeño valle a 422 nm (Figura 9 b).

En la región del espectro (por ejemplo 540 a 700 nm) se presenta también la inversión del espectro al llevarse a cabo la fotodisociación del complejo *a*-CO con las señales típicas de valle a 591 nm y pico a 610 nm. Además, las señales que muestran un aducto *b*-CO parcialmente fotodisociado en las condiciones utilizadas, con picos pequeños a 530 nm y 563 nm y los valles poco profundos a 540 nm y 570 nm (Figura 9 b).

Todas las evidencias indicaban la presencia de dos ubiquinol oxidasas en *Ga. diazotrophicus*: citocromo *ba*₃ y citocromo *bb*₃ y los datos sugieren que la única diferencia entre la respiración resistente y sensible a KCN está a nivel de oxidasas terminales ya que ambas vías parecen compartir el resto de los componentes respiratorios.

6.5.2 Efecto del KCN sobre la oxidación de los citocromos de la cadena respiratoria.

Para identificar la naturaleza citocrómica de las oxidasas resistente y sensible a KCN, se determinó el grado de oxidación inducida por aire (agitación vortex, 1min) de los citocromos en membranas previamente reducidas hasta anaerobiosis con NADH y en presencia de cantidades crecientes de KCN.

Se prepararon muestras de membranas reducidas con NADH hasta anaerobiosis (60 min. 30°C), a las que se les agregó cantidades crecientes de KCN (0 - 2000 M de KCN). Entonces fueron congeladas a 77 K y sus espectros se registraron (anaeróbico).

A continuación, a muestras anaeróbicas, similares a las anteriores, se les agregó rotenona 50 M (para impedir una posterior

reducción citocrómica por la NDH-1) justo antes de la agitación vortex (30seg.). Después de la agitación las muestras fueron inmediatamente congeladas (77 K) y sus espectros grabados (Aeróbico). Al espectro de la muestra anaeróbica se le restó el espectro aeróbico y así, se obtuvieron los espectros diferenciales de oxidación en presencia de KCN, mostrados en la Figura 9. De esta manera, la oxidación de cada citocromo va a ser indicada por la altura del pico que forma y su inhibición por concentraciones dadas de KCN será indicada por la disminución del mismo pico, esto debido a que al ser bloqueada la oxidación por el KCN, el citocromo sensible se mantiene cada vez más reducido (celda de referencia) e iguala los niveles registrados en la muestra anaeróbica (celda de muestra).

A bajas concentraciones de KCN, el nivel de oxidación de los componentes citocrómicos de la oxidasa sensible a KCN debe ser cada vez menor, produciendo picos menores y los de la oxidasa resistente deben mantenerse hasta alcanzar la concentración inhibitoria que impida su oxidación y por tanto, también disminuirán su tamaño.

Se utilizó NADH como donador de electrones porque la NDHI es fuertemente inhibida por rotenona.

Se tomó como referencia la absorbencia a 442 nm correspondiente al citocromo *a* y a 432nm para el citocromo *b*.

En ausencia de KCN, se tiene el nivel máximo de oxidación para las dos oxidasas. Al incrementar la concentración de KCN se observa lo siguiente:

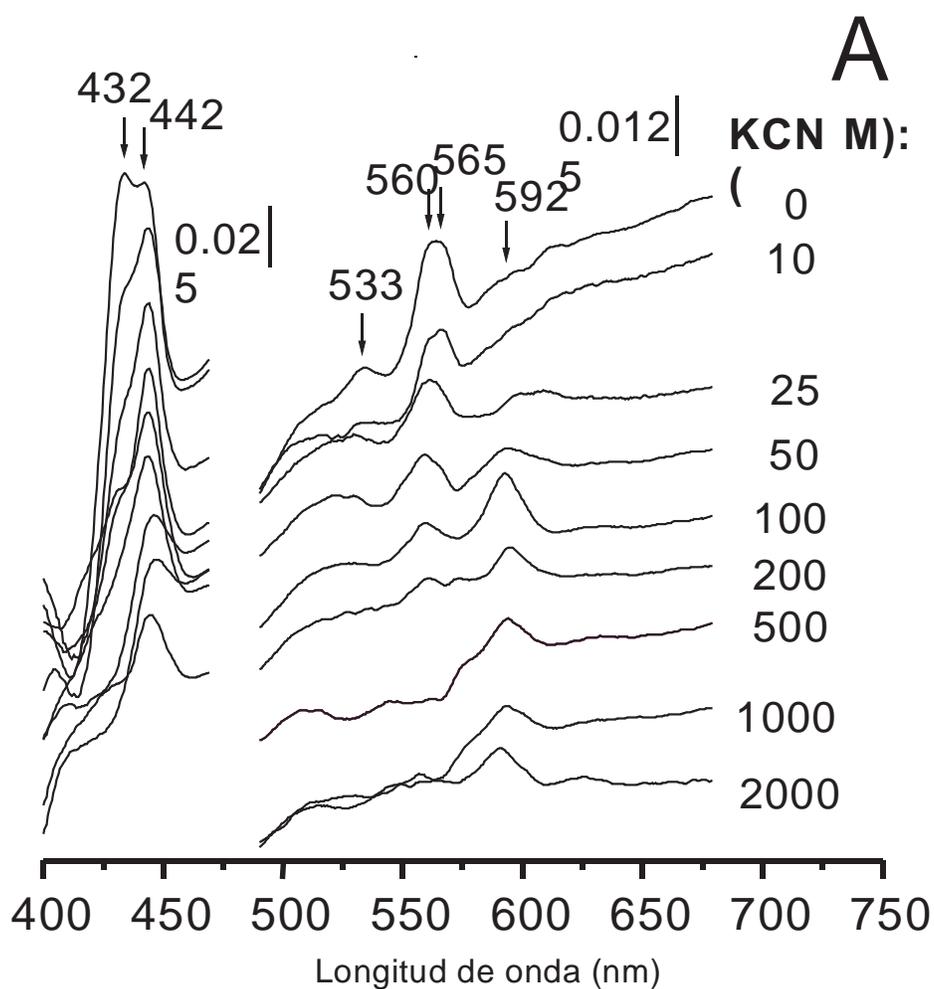


Figura 9. Efecto del KCN sobre la oxidación de citocromos por aire de membranas de *Ga. diazotrophicus* Pal5. Espectros a 77 K.

Espectro anaeróbico. Se redujo hasta anaerobiosis con NADH (20mM) en presencia de KCN (0-2000 M) . Registrados a 77 K.

Espectro aeróbico. Se redujo hasta anaerobiosis con NADH (20mM) en presencia de KCN (0-2000 M), se incubó 60 min. a 30° C y entonces se agregó rotenona (50 M) y se oxidó la muestra por agitación vigorosa en presencia de aire(30 seg.) e inmediatamente congeladas (77 K).

Cada uno de los espectros mostrados es el espectro anaeróbico menos el espectro aeróbico a la concentración de KCN anotada en el margen derecho de cada espectro (0-2000 M).

1. Efecto sobre la oxidasa sensible a KCN. Este se presenta a concentraciones inferiores a 25 M de KCN y los componentes citocrómicos aumentan su nivel de reducción por que se encuentra inhibida por lo que la señal correspondiente a b_{432nm} disminuye el tamaño del pico a un 30%, sugiriendo que el hemo B es integrante de la oxidasa sensible a KCN. A estas concentraciones de inhibidor la oxidasa resistente no es afectada y por tanto, el nivel de oxidación de a_{442} se mantiene cercano al 80%, sugiriendo que hemo A es parte de la oxidasa resistente a KCN (figura 9).

2.Efecto sobre la oxidasa resistente a KCN. A partir de

200 M, la oxidación de b_{432} ha sido abatida y el tamaño del pico a_{442} es del 70%. A 500 m de KCN el *pico* a_{442} se ha deprimido en un 80% sugiriendo que el hemo A es parte de la oxidasa resistente a KCN (Figura 9).

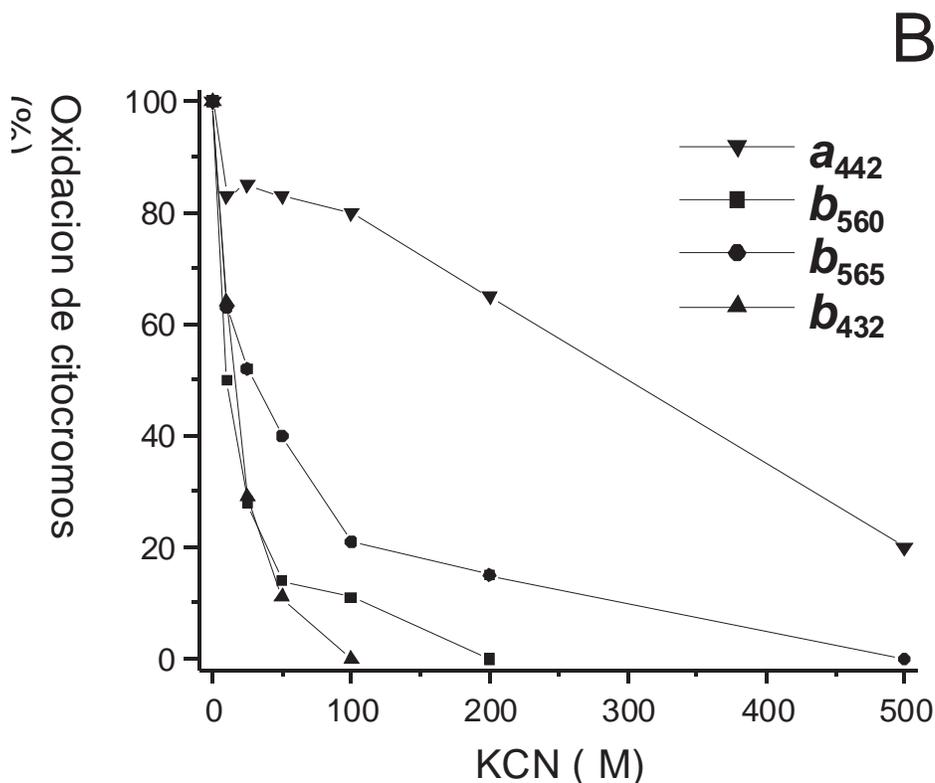


Figura 10. Representación gráfica del efecto de KCN sobre el nivel de oxidación de citocromos, calculada a partir de los espectros de la figura 9.

