



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

La fermentación oxidativa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*  
y la especificidad por alcoholes y azúcares para el crecimiento  
y la respiración

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Helga Maricruz López Carbajal



DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. José Edgardo Escamilla Marván  
2011



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.

1. Datos del alumno

Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre(s)  
Teléfono  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera  
Número de cuenta

López  
Carbajal  
Helga Maricruz  
5622 5627  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303203340

2. Datos del tutor

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Dr.  
José Edgardo  
Escamilla  
Marván

3. Datos del sinodal 1

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Dr.  
Salvador  
Uribe  
Carvajal

4. Datos del sinodal 2

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Dr.  
Roberto Alejandro  
Arreguín  
Espinosa de los Monteros

5. Datos del sinodal 3

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Dr.  
Luis Felipe  
Jiménez  
García

6. Datos del sinodal 4

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Dra.  
María Teresa  
Lara  
Ortiz

7. Datos del trabajo escrito.

Título

La fermentación oxidativa de  
*Gluconacetobacter diazotrophicus* y la  
especificidad por alcoholes y azúcares para el  
crecimiento y la respiración.

Número de páginas

60 p

Año

2011

## **DEDICATORIA**

A Dios, por su infinito amor hacia mí. Por darme la vida y a la familia que tengo.

A mis padres, quienes me han guiado por el camino hacia el éxito con su amor, con sus consejos y su apoyo incondicional. No podría tener mejores padres. Gracias papitos.

A Héctor, mi hermano, por ser un ejemplo de constancia, esfuerzo e inteligencia, por confiar en mí y hacer de mi infancia algo memorable a su lado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi papá, por ser un hombre excepcional, por escucharme y aconsejarme en los momentos difíciles, por consentirme tanto.

A mi mamá, por la fortaleza que me has ayudado a forjar. Gracias por insistir.

A mi tutor, el Dr. José Edgardo Escamilla Marván, por darme la oportunidad de participar en su proyecto y por todos sus consejos y ayuda para la elaboración de esta tesis.

A mis sinodales, el Dr. Roberto Arreguín, el Dr. Luis Felipe García y la Dra. Teresa Lara. Y en especial al Dr. Salvador Uribe Carvajal.

A mi amiga Elizabeth, por los momentos tan gratos a tu lado, y por escucharme tanto. Te quiero amiga.

A José Reyes Castillo, por acompañarme de una manera tan especial en mi vida y en mi carrera. Por quererme tanto. Espero tener algún día la alegría de acompañarte en tu titulación. Mucho éxito.

A la Doctora Martha Contreras Zentella, por la dirección que me ha brindado. Por su apoyo y por sus consejos.

A mis amigos de la H. Facultad de Ciencias con quienes disfrute mi carrera de convertirme en bióloga: Elizabeth, Lina, Ricardo, Sara y Diana.

A Juan Carlos, por impulsarme al inicio de la carrera, por tu confianza, por tu amistad.

A mis amigos Les, Azu, Cristian, Rolando, Sury y Emmanuel por hacerme tan grata mi estancia en el laboratorio. Por nuestras amenas charlas y las escapadas. Por sus consejos para la preparación de mi tesis.

## ÍNDICE

### I. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistemas respiratorios bacterianos.....	4
1.2 Las bacterias del ácido acético.....	6
1.3 La fermentación oxidativa.....	6
1.4 Las deshidrogenasas membranales de las bacterias del ácido acético.....	7

### II. ANTECEDENTES

2.1 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> : Aislamiento y hábitat.....	12
2.1.2 Clasificación y características morfológicas.....	13
2.2 La fijación biológica de nitrógeno y la fermentación oxidativa de <i>Ga. diazotrophicus</i> .....	14
2.3 La cadena respiratoria de <i>Ga. diazotrophicus</i> .....	16
2.3.1 Deshidrogenasas.....	17
2.3.2 Oxidasas.....	18

### III. OBJETIVO

3.1 Objetivo General.....	20
3.2 Objetivos Particulares.....	20

IV. JUSTIFICACIÓN.....	20
------------------------	----

### V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico.....	21
5.2 Medios de cultivo.....	21
5.3 Mantenimiento del material biológico.....	22
5.4 Preinóculos.....	22
5.5 Curvas de crecimiento.....	22
5.6 Actividades de oxidasas terminales.....	23

### VI. RESULTADOS

6.1 Gluconato.....	25
6.2 Lactato.....	28

6.3 Fructosa.....	31
6.4 Glicerol.....	34
6.5 Malato.....	37
6.6 Sorbitol.....	40
6.7 Glicerol como única fuente de carbono.....	43
6.7.1 Influencia de la concentración del glicerol sobre la inducción de la enzima glicerol deshidrogenasa y sobre la biomasa producida.....	43
6.7.2 Papel de la enzima PQQ-alcohol deshidrogenasa en la oxidación del glicerol.....	45
 <b>VII. DISCUSIÓN</b>	
Parte I. Sobre el crecimiento de <i>Ga. diazotrophicus</i> .....	47
Parte II. Sobre la obtención de energía durante la respiración.....	49
7.2 Glicerol deshidrogenasa y gluconato deshidrogenasa: Nuevas enzimas en el sistema respiratorio de <i>Ga. diazotrophicus</i> PAL5	
7.2.1 Sobre la gluconato deshidrogenasa y la oxidación de gluconato.....	49
7.2.2 Sobre la glicerol deshidrogenasa y la oxidación por glicerol.....	50
 <b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	53
 <b>IX. ABREVIACIONES</b> .....	54
 <b>X. REFERENCIAS</b> .....	55

## RESUMEN

Las bacterias pertenecientes a la familia *Acetobacteraceae*, mejor conocidas como bacterias del ácido acético (BAA), han aportado grandes beneficios a la humanidad debido a sus aplicaciones biotecnológicas. Su capacidad de oxidar sustratos de manera incompleta bajo condiciones normales de crecimiento se ha aprovechado para producir de manera industrial dichos productos mediante la “Fermentación Oxidativa”. En las BAA este proceso es llevado a cabo por dos tipos de enzimas deshidrogenasas membranales, unas dependientes de FAD con el sitio catalítico orientado hacia el citoplasma y otras dependientes de PQQ con el sitio catalítico orientado hacia el periplasma.

*Gluconacetobacter diazotrophicus* es una bacteria perteneciente a dicha familia, es endófito de la caña de azúcar, Gram (-), aerobio estricto. Lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN) por medio de la nitrogenasa, requiriendo un alto consumo de oxígeno (respiración) para suplir la demanda de ATP (fosforilación oxidativa) impuesta por la FBN. Sin embargo, todas las nitrogenasas conocidas son altamente susceptibles al O<sub>2</sub> inactivándose irreversiblemente ante su contacto. La “Protección respiratoria” provee una explicación satisfactoria para esta paradoja, la cual predice que la alta actividad respiratoria impulsada por las deshidrogenasas membranales del periplasma consumen el oxígeno del medio aledaño a la célula, disminuyendo su concentración intracelular; permitiendo al mismo tiempo la Fermentación Oxidativa y supliendo la demanda de ATP.

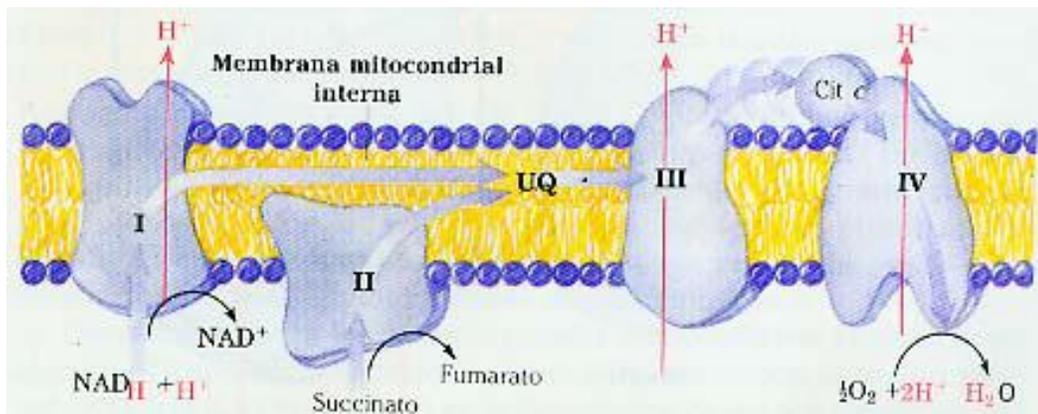
Estas notables cualidades han llevado a investigar la composición y función del sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*. En nuestro grupo de trabajo se han caracterizado y purificado las PQQ-deshidrogenasas para glucosa, etanol y acetaldehído. Sin embargo, es imprescindible conocer más acerca de la cadena respiratoria de esta bacteria. Este trabajo se enfocó en la búsqueda de nuevas enzimas deshidrogenasas constituyentes del sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*. Mediante el ensayo de diversos sustratos como fuente de carbono y su utilización directa como sustratos respiratorios quedó en evidencia la existencia de al menos dos enzimas deshidrogenasas nuevas: una enzima constitutiva responsable de la oxidación del gluconato (gluconato deshidrogenasa) y otra enzima inducible responsable de la oxidación del glicerol (glicerol deshidrogenasa).

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Sistemas respiratorios bacterianos.

Los sistemas respiratorios bacterianos son un conjunto de flavoproteínas Fe-S, quinoproteínas, quinhemoproteínas, quinonas liposolubles y citocromos, organizadas de forma asimétrica en la membrana (Figura 1). Estos componentes forman una cadena que transporta electrones desde proteínas con un potencial redox bajo o negativo, hacia uno alto o positivo, en una serie de reacciones redox hasta un aceptor final y, al mismo tiempo, generan un gradiente protón motriz transmembranal que conduce a la formación de ATP por el complejo  $F_1F_0$  de la ATP sintetasa (Escamilla y cols., 1999).

Las bacterias presentan un panorama extraordinariamente diverso en sus sistemas respiratorios; el arreglo de los componentes de la cadena suele ser modular y puede cambiar en función de los nutrientes y de las condiciones presentes en el medio. Sin embargo, los sistemas respiratorios bacterianos pueden contener los mismos componentes hallados en la mitocondria: La NADH-deshidrogenasa (NADH: complejo I), la succinato deshidrogenasa (SDH: complejo II), además de una gama variable de otras deshidrogenasas que oxidan diferentes sustratos. La ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductasa (complejo III ó citocromo *bc<sub>1</sub>*) y la citocromo oxidasa terminal (complejo IV). También suelen estar presentes componentes móviles transportadores de electrones tales como quinonas y citocromo *c* soluble (Anraku y Gennis, 1987).



**Figura 1.** Composición general de una cadena respiratoria aeróbica. I: Complejo de la NADH deshidrogenasa, II: Succinato deshidrogenasa, III: Complejo la ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductasa, IV: Complejo del citocromo oxidasa terminal.

Los electrones son conducidos por dichos componentes móviles hacia las oxidasas terminales, las cuales participan activamente en la reducción del oxígeno, aceptor final de las cadenas respiratorias de bacterias aeróbicas (Matsushita y cols., 1994). Las oxidasas terminales se pueden dividir en dos grupos importantes, las **quinol oxidasas**, que reciben los electrones directamente del quinol (quinona reducida) (Anraku y Gennis, 1987) y las **citocromo c oxidasas** que aceptan electrones del citocromo c soluble (Escamilla y cols., 1987). Las cadenas respiratorias que contienen citocromos c oxidasas son más eficientes energéticamente por la incorporación de un sitio extra de bombeo de protones (complejo III) y aumentan la generación de gradiente protón-motriz.

En respuesta a las variaciones del medio ambiente, las bacterias pueden expresar dos o más oxidasas terminales, su expresión depende del ambiente en que se encuentre, de las condiciones de cultivo y del estadio de desarrollo, siendo la tensión de oxígeno el factor regulador más importante. Las bacterias pueden crecer en un amplio intervalo de concentración de oxígeno ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M), debido a la presencia de oxidasas con diferente afinidad. Sin embargo, en ausencia de oxígeno, algunas bacterias pueden emplear otros aceptores de electrones como fumarato, sulfato ó nitrato y las enzimas que catalizan el proceso se denominan reductasas, se han descrito al menos 12 reductasas diferentes, todas con citocromos que pueden recibir los electrones directamente del quinol o del citocromo c (Escamilla y cols., 1987).

La función principal de los sistemas respiratorios es la producción de ATP, sin embargo, también funcionan para disipar el exceso de poder reductor generado en el metabolismo.

## 1.2 Las bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético (BAA) pertenecen a un grupo monofilético de las *Alphaproteobacteria* que se encuentra dentro del orden de las Rhodospirillales en la familia *Acetobacteraceae*. Su taxonomía ha cambiado en la última década, la comparación de las secuencias de rRNA han resultado en la creación de nuevos géneros y la reclasificación de algunas especies. Actualmente las BAA se han organizado dentro de diez géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozaia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neosaia* y *Granulibacter*. (Yamada y Yukphan, 2008)

Todas son bacterias acidófilas, capaces de crecer a pH 4.5 con un metabolismo estrictamente oxidativo. Los hábitats típicos son frutas, néctares, comida fermentada o vinagre. Las BAA carecen de citocromo *c* oxidasa, a excepción de *Acidomonas methanolica*. Tienen la habilidad de oxidar de manera incompleta un amplio rango de carbohidratos y alcoholes, convirtiendo los alcoholes primarios en ácidos orgánicos y los alcoholes secundarios en sus cetonas correspondientes (Deppenmeier y Ehrenreich, 2008). Son aerobios estrictos, Gram-negativos; los sustratos son utilizados en poca proporción para la producción de biomasa y son capaces de crecer en medios con una alta concentración de azúcares por ejemplo, en 30% (p/v) de glucosa.

## 1.3 La Fermentación Oxidativa

La mayoría de bacterias aerobias realizan la oxidación de sustratos hasta dióxido de carbono y agua, y sólo bajo ciertas condiciones presentan una oxidación incompleta de dichos sustratos, especialmente cuando hay una gran disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, las bacterias del ácido acético presentan la oxidación incompleta de azúcares y alcoholes bajo condiciones normales de crecimiento, depositando los ácidos orgánicos correspondientes en el medio (Deppenmeier y Ehrenreich 2008). Basándose en estas características, los productos de estas oxidaciones con alto valor agregado se han explotado industrialmente mediante el proceso denominado “Fermentación Oxidativa” (Adachi y cols., 2001a).

La fermentación oxidativa ha sido bien establecida por largo tiempo en procesos como la producción de vinagre y, en general, la acetificación de bebidas alcohólicas. En biotecnología, ha permitido la obtención de productos de interés alimenticio, farmacéutico y cosmético, como la sorbosa (precursor biológico del ácido ascórbico), gluconato y ceto gluconato (de utilidad alimenticia y farmacéutica para la síntesis de ácido tartárico), de dihidroxiacetona (precursor usado en la industria cosmética), de biopolímeros (celulosa, acetán) y de etanol. Las BAA también se han vuelto de suma importancia en la producción de biomateriales para las industrias (Matsushita y cols., 1994). Por su relevancia en la síntesis de compuestos de interés biotecnológico, las enzimas responsables de este proceso han sido exhaustivamente estudiadas.

