



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

UN NUEVO ENFOQUE PARA LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ACCO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

JOSE FRANCISCO GASTEAZORO PIÑEIRO

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. BRENDA VALDERRAMA BLANCO

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. GLORIA SAAB RINCÓN

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. ROSARIO MUÑOZ CLARES

Facultad de Química, UNAM

Cuernavaca, Mor. Febrero 2014.



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.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

M. EN C. JOSE FRANCISCO GASTEAZORO PIÑEIRO
P r e s e n t e.

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Presidente	Dr. Lorenzo Segovia Forcella
Secretario	Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani
Vocal	Dra. Sandra Ramírez Jiménez
Vocal	Dr. Alejandro Torres Gavilán
Vocal	Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán

Sin más por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 07 de enero de 2015

Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz
Coordinadora de Docencia

En un plazo máximo de **tres semanas**, contados a partir del momento en que el sinodal designado oficialmente reciba la tesis, éste deberá dar su voto fundamentado por escrito, el cual será comunicado al comité académico. Si considera que le será imposible cumplir con esta obligación deberá indicarlo al alumno para ser sustituido de inmediato.



Este proyecto se llevo a cabo en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Brenda Valderrama Blanco.

Agradecemos al laboratorio de Biociencias de la Universidad de AixMarseille por las facilidades prestadas durante la estancia de investigación. En particular a la Dra. Jalila Simaan por su invaluable cooperación.

Este proyecto fue financiado por DGAPA IN-213010 y SEP-CONACyT 128156

Agradecimientos

A la doctora Brenda Valderrama Blanco, por permitirme formar parte de su grupo y ser mi guía en el camino de la ciencia. Gracias por las enseñanzas que a lo largo de tantos años han sido innumerables y me han forjado profesionalmente. Gracias por el apoyo constante.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Gloria Saab Rincón y a la Dra. Rosario Muñoz Clares, por todas sus aportaciones a este proyecto, revisiones, y discusiones que enriquecieron a este trabajo.

Al jurado de grado Dr. Lorenzo Segovia Forcella, Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani, Dra. Sandra Ramírez Jiménez, Dr. Alejandro Torres Gavilán y al Dr. Mauricio Trujillo Roldán, por todo su esfuerzo en la revisión y corrección para hacer de este un mejor trabajo.

La asistencia constante y el trabajo técnico de: M. en B. Raunel Tinoco Valencia, Tec. Guadalupe Paredes y la Dra. Georgina Hernández Montes.

A los integrantes del laboratorio por tantas horas de trabajo compartido.

Para mi familia, Margarita Piñeiro, Marycruz Piñeiro, Merce Gasteazoro por darme bases solidas en las que puedo construir mis sueños.

A Juan y Jacquie por siempre apoyarnos.

También quiero agradecer a los amigos que a lo largo de los años lejos de casa se volvieron la familia que elegí. Anilú, Adam, Werita, Sath, Maye, Karlis, Vivis, Areli, Enrique, Cris, Lore, Diego, Rodolfo. Mil gracias por todo.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
De Sustentabilidad y Etileno.....	2
Hacia una producción de etileno ambientalmente amigable	10
La ACCO.....	10
Catálisis de la ACCO.....	12
Inconsistencias en los estudios de la ACCO	16
Estudios de la ACCO	22
Cianuro, el patito feo	26
Hipótesis.....	34
Objetivo General.....	34
Objetivos particulares.....	34
Materiales y Métodos.....	35
Resultados.....	43
Discusión	60
Perspectivas	66
Referencias	68
Anexo 1	I
Anexo 2	II
Anexo 3	VII
Anexo 4	XIII
Anexo 5	XIV