Una representación gráfica pone de manifiesto, con mayor claridad, el efecto del KCN sobre el nivel de oxidación de citocromos. Se nota que los niveles de oxidación de b_{432} y b_{565} caen drásticamente a concentraciones menores que 25 M con un 30% de oxidación del nivel inicial. Para deprimir la oxidación de a_{442} a niveles semejantes se requiere llegar a 500 M de KCN (Figura 10).

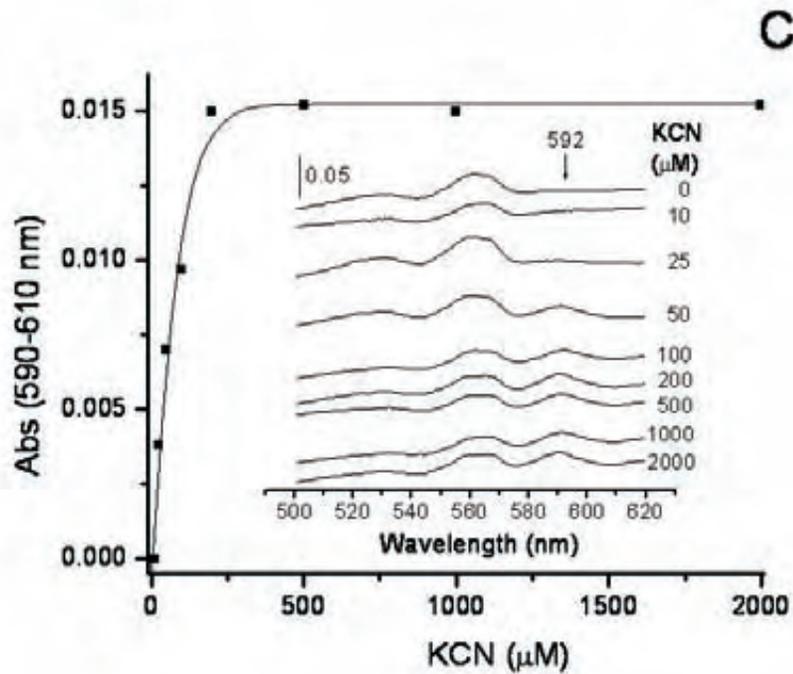


Figura 11. Representación gráfica del efecto hipercrómico del KCN sobre el ferrocitocromo *ba₃* reducido con NADH. La gráfica incluida muestra los espectros que resultan de membranas reducidas con NADH y a concentraciones crecientes de KCN (0-2000mM) menos el espectro oxidado con persulfato. Los espectros fueron registrados a 77 K.

6.5.3 EFECTO HIPERCROMICO INDUCIDO POR KCN.

En el espectro reducido menos oxidado de una oxidasa *ba₃*, la zona alfa presenta un pico pequeño y ancho. Este pico se estrecha y crece a 591nm al agregar KCN. Esta señal representa la unión de KCN al hemo a de alto espín, a esto se le conoce como el efecto hipercrómico y es típico de las oxidasas tipo *ba₃* (Matsushita *et al* 1992, Poole 1983).

El efecto hipercrómico en membranas de *Ga. diazotrophicus* es casi nulo a concentraciones menores de 25 μ M de KCN, presentándose una intensificación progresiva hasta alcanzar saturación a 200 μ M de KCN. Esto refuerza nuestra sugerencia de que el hemo *a* es parte de la oxidasa resistente a KCN pues su interacción con el inhibidor medida como efecto hipercrómico solo se hace evidente después de concentraciones de KCN mayores que 25 μ M (figura 11), concentración que es suficiente para inhibir totalmente a la oxidasa sensible (figura 10), a 50 μ M de KCN se observa un pico definido a 592nm que alcanza su máxima altura a 100 μ M, indicando que la unión del KCN al hemo A de alto espín sólo se da a concentraciones elevadas de KCN. Lo anterior refuerza nuestra propuesta de que el citocromo *ba₃* es la oxidasa resistente a KCN (figura 11).

6.6 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS OXIDASAS TERMINALES.

Todas las evidencias indicaban la presencia de dos ubiquinol oxidasas, citocromo *bb₃* sensible a KCN y citocromo *ba₃* resistente a KCN. Ahora, era necesario constatar la naturaleza citocrómica de las oxidasas, intentando su purificación parcial.

La mayoría de los reportes de purificación de oxidasas terminales de bacterias del ácido acético (Matsushita *et al* 1987, 1990,1992) se ha llevado a cabo utilizando como paso inicial cromatografía de intercambio aniónico (DEAE).

Se obtuvieron membranas de células crecidas en condiciones estándar:

1) Extracción con Tritón X-100 al 1%. Se resuspendió el paquete membranal con amortiguador de fosfatos 50mM, pH 6.5 al cual se le añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1%, la concentración de proteína final fue de 10 mg ml⁻¹. Se incubó por 30

min en hielo y con agitación. Al cabo de la incubación, la preparación fue centrifugada por 60 minutos a 144,000 g. En este paso se rasuran las membranas, eliminándose el conjunto de deshidrogenasas periplásmicas.

2) Solubilización con octilglucopiranosido. El precipitado conteniendo los residuos membranales fue resolubilizado con octilglucopiranosido al 1.25%. Se incubó por 30 minutos en hielo en agitación y entonces fue centrifugado por 60 minutos a 144,000 g.

3) Columna de intercambio aniónico. Al sobrenadante anterior se le agregó buffer de K-fosfatos 50mM, pH 6.5 hasta tener una concentración de 1mg de proteína por ml, esta suspensión fue absorbida a una columna de dietilaminoetil-toyopearl (DEAE-T) previamente equilibrada con una solución de fosfatos 50 mM, pH 6.5 conteniendo octilglucopiranosido al 0.5%.

4. Elusión. La proteína retenida fue liberada por incrementos sucesivos de la molaridad del K-fosfato, manteniendo constante el octilglucopiranosido al 0.5%. Las fracciones colectadas fueron analizadas por su actividad de quinol oxidasa y contenidos de hemos.

6.6.1 Citocromo *bb*₃ sensible a KCN

Una fracción verde pálida que eluyó con 70mM de fosfatos mostró actividad de quinol oxidasa, la curva de titulación con KCN, evidenció la presencia de un solo componente cinético con una $I_{50} = 5 \text{ M}$.

Para establecer la identidad citocrómica de la oxidasa sensible a KCN se realizaron espectros diferenciales a 77 K (ditionita-reducido + KCN vs oxidado-aire). Al observarse en las señales espectrales únicamente citocromos tipo-*b* con picos simétricos a 428 nm y 558 nm, además de la señal a 520 nm, podemos concluir que la oxidasa sensible a KCN es una ubiquinol oxidasa *bb*₃. (Fig. 12)

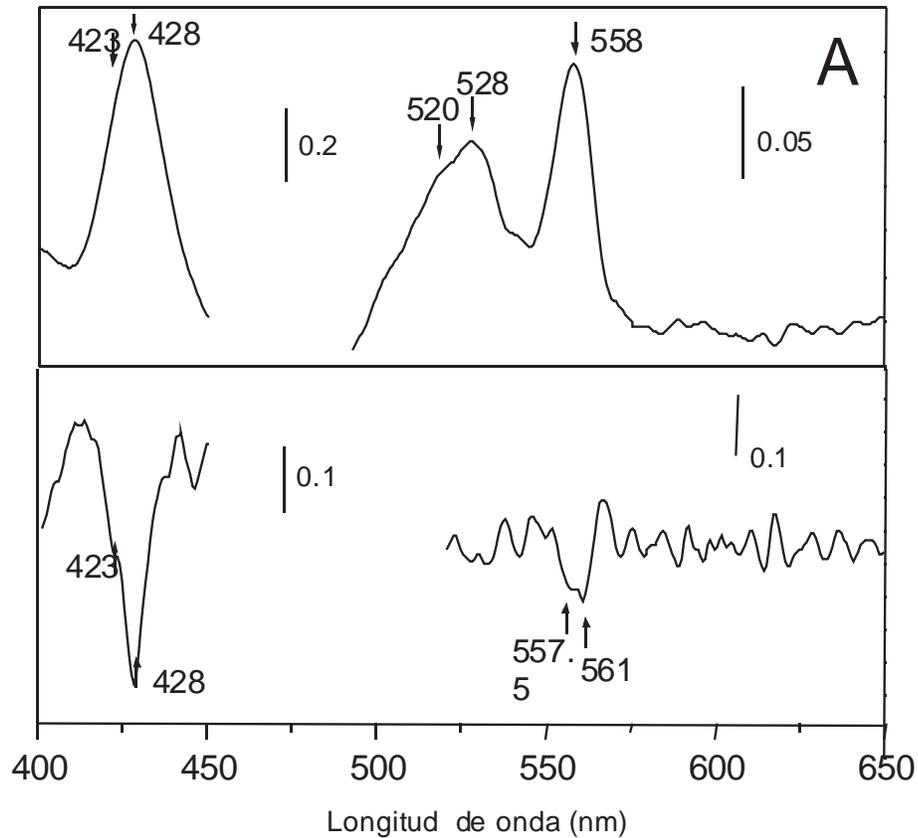


Figura 12. Espectro (77K) de la fracción eluída de DEAE-Toyopearl a 70 mM K-fosfatos, pH 6.5. Fracción con actividad de quinol-oxidasa sensible a KCN ($I_{50}=5 \text{ M}$)
 Arriba. Reducido-ditionita + KCN menos oxidado al aire. Espectro a 77 K.
 Abajo. Segunda derivada del espectro del espectro del panel A.

El análisis de derivadas superiores permite la resolución de espectros complejos (Jones & Poole 1985). Así para definir mejor el patrón espectral se le aplicó la segunda derivada al espectro, mostrando una división del patrón de bandeos espectral en la zona Soret a 423 y 428 nm, así como en la zona a 557 y 561 nm. Sugiriendo la presencia de 2 hemo B, indicando que la oxidasa sensible a KCN ($I_{50}=5 \text{ M}$) es una ubiquinol oxidasa bb_3 .

6.6.2 Citocromo *ba*₃ resistente a KCN.

Una fracción rojiza que eluyó con 300mM de fosfatos mostró actividad de quinol oxidasa. La curva de titulación con KCN mostró un solo componente con una $I_{50}=450$ M.