#### **1.4 Deshidrogenasas membranales de las bacterias del ácido acético.**

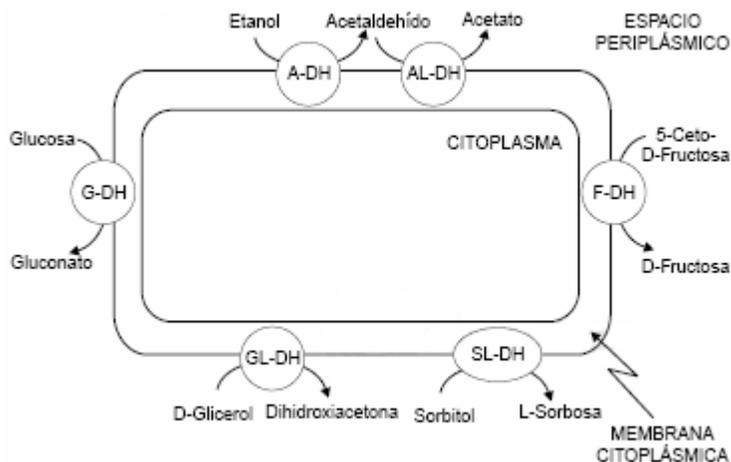
En general, son dos tipos de enzimas deshidrogenasas membranales las que se encuentran involucradas en la fermentación oxidativa: **las quinoproteínas y las flavoproteínas**. Estas enzimas catalizan la oxidación de sustratos como azúcares y alcoholes, acompañada por la acumulación de sus productos en el medio de cultivo. Se presentan como un grupo variable de enzimas que se expresan de acuerdo a los sustratos disponibles del medio ambiente y/o a las condiciones del medio de cultivo. (Escamilla y cols., 1999). Estos sistemas de oxidación están acoplados directamente a la cadena respiratoria de la bacteria, así la transferencia de electrones produce un gradiente electroquímico a través de las membranas citoplasmáticas, que se usa para la generación de ATP y los procesos bioenergéticos del crecimiento celular (Flores-Encarnación y cols., 2004). El acoplamiento de estas dos vías metabólicas hace que la respiración llegue a ser de 10-20 veces superior a las que se registran en otras bacterias aeróbicas típicas (Flores-Encarnación y cols., 1999)

Las deshidrogenasas se encuentran divididas en función del grupo prostético que contengan: Quinona de Pirrolo-Quinolina (PQQ) ó bien, Flavín Nucleótidos (FMN ó FAD) (Matsushita y cols., 1994); la riboflavina forma parte del Flavín Adenín Dinucleótido (FAD) o Flavín Mononucleótido (FMN), que son las coenzimas o grupos prostéticos de las enzimas denominadas **flavoproteínas**. Este tipo de enzimas tienen su sitio activo orientado hacia el citoplasma. En *Ga. diazotrophicus* se encuentra la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa.

Por otro lado, el grupo prostético PQQ (quinona de pirrolo-quinolina) es uno de los cuatro tipos de o-quinonas presentes en las enzimas bacterianas y se sintetiza a partir de residuos de tirosina y ácido glutámico. En los años 80's, el grupo de Duine determinó la actividad de las quinonas como cofactor a partir de la enzima metanol deshidrogenasa de bacterias metilotróficas; recientemente a estas enzimas que utilizan grupos prostéticos de quinonas (o-quinonas) se les ha llamado **quinoproteínas**, como son los casos de la glucosa deshidrogenasa y la glicerol deshidrogenasa. No obstante, si además de PQQ las enzimas poseen uno o varios citocromos c como grupos prostéticos, las enzimas se denominan **quinohemoproteínas**, como la alcohol deshidrogenasa tipo III y la aldehído deshidrogenasa. (Gómez-Manzo y cols., 2005).

Se ha demostrado que las quinoproteínas llevan a cabo reacciones de oxidación con gran facilidad debido a que el grupo prostético PQQ posee un alto potencial medio estándar (+90mV), el cual es mucho mayor que el potencial de los nucleótidos de piridina (-320mV) y los nucleótidos de flavina (-45mV), permitiendo que la respiración bacteriana sea mucho más diversa. Su localización externa favorece que las PQQ-deshidrogenasas oxiden grandes cantidades de sustrato y los productos de oxidación se acumulen en el exterior de las células. Estos sistemas de oxidación benefician notablemente a la economía energética: no se requiere energía para el transporte de los sustratos, ya que los sustratos son oxidados desde el exterior (Flores-Encarnación y cols., 2004)

Las PQQ – deshidrogenasas se encuentran unidas a la membrana interna de la bacteria y la mayoría tienen su sitio activo orientado hacia el espacio periplásmico (Figura 2). Son capaces de oxidar directamente una amplia gama de sustratos como azúcares y alcoholes.



**Figura 2.** La mayoría de las PQQ-deshidrogenasas tienen sus sitios catalíticos orientados hacia el espacio periplásmico. G-DH, glucosa deshidrogenasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; AL-DH, aldehído deshidrogenasa; F-DH, fructosa deshidrogenasa; SL-DH, sorbitol deshidrogenasa; GL-DH, glicerol deshidrogenasa.

De Gómez-Manzo y cols. 2005

Para muchos sustratos existe una deshidrogenasa membranal y muchas de ellas se han logrado solubilizar mediante tratamientos con detergentes, se han purificado y caracterizado (Cuadro 1).

Además de las deshidrogenasas membranales existen varios tipos de deshidrogenasas en la fracción citosólica, la mayoría son dependientes de NAD (P), como la D-glucosa deshidrogenasa (Adachi y cols., 1980) y la 2-ceto-D-gluconato-reductasa (2KGR) (Ameyama y Adachi, 1982). La mayoría de las cuales catalizan las mismas reacciones que las deshidrogenasas membranales; sin embargo, no existe evidencia de su participación en la producción de energía ni en la fermentación oxidativa. Otra diferencia importante entre las deshidrogenasas membranales y las citosólicas, es el pH óptimo en el cual llevan a cabo las reacciones de oxidación. La actividad de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P) es observada generalmente en regiones alcalinas de pH en un rango de pH 8.0–11.0, mientras las deshidrogenasas membranales catalizan las reacciones en regiones ácidas de pH en un rango de pH 3.0-6.0 (Adachi y cols., 2001b).

**Cuadro 1:**

**Enzimas dependientes de PQQ: Quinoproteínas y Quinohemoproteínas**

Deshidrogenasa	Grupo Prostético	Organismo en que se ha aislado	Masa Molecular	Subunidades	Sustrato(s) específico(s)	Producto de oxidación	Precursor para	pH óptimo	Ref.
Glucosa (GDH)	PQQ	<i>G. oxydans</i>	87kDa	Monómero	Glucosa, maltosa	Acido glucónico	Ácido tartárico	6.0	14
Alcohol (ADH Tipo III)	PQQ 4 Cyt c	<i>A. aceti</i> <i>Ga. polyoxogenes</i>	134kDa	I (72) II (48) III (14)	Etanol Butanol	Aldehído		4.0-6.0	28
Aldehído (ALDH)	PQQ 4 Cyt c	<i>G. oxydans</i>	141kDa	I (86) II (55)	Acetaldehído, Propanaldehído	Acetato		4.0	14
Sorbitol (PQQ-SLDH)	PQQ	<i>G. suboxydans</i> IFO 3255	80kDa	Monómero	Sorbitol Manitol, Glicerol			5.0	28 49
Sorbitol (PQQ-SLDH)		<i>G. suboxydans</i> IFO 3258	91kDa	I (77) II (14)	Sorbitol Otros azúcares.	L-sorbosa	Vitamina C	5.0	3 4
Sorbitol (PQQ-SLDH)	PQQ Cyt c	<i>G. suboxydans</i> KCTC 2111	139kDa	I (75) II (50) III (14)	Sorbitol Otros azúcares.	L-sorbosa	Vitamina C		12 14 4
Quinato (QDH)		<i>G. melanogeneus</i> <i>G. oxidans</i> IFO 3292 y 3244 <i>A. calcoaceticus</i> AC3	85kDa	Monómero	Quinato	3-deshidroquinato	Shikimato. Aminoácidos aromáticos.		3 4
Glicerol (GLDH)	PQQ	<i>G. industrius</i> IFO 3260	80kDa	Monómero	Glicerol Poliol	Dihidroxiacetona	Cosméticos Bronceador Químicos orgánicos	4.0	4 5 14 21
Arabitol (ARDH)	PQQ	<i>G. suboxydans</i> IFO 3257	96kDa	I (82) II (14)	Glicerol	Dihidroxiacetona	Cosméticos	<5.0	1 3

				Ribitol D-arabitol D-gluconato	L-ribulosa D-xylulosa 5KGA	Producción de azúcares		4 21
<b>Gluconato (PQQ-GLDH)</b>	PQQ	<i>G. suboxydans</i> IFO 12528		D-gluconato	5KGA	Ácido tartárico	4.0	48 39

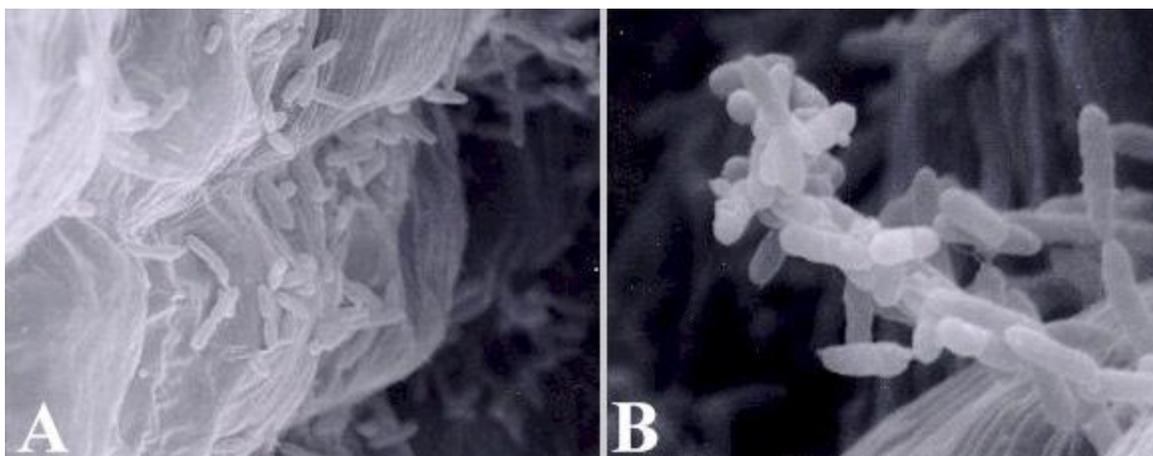
### Enzimas dependientes de flavin nucleótidos: Flavoproteínas

Deshidrogenasa	Grupo Prostético	Organismo en que se ha aislado	Masa Molecular	Subunidades	Sustrato(s) específico(s)	Producto de oxidación	Precursor para	pH óptimo	Ref.
<b>Alcohol (ADH)</b>	FAD Cyt c	<i>G. suboxydans</i>	128kDa	I (80) II (48)	Etanol butanol Propanol, etc.	Acetaldehído		5.0-6.0	14
<b>Sorbitol (FAD-SLDH)</b>	FAD	<i>G. suboxydans</i> IFO 3258 y 3254	130kDa	I (61) II (53) III (17)	D-sorbitol	D-fructosa		4.5	3 4 12
<b>Sorbitol (FAD-SLDH)</b>	FAD (cov) Cyt c	<i>G. suboxydans</i> var. $\alpha$ IFO 3254	131 kDa	I (63) II (51) III (17)	D-sorbitol	L-sorbosa	Vitamina C	4.5	38 46
<b>D-Gluconato (GADH)</b>	FAD Cyt c	<i>G. dioxyacetionicus</i> IFO 3271	130kDa	I (64) II (45) III (21)	D-gluconato	2KGA		6.0	38 47
<b>2-keto-D-gluconato (2KGDH)</b>	FAD (cov) Cyt c	<i>G. melanogenus</i>	133kDa	I (61) II (47) III (25)	2-ceto-D-gluconato	2,5-diceto-D-gluconato			38 39
<b>Gluconato-2- (GA2DH)</b>						2-ceto-D-ácido gluconico		4.0	3 14

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*: Aislamiento y hábitat

*Ga. diazotrophicus* se aisló por primera vez a partir de raíces de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cultivadas en diferentes regiones de Brasil por Cavalcante y Döbereiner en 1988 (Figura 3) Este microorganismo fue descrito como una bacteria endófito de la caña de azúcar tolerante al ácido y capaz de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Loiret y cols., 2004). Además de contribuir a la disponibilidad del nitrógeno fijado para las plantas hospedadas, *Ga. diazotrophicus* tiene otras cualidades: puede contribuir a la producción y liberación de fitohormonas, como las giberelinas y las auxinas; es capaz de producir una bacteriocina con actividad de lisozima, inhibiendo el crecimiento del patógeno de la caña de azúcar, *Xanthomonas albilineans*; cuenta con actividad antagonista en contra de una fitotoxina producida por *Colletotrichum falcatum*, causante de una enfermedad letal para la caña de azúcar.



**Figura 3. Panel A.** Micrografía electrónica del tallo de la caña de azúcar colonizada por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Panel B.** Micrografía electrónica de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, las células se mantienen juntas por un material de tipo mucilaginoso encontrado en el interior del tejido de la caña de azúcar cuando es colonizado por la bacteria. **Microfotografías tomadas por la Universidad de Arizona.** De <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Acetobacter>

*Ga. diazotrophicus* no es un organismo exclusivamente endófito y se ha aislado de otras plantas, como la hierba elefante (*Pennisetum purpureum*), el boniato (*Ipomea batatas*), el café (*Coffea arabica*), el plátano, la piña y el arroz e incluso de insectos que infectan la caña de azúcar. También se puede encontrar asociado con esporas fúngicas de resistencia VAM (Cuadro 2) (Muthukumarasamy, 2002).

Fuente	Parte
Caña de azúcar	Raíz, pelo de raíz, tallo, hojas
Hierba elefante	Raíz, tallo
Boniato	Raíz, tallo tuberoso
Café	Raíz, rizósfera, tallo
Piña	Fruta
Mango	Fruta
Banana	Rizósfera
Otros – Cochinillas, Esporas VAM	Ambiente interno.

**Cuadro 2.** Hábitat de *Ga. diazotrophicus*. De Muthukumarasamy, 2002.

### 2.1.2 Clasificación y características morfológicas.

Originalmente *Ga. diazotrophicus* fue nombrada como *Saccharobacter nitrocaptans*. Posteriormente se le dio el nombre de *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis, M. y cols., 1989), y finalmente Yamada y cols. (1997) reclasificaron el microorganismo como *Gluconacetobacter diazotrophicus* basándose en análisis de secuencias del rRNA 16s.

*Ga. diazotrophicus* es un bacilo Gram negativo, con un tamaño de 0.7 x 2 µm aproximadamente, con extremos redondeados y de 1-3 flagelos laterales. Es un organismo aerobio, capaz de crecer en medios con concentraciones de hasta 30% de sacarosa ó glucosa, acidifica su medio hasta valores de pH 3.0 y es capaz de fijar nitrógeno aún bajo estas condiciones, ambas características son inusuales para un diazótrofo; su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y su pH óptimo es de 5.5, no crece a pH 7.0 (Gillis y cols., 1989) Es catalasa positivo, no presenta actividad nitrato reductasa, a pesar de poseer un alto contenido de citocromo tipo c; no existe actividad de citocromo c oxidasa y emplea un amplio rango de azúcares y alcoholes como única fuente de carbono (Loiret y cols. 2004).

El metabolismo de la glucosa se da exclusivamente por la vía colateral de las hexosas – fosfato, la entrada de la glucosa a la célula se da preferentemente en forma de gluconato; forma dos tipos distintos de cetogluconatos a partir del gluconato. La glucólisis no se encuentra presente en esta bacteria a pesar de haberse identificado la mayoría de las

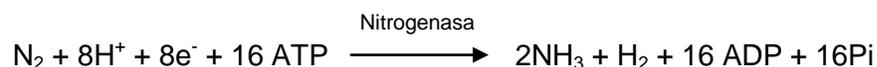
enzimas constituyentes de dicha ruta debido a la carencia de la enzima fosfofructocinasa (Lery y cols., 2007).

## 2.2 La fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la fermentación oxidativa en *Ga. Diazotrophicus*.

Uno de los factores limitantes de crecimiento para cualquier organismo es el nitrógeno. A pesar de que es el compuesto mayoritario de la atmósfera, aproximadamente 79%, este gran reservorio de nitrógeno libre no es aprovechable por la mayoría de los organismos, incluidas las plantas (Kim y cols., 1994). El N<sub>2</sub> no se asimila fácilmente por los organismos debido al triple enlace presente en la molécula; para su asimilación es necesario reducirlo mediante su conversión a óxidos ó a amonio. Su creciente demanda en la agricultura intensiva ha generado la necesidad del uso de fertilizantes químicos para suministrar la cantidad de nitrógeno suficiente; sin embargo, esto representa, además de un elevado costo, la contaminación de acuíferos y un aumento en la cantidad de óxido nitroso (Hardy, 1994)

Una alternativa la constituye la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la cual representa el 65% del total de nitrógeno fijado, siendo así la vía principal por la que el N<sub>2</sub> es transformado en formas asimilables para los organismos. La reducción enzimática del nitrógeno a amonio se encuentra limitada a algunos microorganismos de *Bacteria* y *Archea* denominados "diazótrofos". Éste es un proceso bioquímico anaeróbico con un alto costo energético (16-18 moléculas de ATP por cada molécula de N<sub>2</sub> reducida) llevado a cabo por el complejo de la enzima nitrogenasa (Nasa).