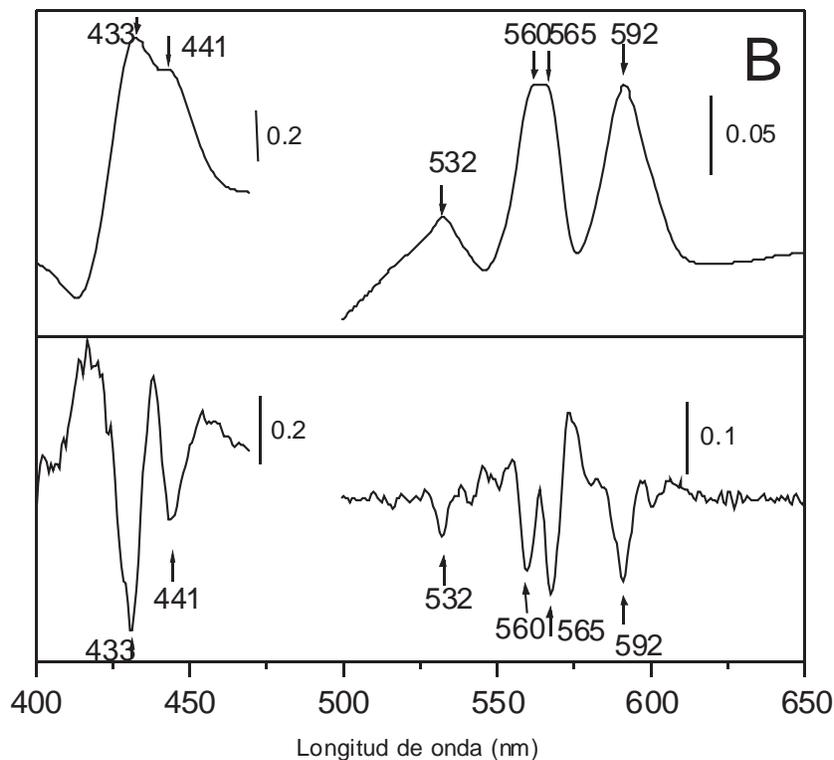


Figura 13. Espectro (77K) de la fracción eluída de DEAE-Toyopearl a 300 mM K-fosfatos, pH 6.5. Fracción con actividad de oxidasa resistente a KCN ($I_{50}=450$ M)
Arriba. Reducido-ditionita+KCN menos oxidado en aire. Espectro a 77 K.
Abajo. Segunda derivada del espectro del panel B.

El espectro de la figura 13 muestra claramente el hombro a 441nm y el efecto hipercrómico a 592nm, la firma espectral típica de *Citocromo ba*₃ purificado de *A. aceti* (Matsushita *et al* 1992), además de los picos a 433, 560 y 565nm. La segunda derivada del espectro de dicha fracción mostró una división de la banda para el citocromo *b* con máximos a 560 y 565nm; también, presente en *A. aceti*. Adicionalmente, la segunda derivada muestra los valles en Soret a 431 y 532 nm que corresponden a un citocromo tipo-*b*.

Todo esto confirma que la oxidasa responsable de la respiración resistente a KCN ($I_{50} = 450 \text{ M}$) es una ubiquinol oxidasa ba_3 .

6.7 Protección respiratoria.

Azotobacter vinelandii expresa un sistema respiratorio muy activo, integrado por componentes desacoplados al bombeo de protones, (NDH-2 y Cyt *bd*) que le permiten mantener los niveles de oxígeno permisibles para que ocurra la actividad de la nitrogenasa y disminuir el nivel redox de la cadena respiratoria (Protección respiratoria). Además, presenta complejos acoplados (NDH-1 y Citocromo bo_3) a la fosforilación oxidativa mediante el gradiente protón-motriz, aportando el ATP necesario para la fijación del nitrógeno. Así, el funcionamiento paralelo permite la actividad diazótropa a elevadas tensiones de oxígeno en el cultivo (Bertzova *et al* 1998).

Entre los componentes desacoplados tenemos a NDH-2 que se encarga de alimentar con electrones a la cadena respiratoria, con alta velocidad. Para evitar el aumento del nivel de reducción de la cadena respiratoria se requiere una vía que consuma electrones con alta velocidad, se es el papel de la oxidasa desacoplada citocromo *bd*. Es decir, para la protección respiratoria se requiere un alimentador desacoplado (deshidrogenasa) y un consumidor desacoplado (oxidasa), cuya función es doble, por un lado, abatir el nivel de oxígeno y por otro, disminuir el nivel de reducción de la cadena respiratoria.

Los componentes acoplados como NDH-1 y citocromo bo_3 funcionan a menor velocidad y son encargados de aportar el ATP necesario para la fijación de N_2 .

En el modelo de protección respiratoria de *Azotobacter vinelandii* se presentan 2 deshidrogenasas primarias, una acoplada (NADH I) y la otra desacoplada (NADH II), además de

consumidores finales de electrones acoplados (*Citocromo bo_3*) y desacoplados (*Citocromo bd*).

6.7.1 ENZIMAS SOMETIDAS A CONTROL RESPIRATORIO.

Para corroborar el modelo de protección respiratoria de *Azotobacter vinelandii*, se hizo un primer acercamiento a la capacidad del bombeo de protones de las enzimas con mayor nivel de expresión en condiciones de fijación de nitrógeno, GDH y NDH1 como alimentadores primarios y Cyt *bb₃* con Cyt *ba₃* como consumidores finales de electrones.

En nuestro sistema, el conjunto de deshidrogenasas periplásmicas son incapaces del traslado vectorial de protones y nuestros experimentos preliminares con inhibidores mostraban una NDH I (acoplada al bombeo de protones, de acuerdo a los reportes de la literatura), esto sería equivalente a los donadores primarios de *A. vinelandii*. En *Ga. diazotrophicus* se presentan dos oxidasas terminales, si se presenta una protección respiratoria de acuerdo al modelo de *A. vinelandii*, una de ellas debe ser desacoplada y la otra sometida a control respiratorio. Por tanto se consideró necesario determinar cuál de las dos oxidasas es estimulada por un desacoplante.

Con base al modelo de protección respiratoria en *Azotobacter vinelandii* se juzgó importante explorar la función de las dos oxidasas identificadas en células íntegras y tener un primer acercamiento a su capacidad de bombeo de protones.

6.7.1.1 Inhibición diferencial de Citocromo *bb₃* y Citocromo *ba₃*

Al llevar a cabo la titulación con KCN de la actividad de glucosa oxidasa en células enteras de *Ga diazotrophicus*, se observó una curva bifásica con una caída drástica del 60% de la actividad respiratoria original a concentraciones de KCN menores que 10 M, sugiriendo la participación de una oxidasa terminal sensible a KCN

(ie. citocromo bb_3). Después de 10 μ M KCN, la respiración remanente (40%) ya no se inhibe, aún a una concentración de 200 μ M de KCN. Por tanto, esta respiración resistente a KCN debe ser el resultado de la función de la oxidasa ba_3 . Es decir a concentraciones mayores que 10 μ M de KCN solo la oxidasa ba_3 sigue funcionando. Dado lo anterior, ahora era deseable encontrar una condición en que la oxidasa ba_3 permaneciera inhibida mientras que la oxidasa bb_3 estuviera funcionando.

La titulación con CO de la actividad de glucosa oxidasa provocó una caída de la respiración al 70% de la respiración inicial. Para probar si este efecto se da sobre distintas enzimas se repitió la titulación con CO, pero ahora en presencia de 50 μ M de KCN (solo citocromo ba_3 activo), resultando en un caída aditiva de la respiración hasta el 10% de respiración inicial, sugiriendo que el CO afecta principalmente al citocromo ba_3 . Es decir, a concentraciones elevadas de KCN (mayor a 5 μ M) sólo permanece activa la oxidasa *citocromo ba_3* , mientras que a concentraciones elevadas de CO sólo es activa *Citocromo bb_3* . Cuando están presentes ambos inhibidores (ie. KCN 50 μ M y CO 50%) ambas oxidasas son inhibidas (Fig. 14).

6.7.1.2 Citocromo ba_3 y el efecto del desacoplante CCCP.

Los desacoplantes transportan protones a través de las membranas hasta igualar la concentración de H^+ en ambos lados de la membrana. Por tanto, se incrementa la velocidad en el transporte de electrones de las vías respiratorias acopladas al bombeo de protones ya que liberan a la vía del control respiratorio, Del mismo

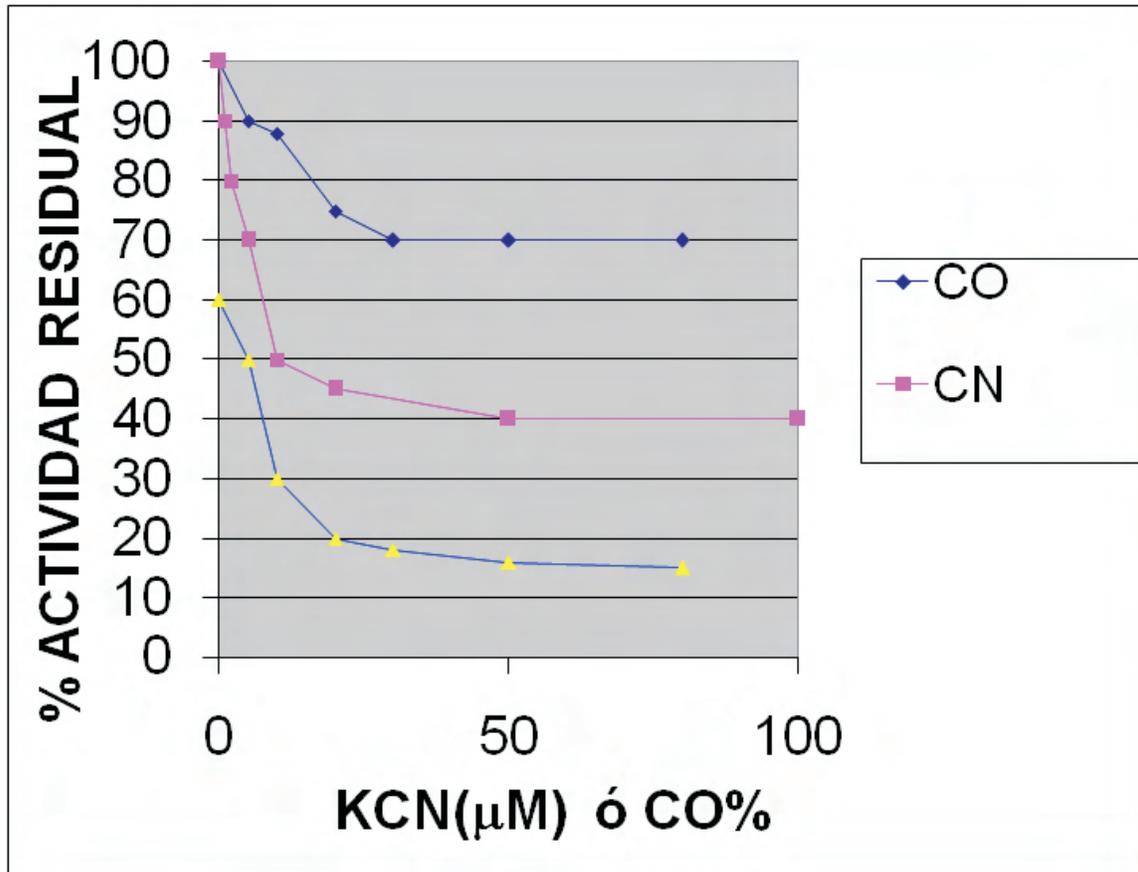


Figura 14. Efecto del CO y CN sobre actividad de glucosa oxidasa en células de *Ga. diazotrophicus* cultivada en condiciones estandar. En la curva en la que se utilizaron los dos inhibidores se mantuvo constante el KCN a 50 μ M

modo, las cadenas de transporte de electrones cuya función no depende del control respiratorio (por ejemplo enzimas desacopladas), no son aceleradas por los desacoplantes.