La enzima nitrogenasa está constituida por dos proteínas, la dinitrogenasa reductasa (Fe-proteína) y la dinitrogenasa (MoFe-proteína) (Loiret y cols., 2004), ambas son inactivadas por el oxígeno debido a la oxidación irreversible de los centros fierro-azufre (Fe-S) presentes en ambas proteínas, aunque la primera proteína es la más sensible. El sistema cataliza una reacción en la que transfiere un total de 6H<sup>+</sup> al N<sub>2</sub> y libera 2H<sup>+</sup> como hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>), siendo el amoníaco el primer producto identificable de esta reacción enzimática:



*Ga. diazotrophicus* es un fijador de nitrógeno aeróbico estricto, requiere un alto flujo de oxígeno para que su sistema respiratorio pueda suministrar la cantidad de ATP y el poder reductor que el proceso de fijación requiere. Paradójicamente un flujo excesivo de oxígeno inhibe irreversiblemente a la nitrogenasa. Sin embargo, se ha determinado que la mayor actividad específica de la nitrogenasa y la mayor velocidad de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* se obtiene cuando el organismo crece en alta aireación (Flores-Encarnación y cols. 1999).

Varios autores han descrito la existencia de mecanismos de protección. La concentración de O<sub>2</sub> en el ambiente intracelular donde actúa la Nasa es el resultado de varios factores: i) concentración de O<sub>2</sub> en el ambiente, ii) tasa de difusión del O<sub>2</sub> desde el ambiente externo hasta el sitio de la enzima, iii) tasa de utilización de O<sub>2</sub> en la vecindad de la nitrogenasa y iv) presencia de moléculas que transporten O<sub>2</sub> (Loiret, F.G. y cols., 2004). Se ha propuesto que *Ga. diazotrophicus* aumenta su tasa respiratoria por lo cual la concentración de O<sub>2</sub> en el ambiente que lo rodea disminuye, evitando así su entrada a la célula, evidenciándose la importancia de cada componente del sistema respiratorio. Este mecanismo se conoce como "Protección Respiratoria". (Flores-Encarnación y cols., 2001).

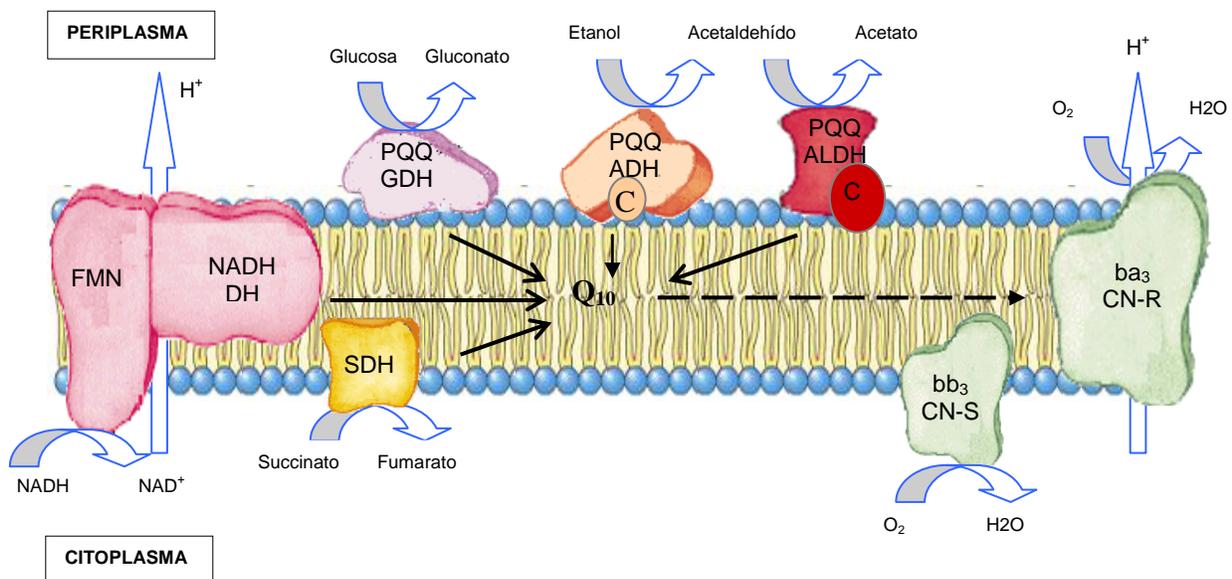
Las deshidrogenasas periplásmicas tienen un papel muy importante en la FBN, al ser las proteínas responsables de ceder electrones que al final de la cadena respiratoria consumen el oxígeno del medio por la acción de las oxidasas terminales. Esta importancia queda comprobada cuando en condiciones de no fijación, además de la sustitución de oxidasa terminal, las actividades para las deshidrogenasas periplásmicas disminuyen considerablemente (Flores-Encarnación, 2001).

Estas enzimas son indispensables para la FBN, la obtención de energía para el crecimiento y la respiración, al mismo tiempo que participan en la oxidación de sustratos desde el exterior celular permitiendo la Fermentación Oxidativa.

### 2.3 La cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus*

La cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* es una de las mejor caracterizadas en bacterias ácido acéticas; está compuesta por múltiples deshidrogenasas membranales, quinonas (principalmente ubiquinona-10 aunque existen trazas de ubiquinona-9 en la membrana plasmática) y tres oxidasas terminales del tipo quinol-oxidasas que se expresan de acuerdo a la concentración de amonio en el medio de cultivo (Flores Encarnación, 2001). El análisis espectroscópico y de HPLC de las membranas de la bacteria identifica citocromos de tipo *c*, *b*, *a* y *d*; no existe evidencia de citocromo tipo *o*. A pesar de que *Ga. diazotrophicus* posee un alto contenido de citocromo tipo *c*, no existe actividad de citocromo *c* oxidasa terminal (Flores-Encarnación y cols., 1999; González y cols., 2006).

La actividad de la cadena de *Ga. diazotrophicus* se puede resumir de la siguiente manera: las diversas deshidrogenasas membranales donan sus electrones desde su grupo prostético reducido hacia la poza de ubiquinona endógena, las ubiquinonas a su vez ceden los electrones a las oxidasas terminales (Figura 4).



**Figura 4.** Composición y actividad de la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* en condiciones de fijación de nitrógeno. Quinoproteína: glucosa deshidrogenasa (PQQ-GDH). Quinohemoproteínas: alcohol deshidrogenasa tipo III (PQQ-ADH) y aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH). Flavoproteínas: NADH deshidrogenasa (NADH-DH), succinato deshidrogenasa (SDH). Quinonas: Q<sub>10</sub>. Oxidasas terminales: bb<sub>3</sub>, oxidasa resistente a cianuro y desacoplada (bb<sub>3</sub> CN-S); ba<sub>3</sub>, oxidasa sensible a cianuro y acoplada (ba<sub>3</sub> CN-R)

### 2.3.1 Deshidrogenasas.

Se ha propuesto que la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* está compuesta por diversas deshidrogenasas. Algunas se encuentran con su sitio catalítico orientado hacia el citoplasma, como la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa y en otras su sitio catalítico se encuentra orientado hacia el espacio periplásmico, como las PQQ-deshidrogenasas para glucosa, alcohol y aldehído.

- i) Deshidrogenasas dependientes de Flavín nucleótidos.

**Succinato deshidrogenasa.** También conocida como complejo II, oxida al succinato produciendo fumarato, transfiriendo los electrones a la poza de quinonas. Aún no se ha realizado un estudio específico sobre la composición y propiedades de esta enzima en *Ga. diazotrophicus*.

**NADH deshidrogenasa.** Por su sensibilidad a rotenona y resistencia a flavona se le identificó como una enzima de tipo I, la cual esta acoplada a la cadena respiratoria, bombeando protones al espacio periplásmico y posee FMN como cofactor. (González y cols., 2004)

- ii) Deshidrogenasas dependientes de PQQ

Nuestro laboratorio se ha dedicado a la purificación y caracterización de las PQQ-deshidrogenasas para alcohol, acetaldehído y etanol.

**Glucosa deshidrogenasa (GDH).** Cataliza la oxidación directa de la D-glucosa para producir D gluconato, esta oxidación se lleva a cabo en la superficie externa de la membrana citoplásmica de la bacteria y está ligada a la cadena transportadora de electrones. La electroforesis nativa y desnaturizante de la enzima purificada demostró que esta enzima es una proteína monomérica de 86kDa. Mediante la secuenciación de péptidos internos se confirmó la presencia de dominios de unión al grupo protético PQQ y de ocho motivos (W) de triptófano, indicando que esta enzima es una quinoproteína. El análisis de perfil hidrofóbico revela que esta enzima cuenta con cinco segmentos transmembranales (Cerqueda, Tesis de Licenciatura, 2010).

**Alcohol deshidrogenasa.** La quinohemoproteína ADH de *Ga. diazotrophicus* es una PQQ-ADH tipo III se encuentra anclada a membrana y además de contener PQQ como grupo prostético contiene cuatro citocromos de tipo c. A diferencia de otras PQQ-ADHs tipo III, sólo posee dos subunidades; la subunidad I tiene un Mr de 71 kDa, posee el grupo PQQ y un citocromo c. La subunidad II con un Mr de 44 kDa tiene tres citocromos tipo c. Esta enzima posee una alta afinidad por etanol ( $K_m = 0.27 \text{ mM}$ ) y oxida alcoholes primarios y sus aldehídos correspondientes; así, es una enzima de doble función que también oxida aldehídos alifáticos (Gómez-Manzo y cols., 2005).

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

**Aldehído deshidrogenasa (ALDH).** Es una quinohemoproteína heterodimérica unida a la superficie externa de la membrana citoplásmica, la subunidad I de 76-86kDa contiene el sitio activo y el PQQ como grupo prostético, la subunidad II de 45-55kDa, presentando el sitio de oxidación de la quinona y al citocromo c como grupo prostético (Gómez-Manzo y cols., 2010, en prensa). Cataliza la oxidación de aldehídos alifáticos, los aldehídos de C2 - C4 son los mejores sustratos, excepto del formaldehído (Gómez-Manzo y cols. 2005).

### 2.3.2 Oxidasas.

Como se mencionó anteriormente, en *Ga. diazotrophicus* se han localizado al menos tres quinol oxidasas terminales, reguladas por la concentración de amonio en el medio de cultivo (Flores-Encarnación y cols., 1999). En condiciones de baja concentración de amonio la bacteria fija nitrógeno atmosférico y expresa dos ubiquinol oxidasas: citocromo  $ba_3$  y la citocromo  $bb_3$ , mientras que en condiciones de alto amonio y no fijación se expresa la ubiquinol oxidasa  $bd$  (Flores-Encarnación y cols., 2001).

La curva de titulación de la actividad respiratoria con varios sustratos y KCN reveló una cinética bifásica en condiciones de fijación de nitrógeno demostrando que una de las oxidasas terminales en dichas condiciones es altamente sensible (citocromo  $bb_3$ ), con una

$I_{50} = 5\mu\text{M}$  representando el 50% de la respiración total, y que la segunda oxidasa permanece activa a KCN  $100\mu\text{M}$  (citocromo  $ba_3$ ) (González y cols., 2006). Análisis de espectros diferenciales de CO y espectros de fotodisociación de los compuestos hemo-CO en membranas de *Ga. diazotrophicus*, muestran señal para citocromos de tipo a y b, espectros de oxidación de los citocromos titulados con KCN, indican que en concentraciones menores a  $25\mu\text{M}$ , la oxidación de un citocromo tipo “b” es suprimida, mientras que la oxidación del citocromo “a” todavía ocurre en KCN  $200\mu\text{M}$  (González y cols., 2006).

El análisis espectral de oxidasas parcialmente solubilizadas y purificadas de membranas de *Ga. diazotrophicus* demuestran que la oxidasa sensible a cianuro  $I_{50} = 5\mu\text{M}$ , tiene solamente pigmentos del citocromo *b*, mientras que la enzima resistente a cianuro  $I_{50} = 450\mu\text{M}$ , contiene cantidades iguales de los citocromos *a* y *b*. Las enzimas separadas por cromatografía de intercambio iónico fueron analizadas por SDS-PAGE, encontrando que los perfiles de las proteínas eran perceptiblemente diferentes, sugiriendo que las oxidasas cianuro-sensible y cianuro-resistente de *Ga. diazotrophicus* son entidades proteicas distintas (González y cols., 2006).

Finalmente, en 2009 se comprobó que en condiciones de fijación de nitrógeno, una de estas dos oxidasas terminales está acoplada a la formación de un gradiente protón-motriz y la otra no lo está. Esta propuesta se realizó hace 10 años (Flores- Encarnación y cols. 1999). En células tratadas con KCN ó CO se midió el efecto del desacoplante CCCP sobre cada oxidasa; se encontró que la actividad respiratoria de la vía con que utiliza la quinol oxidasa  $ba_3$  aumentó, ya que el desacoplante permitió la disipación del gradiente, por lo que se propuso que esta oxidasa funciona de manera acoplada actuando en la formación del gradiente protón-motriz. Por otro lado y como se esperaba, en la vía con la quinol oxidasa  $bb_3$  no se observó ningún efecto con la adición del desacoplante, sugiriendo que esta quinol oxidasa funciona de manera desacoplada a la formación de un gradiente protón-motriz. Estos resultados fueron comprobados a través de espectros de absorción (González, Tesis Doctoral, 2008 y Gasca, Tesis de Licenciatura, 2009).

### III. OBJETIVO

#### GENERAL

Definir la presencia de nuevas actividades enzimáticas que capaciten a *Ga. diazotrophicus* para utilizar diversos alcoholes y azúcares como fuentes de carbono y sustratos respiratorios.

#### PARTICULARES

1. Definir si *Ga. diazotrophicus* posee un sistema de oxidación para glicerol y otros sustratos como alcoholes y azúcares.
2. Definir el papel de la ADH en la oxidación de diversos sustratos alcoholes y azúcares mediante la comparación de la capacidad oxidativa en la cepa silvestre y cepas ADH-.
3. Identificar un nuevo sistema enzimático en *Ga. diazotrophicus* que sea metabólicamente interesante para estudios posteriores de la fermentación oxidativa de alcoholes y/o azúcares.

### IV. JUSTIFICACIÓN

Las deshidrogenasas del espacio periplásmico de *Ga. diazotrophicus* son determinantes en la producción de compuestos de interés biotecnológico (como la dihidroxiacetona y el ácido acético) y también en la fijación biológica de nitrógeno. No obstante su importancia, sólo se han purificado y caracterizado las deshidrogenasas encargadas de la oxidación de la glucosa, etanol y aldehído. Por tanto, juzgamos importante llevar a cabo la identificación de otras enzimas deshidrogenasas presentes en la cadena respiratoria de dicha bacteria.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico.

*Gluconacetobacter diazotrophicus* cepa PAL5

### 5.2 Medios de cultivo.

Para la realización de los experimentos se emplearon tres medios de cultivo distintos:

a) Medio LSI (condiciones para fijación de nitrógeno) el cual contiene:

Reactivo	g/L
$K_2HPO_4$	5
$NaHPO_4$	4
$MgCl_2$	0.2
$CaCl_2$	0.02
$FeCl_3$	0.01
Citrato de sodio	5
$(NH_4)_2SO_4$	0.2642
$Na_2MoO_2$	0.002

Y sacarosa al 5% como fuente de carbono.

b) Medios de cultivo modificados:

1. Medio LSI<sup>+</sup>. Medio LSI enriquecido con una fuente de carbono\* adicional a la sacarosa.
2. Medio LI<sup>+</sup>. Medio LSI sin sacarosa, con una fuente de carbono única\* y diferente a la sacarosa.

Todos los medios fueron ajustados a un pH de 5.5 con ácido clorhídrico, midiendo continuamente con un electrodo de pH Corning 10.

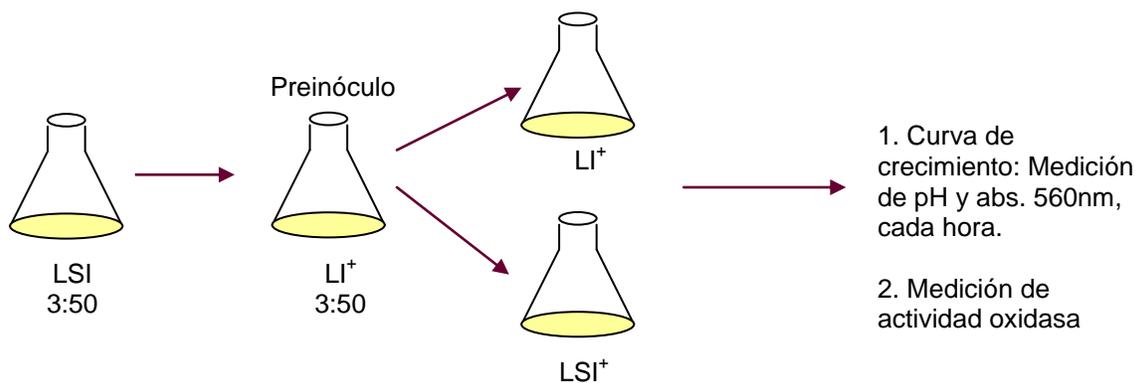
\*Las fuentes de carbono adicionales a la sacarosa o únicas utilizadas en sustitución de ésta, fueron: glicerol, fructosa, lactato, malato, sorbitol ó gluconato en una concentración final de 20mM.