A concentraciones de KCN mayores de 4 μ M se encuentra inhibida la oxidasa bb_3 y entonces, la respiración es llevada a cabo por citocromo ba_3 ; sí citocromo ba_3 funciona acoplado al bombeo de protones, entonces la respiración será estimulada por un desacoplante (CCCP).

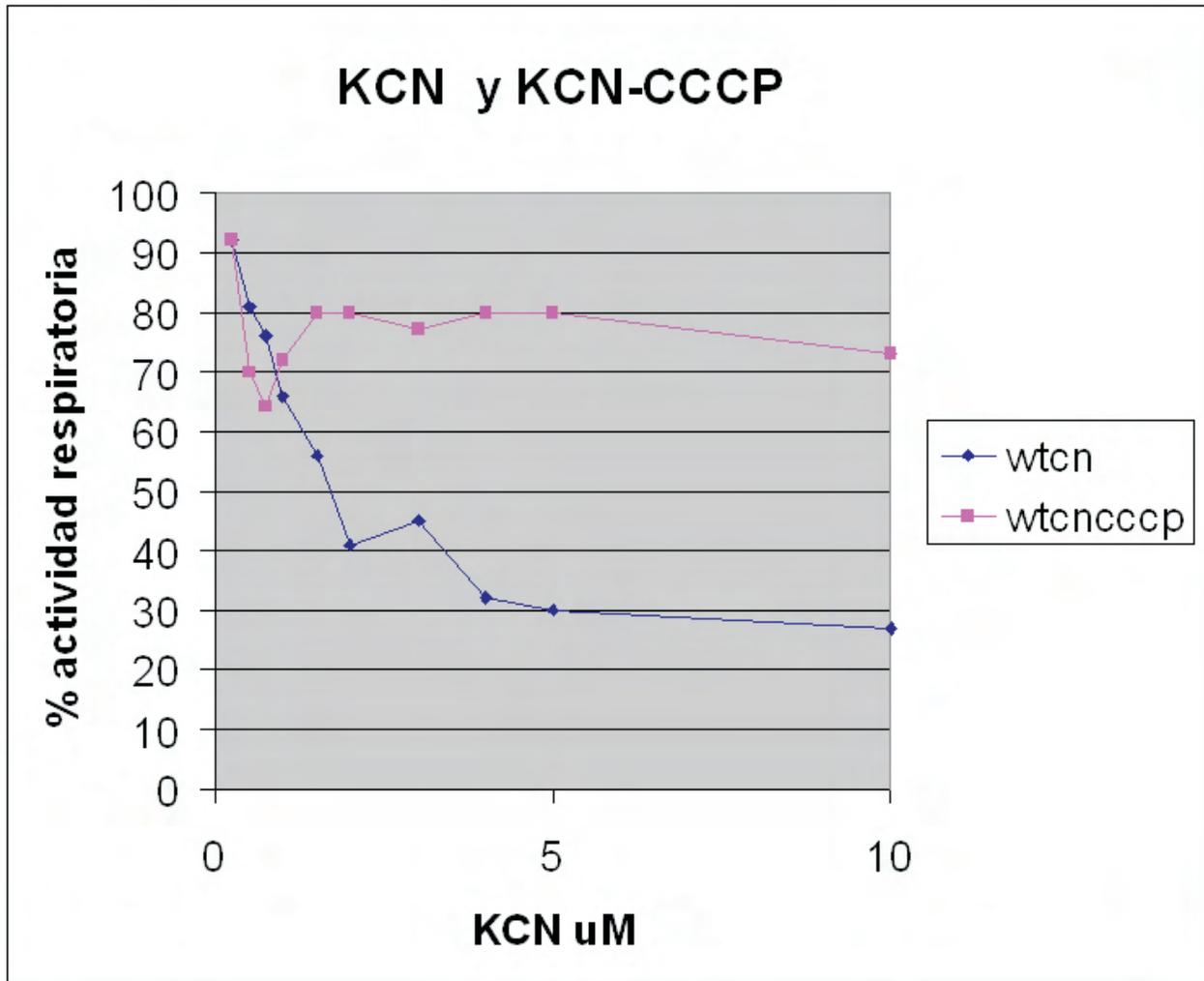


Figura 15. Efecto del CCCP y KCN sobre la actividad de glucosa oxidasa en células de *Ga. diazotrophicus Pal5*.

En la preparación WT + CCCP la concentración de CCCP (80 μ M) se mantuvo constante y sobre ella se hizo la titulación con el KCN.

WT: *Ga. diazotrophicus Pal5* silvestre

WTCN: *Ga. diazotrophicus Pal5* silvestre + KCN

WTCN: *Ga. diazotrophicus Pal5* silvestre + KCN + CCCP (80 μ M)

Se llevó a cabo la titulación con KCN de la actividad de glucosa oxidasa en presencia de un desacoplante (CCCP 80 μ M). La curva de titulación mostró nula estimulación de la respiración a concentraciones menores que 1 μ M de KCN, pero a partir de esa concentración se observó un claro efecto estimulante que llegó a su máximo a una concentración de 4 μ M de KCN.

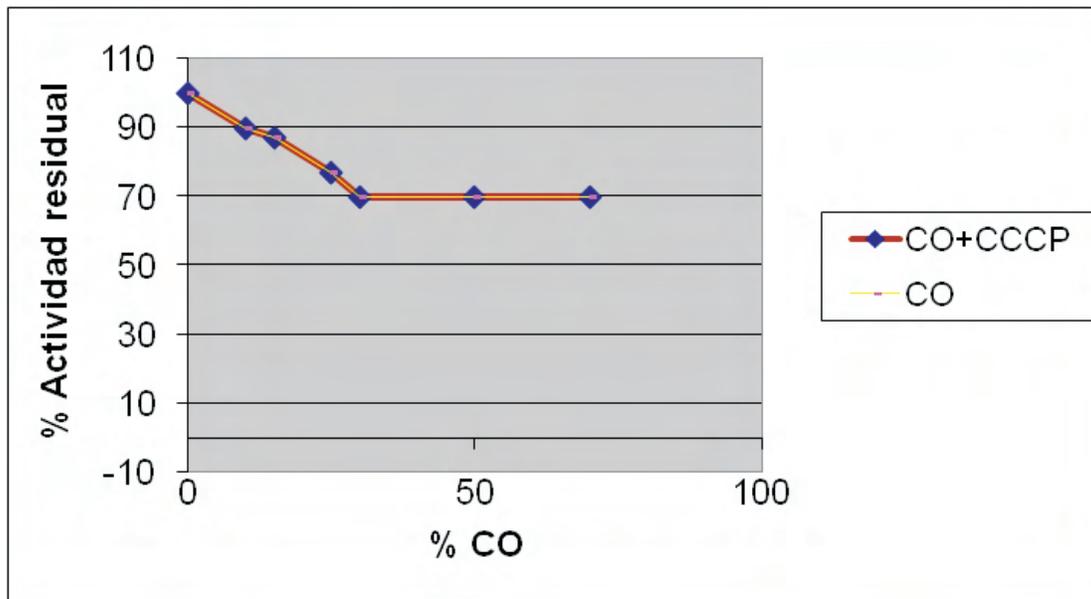


Figura 16. Efecto del CCCP y CO sobre la actividad de glucosa oxidasa en células de *Ga. diazotrophicus*.

La concentración añadida de CCCP (80 μ M) se mantuvo constante en la preparación Células + CCCP y sobre ella se hizo la titulación con CO.

Las respuesta hacia el CCCP fue nula, por lo que las graficas están encimadas.

Este efecto estimulante parece corresponder a la liberación de la respiración catalizada por la oxidasa KCN-resistente (citocromo ba_3) que se encuentra frenada por el control respiratorio (Figura 15).

6.7.1.3 Citocromo bb_3 y el efecto del desacoplante CCCP.

Al llevar a cabo la titulación con CO de la actividad de glucosa oxidasa en presencia de un desacoplante (CCCP 80 μ M), no se observó diferencia entre las curvas con ó sin desacoplante, sugiriendo que *citocromo bb_3* es una enzima desacoplada y por tanto no translocaría protones (Fig. 16).

VII. DISCUSIÓN

7.1 Quinona.

Las bacterias del ácido acético utilizan ubiquinonas como aceptores de electrones para las deshidrogenasas membranales, de las cuales algunas tienen su sitio activo orientado hacia el citoplasma y otras hacia el espacio periplásmico. La identificación del tipo de quinona se ha empleado como un sólido criterio taxonómico. Así, el género *Acetobacter* posee ubiquinona-9 (Q₉), mientras que el género *Gluconacetobacter* posee Q₁₀. En ambos casos el subíndice indica el número de unidades isoprenoides presentes en la cadena lateral (Yamada *et al* 1997).

El análisis cromatográfico por HPLC de la quinonas extraídas con n-pentano de membranas confirmó la asignación previa de nuestra cepa como un *Gluconacetobacter*. Se evidenció la presencia de Q₁₀ como la quinona predominante y a Q₉ en pequeñas cantidades (10%). La presencia de quinonas de longitud isoprenoide menor a la quinona predominante es algo común (Crane and Barr 1985).

Adicionalmente nuestro cromatograma mostró un pico que se eluye más rápido que las ubiquinonas y que de acuerdo con los estándares utilizados corresponde a PQQ, que es el grupo prostético de las deshidrogenasas quinoproteínas.