### 5.3 Mantenimiento del material biológico

Las cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* fueron cultivadas en medio LSI a 30°C en agitación constante (200 r.p.m.) y almacenadas a 4°C para su uso posterior como inóculo.

### 5.4 Preinóculos

A partir de células cultivadas en medio LSI se inocularon (3ml) medios modificados (LI<sup>+</sup>). Estas cepas se dejaron crecer a 30°C en agitación orbital constante (250 rpm) durante 24 horas. A partir de este preinóculo se inocularon medios modificados LSI<sup>+</sup> y medios LI<sup>+</sup>. Y se realizaron los siguientes experimentos.



(+) Sustratos adicionados a una concentración 20mM: Glicerol, fructosa, lactato, malato, sorbitol ó gluconato

### 5.5 Curvas de crecimiento

Se compararon las curvas de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LSI y en los medios modificados, LSI<sup>+</sup> y LI<sup>+</sup>, con diversas fuentes de carbono 20mM (glicerol, fructosa, lactato, malato, sorbitol ó gluconato) adicionales ó en sustitución de la sacarosa, respectivamente, registrándose cada hora la densidad óptica a 560nm de

cada cultivo en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC en modo de absorbencia y el pH en un potenciómetro Corning 10.

Los resultados numéricos obtenidos del crecimiento se procesaron usando el programa Microsoft Office Excel 2007 para obtener las curvas comparativas de crecimiento.

### **5.6 Actividad de oxidasas.**

1. Obtención de material biológico. Las células de cualquier cultivo fueron recuperadas durante su fase exponencial en una centrifuga Beckman J2-21. Se centrifugaron a 7000r.p.m durante 10 minutos, y fueron lavadas dos veces con amortiguador de fosfato de potasio 50mM pH 6.0. Las células fueron empleadas inmediatamente.
2. Medición de actividad oxidasa. Se midió la actividad oxidasa para glucosa, etanol, acetaldehído, glicerol, fructosa malato, sorbitol, gluconato y lactato, en un oxímetro Yellow Springs Instruments 5300 empleando: 1.93ml amortiguador de fosfato 50mM, pH 6.0, 50µl de células (50µg de células) y 20µl de un stock 1M de cada sustrato mencionado en un volumen final de 2ml, tal como se describe en Escamilla y cols. (1987).

## VI. RESULTADOS

*Ga. diazotrophicus* es una bacteria capaz de emplear un amplio rango de azúcares y alcoholes como única fuente de carbono ((Li y cols., 1991; Fuentes-Ramírez y cols., 2001). De las fuentes reportadas, sin duda, la glucosa y el etanol pueden actuar como fuentes de carbono únicas y este dato ha sido constatado en nuestro laboratorio (Domínguez, Tesis de Licenciatura, 2003). Del mismo modo, nuestro laboratorio ha purificado y caracterizado las deshidrogenasas responsables de la oxidación de la glucosa, etanol y acetaldehído (Gómez Manzo, 2007, Tesis Doctoral, Sara Páez, Tesis de doctorado, 2010).

Con la finalidad de conocer nuevas vías de oxidación presentes *Ga. diazotrophicus*, que posiblemente involucren nuevas deshidrogenasas asociadas a la cadena respiratoria de esta bacteria, se realizaron cultivos en matraces de 250ml que contenían 50ml del medio modificado LSI<sup>+</sup> (contiene sacarosa más el sustrato probado) ó LI<sup>+</sup> (el sustrato probado es la fuente de carbono única). Los sustratos ensayados fueron: glicerol, fructosa, lactato, malato, sorbitol ó gluconato; todos, a una concentración final de 20mM. Las fuentes de carbono utilizadas han sido reportadas por diversos autores como potenciales fuentes de carbono para el crecimiento de otras bacterias del ácido acético. Para efectos de comparación, *Ga. diazotrophicus* se cultivó en un medio LSI, el cual contiene sacarosa como única fuente de carbono. Para determinar la presencia/ausencia de la enzima responsable de la oxidación del sustrato adicionado en los medios modificados, se realizaron curvas de crecimiento midiendo la densidad óptica a 560nm y la acidificación del medio; por otro lado se determinó la actividad oxidasa en cada condición para cada sustrato probado.

Mediante las curvas de crecimiento se obtuvo un esquema cuantitativo sobre el crecimiento de la bacteria. La diferencia en los niveles de actividad oxidasa entre las células cultivadas en los diferentes medios nos permitió conocer la presencia o ausencia y el carácter inducible o constitutivo de la enzima deshidrogenasa para el sustrato específicamente probado, ya que el oxígeno consumido es directamente proporcional a la cantidad de sustrato oxidado por alguna deshidrogenasa específica, que a su vez cede los electrones a la UQ y oxidasas terminales.

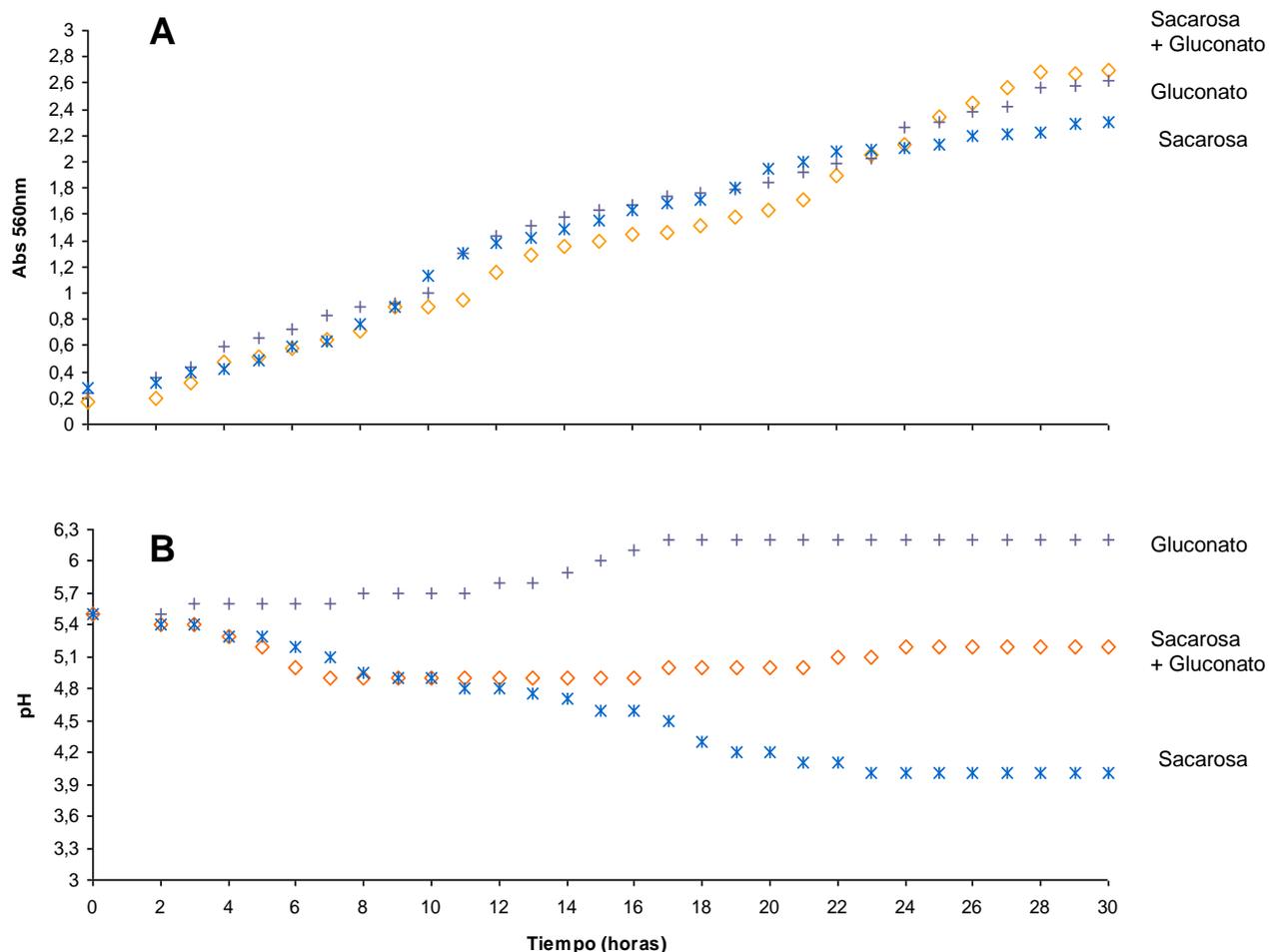
## 6.1 Gluconato

### Efecto del gluconato en el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*

Acorde a los experimentos de Flores-Encarnación (1999), el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en el medio LSI (control) se presentó como una curva bifásica. La primera fase de crecimiento depende de la remoción inicial de  $\text{NH}_4^+$ . Después de una pequeña fase de adaptación el crecimiento se reanuda, se presume que este periodo está acompañado de la expresión de la actividad nitrogenasa. La segunda fase de crecimiento depende de la actividad diazótropa de la bacteria (Gráfica 1A). La oxidación de la sacarosa por la GDH membranal lleva a la acidificación del medio debido a la acumulación de ácido glucónico. La acidificación del medio es una curva inversa al crecimiento, presentándose también de manera bifásica (Gráfica 1B); se observó una acidificación más intensa durante la segunda fase de crecimiento, sugiriendo que la oxidación de la glucosa a ácido glucónico es mayor con el propósito de proveer las condiciones metabólicas apropiadas para generar suficiente ATP y remover  $\text{O}_2$  para la fijación de nitrógeno.

El crecimiento de la bacteria en los medios que contienen gluconato ( $\text{LSI}^+$  y  $\text{LI}^+$ ) es bifásico y paralelo al grupo control, sugiriendo que la bacteria cuenta con un sistema constitutivo, homólogo al sistema de oxidación para la glucosa, de oxidación para gluconato y con una ruta metabólica que permite la utilización del esqueleto carbonado del gluconato para la síntesis de biomoléculas que finalmente permiten el crecimiento de la bacteria (Gráfica 1A).

A pesar de esta similitud en el crecimiento entre el grupo control y los medios con gluconato, la acidificación del medio no se comportó de manera paralela. En las cepas de *Gluconobacter* la oxidación de gluconato puede producir 2-ceto-D-gluconato o bien, 5-ceto-D-gluconato (Shinagawa, 1999) y estos productos no conllevan a la acidificación del medio. Por tanto, es comprensible que en el medio  $\text{LSI}^+$ gluconato se observara acidificación durante la primera fase del crecimiento debida a la oxidación de la glucosa a ácido glucónico por la GDH y durante la segunda fase el pH comenzara a aumentar debido a la remoción del ácido glucónico como fuente de carbono ya que el gluconato ingresa a la célula y se incorpora a la vía de las pentosas-fosfato.



**Gráfica 1.** Curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medios modificados por la adición de gluconato. **Panel A.** Utilización de gluconato como única fuente de carbono (+ + +) o adicionado con sacarosa (♦ ♦ ♦). El crecimiento en el medio LSI se usa como cinética de referencia (\* \* \*). **Panel B.** Acidificación del medio de cultivo con gluconato como fuente de carbono (+ + +) o adicionado con sacarosa (♦ ♦ ♦). La acidificación en el medio LSI se utiliza como referencia (\* \* \*).

En el medio LI<sup>+</sup>gluconato no se registró acidificación, el pH aumentó durante ambas fases y de manera más intensa durante la segunda por las causas mencionadas anteriormente (Gráfica 1B).

Este aumento de pH en los medios LSI<sup>+</sup>gluconato y LI<sup>+</sup>gluconato durante la segunda fase de crecimiento es el que representa el aumento de actividad de las deshidrogenasas membranales que brindan las condiciones metabólicas que permiten la actividad de la nitrogenasa para la fijación de nitrógeno.

### Efecto del gluconato sobre la respiración endógena de *Ga. diazotrophicus*.

Al medir la actividad respiratoria estimulada por glucosa, acetaldehído o etanol, se encontró que ésta fue discretamente mayor en las células que crecieron en los medios que contenían gluconato como fuente de carbono adicional o de reemplazo (Tabla 1) respecto al grupo control (LSI). El mayor incremento de actividades fue observado en el medio LSI<sup>+</sup>gluconato donde la actividad con glucosa y etanol se incrementó 1.6 y 1.8 veces, respectivamente. Contrastando; las actividades con acetaldehído y gluconato no experimentaron cambio significativo. Es notable el hecho de que la actividad respiratoria con gluconato solo se incrementa en un 40% cuando el gluconato es utilizado como fuente de carbono adicional o de reemplazo. Esto nos sugiere que la gluconato deshidrogenasa es una enzima constitutiva que se sobreinduce discretamente por la presencia de gluconato en el medio.

Sustrato [10mM]	Tipo de medio		
	LSI	LSI <sup>+</sup>	LI <sup>+</sup>
Glucosa	73*	117	101
Acetaldehído	58	67	63
Etanol	41	73	40
<b>GLUCONATO</b>	<b>33</b>	<b>47</b>	<b>46</b>

**Tabla 1.** Actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LSI, LSI<sup>+</sup> y LI<sup>+</sup> con gluconato como sustrato adicional.

\* La actividad está dada en nanoátomos de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de peso húmedo de células enteras.

Estos datos confirman que *Ga. diazotrophicus* posee la enzima gluconato deshidrogenasa como enzima constitutiva de su cadena respiratoria permitiendo la oxidación del gluconato y por tanto la obtención de energía para la célula. Por otro lado, el esqueleto carbonado de dicho sustrato es capaz de reemplazar a la sacarosa como única fuente de carbono produciendo un crecimiento con cinética y rendimiento similares.

## 6.2 Lactato

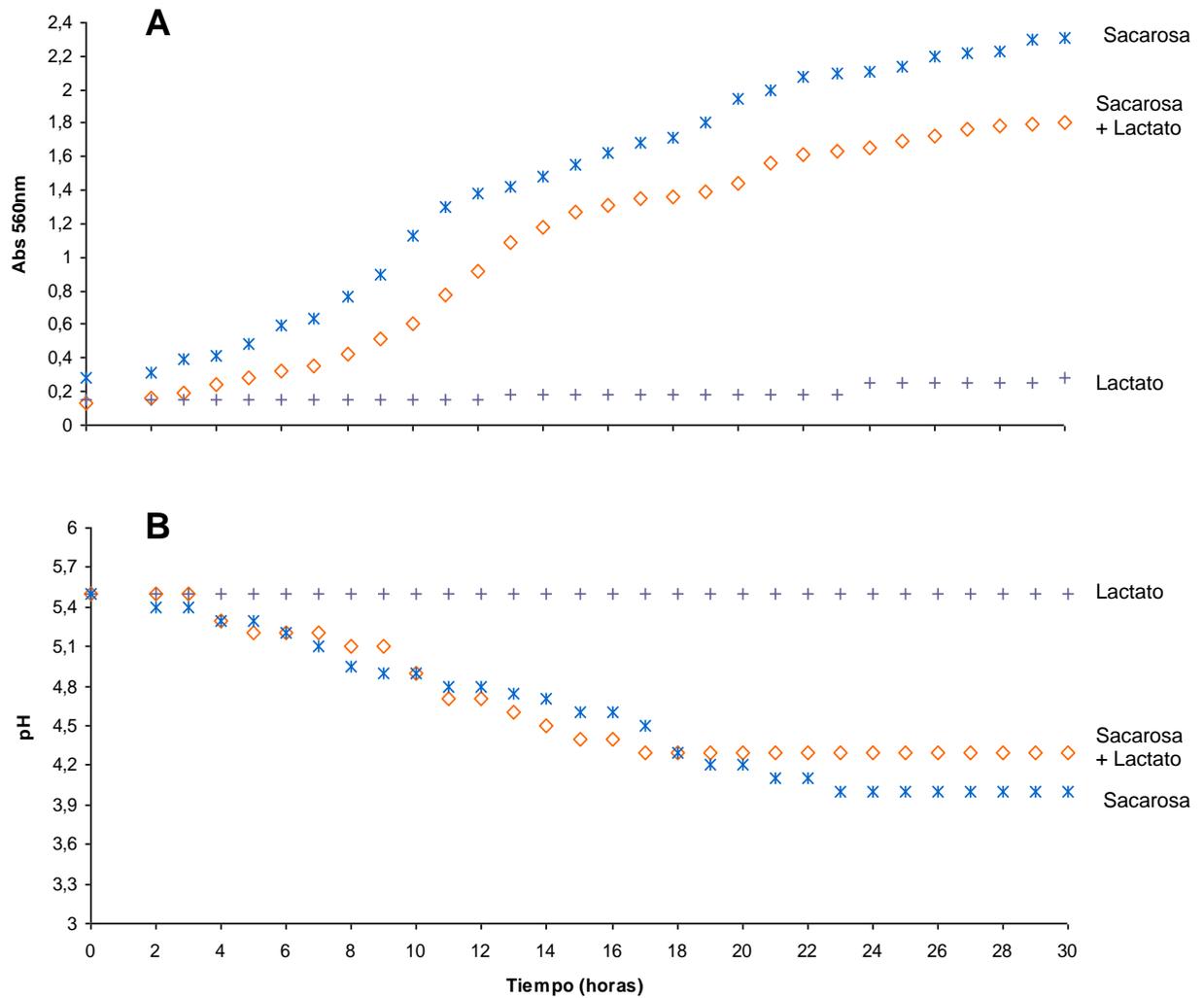
### Efecto del lactato en el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*

Al igual que en el grupo control (medio LSI), el crecimiento de la bacteria en el medio LSI+lactato se presentó de manera bifásica y casi de manera paralela. Se observa un ligero desfase de tiempo en que ocurre cada fase de crecimiento, siendo en el medio LSI+lactato más lento, además, el rendimiento de biomasa fue menor en un 20%. (Gráfica 2A).