Para demostrar el papel de Q₁₀ como mediador en el transporte de electrones entre las deshidrogenasas y las quinol oxidasas terminales, se destruyó a la Q₁₀ por irradiación con luz UV_{360nm}. La destrucción de Q₁₀ abatió las actividades de oxidasa para todos los sustratos ensayados y el daño es directamente proporcional al tiempo de irradiación, con un 10% de la actividad de oxidasa

remanente. Dado que todas las oxidasas decaen con pendientes semejantes, podemos asegurar que para todas las vías ensayadas existe un mismo componente fotosensible, la UQ₁₀. Una cinética de inactivación similar se presenta en *Thiobacillus thiooxidans* (Adair 1968) y en *Aerobacter aerogenes*, la inactivación fue menos eficiente. (Knook & Planta 1971).

El análisis de la actividad de oxidasas nos representa el impacto que tiene la destrucción de la quinona sobre la cadena respiratoria en su conjunto. De esta manera, también decidimos examinar el impacto de la fotoirradiación sobre las deshidrogenasas individuales, usando para esto, un ensayo de actividad con colorantes redox (PMS-DCPIP) que sólo mide la actividad de la deshidrogenasa ensayada. Este ensayo fue necesario pues hay que recordar que varias de las deshidrogenasas contienen PQQ como grupo prostético y por tanto susceptible a la fotoinactivación. La evaluación de las actividades de deshidrogenasa de membranas fotoirradiadas confirmó nuestro pronóstico pues aquellas enzimas que son quinoproteínas: GDH, ADH y ALDH resultaron inactivadas en un 50% después de 45 minutos de irradiación y en 60% después de 120 minutos.

La NADH-DH que no contiene PQQ asociado fue considerablemente más resistente a la fotoirradiación pues después de 120 min sobrevive un 70% de la actividad.

Los análogos de quinona con cadena isoprenoide variables han mostrado ser biológicamente funcionales en la restauración de la actividad respiratoria de *Sacharomyces cerevisiae*, aunque la quinona endógena, la Q₆, mostró la mas alta actividad (Okada *et al* 1998).

La recuperación de la actividad respiratoria con análogos de quinona en nuestras membranas fotoirradiadas mostró una dependencia con el parecido estructural de la quinona original. El orden en la eficiencia de reactivación fue: Q₂>Q₁>Q₀ y finalmente el DeUQ. Así el número de isoprenos asociados a la Q parece ser el determinante en la eficiencia como aceptor de electrones en esta cadena respiratoria.

En proteoliposomas se ha reconstituido la actividad de glucosa oxidasa con GDH, Citocromo *bo* y Q₁₀ purificadas de *Gluconobacter suboxydans*. (Matsushita *et al* 1989b). Además es posible la reconstitución en solventes acuosos con Q₃-Q₁ a una velocidad significativa y también, con Q₉ ó Q₁₀, si se utiliza octilglucósido como agente dispersante. (Matsushita *et al* 1992)

7.2 NADH deshidrogenasa

En la literatura se ha reportado que rotenona y capsaicina son inhibidores típicos de enzimas tipo NDH-1 y la flavona como inhibidor de enzimas NDH-2. Las NDH-1 poseen un sitio de acoplamiento energético asociado, mientras que las NDH-2 no lo presentan (Yagi 1990).

La determinación de la sensibilidad a inhibidores específicos es uno de los primeros acercamientos para definir el tipo de NADH-DH presente.

La curva de inhibición para la actividad de NADH oxidasa sugiere la presencia de una NDH-1, porque la inhibición con rotenona es potente y monofásica. La capsaicina tuvo un efecto intermedio pero semejante a otras NDH-1 reportadas en la literatura (Satoh *et al* 1996), y por otro lado, la flavona como inhibidor típico de NDH-2 solo produjo una inhibición marginal, no significativa.

En *Azotobacter vinelandii* se presentan los dos tipos de NADH-DH:

NDH-1 es sensible a capsaicina ($I_{50}=12.7 \text{ M}$) y es capaz del translocamiento vectorial de protones. Su expresión es estimulada por bajas tensiones de oxígeno y concentraciones elevadas de NH_4^+

NDH-2 presenta 50 % de la actividad de oxidasa inicial a 200 M de capsaicina, no contribuye al gradiente protón motriz y se expresa en mayor proporción a elevadas tensiones de oxígeno y baja

concentración de NH^{4+} , es decir es un componente desacoplado que participa en la protección respiratoria (Bertsova *et al* 1998).

Nuestros resultados con inhibidores de NADH-DH sugieren que en *Ga. diazotrophicus* no hay una NADH-2 y esto a pesar de que las condiciones de cultivo implican intensa aereación. Es posible que la GDH periplásmica, como la principal deshidrogenasa primaria durante el crecimiento en sacarosa, desempeñe el papel de la NADH-2 en *A. vinelandii*.

7.3 RESPIRACIÓN RESISTENTE A KCN.

Para determinar los componentes involucrados en la respiración resistente y sensible a KCN se titularon con KCN la actividad de oxidasa para glucosa, etanol, acetaldehído y NADH de membranas de *Ga. diazotrophicus* (figura 17).

Las curvas de titulación de las actividades de oxidasa con KCN para glucosa, etanol, acetaldehído y NADH muestran dos componentes cinéticos: uno resistente y otro sensible a KCN. Las curvas de inhibición son muy parecidas, lo que implica que todas las vías de oxidación hacen uso parecido de las oxidasas terminales. Sin embargo, se observó una diferencia importante cuando se utilizó tetraclorohidroquinol (TCHQH_2 reducida por ascorbato) como donador de electrones. En este caso, el KCN mostró un fuerte efecto inhibitorio ($I_{50} = 2.5 \text{ M}$) y una cinética monofásica lo que sugiere que el TCHQH_2 es oxidado, casi exclusivamente, por la oxidasa sensible a KCN. En *Gluconobacter suboxydans* se ha demostrado que GDH, ADH y NADH participan de forma similar en la respiración sensible y resistente a KCN y la principal diferencia se da a nivel de oxidasa terminal (Ameyama *et al* 1987).

7.4 LA SII-ADH Y LA RESPIRACION RESISTENTE A KCN.

Las curvas de titulación con KCN para la actividad de glucosa oxidasa en membranas de células crecidas en condiciones de expresión normal, elevada o nula para citocromo *c* resultaron ser muy similares, sugiriendo fuertemente que el citocromo *c* no es un componente de la vía resistente a KCN, contrario a lo reportado por Matsushita et al. (1989) en *G. suboxydans*, ya que las condiciones que sobreexpresan citocromo *c* en esta cepa también son válidas para *Ga diazotrophicus*, no así la manifestación de la respiración resistente a KCN que se expresa de manera paralela a los niveles del citocromo *c* en *G. suboxydans* (Matsushita et al 1989).

En el caso de *G. suboxydans*, existen evidencias bioquímicas y genéticas que sugieren el papel central de la SIIADH en la respiración KCN resistente (Ameyama et al 1987), en cambio en *Ga diazotrophicus* el mutante *C6* que carece de actividad de ADH y el mutante *Mad22* (Citocromo *c*) indican que este paradigma no es válido en *Ga diazotrophicus*. Además se ha demostrado en *G. suboxydans* que el citocromo *c3* de la subunidad II (*CII₃*) no parece estar involucrado en el transporte de electrones a la quinona y se ha sugerido que podría participar en la alimentación de la oxidasa resistente a cianuro. (Matsushita et al 1996, Frebortova et al 1998)

7.5 OXIDASAS TERMINALES.

La capacidad de una hemoproteína para formar aductos con CO que resulten fotodisociables es indicativo de la presencia de una oxidasa terminal, cuyas señales espectrales son características del tipo de citocromo presente (Jones and Poole 1985). Así, el CO reacciona con nuestras membranas reducidas para formar un aducto que da la firma espectral de un complejo *a*-CO. Este complejo fue

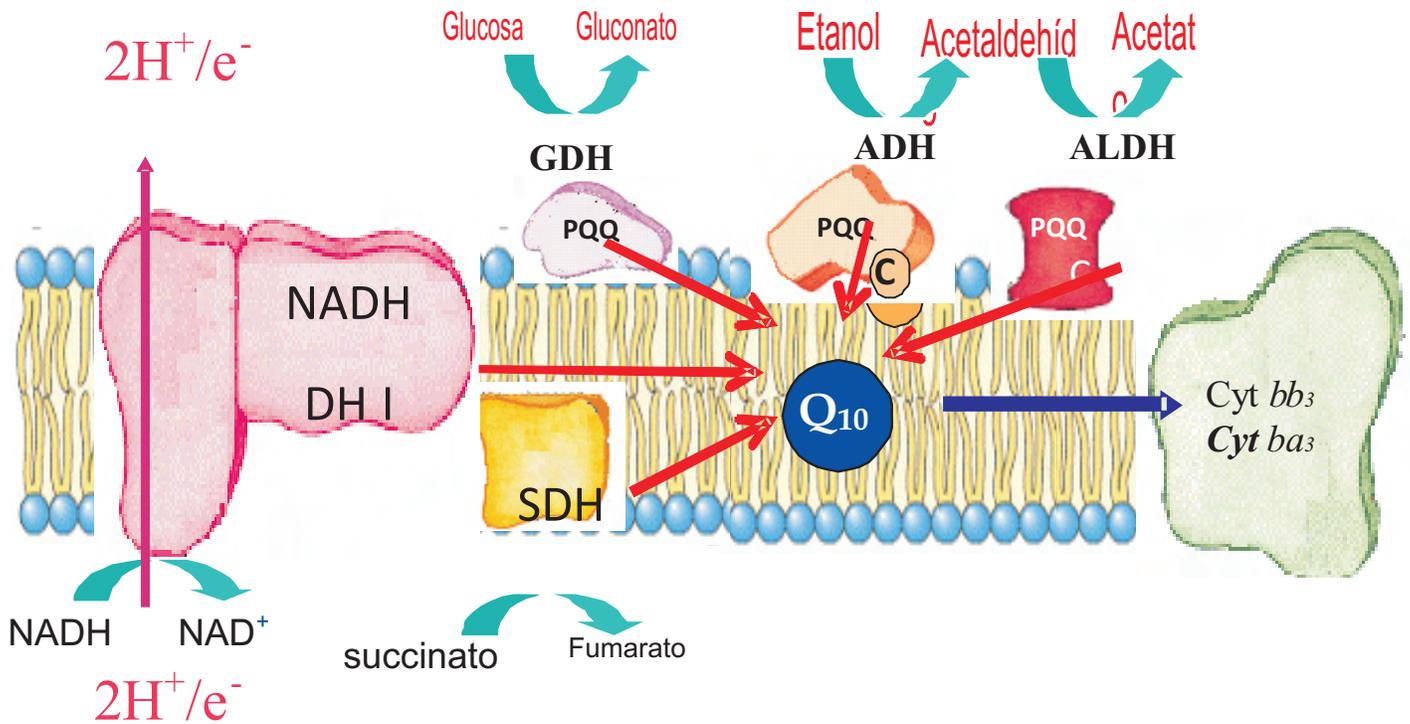


Figura 17. Sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* Pal5.

Se pone énfasis en el sistema de deshidrogenasas, las cuales participan de forma similar en la respiración resistente y sensible a KCN y todas tienen como aceptor común de electrones a Q₁₀. El quinol generado es oxidado por Cyt *bb*₃ y Cyt *ba*₃ sin involucrar a ningún citocromo c. Cyt *bb*₃ es la oxidasa sensible a KCN y resistente a CO. Cyt *ba*₃ es la oxidasa resistente a KCN y sensible a CO

claramente disociado por luz blanca y el producto de la fotodisociación confirma nuevamente la presencia de citocromo *a* en el centro binuclear de una oxidasa terminal tipo citocromo *ba*₃ (también llamada citocromo *a*₁ en bacterias acéticas).

Un análisis detallado del espectro diferencial de CO (reducido-ditionita + CO menos ditionita) y su espectro de fotodisociación sugirió la presencia de un segundo aducto que podría contener un citocromo *b* ó un citocromo *o* reactivos con CO, mostrando un pico pequeño a 563nm y un valle a 428nm, esto es indicativo de la

fotodisociación limitada de aductos citocromo *b*-CO o bien, aductos citocromos *o*-CO. (Wood 1984). Las señales espectrales del hemo O y hemo B son idénticas y no es posible diferenciarlos por su interacción con ligandos externos (CO, KCN), ya que presentan firmas espectrales similares. Los reportes de Cyt *bo*₃ de *G. suboxydans*, de *A. vinelandii* (Yang *et al* 1996, Wong *et al* 1984), *E. coli* (Kita *et al* 1984) y *Ps. Aeruginosa* (Matsushita *et al* 1982) presentan al espectro reducido + CO – reducido con picos a 416 nm, 535-538 nm y 560-565 nm y un valle a 416 nm, que a su vez son similares a las señales espectrales de Citocromo *cbb*₃ de *Azorhizobium caulinodans* (Kaminski *et al* 1996), *Bradirhizobium japonicum* (Preisig *et al* 1996) ya que el espectro reducido + CO – reducido presenta picos a 416 nm, 535-538 nm, 560 565 nm y valle a 430 nm, y solo se presenta interferencia por un citocromo *c* con señales de un hombro a 410 nm y el desplazamiento del valle de 416 a 430 nm.

Inclusive hemo B y hemo O purificados al formar hemocromógenos con piridina presentan señales espectrales muy similares con picos a 398 nm y 555 nm para hemo B, y 394.5 nm y 551 nm para hemo O (Sone *et al* 1985, Matsushita *et al* 1992), por lo que la evidencia de mayor peso en su identificación en una hemoproteína es la extracción de hemos y análisis por HPLC-PR (Jones & Poole 1985).

Desde el primer ensayo consideramos que el citocromo reactivo con CO tendría que ser un citocromo *b* pues nuestros análisis de hemos previos por HPLC demostraban que *Ga diazotrophicus* no contiene hemo O en sus membranas (Flores-Encarnación 1999). Así, la fórmula citocrómica de la nueva oxidasa detectada tendría que ser un citocromo *bb*₃.

El espectro Reducido + CO – reducido de membranas de *Ga diazotrophicus* presenta las señales típicas de citocromo *ba*₃ y citocromo *bo*₃ (que son similares a las de citocromo *bb*₃) fusionadas, indicando la presencia de un hemo A y un hemo B reactivo con CO y fotodisociable, esto se vuelve confuso en la región Soret ya que la

señal de *citocromo bb₃* es enmascarada por *citocromo ba₃*, pero la interferencia es puesta de manifiesto por la forma del espectro siendo ancha en comparación al espectro reportado para *citocromo ba₃* y *citocromo bo₃*, implicado el enmascaramiento de dos especies reactivas con monóxido: *citocromo ba₃* con pico a 421 nm y valle a 444 nm y *citocromo bo₃* con pico a 415 nm y valle a 430 nm. (Matsushita *et al* 1992).

La oxidación de *Citocromo bb₃* se inhibe a concentraciones menores que 25 M, mientras que la oxidación de *citocromo ba₃* se inhibe a concentraciones mayores que 200 M. Esto sugiere que *Citocromo ba₃* es la oxidasa resistente a KCN y es confirmado por el efecto hipercrómico a 589 nm inducido por KCN en oxidasas terminales tipo-*ba₃*, (Poole 1983, Matsushita *et al* 1992), que sólo se presenta a concentraciones mayores a 50 M alcanzando saturación a 200 M, esto es similar a los reportes en otras bacterias del ácido acético, que muestran al *citocromo bo₃* como la oxidasa sensible a KCN con *Ki* de 2.8, 2.2 y 38 M de KCN para *Citocromo bo₃* de *G. suboxidans*, *Acidomonas (Acetobacter) methanolica* y *Acetobacter aceti* respectivamente (Matsushita *et al* 1987, 1992b, 1992^a, 1990 y a *citocromo ba₃* como la oxidasa resistente a KCN en *Acetobacter aceti* (*ki* = 74 M, Matsushita *et al* 1992).

7.6 Separación cromatográfica de *Citocromo bb₃* y *Citocromo ba₃*.

Para confirmar la presencia y función como oxidasas de *citocromo bb₃* y *citocromo ba₃* se decidió intentar la solubilización y purificación parcial de los citocromos mencionados.

Se utilizó una columna DEAE-Toyopearl de intercambio aniónico, a la cual se le aplicó una muestra solubilizada en octilglucopiranosido, que fue eluída por pasos, con concentraciones crecientes de fosfato de potasio pH 6.5 + glucopiranosido al 0.5%.

El mismo procedimiento ha sido utilizado para la purificación

de citocromo bo_3 de *A. aceti*, *G. suboxydans* y *A. methanolicus* y de citocromo ba_3 de *A. aceti* (Matsushita *et al* 1987b, 1992b, 1992^a, 1990)

Una fracción verde pálida que eluyó con 70mM de fosfatos mostró actividad de quinol oxidasa con una $I_{50} = 5 \text{ M}$ a KCN, ésto similar a otras oxidasas bo_3 con K_i de 2.8 M y 2.2 M en *G. suboxydans* (Matsushita *et al* 1987) y *A. methanolicus* (Matsushita *et al* 1992d) e inferior a Cyt bo_3 de *A. aceti* con una $k_i = 38 \text{ M}$ (Matsushita 1992 a). Al observarse en las señales espectrales únicamente citocromos de tipo *b* sugiere que la oxidasa sensible a KCN es una ubiquinol oxidasa bb_3 , además el efecto del KCN sobre el espectro reducido-oxidado es idéntico al espectro reducido + KCN – oxidado, semejante a otras oxidasas bo_3 purificadas. (Matsushita *et al* 1992, Daniel *et al* 1970)

Una fracción rojiza que eluyó con 300 mM de fosfatos mostró actividad de quinol oxidasa y las características espectrales típicas de citocromo ba_3 , con el efecto hipercrómico a 589 nm inducido por KCN en las oxidasas tipo ba_3 (Poole 1983, Matsushita 1992) La curva de titulación con KCN mostró una $I_{50} = 450 \text{ M}$, comprobando que Citocromo ba_3 es la oxidasa resistente a KCN. En *A. aceti* la oxidasa ba_3 purificada tiene una $k_i = 74 \text{ M}$

7.7 Control respiratorio

El efecto diferencial de inhibidores específicos para enzimas que catalizan la misma reacción, es uno de los primeros indicativos para determinar el papel de la actividad de dicha enzima sobre la ruta metabólica. La purificación parcial de ambas enzimas mostró que citocromo ba_3 es la oxidasa resistente a KCN ($K_{50} = 450 \text{ M}$), mientras que el Citocromo bb_3 la enzima sensible a KCN ($K_{50} = 5 \text{ M}$).

Al llevar a cabo la titulación con KCN de la actividad de glucosa oxidasa de células enteras de *Ga diazotrophicus*, se observa una curva bifásica con una caída drástica del 60% de la actividad respiratoria original a concentraciones de KCN menores a 10 μ M, indicando la presencia de una oxidasa terminal sensible a KCN (*citocromo bb₃*) y una respiración estable hasta 200 μ M de KCN, representando el 40% de la actividad original, indicando la presencia de una oxidasa terminal resistente a KCN (*Citocromo ba₃*). Cuando el experimento se repite en presencia del desacoplante CCCP 80 μ M, la estimulación de la respiración solo se presenta a concentraciones mayores de 2 μ M (inhibición de *citocromo bb₃*) y a 10 μ M de KCN, se presenta una estimulación de la respiración del 100 %, sugiriendo que la enzima sometida a control respiratorio es el *citocromo ba₃*.

El control de la velocidad de la respiración se da por el grado de desequilibrio entre el potencial redox desarrollado en las regiones traslocadoras de protones de los componentes de la cadena respiratoria y el gradiente protón-motriz (Ferguson 1980).

Un desacoplante aumenta la permeabilidad de la membrana hacia los H⁺, provocando un aumento de la actividad respiratoria de los componentes acoplados, hasta que se abate el gradiente protón motriz (Pérdida del control respiratorio).

Para llevar a cabo la protección respiratoria se requiere la presencia de al menos dos oxidasas terminales, una de ellas acoplada al bombeo de protones (aporta el ATP) y otra desacoplada (disminuye la tensión de oxígeno a niveles permisibles para la nitrogenasa).

Para determinar la contribución del citocromo *bb₃*, al gradiente protón-motriz se necesita inhibir la actividad de *citocromo ba₃*.

Al llevar a cabo la titulación con CO se observa una caída de la respiración del 30%, al repetir la titulación ahora en presencia de KCN 50 μ M constante, se presenta un abatimiento del 85% de la respiración inicial, sugiriendo que el CO afecta específicamente a *citocromo ba₃*. La titulación de la actividad de glucosa oxidasa con

CO con o sin CCCP 80 M constante mostró la misma curva, sugiriendo que *citocromo bb₃* no trasloca protones.