La acidificación fue similar en ambas condiciones durante la primera fase de crecimiento, durante la segunda fase de crecimiento se encuentra una diferencia importante, ya que en el medio LSI+lactato, la acidificación se detuvo por completo (Gráfica 2B)

En el medio LI+lactato no se registró crecimiento y tampoco hubo acidificación del medio (Gráfica 2).

Estos datos indican que: 1) El crecimiento observado se da exclusivamente por la utilización de la sacarosa como fuente de carbono, 2) la acidificación se debe por completo a la producción de ácido glucónico por medio de la PQQ-GDH, ya que ésta sólo se detectó en los medios LSI y LSI+lactato, los cuales contienen sacarosa, sustrato de dicha enzima. 3) *Ga. diazotrophicus* no es capaz de utilizar el esqueleto carbonado del lactato como fuente de carbono única y en todo caso, la presencia de lactato en el medio hizo menos eficiente el crecimiento con sacarosa.



**Grafica 2.** Curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medios modificados por la adición de lactato. **Panel A.** Utilización de lactato como única fuente de carbono (+ + +) ó adicionado con sacarosa (◊ ◊ ◊). El crecimiento en el medio LSI se usa como cinética de referencia (\* \* \*). **Panel B.** Acidificación del medio de cultivo con lactato como fuente de carbono (+ + +) ó adicionado con sacarosa (◊ ◊ ◊). La acidificación en el medio LSI se utiliza como referencia (\* \* \*).

### Efecto del lactato sobre la respiración endógena de *Ga. diazotrophicus*.

Al medir la actividad respiratoria estimulada por glucosa, acetaldehído y etanol en células enteras de *Ga. diazotrophicus* cultivadas en un medio LSI+lactato, se encontró un aumento de actividad (Tabla 2) con los tres sustratos, en especial para el etanol cuya actividad se incrementó 2.4 veces. La razón por la cual el lactato incrementa notablemente la actividad con etanol no es clara y probablemente tenga que ver con su efecto tóxico sobre el crecimiento, ya anotado. Lo anterior es notable pues la respiración con lactato en *Ga. diazotrophicus* fue marginal en toda condición de crecimiento (tabla 2), lo que nos lleva a la conclusión de que no existe un sistema de oxidación para lactato que esté asociado a la cadena respiratoria y tampoco, al parecer, una vía que permita la utilización del lactato como fuente de carbono.

Sustrato [10mM]	Tipo de medio		
	LSI	LSI <sup>+</sup>	LI <sup>+</sup>
Glucosa	73*	80	-
Acetaldehído	58	65	-
Etanol	41	99	-
<b>LACTATO</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>-</b>

**Tabla 2.** Actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LSI, LSI<sup>+</sup> y LI<sup>+</sup> con lactato como sustrato adicional.

\* La actividad está dada en nanoátomos de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de peso húmedo de células enteras

Los resultados de las cinéticas de crecimiento y de actividad oxidasa se corroboran en que el lactato no es una buena fuente de carbono al no permitir el crecimiento ni un buen sustrato respiratorio, al no ser oxidado de manera considerable en ninguna de las condiciones probadas. Por tanto, no existe una enzima capaz de oxidar el lactato, ya sea lactato deshidrogenasa u otra, ni ninguna ruta metabólica que utilice el lactato con fuente de carbono.

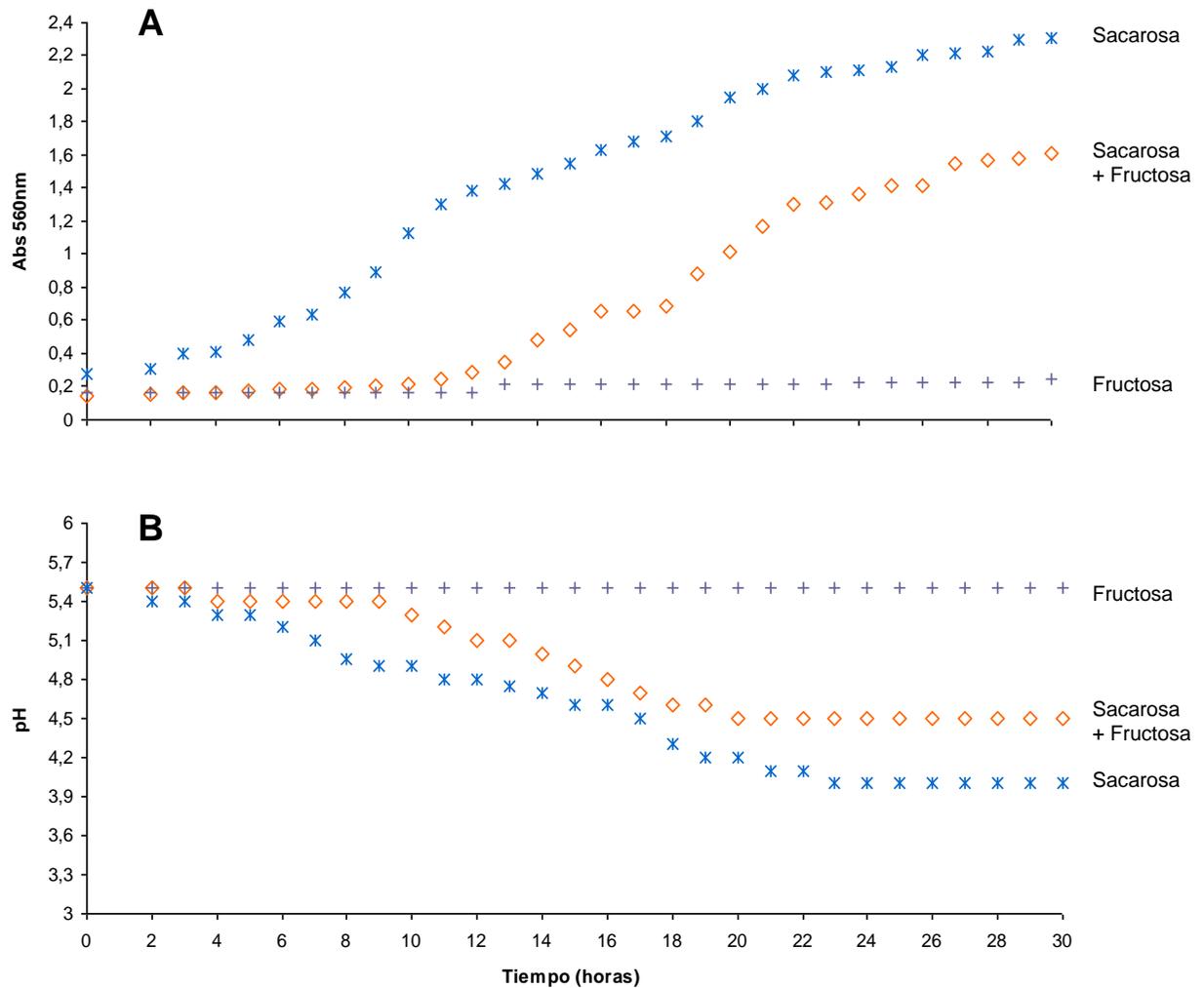
### 6.3 Fructosa

#### Efecto de la fructosa en el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*

La fructosa, como fuente de carbono adicional a la sacarosa (medio LSI<sup>+</sup>fructosa), tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* ya que, como se observa en la cinética de crecimiento (Figura 3A), produce un retraso considerable en el crecimiento y rendimiento 30% menor en biomasa.

Como se ha descrito anteriormente, en el medio LSI se presentaron dos etapas de acidificación del medio que corresponden a las fases exponenciales de crecimiento, sin embargo, en el medio LSI<sup>+</sup> la acidificación fue constante durante toda la fase exponencial (de 5.4-4.5), al final esta fase la acidificación se detuvo (Gráfica. 3 panel B).

En el medio LI<sup>+</sup>fructosa no hay crecimiento alguno y tampoco hay acidificación. Evidenciando que la fructosa no es utilizada como fuente de carbono por *Ga. diazotrophicus* y que el crecimiento en el medio LSI<sup>+</sup>fructosa se debe exclusivamente a la sacarosa que hay en el medio.



**Grafica 3.** Curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medios modificados por la adición de fructosa. **Panel A.** Utilización de fructosa como única fuente de carbono (+ + +) ó adicionado con sacarosa (◇ ◇ ◇). El crecimiento en el medio LSI se usa como cinética de referencia (\* \* \*). **Panel B.** Acidificación del medio de cultivo con fructosa como fuente de carbono (+ + +) ó adicionado con sacarosa (◇ ◇ ◇). La acidificación en el medio LSI se utiliza como referencia (\* \* \*).

### Efecto de la fructosa sobre la respiración endógena de *Ga. diazotrophicus*.

Al medir la actividad respiratoria inducida en células que crecieron en un medio con fructosa como fuente adicional se encontró un aumento de actividad para aldehído en 1.5 veces, mientras que para glucosa la actividad permanece constante, es notable que la bacteria no utilizó la sacarosa como fuente de carbono de manera tan efectiva respecto al grupo control (Gráfica 3A) y tampoco la oxidó de manera más intensa por medio de la GDH membranal. Para etanol la actividad disminuye un poco más de la mitad. La baja actividad registrada para fructosa en los medios LSI y LSI<sup>+</sup>fructosa es despreciable y sugiere la ausencia de una deshidrogenasa específica para este sustrato (Tabla 3).

No se midió actividad oxidasa para células cultivadas en medios con fructosa como única fuente de carbono pues no hubo crecimiento, sugiriendo que *Ga. diazotrophicus* no posee un sistema de oxidación para fructosa asociado a la cadena respiratoria.

Sustrato [10mM]	Tipo de medio		
	LSI	LSI <sup>+</sup>	LI <sup>+</sup>
Glucosa	73*	77	-
Acetaldehído	58	85	-
Etanol	41	18	-
<b>FRUCTOSA</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>-</b>

**Tabla 3.** Actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LSI, LSI<sup>+</sup> y LI<sup>+</sup> con fructosa como sustrato adicional.

\* La actividad está dada en nanoátomos de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de peso húmedo de células enteras.

Estos resultados indican que la fructosa no es utilizable como fuente de carbono ni como sustrato respiratorio.

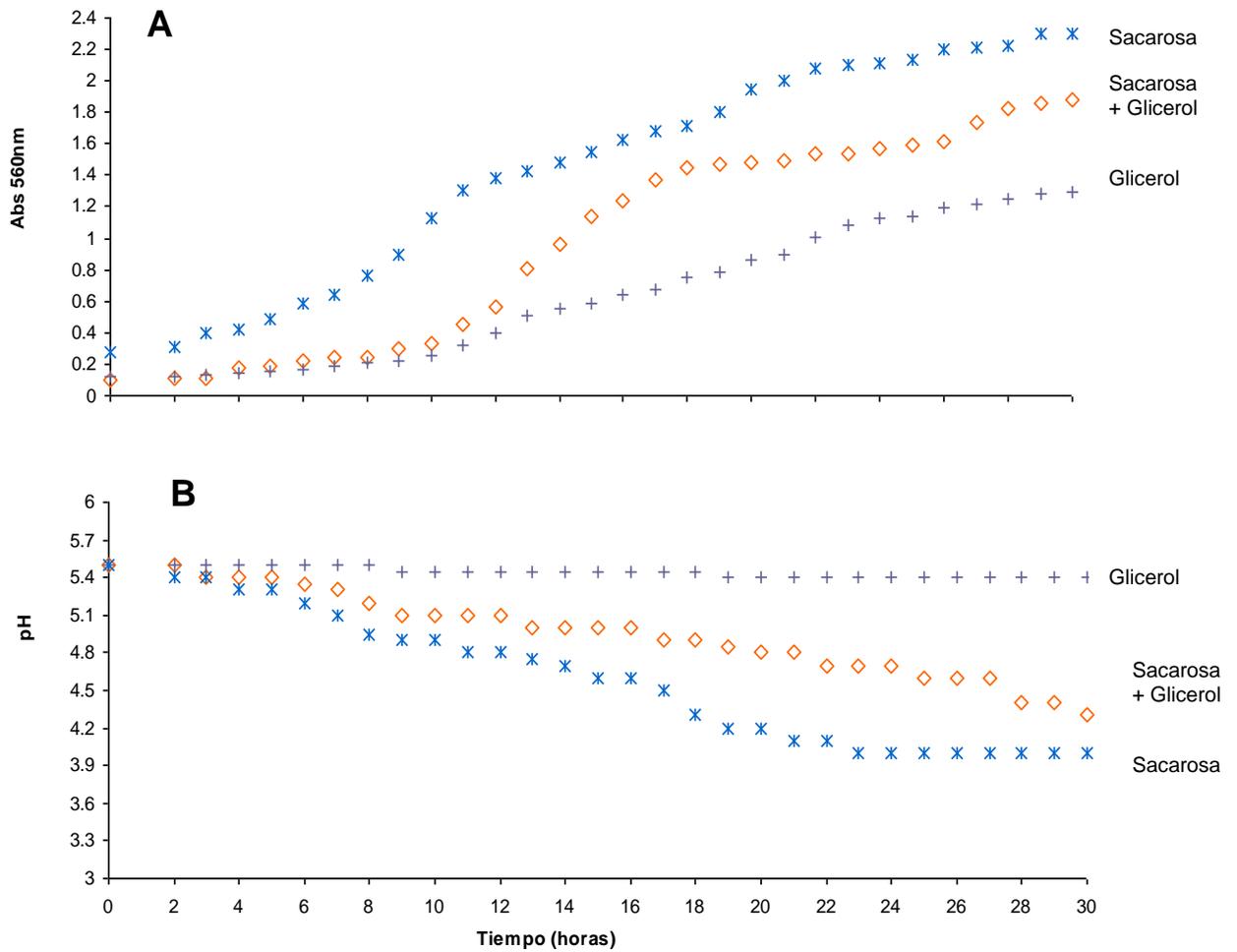
## 6.4 Glicerol

### Efecto del glicerol en el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*

La cinética de crecimiento de *Ga diazotrophicus* en los tres tipos de medio se presentan como curvas bifásicas, reflejando que la bacteria es capaz de crecer utilizando ambos sustratos como fuente de carbono (Gráfica 4A), sin embargo, existen diferencias notables entre ellas, primero por el rendimiento de la biomasa y segundo por el tiempo en que cada fase de crecimiento se desarrolla. En los medios con glicerol (LSI<sup>+</sup> y LI<sup>+</sup>) se observó una fase *lag* considerablemente mayor que implica una fase adaptativa al sustrato, retrasándose así la fase exponencial.

Cuando *Ga. diazotrophicus* creció en el medio LI<sup>+</sup> su rendimiento se encontró disminuido casi a la mitad y en el medio LSI<sup>+</sup> en un 20% respecto al grupo control. Es importante comentar que éste resultado no demuestra qué sustrato permite un mejor crecimiento, es decir, una concentración distinta a la utilizada de glicerol podría permitir un mejor crecimiento (ver página 43-45).