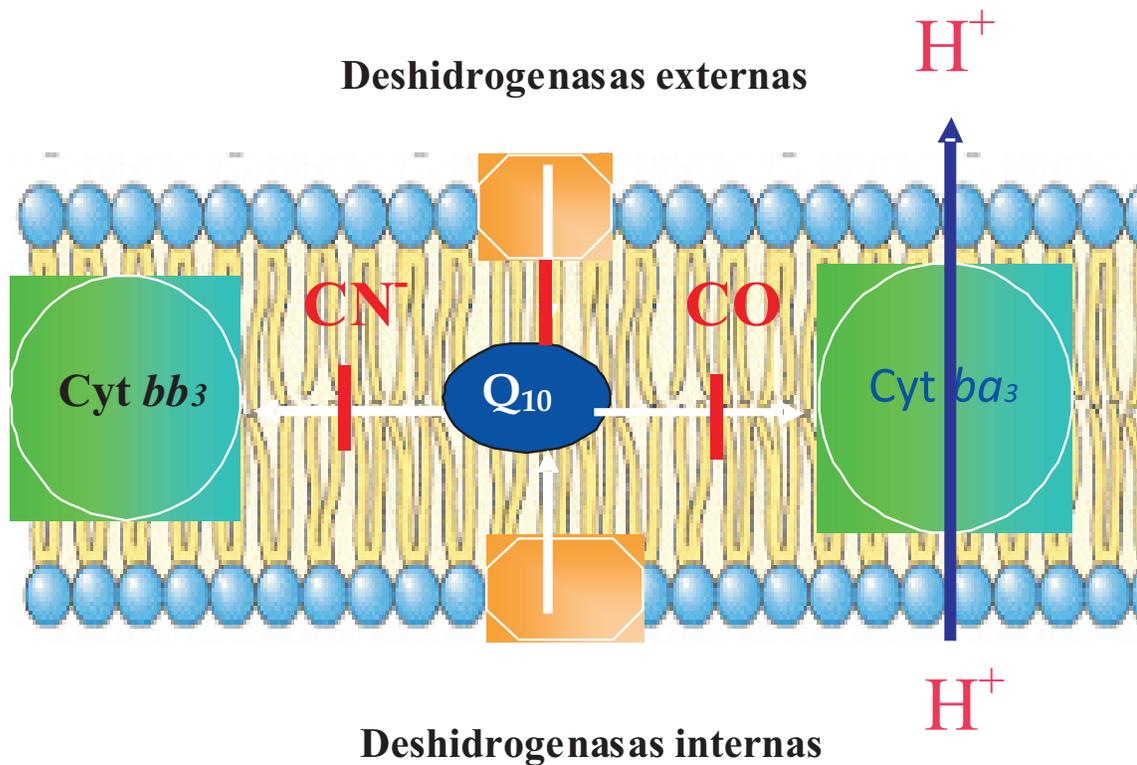


Figura 18. Las oxidasas terminales de *Ga. diazotrophicus* Pal5.

Cyt *bb*₃ es una ubiquinol oxidasa desacoplada al bombeo de protones ($1\text{H}^+/1\text{e}^-$, sensible a KCN y resistente a CO).

Cyt *ba*₃ es una ubiquinol oxidasa acoplada al bombeo de protones ($2\text{H}^+/1\text{e}^-$, resistente a KCN y sensible a CO).

7.8 Protección respiratoria.

En la mayoría de las bacterias sus cadenas respiratorias son ramificadas, con diversidad a nivel de deshidrogenasas primarias, las cuales presentan diversos grados de eficiencia en el traslocamiento de protones (Jaworowki *et al* 1981), además de diversas oxidasas terminales con diferentes afinidades por oxígeno y variación en su capacidad de bombeo de protones (Meyer *et al* 1973).

Si la bacteria se encuentra en un medio con sustrato limitado, una cadena respiratoria acoplada será un factor de sobrevivencia, pero al cambiar la concentración del sustrato (en exceso), se favorece la expresión de componentes desacoplados, para consumir sustrato disponible en el exterior y regenerar NAD. que permite un flujo apropiado a través de la glucólisis, para aportar metabolitos necesarios para la biosíntesis (Neijssel *et al* 1994).

En este estudio se sugiere que a nivel de deshidrogenasas primarias acopladas al bombeo de protones tenemos a NDH-1 ($4\text{H}^+/2\text{e}^-$) y entre las desacopladas a GDH ($1\text{H}^+/2\text{e}^-$).

A nivel de las oxidasas terminales tenemos a los citocromos ba_3 , sensible a CO, resistente a CN y acoplado al bombeo de H^+ ($4\text{H}^+/2\text{e}^-$) y al Citocromo bb_3 sensible a KCN y resistente a CO y desacoplado al bombeo de protones ($2\text{H}^+/2\text{e}^-$).

Para llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno se requiere de una cadena respiratoria acoplada, por lo que el mayor flujo de electrones se debe de dar a través de los componentes acoplados NDH-1 y Citocromo ba_3 , como ha sido sugerido por Luna *et al* (2000), ya que en condiciones de fijación de N_2 (glucosa / N_2) tiene una eficiencia de producción de ATP ligada a la cadena respiratoria P:O = 0.78, en cambio a elevadas tensiones de oxígeno o en presencia de glucosa/ NH_3 se favorece la cadena respiratoria desacoplada GDH y Citocromo bb_3 , con una P:O = 0.58 (Luna *et al* 2000).

Si consideramos los valores teóricos de H^+/e^- para NDH-1 = 2, GDH = 1/2, citocromo ba_3 = 2 y Citocromo bb_3 = 1, podríamos tener una cadena con un $\text{H}^+/\text{e}^- = 1\frac{1}{2}$, si solo funciona GDH y Citocromo bb_3 (y la función de la cadena respiratoria sería la regeneración de NAD y el abatimiento de O_2) o un $\text{H}^+/\text{e}^- = 4$ si solo intervinieran citocromo ba_3 y NDH-1, cuya función sería aportar ATP, entonces la expresión simultanea y la regulación eficaz del flujo de protones permite un amplio rango de acoples (H^+/e^- de $1\frac{1}{2}$ y hasta 4) y por tanto la fijación biológica del nitrógeno en cultivos con una variación amplia en la concentración de O_2 . Esto sería concordante con el modelo de protección respiratoria propuesto en *Azotobacter vinelandii* (Bertzova *et al* 1997, 1998)

VIII. CONCLUSIONES

1. La ubiquinona Q_{10} es el aceptor común de electrones para las deshidrogenasas orientadas hacia el citoplasma y periplasma.
2. El ubiquinol Q_{10RED} de *Gluconacetobacter diazotrophicus* es el donador único de electrones para las oxidasas terminales.
3. La NADH-quinona oxidorreductasa es una enzima tipo NDH-1 (sensible a rotenona) y probablemente acoplada.
4. La sobreexpresión de Citocromo *c* o su expresión nula no afecta la respuesta bifásica de la respiración al KCN. Por tanto citocromo *c* (SII-ADH) no es componente obligado de la vía resistente a KCN.
5. Los sustratos fisiológicos etanol, glucosa, acetaldehído y NADH, alimentan en igual proporción las vías resistente y sensible a KCN.
6. La cinética de titulación con KCN de la oxidación de citocromos demostró que la oxidasa sensible contiene citocromo *b* y la oxidasa resistente citocromo *a*
7. La separación cromatográfica de las quinol oxidasas, distingue al citocromo bb_3 como la sensible a KCN ($I_{50} = 5 \text{ M}$) y al citocromo bq como la resistente a KCN ($I_{50} = 450 \text{ M}$).
9. Experimentos preliminares con desacoplantes (CCCP y FCCP) sugieren que citocromo ba_3 está sujeta al control respiratorio (acoplada) mientras que el citocromo bb_3 no lo está (desacoplada).

IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Adachi, O.;Tayama,K.; M.; Matsushita, K; Shinagawa, E. and Ameyama, M. (1980). Crystallization of Membrane-bound Alcohol Dehydrogenase of Acetic Acid Bacteria. Agric. Biol. Chem. **44**:503.
- Adair, F. (1968). Inhibition of oxygen utilization and destruction of ubiquinone by ultraviolet irradiation of *Thiobacillus thiooxidans*. J. Bac. 95(1):147-151.
- Ameyama, M.; Matsushita, Ohno, Y.; K; Shinagawa, E. and Adachi, O. (1981). FEBS Letters. **130**:179.
- Ameyama, M.; Matsushita,.; K; Shinagawa, E. and Adachi, O. D.Glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxidans* :solubilization, purification and characterization. (1981). Agric. Biol. Chem. **45**:1889.
- Ameyama, M.; Matsushita, K; Shinagawa, E. and Adachi, O. (1987). Sugar oxidizing respiratory chain of *Gluconobacter suboxidans*. Evidence for a branched respiratory chain and characterization of respiratory chain-linked cytochromes. Agric. Biol. Chem. 51:2943-2950.
- Attwood, M; Johannes, P; van Dijken, P and J.T. Pronk. (1991). Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J. Ferment. Bioengin. **72**:101-105
- Brand, MD; Chien, LF; Ainscow, E.; Rolfe, D. and R. Porter (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. BBA. **1187**:132-139.
- Bertsova, YV; Bogachev, AV. and Skulachev, P. (1997). Generation of protonic potential by the *bd-type* quinol oxidase of *Azotobacter vinelandii*. FEBS Letters. **414**:369-372.

Bertsova, YV; Bogachev, AV. and Skulachev, P. (1998). Two NADH:ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. BBA. **1363**:125-133.

Borisov (1996). Cyt *bd* structure and properties. A review. Biochemistry (Moscow) **61**:565-574.

Cavalcante, V. and J. Döbereiner. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil. **108**:23-31.

Collins, M and D. Jones. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol. Rev. **45**:316-354.

Crane and Barr. (1985). Oxidation of reduced pyridine nucleotides by plasma membranes of soybean hypocotyl. Biochem. Biophys Res. Commun. 1985 Sep 16;131(2):943-8.

Daniel, RM. (1970) The electron transport system of *Acetobacter suboxidans* with particular reference to cytochrome *o*. BBA. **216**:328-341

Drozd, J and Postgate, R. (1970). Effects of oxygen on acetylen reduction, cythochrome content and respiratory content of terminal oxidases of *A. chroococcum*. J. Gen. Microbiol. **63**:63-73.

Escamilla, J.; Ramírez, R.; del Arenal, I.; Zarzoza, G. and V. Linares. (1987). Expresión of cytochrome oxidases in *Bacillus cereus*. Effects of oxygen tension and carbon source. J. Gen. Microbiol. **133**:3549-3555.

Ferguson, S.J. (1985). Fully delocalised chimiosmotic or localised proton flow pathways in energy coupling. BBA. **811**:47-95.