La oxidación del glicerol por medio de la GLDH produce dihidroxiacetona. Por tanto, no se observó acidificación del medio en las células cultivadas en LI<sup>+</sup>glicerol; por otro lado, es evidente que la acidificación observada en el medio LSI<sup>+</sup>glicerol se debe exclusivamente a la acumulación de ácido glucónico, sin embargo, la acidificación es menor que en el grupo control debido a que la bacteria puede obtener energía tanto de la oxidación de la sacarosa como del glicerol, acumulándose una menor cantidad de ácido glucónico. (Gráfica 4B).



**Grafica 4.** Curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medios modificados por la adición de glicerol. **Panel A.** Utilización de glicerol como única fuente de carbono (+ + +) ó adicionado con sacarosa (◇ ◇ ◇). El crecimiento en el medio LSI se usa como cinética de referencia (\*\*\*). **Panel B.** Acidificación del medio de cultivo con glicerol como fuente de carbono (+ + +) ó adicionado con sacarosa (◇ ◇ ◇). La acidificación en el medio LSI se utiliza como referencia (\*\*\*)

### Efecto de la glicerol sobre la respiración endógena de *Ga. diazotrophicus*.

Al medir la actividad respiratoria inducida por glucosa y etanol en células cultivadas en un medio LSI<sup>+</sup>glicerol se encontró un aumento discreto de actividad de 1.4 y 1.2 veces respectivamente, la actividad respiratoria con acetaldehído fue constante, y el aumento de la oxidación del glicerol es muy poco significativo respecto al grupo control.

Por otro lado, en las células cultivadas en un medio LI<sup>+</sup>glicerol la actividad respiratoria para glucosa y acetaldehído no se modificó, y hubo una ligera disminución de actividad para etanol de 1.2 veces. Sin embargo, la actividad respiratoria para aumentó casi 17 veces respecto al grupo control (Tabla 4). Este resultado refleja que la glicerol deshidrogenasa es una enzima inducible y sujeta a represión catabólica por glucosa que se genera a partir de la sacarosa del medio; este dato se corrobora con la cinética de crecimiento, en donde la fase de latencia es dos veces mayor, tiempo en el cual la bacteria estaría adaptándose a dicho sustrato y estaría comenzando a sintetizar las enzimas responsables de la oxidación del glicerol y de su utilización como fuente de carbono.

Sustrato [10mM]	Tipo de medio		
	LSI	LSI <sup>+</sup>	LI <sup>+</sup>
Glucosa	73*	104	71
Acetaldehído	58	59	56
Etanol	41	52	33
<b>GLICEROL</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>30</b>

**Tabla 4.** Actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LSI, LSI<sup>+</sup> y LI<sup>+</sup> con glicerol como sustrato adicional.

\* La actividad está dada en nanoátomos de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de peso húmedo de células enteras.

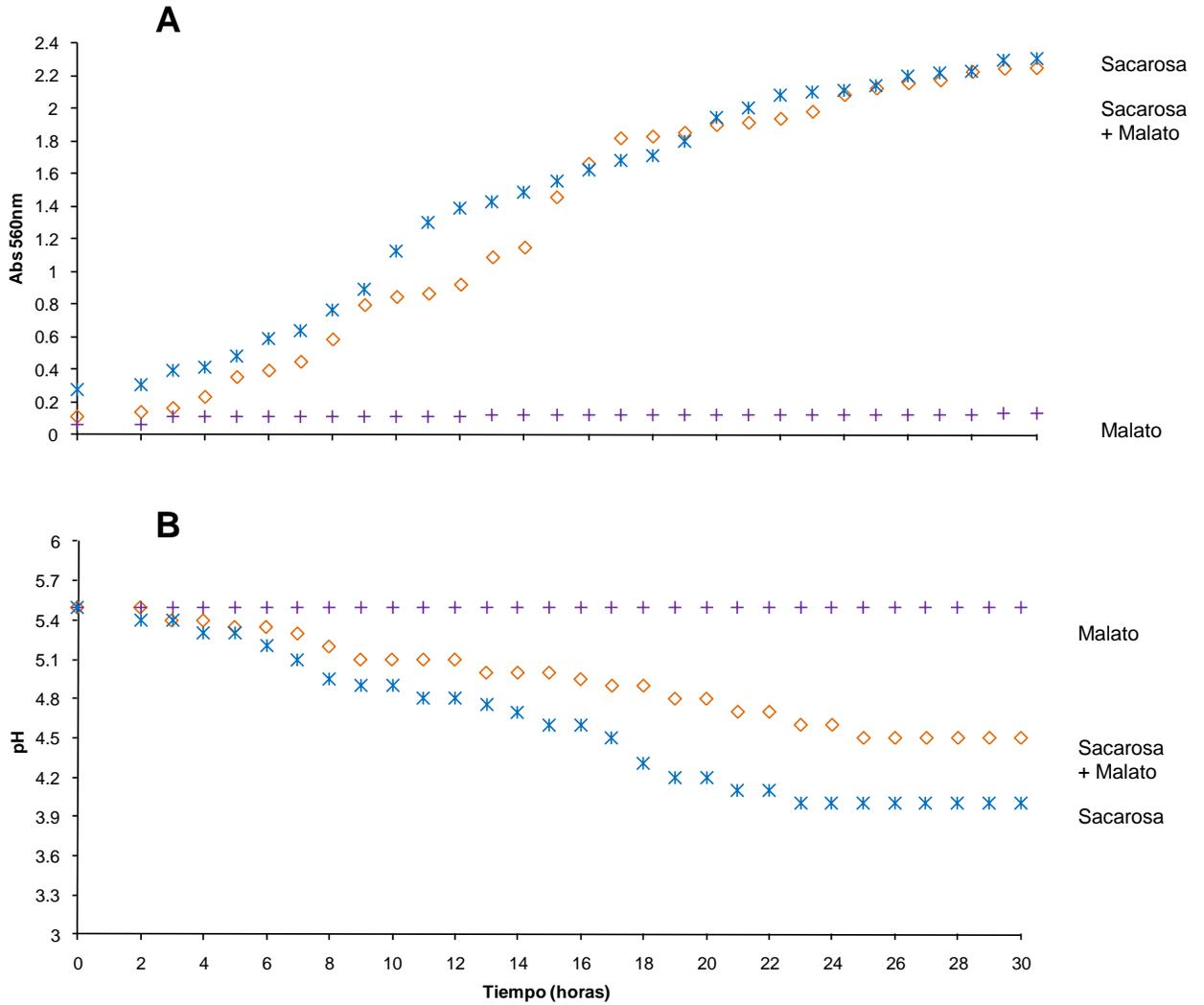
Por tanto, el glicerol se muestra como una buena fuente de carbono única, sugiriendo la utilización de su esqueleto carbonado mediante alguna ruta metabólica; por otro lado, el glicerol es un buen sustrato respiratorio cuando es el único sustrato disponible en el medio permitiendo así la inducción de la enzima glicerol deshidrogenasa.

## 6.5 Malato

### Efecto del malato en el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*

Cuando se cultivó a *Ga. diazotrophicus* en un medio LSI<sup>+</sup>malato, se encontró una cinética de crecimiento bifásica y paralela a la del grupo control. No existió crecimiento alguno en el medio LI<sup>+</sup>malato, sugiriendo que el crecimiento se debe exclusivamente a la utilización de la sacarosa (Gráfica 5A).

A pesar de estas similitudes respecto al crecimiento entre el grupo control y LSI<sup>+</sup>malato, la acidificación en el medio LSI<sup>+</sup>malato fue menor. No se registró acidificación en el medio LI<sup>+</sup>malato (Gráfica 5). Estos resultados indican que no existe una deshidrogenasa membranal capaz de oxidar malato, y que la acidificación registrada se debe a la acumulación de ácido glucónico.



**Grafica 5.** Curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medios modificados por la adición de malato. **Panel A.** Utilización de malato como única fuente de carbono (+ + +) ó adicionado con sacarosa (◊ ◊ ◊). El crecimiento en el medio LSI se usa como cinética de referencia (\*\*\*). **Panel B.** Acidificación del medio de cultivo con malato como fuente de carbono (+ + +) ó adicionado con sacarosa (◊ ◊ ◊). La acidificación en el medio LSI se utiliza como referencia(\*\*\*\*).

### Efecto del malato sobre la respiración endógena de *Ga. diazotrophicus*.

Al medir actividad respiratoria en células cultivadas en medio LSI<sup>+</sup>malato se encontró una disminución en la oxidación del aldehído en 1.6 veces; la respiración estimulada por glucosa y etanol permaneció prácticamente constante. Por otro lado, en los medios LSI y LSI<sup>+</sup>malato no se registró actividad respiratoria con gluconato. En el medio LI<sup>+</sup>malato no hubo crecimiento por lo que no se midió actividad respiratoria (Tabla 5). Estos resultados sugieren que *Ga. diazotrophicus* no cuenta alguna enzima deshidrogenasa membranal capaz de oxidar el malato.

Sustrato [10mM]	Tipo de medio		
	LSI	LSI <sup>+</sup>	LI <sup>+</sup>
Glucosa	73*	96	-
Acetaldehído	58	37	-
Etanol	41	46	-
<b>MALATO</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>

**Tabla 5.** Actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LSI, LSI<sup>+</sup> y LI<sup>+</sup> con malato como sustrato adicional.

\* La actividad está dada en nanoátomos de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de peso húmedo de células enteras.

Estos resultados indican que *Ga. diazotrophicus* no posee alguna deshidrogenasa membranal que utilice el malato como fuente de energía, y que no posee algún sistema de transporte para poder utilizarlo como fuente carbono, para así incorporarse al Ciclo de Krebs, por ejemplo.

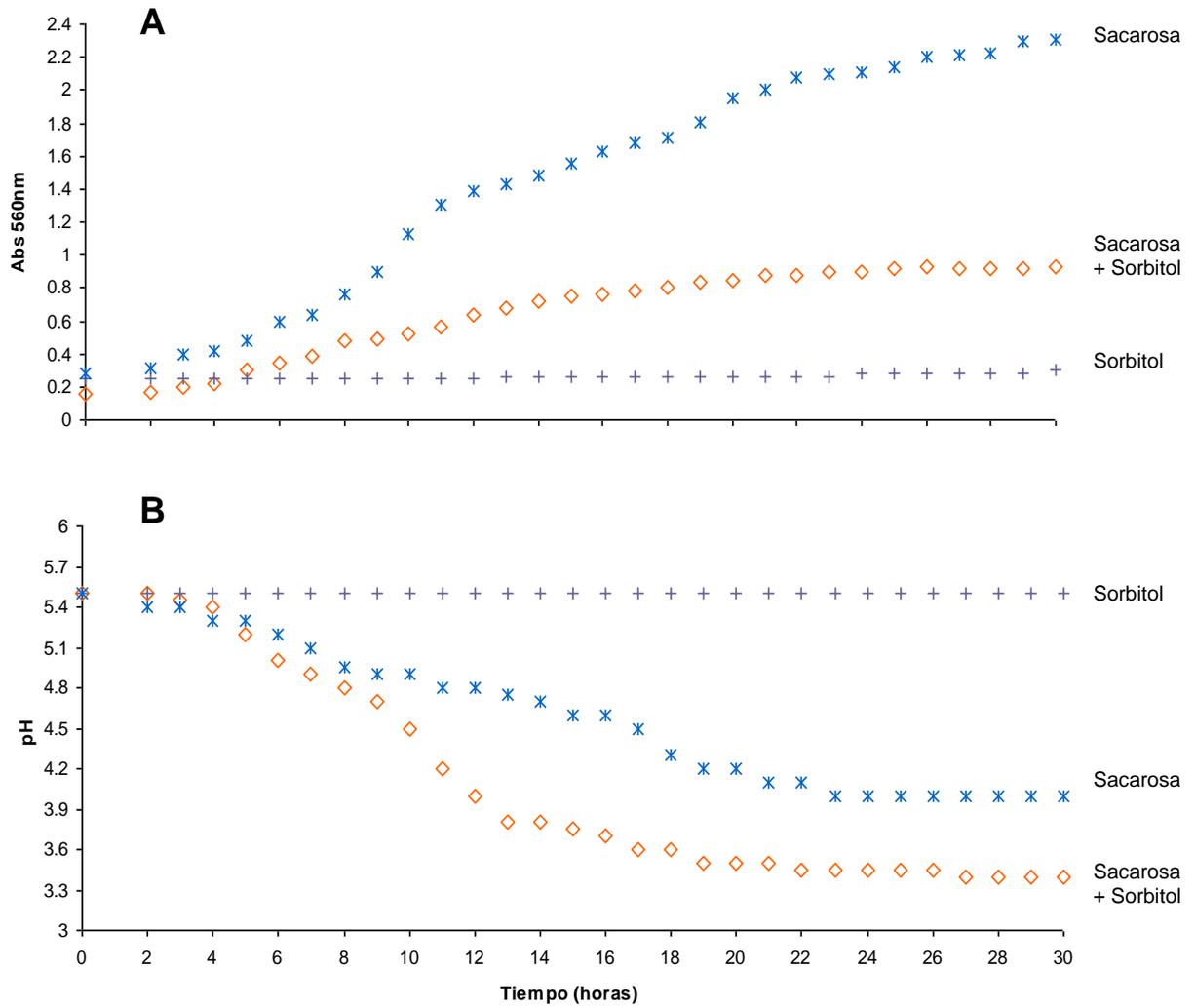
## 6.6 Sorbitol

### Efecto del sorbitol en el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*

En la cinética de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en un medio LSI<sup>+</sup>sorbitol no se puede apreciar una cinética bifásica, el sorbitol parece ser tóxico para la célula, pues interfiere en el crecimiento. (Gráfica 6A). Aparentemente el sorbitol también afecta la oxidación del ácido glucónico producido a partir de la sacarosa, la mayor acidificación tuvo lugar en paralelo al tiempo de máximo crecimiento y a pesar de que el crecimiento en el medio LSI<sup>+</sup> fue considerablemente menor, se observó un descenso importante de pH durante su fase exponencial (Gráfica 6B).

Por otro lado, en el medio LI<sup>+</sup> no se observó crecimiento alguno y tampoco hubo acidificación del medio, indicando que la bacteria no es capaz de utilizar el sorbitol como fuente de carbono y que el poco crecimiento observado en el medio LSI<sup>+</sup> se debe exclusivamente a la utilización de la sacarosa.

Estos resultados sugieren que en el medio LSI<sup>+</sup> *Ga. diazotrophicus* utilizó la sacarosa como fuente de carbono en una cantidad muy baja, y que existió una acumulación importante de ácido glucónico debido a un efecto negativo del sorbitol.



**Grafica 6.** Curva de crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medios modificados por la adición de sorbitol. **Panel A.** Utilización de sorbitol como única fuente de carbono (+ + +) o adicionado con sacarosa (◇ ◇ ◇). El crecimiento en el medio LSI se usa como cinética de referencia (\* \* \*). **Panel B.** Acidificación del medio de cultivo con sorbitol como fuente de carbono (+ + +) o adicionado con sacarosa (◇ ◇ ◇). La acidificación en el medio LSI se utiliza como referencia (\* \* \*).

### Efecto del sorbitol sobre la respiración endógena de *Ga. diazotrophicus*.

Con los resultados obtenidos sobre la acidificación en la curva de crecimiento se esperaba que la actividad respiratoria estimulada por glucosa fuera mayor en el medio LSI<sup>+</sup>, sin embargo, la actividad respiratoria no se modificó respecto al grupo control. Para acetaldehído y etanol la actividad respiratoria disminuyó, en 1.4 veces y 3 veces, respectivamente, de manera considerable para este último (Tabla 6).

No se encontró actividad respiratoria estimulada por sorbitol cuando *Ga. diazotrophicus* creció en los medios LSI y LSI<sup>+</sup>, no se midió la actividad para las células cultivadas en el medio LI<sup>+</sup>, ya que no hubo crecimiento alguno.

Sustrato [10mM]	Tipo de medio		
	LSI	LSI <sup>+</sup>	LI <sup>+</sup>
Glucosa	73*	74	-
Acetaldehído	58	40	-
Etanol	41	14	-
<b>SORBITOL</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>

**Tabla 6.** Actividad respiratoria de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LSI, LSI<sup>+</sup> y LI<sup>+</sup> con sorbitol como sustrato adicional.

\* La actividad está dada en nanoátomos de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de peso húmedo de células enteras.