Flores-Encarnación,M; Contreras, M; Soto,L; Aguilar, G,Baca,B. and Escamilla,M. (1999). The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bac.* **181**:6987-6995.

Frebortova, J., Matsushita, K.; Arata, A. and Adachi, O. (1998). Intramolecular electron transport in quinoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter methanolicus* : a redox titration study. *BBA.* **1363**: 24-34.

García-Horsman,JA; Barquera,B; Rumbley,J and Gennis,RB. (1994). The superfamily of the heme-copper respiratory oxidases. *J. Bac.* **176**:5587-560

De Gier,J; Lubben,W; Reijnders,C; Tipker,C; van Spanning,R; Stouthamer,A. and J van der Oost. (1994). The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. **13(2)**:183-196.

Gomez-Manzo,S; Contreras-Zentella,M; González –Valdez,A; Sosa-Torres,M; Arreguin-Espinoza,M and Escamilla Marvan, E. (2007). The PQQ alcohol dehydrogenase of *Ga. diazotrophicus* *Int. J. Food Microbiol.*

Hosler, J.; Miller, S.; Hill, T. and Lemieux L. (1993). Insight into the active-site structure and function of cytochrome oxidase by analysis of site-directed mutants of bacterial cytochrome *aa3* and cytochrome *bo3*. *J. Bioenerg. & Biomemb.* **25**:121-133.

Mc Inerney, M.; Holmes, S.; Hoffman, P.; Dervatio, V. (1984). Respiratory mutants of *Azotobacter vinelandii* with elevated levels of cytochrome *d*. *FEBS Letters* 4447-4452.

Jaworoswki, A.; Campbell, H.; Poulis, M. and Y. Young. (1981).

Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* and reconstitution of NADH oxidase in *ndh* mutant membrane vesicles.. *Biochemistry* **20**:2041-2047.

Jones, CW and Poole, RK, (1985) The analysis of cytochromes. *Met Microbiol.* **18**: 285-328.

Kaminski, P.A; Kitts, C.L.; Zimmerman, Z. and R. Ludwig. (1996). *Azorhizobium caulinodans* uses both cytochrome *bd* (quinol) and Cytochrome *cbb₃* (cytochrome c) terminal oxidases for symbiotic N₂ fixation. *J. Bac.* **178(20)**:5989-5994.

Kelly, M; Poole, R.; Yates, M, and C. Kennedy. (1990). Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome *bd* terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome *bd* complex are unable to fix nitrogen in air. *J. Bac.* **172**:6010-6019.

Khula, T. and Oelze, J. (1988). Dependence of the nitrogenase switch-off upon oxygen stress on the nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bac.* **130**:5325-5329.

Kita, K.; Konoshi, K and Y. Anraku. (1984). Terminal oxidases of *E. coli* aerobic respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **259**:3375-3381.

Knook, D and Planta, R. (1971). Function of ubiquinone in electron transport from NADH reduced to nitrate and oxygen in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bac.* **105(2)**:483-488.

Lee, S; Flores-Encarnación, M; Contreras, M; Garcia, L; Escamilla, E. and Kennedy, C. (2004). Indole 3- acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain with mutations in cytochrome *c* biogenesis genes. *J. Bac.* **186**: 5384-5391.

Luna, M.; Mignone F and J. Boiardi. (2000). The carbon source influences the energetics efficiency of the respiratory chain of N₂ –fixing *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **54**:564-569.

Matsushita, K.; and M. Ameyama (1982). D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* membrane found. Methods. Enzimol. **89**:149-154.

Matsushita K.; Nagatani, Y.; Shinagawa, E.; Adachi, O. and Ameyama, M. (1989). Effects of extracellular pH on the respiratory chain and energetics of *Gluconobacter suboxidans*. Agric. Biol. Chem. **52**:2895

Matsushita K.; Nagatani, Y.; Shinagawa, E.; Adachi, O. and Ameyama, M. (1991). Reconstitution of the ethanol oxidase respiratory chain in membranes of quinoprotein alcohol dehydrogenase-deficient *Gluconobacter suboxidans* *subsp* strains. J. Bac. **173**: 3440.

Matsushita, K.; Ebisuya, H.; . Ameyama, M.; and O. Adachi. (1992). Change of terminal oxidase from cytochrome *a1* in shaking cultures to cytochrome *o* in static cultures of *Acetobacter aceti*. J. Bac. **174**:122-129.

Matsushita K.; Toyama, H.; and O. Adachi. (1994). Respiratory chain and bioenergetics of acetic acid bacteria. Adv. Microbial. Physiol. **36**:248-301.

Matsushita, K.; Yakushi, T.; Toyama, H; Shinagawa, E. and Adachi, O. (1996). Function of multiple heme *c* moieties in intramolecular electron transport and ubiquinone reduction in the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-cytochrome *c* complex of *Gluconobacter suboxidans*. J. Biol. Chem. **271**:4840-4857.

Matsushita,K; Toyama, H; Adachi, O. and Yakushi,T. (1995) Generation mechanism and purification of an inactive form convertible *in vivo* to the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxidans*. J.Bac. 177: 6552-6559.

Matsushita,K; Toyama, H; Adachi, O. and Yamada,M. (2001). Quinoproteins: structure, function and technological applications. App. Microbiol. Biotech. 1-18.

D'Mello, R.; Purchase,D.; Poole,R. and Hill, S. (1996). Expression and content of terminal oxidases in *Azotobacter vinelandii* growth with excess of NH₄⁺ modulated by oxygen supply. Microbiology **143**:231-237.

Meyer, D.J. and CW Jones (1973) Oxidative phosphorylation in bacteria which contain different cytochrome oxidases. Eur. J. Biochem. **36**:144-151.

Morgan, J.; Verkhovskiy, M. and M. Wikström. (1994). The histidine cycle: A new model for proton traslocation in the respiratory heme-copper oxidases. J. Bioenerg. & Biomemb. **26**:599-608.

Neijssel, O.M. and M.J. Teixeira de Matos (1994) The energetics of bacterial growth: a reassessment. Mol. Microbiol. **13**(2):179-182.

Nicholls, P. and Butko, P. (1993). Proton, pumps and potentials: control of cytochrome oxidase. J. Bioenerg. and Biomemb. **25**: 137-143.

Okada,K; Kainou, T.; Matsuda, H. and Kawamukai, M. (1998). Biological significance of the side chain lenght in *Sacharomyces cereviciae*. FEBS Letters **431**:241-244.

Peschek, G. (1980) Restoration of the respiratory electron –transport reactions in quinone-depleted particle preparations from *Anacystis nidulans*. *Biochem. J.* **186**:515-523.

Preisig, O.; Zufferey, R.; Thöny-Meyer, L.; Appleby, C. And H. Hennecke. (1996). A high-affinity *cbb3* cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bac.* **178(6)**:1532-1538.

Puustinen, A. and M. Wikström. (1991). The heme groups of cytochrome *o* from *Escherichia coli*. *PNAS.* **88**:6122-6126.

Satoh, T.; Miyohi, H.; Sakamoto, K and H. Iwamura. (1996). Comparison of the inhibitory action of synthetic capsaicin analogues with various NADH-ubiquinone oxidoreductases. *BBA.* **1273**:21-30.

Sevilla, M; De Oliveira, A; Balani, I. and Kennedy, C (1998). Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: a preliminary study. *Symbiosis.* **25**:181-196.

Shinagawa, E.; Ameyama, M.; Matsushita, K; Shinagawa, E (1984) [D-Gluconate Dehydrogenase, 2-Keto-D-gluconate Yielding, from *Gluconobacter dioxyaceticus*: Purification and Characterization](#) *Agric. Biol. Chem.* **48**:1517.

Shinagawa, E; Matsushita, K; Ameyama, M. and Adachi, O. (1990). Evidence for electron transfer via ubiquinone between quinoprotein D-glucose dehydrogenases and alcohol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*. *J. Biochem.* **107**:863-867.

Skulachev, V. (1996). Uncoupled and non-coupled oxidations. *Biosc. Rep.* **347-360**.

Sone, N. and Yanagita, Y. (1982). A cytochrome *aa3*-type terminal oxidase of a thermophilic bacterium. Purification, properties and proton pumping. *BBA* **682**:216.

Stanier, R.Y.; Adelberg, E.A. and Ingraham, J.L. (1986) pp.580-582. *MICROBIOLOGIA*.

Stephan, M.; Oliveira, M.; Teixeira, S.; Martínez, G. and Dobereiner. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Letters*. **77**:67-72.

Swings, J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. Pp:2268-2286. In a Balows, H.; Truper, G.; Dworking, M.; Harder, W. And Schleifer (Ed.) *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification and applications*. Vol III. Springer-verlag. New York, N.Y. (1992).

Takeda, Y.; and T. Shimizu. (1991). *Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c-553 (CO) from Gluconobacter suboxydans*. *J. Ferm. Bioeng.* **72**:1

Takeda, Y.; and T. Shimizu. (1992a). *Expression of cytochrome c-553(CO) gene that complements the second subunit deficiency of membrane-bound alcohol dehydrogenase in Gluconobacter suboxydans subsp. α*. *J. Ferm. Bioeng.* **73**:89

Takeda, Y.; Shimizu, T.; Matsushita, K.; Ameyama, M.; and O. Adachi. (1992b). Role of cytochrome *c-553(CO)*, the second subunit of alcohol dehydrogenase, in the azide-insensitive respiratory chain and in oxidative fermentation of *Gluconobacter* species. *J. Ferm. Bioeng.* **74**:209-213.

Toyama, H.; Scott, F.; Adachi, O. and Matsushita, K. (2004). Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase: structure, function and physiology. *ABB.* **428**:10-21.

Wong, T. and Jurtschuk, K. (1984). Activation of phospholipids on the purified cytochrome *c4:0* oxidase of *A. vinelandii*. JBB. **16**:477-489.

Wood, P.M. (1984). Bacterial protein with CO-binding *b* or *c*-type haem functions and absorption spectroscopy. BBA. **768**:293-317.

Yagi, T. (1990). Bacterial NADH:quinone oxidoreductases. J. Bioenerg. Biomemb. **23**(2):211-225.

Yamada, Y; Hoshino, K. and Ishikawa. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. Biosci. Biotechnol. Biochem. **61**:1244-1251.

Yamada, Y; Hoshino, K. and Ishikawa. (1998). *Gluconoacetobacter* nom. Corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJBS. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**:327-328.

Yang, T. (1996). Biochemical and biophysical properties of cytochrome *o* of *A. vinelandii* BBA. **848**:342-351.