Estos resultados indican que no existe alguna deshidrogenasa capaz de oxidar el sorbitol y que tampoco existe alguna manera de internalizar el sustrato para que la bacteria lo pueda utilizar como fuente de carbono, además todo indica que el sorbitol tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*.

## 6.7 GLICEROL COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO

Acorde a los experimentos anteriores, el glicerol es utilizado como fuente de carbono y como sustrato respiratorio por la bacteria *Ga. diazotrophicus*. La enzima responsable de la oxidación del glicerol mostró ser una enzima inducible, ya que sólo cuando el glicerol es la única fuente de carbono disponible en el medio (medio LI<sup>+</sup>glicerol) se encontró actividad respiratoria para dicho sustrato. Por tanto, es preciso conocer la concentración de glicerol que permite una mayor actividad respiratoria de la enzima y mejor rendimiento en biomasa.

### 6.7.1. Influencia de la concentración del glicerol sobre la inducción de la enzima Glicerol Deshidrogenasa y sobre la biomasa producida.

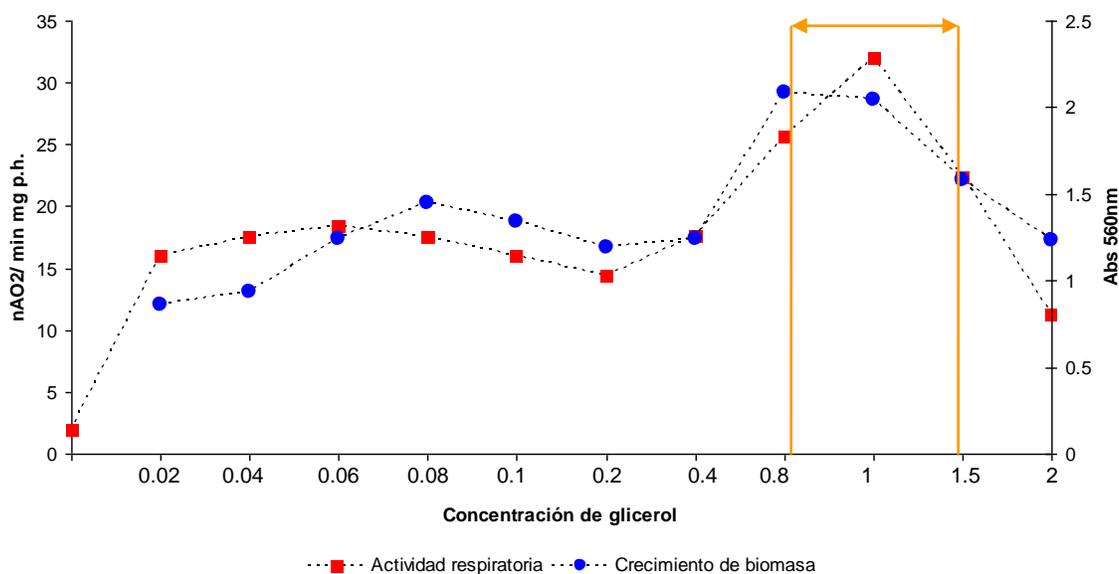
Tomando en cuenta que la Glicerol Deshidrogenasa es una enzima inducible, se cultivó a *Ga. diazotrophicus* en un medio LI<sup>+</sup>glicerol con concentraciones crecientes de glicerol de 0.02% hasta 2%. El grupo control fue cultivado en un medio LSI.

La actividad respiratoria estimulada por glicerol sugirió que cuando *Ga. diazotrophicus* crece en un medio LI<sup>+</sup>glicerol como única fuente de carbono, la enzima Glicerol Deshidrogenasa se induce a cualquiera de las concentraciones ensayadas (Tabla 7); es notable que aún pequeñas concentraciones de glicerol (desde 0.02% hasta 0.4%) produzcan una inducción de al menos 7.5 veces respecto al grupo control. A concentraciones mayores de 0.4% se observó una inducción aún mayor de la enzima, llegando a su máxima inducción, de 16 veces, cuando las células se cultivaron con 1% de glicerol. Por otro lado, dicha inducción comenzó a declinar a concentraciones mayores del 1%, disminuyendo hasta una inducción de solo 5.5 veces cuando el glicerol se incrementó al 2% (Gráfica 7).

	[ %] Glicerol	Act. oxidasa para glicerol	Abs 560nm (48 hrs.)	pH (48 hrs.)
Grupo control (medio LSI)	0	2*	-	-
	0.02	16	0.86229	5.2
	0.04	17	0.93858	5.3
	0.06	18	1.24196	5.2
	0.08	17	1.44533	5.2
Ensayos previos	0.1	16	1.33713	5.2
	<b>0.2</b>	<b>17</b>	<b>1.19376</b>	<b>5.5</b>
	0.4	18	1.2437	5.5
Concentración óptima	0.8	26	2.08562	5.5
	<b>1</b>	<b>32</b>	<b>2.04292</b>	<b>5.5</b>
	1.5	23	1.5807	5.3
	2	11	1.23705	5.2

**Tabla 7.** Actividad oxidasa y crecimiento de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LI<sup>+</sup> con concentraciones crecientes de glicerol (de 0.02% – 2%). A 1% se encuentra la mayor inducción de la enzima GLDH.

\* La actividad está dada en nanoátomos de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de peso húmedo de células enteras.



**Gráfica 7.** Actividad respiratoria y crecimiento de *Ga. diazotrophicus* cultivada en medios LI<sup>+</sup> con concentraciones crecientes de glicerol (de 0.02% a 2%). La flecha señala el intervalo de concentración óptima de glicerol (de 0.9%–1.4%) para conseguir la mejor actividad de la enzima glicerol deshidrogenasa y el mejor crecimiento.

Respecto al crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en el medio LI<sup>+</sup>glicerol, la densidad óptica se comportó de manera paralela a la oxidación del glicerol (Gráfica 7). Cuando el glicerol se adicionó al 1% la bacteria creció 2.3 veces más que en el medio adicionado con glicerol 0.02%. Al igual que para la actividad respiratoria, el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* comenzó a declinar a concentraciones mayores de 1.5%. Según reportes de Ohrem y Voss (1996), altas concentraciones de glicerol inhiben el crecimiento de *G. oxydans* al interferir con el mecanismo de división celular, además de causar deformaciones celulares en largos filamentos en lugar de las “barras” cortas que suelen observarse y demostraron que la dihidroxiacetona causa un daño irreversible en las células.

No se registró disminución de pH a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Así, nuestros resultados indican que la concentración óptima de glicerol para su utilización como sustrato respiratorio y fuente de carbono única en *Ga. diazotrophicus* se encuentra entre 0.9% y 1.4% (Gráfica 7).

#### 6.7.2 Papel de la enzima PQQ-Alcohol Deshidrogenasa en la oxidación del glicerol.

La enzima Alcohol Deshidrogenasa (PQQ-ADH) es capaz de llevar a cabo la oxidación de alcohol alílico (Gómez-Manzo, Tesis doctoral, 2007). El producto de esta reacción, la acroleína, es altamente tóxico para la bacteria, y por ello, el alcohol alílico es considerado como un sustrato suicida, por tanto, las bacterias sobrevivientes en presencia de alcohol alílico serán mutantes ADH-. De este modo, en nuestro laboratorio se aisló una mutante espontánea de *Ga. diazotrophicus* PAL5 carente de la enzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH<sup>-</sup>), la cual se denominó *Ga. diazotrophicus* C<sub>6</sub>. (Antúnez-Arguelles, Tesis de licenciatura, 2007).

Se utilizó *Ga. diazotrophicus* C<sub>6</sub> para conocer el papel de la enzima ADH en la oxidación del glicerol. Se cultivó la cepa C<sub>6</sub> en los tres tipos de medios descritos anteriormente (LSI, LSI<sup>+</sup>glicerol y LI<sup>+</sup>glicerol) y se dejó crecer durante 30hrs. Los medios modificados fueron adicionados con glicerol al 1%, que fue la concentración que demostró el mejor crecimiento y la mayor actividad oxidasa en el experimento anterior. A modo de comparación, se cultivo también la cepa WT-PAL5 en un medio LI<sup>+</sup>glicerol al 1%.

La actividad respiratoria de células íntegras de la mutante *Ga. diazotrophicus* C<sub>6</sub> y de la cepa WT-PAL5 para glucosa y aldehído fue similar, independientemente del medio utilizado (Tabla 8). Como se esperaba, no se encontró actividad estimulada por etanol en células de *Ga. diazotrophicus* C<sub>6</sub>, a diferencia de la cepa WT-PAL5 que sí oxidó el etanol. El glicerol sólo fue oxidado cuando fue el único sustrato disponible en el medio (LI<sup>+</sup>glicerol), es notable que en ambas cepas la actividad respiratoria estimulada por glicerol fue muy similar.

Sustrato	C6			WT-PAL5
	LSI	LSI+	LI+	LI+
Glucosa	108*	105	115	131
Etanol	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>61</b>
Aldehído	96	70	102	112
Glicerol	0	3	<b>35</b>	<b>32</b>

Actividad nula con etanol en la cepa C<sub>6</sub> →

En el medio LI<sup>+</sup>glicerol, la actividad respiratoria para glicerol es muy similar en ambas cepas.

**Tabla 8.** Actividades respiratorias en células de *Ga diazotrophicus* C<sub>6</sub> y *Ga. diazotrophicus* PAL5 cultivada en diferentes medios de cultivo. Las células crecieron durante 30hrs.

\*La actividad está dada en nanoátomos de O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de peso húmedo.

Es evidente que la mutación de la cepa C<sub>6</sub> no afecta la expresión de la vía de oxidación para glicerol. Las actividad respiratoria de ambas cepas cultivadas en medios LI<sup>+</sup>glicerol revelan que la enzima ADH aun siendo capaz de oxidar diversos alcoholes primarios de cadena corta (C2-C6) (Gómez-Manzo 2007, Tesis Doctoral), no es capaz de oxidar al glicerol que contiene dos grupos alcohol primarios y uno secundario. Esta conclusión se basa en el hecho de que la cepa WT-PAL5 cultivada en sacarosa no oxida glicerol y en que la cepa C<sub>6</sub>, carente de ADH, cuando es crecida en el medio LI<sup>+</sup>glicerol es capaz de oxidar glicerol indicando la expresión de una Glicerol Deshidrogenasa *bona fide*.

## VII. DISCUSIÓN

### Parte I. Sobre el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*.

Para su crecimiento y desarrollo *Ga. diazotrophicus* utiliza de manera primordial el disacárido sacarosa, más exactamente, de ella, la glucosa. La sacarosa no puede ser transportada u oxidada directamente, por lo que la bacteria crece secretando una enzima extracelular, la levansacarasa (Arrieta y cols. 2004), la cual hidroliza a la sacarosa en fructosa y glucosa.

No se han realizado estudios sobre otras fuentes de carbono únicas que permitan el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*. Algunos autores han reportado como otras buenas fuentes de carbono gluconato, fructosa, manitol, arabinosa, meso-inositol, i-inositol, sorbitol, glicerol, galactosa y el gluconato de sodio (Li y cols., 1991; Fuentes-Ramírez y cols., 2001) (Tabla 9) y de acuerdo con Hartmann y cols. (2001), aminoácidos como glutamato, serina, alanina e histidina también son utilizados como fuente de carbono (Hartmann y cols., 1991), mientras que la celobiosa, almidón, meso-eritrol y metanol no favorecen el crecimiento.

Crece en:	
D-Galactosa	+
D-Xilosa	±/-
D-Rafinosa	+
D-Arabinosa	+
Melibiosa	±
Maltosa	±/-
Manosa	±
D-Sorbitol	+
Glicerol	+
D-Manitol	+
Etanol	±
Butanol	-

**Tabla 9.** Crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en diversas fuentes de carbono en un medio base conteniendo extracto de levadura. +, Buen crecimiento. ± Crecimiento ligero, - Sin crecimiento. Resultados tomados de Fuentes-Ramírez, L.E. y cols. 2001.

Sin embargo, a diferencia de dichos reportes, en los experimentos realizados en esta tesis, el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* fue ensayado utilizando fuentes únicas de carbono sin la adición de mezclas complejas como el extracto de levadura, de tal manera que en las condiciones reportadas por Fuentes-Ramírez y cols (2001) no es posible dilucidar si el efecto de cada sustrato probado sobre el crecimiento es directamente como fuente de carbón asimilable, como sustrato de cadena respiratoria (Fermentación Oxidativa) o como sustrato de ambos procesos. Baste como ejemplo el caso con sorbitol. Fuentes-Ramírez y cols. (2001) muestran crecimiento positivo (ver tabla 9). En nuestro caso, el sorbitol utilizado como fuente única (LI<sup>+</sup>sorbitol, Fig. 6) no produce crecimiento y además tiene un efecto negativo durante el crecimiento en combinación con sacarosa (LI<sup>+</sup>sorbitol). Además, nosotros demostramos que el sorbitol no es sustrato de Fermentación Oxidativa en células obtenidas en medio LSI o LSI<sup>+</sup>sorbitol. Nuestro resultado indica que el sorbitol no es una buena fuente carbono, tampoco un sustrato de la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus*. Consideramos que los resultados obtenidos por Fuentes Ramírez y cols. (2001) en el fondo nutricional utilizado no pueden ser claramente interpretados.

Por otro lado, tampoco observamos crecimiento con malato y lactato, situación concordante con lo descrito por Li, 1991.

De nuestros resultados obtenidos con fuentes únicas de carbono, sólo en los casos en que se usó gluconato o glicerol se registró crecimiento notable de nuestra cepa. Un comportamiento bifásico en cada curva de crecimiento fue notable. Se ha visto que el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* en medios con amonio limitado, presenta este comportamiento bifásico (Flores-Encarnación y cols. 1999). Durante la primera fase, la bacteria ocupa el amonio como fuente de nitrógeno, mientras que en la segunda fase depende de la actividad fijadora de nitrógeno. La fase de latencia que existe entre una y otra fase se debe al tiempo que toma la transición de un estado en que no se cuenta con la capacidad para fijar N<sub>2</sub> a un nuevo estado donde el cultivo sigue creciendo gracias a su capacidad para fijarlo y esto está relacionado con la inducción y protección de la nitrogenasa, complejo enzimático que fija nitrógeno atmosférico (Flores-Encarnación y cols. 1999).

## Parte II. Sobre la obtención de energía durante la respiración.

7.2 Glicerol Deshidrogenasa y Gluconato Deshidrogenasa: Nuevas enzimas del sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus* PAL5.

En este trabajo se identificó la presencia de una enzima inducible en la cadena respiratoria de *Ga. diazotrophicus* capaz de oxidar el glicerol no reportada anteriormente. Sobre la Gluconato deshidrogenasa, en 1999 por Flores-Encarnación y cols. reportó su actividad, y ahora sabemos que esta enzima se tiene un carácter constitutivo. A continuación se describirán las características de estas dos enzimas, aisladas a partir de las fracciones membranales de otras bacterias de la familia *Acetobacteraceae*.

7.2.1. Sobre la Gluconato Deshidrogenasa (GADH) y la oxidación del gluconato.

En las especies del género *Gluconobacter* la glucosa puede ser oxidada mediante dos vías alternativas: la primera incluye la captación, oxidación intracelular por deshidrogenasas solubles y asimilación por la vía colateral de las Pentosas Fosfato. El gluconato es el producto oxidado de la glucosa y su ingreso a la vía colateral de las pentosas fosfato implica fosforilación, una oxidación y la acción de la transaldolasa y tranacetolasa. (Matsushita, 1994). La segunda alternativa consiste en la oxidación directa en el espacio periplásmico por deshidrogenasas membranales dependientes de PQQ o dependientes de grupos flavín.

El gluconato puede ser oxidado por diferentes rutas de oxidación; se han reportado al menos dos deshidrogenasas membranales responsables de la oxidación del gluconato a dos tipos diferentes de ceto-D-gluconatos vía D-glucosa (Shinagawa y cols., 1999). La primera ruta de oxidación es llevada a cabo por una enzima membranal dependiente de PQQ (PQQ-GADH); la segunda ruta de oxidación se lleva a cabo mediante una flavoproteína membranal (FAD-GADH).

La D-gluconato deshidrogenasa (GADH) que cataliza la formación de 2-ceto-gluconato (2KGA) ha sido purificada a partir de la fracción membranal de *Gluconobacter dioxyacetonicus* IFO 3271 (Shinagawa y cols., 1984); ha sido caracterizada como una enzima de tres subunidades con pesos moleculares de 64kDa, 45kDa y 21kDa y contiene

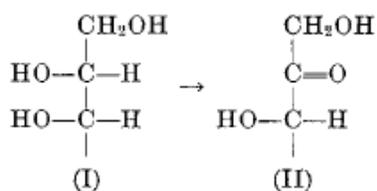
aprox. 2 moles de hemo por cada mol de enzima. El grupo prostético de la enzima fue identificado como un grupo flavín unido covalentemente a la enzima. La especificidad por sustratos por la enzima purificada es estricta para D-gluconato. La enzima tiene un pH óptimo de 6.0 y una temperatura óptima de catálisis de 40° C.

Por otro lado, existe una GADH alternativa que cataliza la formación de 5-ceto-D-gluconato (5KGA). Se utilizó una *Gluconacetobacter suboxydans* IFO 12528 (Shinawaga, y cols. 1999); después de un tratamiento con EDTA se confirmó como una enzima dependiente de PQQ. El grupo prostético PQQ se encuentra unido débilmente a las enzimas, el ión  $\text{Ca}^{2+}$  (u otros cationes divalentes) mantiene al PQQ en una configuración activa al mantenerlo unido a la enzima, cuando se adiciona EDTA a una suspensión membranal éste se asocia con el  $\text{Ca}^{2+}$  y el PQQ se desprende de la enzima (Anthony, 1996), haciendo que pierda su actividad, en la mayoría de las ocasiones. Se han detectado quinoproteínas que no son sensibles al tratamiento con EDTA. Su pH óptimo es de 4.0 y su temperatura de 15°C. Aún no se ha reportado la composición estructural de esta enzima.

En este trabajo se demostró que *Ga. diazotrophicus* cuenta con una ruta de oxidación para el gluconato que muy probablemente es dependiente de PQQ, este sistema estaría asociado con la PQQ-GDH.

#### 7.2.2 Sobre la Glicerol Deshidrogenasa (GLDH) y la oxidación del glicerol.

En las BAA, la enzima responsable de la oxidación de glicerol fue purificada a partir de la fracción membranal de *Gluconacetobacter industrius* IFO 3260 (Ameyama y cols., 1985). Esta enzima mostró una amplia especificidad por diversos polioles como glicerol, D-manitol, D-sorbitol y D-arabitol oxidándolos de acuerdo a la regla de Bertrand-Hudson. Esta regla establece que los polioles (Configuración I) son oxidados a sus correspondientes cetosas (Configuración II); el hidroxilo secundario del poliol que se encuentra involucrado en la oxidación debe tener un arreglo cis y con configuración D respecto al grupo alcohol primario (Kerstens, K. y cols., 1965) (Figura 5). La GLDH no oxida sustratos como etanol, aldehídos alifáticos, D-glucosa, D-fructosa, D-gluconato o 2-ceto-D-gluconato. La actividad total máxima se observa al final de la fase exponencial de crecimiento de la bacteria (Ameyama y cols., 1985).



**Figura 5. Regla de Bertrand-Hudson**

El tratamiento de la fracción membranal con EDTA ha demostrado que la GLDH es una enzima que tiene PQQ como grupo prostético; sin embargo, debido a que la enzima es altamente hidrofóbica e inestable cuando se purifica, los datos obtenidos han sido insuficientes para poder compararla completamente con otras quinoproteínas (Adachi, O. y cols., 2003b).

Por otro lado, las quinoproteínas membranales D-arabitol deshidrogenasa (ARDH) y D-Sorbitol deshidrogenasa (SLDH) que se purificaron a partir de *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257 y 3255 respectivamente (Adachi, O., 2001a, Sugisawa, T. y cols., 2002), han mostrado que son idénticas en varios aspectos y responsables de la oxidación de diversos polioles y azúcares en especies del género *Gluconobacter* de manera similar que la GLDH. Estas enzimas son idénticas en los siguientes criterios: una amplia especificidad para la oxidación de sustratos, ausencia de un componente hemo e identificación de PQQ como grupo prostético. Entre las diferencias descritas se encuentra una diferencia en la estructura, la ARDH se ha descrito como un heterodímero (82 y 14kDa) y la SLDH como un monómero (80kDa), su pH óptimo de actividad con PMS-DCPI es de 6.0 para la SLDH, mientras que para la ARDH son de 5.0 y 8.0. La SLDH es estable a un pH alcalino alrededor de 8.0, mientras que la ARDH es estable en un pH un poco debajo de 5.0.

En un estudio posterior se comprobó la relación y similitud entre estas enzimas: i) los péptidos de ambas enzimas reaccionan de manera cruzada con los anticuerpos que se prepararon a partir de ellas mismas, ii) la secuencia N-terminal de la subunidad grande de la ARDH es idéntica a la secuencia encontrada en el gen *sldA* que codifica para una parte de la SLDH, iii) la interrupción del gen *sldA* conduce a la pérdida de la actividad enzimática (Matsushita K., y cols., 2003)

Contrastando con la amplia especificidad reportada para esta(s) enzima(s) en la literatura (Adachi, O. y cols., 2003b), en nuestro estudio no se registró actividad sobre sorbitol, que es uno de los sustratos supuestamente oxidados por la GLDH de otras bacterias del ácido acético. La diferencia encontrada hace pensar que la GLDH en *Ga. diazotrophicus* sería una enzima diferente a las ya reportadas. Lo anterior nos invita a investigar sobre las propiedades moleculares y cinéticas de la la GLDH de la membrana de *Ga. diazotrophicus*. Nuestro trabajo previo con otras enzimas del periplasma de *Ga. diazotrophicus*, específicamente la ADHIII y la ALDH (Gómez-Manzo, 2007. Tesis Doctoral) nos ha demostrado que las enzimas del espacio periplásmico son un grupo diverso con propiedades moleculares y cinéticas que pueden servir de carácter taxonómico distintivo entre los géneros *Glucobacter*, *Acetobacter* y *Gluconoacetobacter*. De acuerdo con lo anterior, nuestro laboratorio ha emprendido la purificación y caracterización molecular y cinética de la GLDH de *Ga. diazotrophicus*

## VIII. CONCLUSIONES

- *Gluconacetobacter diazotrophicus* es capaz de crecer en diversas fuentes de carbono, como glicerol y gluconato.
- El crecimiento de tipo bifásico se debe al cambio de actividad del complejo de la enzima nitrogenasa para comenzar el crecimiento dependiente de la FBN.
- Confirmamos la existencia de una enzima GADH en la cadena respiratoria de esta bacteria y demostramos su expresión constitutiva.
- Demostramos la existencia de una enzima GLDH inducible en la cadena respiratoria de esta bacteria.
- El crecimiento y la inducción de la GLDH tiene una respuesta de “campana” dependiente de la concentración de glicerol en el medio, con un óptimo de 1 %.
- La GLDH de *Ga. diazotrophicus* no oxida sorbitol, a diferencia de la GLDH aislada a partir de la fracción membranal de *G. industrius* IFO 3260.
- El espectro de utilización de sustratos oxidables de la cepa C<sub>6</sub> (deficiente en ADH) nos permite asegurar que la ADH no participa en el sistema de oxidación del glicerol de *Ga diazotrophicus*.

## **IX. ABREVIATURAS**

**ADH** Alcohol deshidrogenasa

**ALDH** Aldehído deshidrogenasa

**C<sub>6</sub>** Cepa mutante de *Ga. diazotrophicus* obtenida por la mutación espontánea de la ADH mediante alcohol alílico. (Antúnez, E. 2007).

**DCPIP** Diclorofenolindofenol

**FBN** Fijación Biológica de Nitrógeno

**GDH** Glucosa deshidrogenasa

**GLDH** Glicerol deshidrogenasa

**LSI** Medio de cultivo

**PAL5** Cepa silvestre de *Ga. diazotrophicus* PAL5 ATCC49037

**PQQ** Pirroloquinolina quinona

**PMS** Metasulfato de fenazina

## X. REFERENCIAS

1. **Adachi, O., Fujii, Y., Ghaly, M. F., Tomaya, H., Shinagawa, E. y Matsushita, K.,** 2001a. Membrane-bound quinoprotein D-arabitol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: A versatile enzyme for the oxidative fermentation of various ketoses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**:2755-2762.
2. **Adachi O., Fujii, Y., Ano Y., Moonmangmee, D., Tomaya, H., Shinagawa, E., Theeragool, G., Lotong, N., Matsushita K.,** 2001b. Membrane-bound sugar alcohol dehydrogenase in acetic acid bacteria catalyzes L-ribulose formation and NAD-depend ribitol dehydrogenase is independent of the oxidative fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**:115-125.
3. **Adachi, O., Moonmangmee, D., Tomaya, H., Yamada, M., Shinagawa, E. y Matsushita, K.,** 2003a. New developments in oxidative fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**:643-653.
4. **Adachi, O., Moonmangmee, D., Shinigawa, E., Tomaya, H., Yamada, M. y Matsushita, K.,** 2003b New quinoproteins in oxidative fermentation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1647**:10-17.
5. **Ameyama, M., Shinagawa E., Matsushita K. y Adachi, O.,** 1985. Solubilization, Purification and Properties of membrane-bound Glycerol Dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**:1001-1010.
6. **Anthony, C.,** 1996. Quinoprotein-catalysed reactions. *Biochem, J.*, **320**: 697-711.
7. **Antúnez Argüelles, Erika,** 2007. Función y biogénesis de la pirroloquinolina-quinona alcohol-deshidrogenasa (PQQ-ADH) de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Caracterización de una mutante PQQ-ADH. Tesis de Licenciatura. UNAM, Instituto de Fisiología Celular.
8. **Anraku, Y. y Gennis, B.,** 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 262-266.
9. **Arrieta, J. G., Sotolongo, M., Menendez, C., Alfonso, D. y cols.,** 2004. A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J. Bacteriol.* **184**: 5031-5039.

10. **Bertalan, M., Albano, R., Pádua, V., Rouws, L., Rojas, C.** y cols., 2009, Complete genome sequence of sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, **10**:450
11. **Cavalcante, V. A. and Döbereiner, J.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*, **108**:23-31.
12. **Choi, E., Lee, E. y Rhee, S.**, 1995. Purification of a membrane-bound sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxidans*. *FEMS Microbiology Letters*, **45**:45-50.
13. **De Ley, J.**, 1961. Comparative carbohydrate metabolism and proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. *J. gen. Microbiol.* **24**:31-50.
14. **De Muynck, C., Pereira, C., Naessens M., Parmentier, S., Soetaert, W. y Vandamme, E.**, 2007. The genus *Gluconobacter oxydans* comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, **27**: 147-171.
15. **Deppenmeier, U. y Ehrenreich, A.**, 2008. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**:69-80.
16. **Dominguez Perez, Miguel Angel**, 2003. Crecimiento y expresión del sistema respiratorio de *Acetobacter diazotrophicus* en etanol como única fuente de carbono. Tesis de Licenciatura. UNAM, Instituto de Fisiología Celular.
17. **Escamilla, J.E., Ramirez, R., Del Arenal, I. P., Zarzoza, G, and V. Linares.** 1987. Expression of cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.* **63**: 63-73.
18. **Escamilla, J.E., Contreras, M., Flores-Encarnación, M. and Flores L.M.** 1999. Los sistemas respiratorios bacterianos. *Mensaje bioquímico*, **XXIII**: 67-103.
19. **Flores Encarnación, Marcos**, 2001. La diazotrofia aeróbica en *Acetobacter diazotrophicus* Modelo para el estudio de la Protección Respiratoria de la Nitrogenasa. Tesis Doctoral. UNAM, Instituto de Fisiología Celular.
20. **Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzúa, L., Aguilar, G.A., Baca, B.E., y J.E. Escamilla.** 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacterial*, **181**: 6987-6995.

21. **Flores-Encarnación, M., Sánchez-Cuevas, M. y Ortiz-Gutiérrez, F.**, 2004. Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **46**:47-59.
22. **Fuentes R., L. E., Tapia H., A., Jiménez S., T., Mascarúa E., M.A., Santoyo P., Y., Caso V., L. R., Romero H., H. T., Cajica E., M. del R., León B., D., Rosales P., M., Fügemann M., P. y Castillo R., M. G.**, 2003. Bacterias acéticas: diversidad e interacción con las plantas. *Elementos*, **49**: 47-51
23. **Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Tao-Wang, T., Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellado, J.**, 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**:1305-1314.
24. **García Cerqueda, Daniel**, 2010. Estudio *in silico* de la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Tesis de Licenciatura. UNAM. Instituto de Fisiología Celular.
25. **Gasca Licea, Rolando**, 2009. Bioenergética de las oxidasas terminales del sistema respiratorio de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Un estudio en células enteras. Tesis de Licenciatura. UNAM. Instituto de Fisiología Celular.
26. **Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Teixeira, K. R. S., Döbereiner, J., and De Ley, J.** 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **39**:361-364.
27. **Gómez Manzo, Saúl**, 2007. Papel de la deshidrogenasa periplásmica para etanol en *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Tesis doctoral. UNAM, Instituto de Fisiología Celular.
28. **Gómez-Manzo, S., Arreguín-Espinosa, R., Contreras-Zentella, M. y Escamilla-Marván, E.**, 2005. La quinoproteínas alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos: distribución, clasificación, estructura y función. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **8**:28-37.

29. **Gómez-Manzo, S., Contreras-Zentella, M., González-Valdez A., Sosa-Torres M., Arreguín-Espinoza, R., Escamilla-Marván, E.,** 2008. The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *International Journal of Food Microbiology*. **125**: 71-78.
30. **González, B., Martínez, S., Chávez, J.L., Lee, S., Castro, N.A., Domínguez, M.A., Gómez, S., Contreras, M.A., Kennedy, C. y Escamilla, J.E.** 2006. Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Evidence for a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1757 (12)**: 1614-1622.
31. **Hardy, R. W. F.,** 1994. Biological Nitrogen Fixation: Research Challenges – A review of research grants funded by U.S. Agency for International Development. *Nacional Academy Press*, 1.
32. **Hartmann, A., Prabhu, S.R. y Galinsky, E. A.,** 1991. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil*, **137**: 105-109.
33. **Kim, J., Ress, D. C.,** 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, **33**: 389-397.
34. **Lery, L., Coelho, A., von Kruger W y cols.** 2008. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics*. **8**: 1631-1644.
35. **Li, R. P. y Macrae, I. C.,** 1991. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biol. Biochem.*, **23**:999-1002.
36. **Loiret, F.G., Ortega, E., Ortega-Rodés, P., Rodés, R. y de la Fuente, E.,** 2004. *Gluconacetobacter diazotrophicus* es todavía un dilema para la ciencia. *Revista Biología*. **18**:113-123.
37. **Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Tomaya, H., Shinjoh, M., Tomiyama N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino T. y Adachi O.,** 2003. 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 1959-1966.
38. **Matsushita, K., Toyama, H. and Adachi, O.** 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **36**: 247-301.

39. **Merfort, M., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S. y Sahm, H.,** 2006. High-yield 5-keto-D-gluconic acid formation is mediated by soluble and membrane-bound gluconate-5-dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**:443-451.
40. **Muñoz-Rojas, J. y Caballero-Mellado, J.,** *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. En: *Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca Morelos*, 1-19
41. **Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., y Lakshminarasimhan, C.,** 2002. *Gluconobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, **83**:137-145.
42. **Ohrem, H. L., y Merck, E.,** 1996. Inhibitory effects of glycerol on *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Lett.* **18**: 245-250.
43. **Kerstens, K., Wood, W. A. y De Ley, J.,** 1965. Polyol dehydrogenase of *Gluconobacter oxydans*. *The Journal of Biological Chemistry*, **240**:965-974.
44. **Raspor, P. y Goranovic, D.,** 2008. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, **28**:101-1024
45. **Sara Páez Martín.** 2009. Tesis doctoral. UNAM, Instituto de Fisiología Celular.
46. **Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. y Ameyama, M.,** 1982. Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var.  $\alpha$ . *Agric. Biol. Chem.*, **46**:135-141.
47. **Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O. y Ameyama, M.,** 1984. D-gluconate dehydrogenase, 2-keto-D-gluconate yielding, from *Gluconobacter dioxyceticus*: Purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.*, **48**:1517-1522.
48. **Shinagawa, E., Matsushita, K., Tomaya, H., Adachi, O.,** 1999. Production of 5-keto-D-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent membrane-bound D-gluconate dehydrogenase. *Journal of Molecular Catalysis*, **6**: 341-350.

49. **Sugisawa, T.**, y **Hoshino, T.**, 2002. Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**:55-64
50. **Yamada Y.**, **Hoshino, K.** y **Ishikawa, T.**, 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**:1244-1251.
51. **Yamada, Y.** y **Yukphan, P.**, 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **125**:15-24.