Índice de Figuras

Figura 1. Etileno y sus derivados (modificado de (85)).....	3
Figura 2. Distribución regional de la producción mundial de etileno (75).....	4
Figura 3. Concentración relativa de las materias primas utilizadas en la producción mundial de etileno (75).....	5
Figura 4. Concentración relativa de las materias primas utilizadas en la producción de etileno en Norteamérica (75).....	6
Figura 5. Procesos para la transformación de gases sintetizados ricos en CO en olefinas (85).....	9
Figura 6. Estructura cristalográfica de la ACCO de <i>P. hybrida</i> en donde se muestra el plegamiento DSBH que comparte con la mayoría de las proteínas del grupo de las oxidasas/oxigenasas no hémicas mononucleares dependientes de Fe ^{II} (Izquierda). Esquema representativo del motivo 2H-1C consistente en un arreglo mononuclear de Fe ^{II} , en donde el hierro se encuentra coordinado por tres ligantes endógenos en los vértices de una fase triangular en un arreglo de coordinación octaédrica (Derecha).....	11
Figura 7. Reacción catalizada por la oxidasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACCO) (28).....	12
Figura 8. Mecanismo catalítico propuesto para la oxidasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACCO) (30).....	16
Figura 9. Mecanismo propuesto para la ruptura secuencial del anillo de ciclopropano del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). En este caso, se propone que el sustrato provee los electrones para la reducción del oxígeno lo cual conlleva a la ruptura del sustrato y como último paso de la reacción la reducción del centro metálico por un donador externo (14).....	19
Figura 10. Posibles mecanismos de oxidación del ACC por la ACCO. Ruta A) apertura directa del anillo y ruta B) abstracción de un protón del amino seguida de la ruptura (42).....	20
Figura 11. Cinética de desactivación de la ACCO de jitomate (El Bakkali y Simaan, comunicación personal).....	21
Figura 12. SDS-PAGE Fragmentación de la ACCO después de 5 minutos de incubación en diferentes condiciones. Carril 1. Sin tratamiento, Carril 2. ACCO/Fe/ácido ascórbico, Carril 3. ACCO/Fe/ácido ascórbico/ACC (5).....	22
Figura 13. Esquema de la formación del complejo Enzima-Sustrato en el mecanismo catalítico de la ACCO en donde AA se refiere al ácido ascórbico (83).....	23
Figura 14. Representación esquemática de la reacción de cianuro con 2,2-dihidroxi-1,3-indanediona (ninhidrina) (32).....	29
Figura 15. Representación esquemática de la reacción de cianuro con Lissamina (50).....	30
Figura 16. Esquemización de la reacción de formación de CBI a partir de NDA y CN ⁻ (18).....	33
Figura 17. Estrategia de subclonación del gen de la ACCO en el vector pET32a(+).....	37
Figura 18. Electroforesis SDS-Page para la preparación obtenida después de los diferentes pasos cromatográficos en la purificación de la ACCO. M) marcador de peso molecular en kDa y 1) la mezcla obtenida de la ACCO de jitomate.....	44
Figura 19. Gráfico de calibración para los estándares de etileno.....	46
Figura 20. Gráfico de calibración para los estándares de etileno en el rango dinámico de las reacciones de la ACCO.....	47
Figura 21. Ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten de los datos de producción de etileno de la ACCO de jitomate utilizando diferentes concentraciones de ACC. Para las preparaciones M2 (●), F1 (○), F2 (▼). Los ajustes a la ecuación se muestran en líneas solidas (M2), guiones (F1) y guiones con puntos (F2).....	48

<i>Figura 22. Curso temporal para la reacción de consumo de oxígeno en la mezcla de reacción en ausencia de ACC (Enzima y hierro en concentraciones equimolares). La flecha indica el tiempo al cual se inicio la reacción añadiendo la mezcla enzimática.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 23. Ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten para los datos de consumo de oxígeno de la ACCO de jitomate utilizando diferentes concentraciones de ACC</i>	<i>50</i>
<i>Figura 24. Representación esquemática de la reacción de derivatización de NDA y CN en presencia de ACC (modificado de (18)).....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 25. Cromatograma del análisis de la actividad de la ACCO derivatizada con:</i>	<i>53</i>
<i>Figura 26. Gráfico de calibración para los estándares de KCN en el rango de 0.99 - 60.17 pmol la cual se ajustó a la ecuación de una línea recta.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 27. Gráfico de calibración para los estándares de KCN en el rango dinámico de las mediciones para las reacciones de la ACCO.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 28. Gráfica para el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten de los datos de producción de cianuro de la ACCO de jitomate utilizando diferentes concentraciones de ACC para las muestras M1 (○) y M2a (▼). Los ajustes a la ecuación se muestran en guiones (M1) y guiones con puntos (M2a)</i>	<i>57</i>
<i>Figura 29. Comparación de las metodologías de purificación de la ACCO. Electroforesis SDS-Page para las preparaciones obtenidas después de: A) protocolo de purificación publicado previamente Brisson et al. (2012), donde M-marcador de peso molecular, AF-ACCO de A. thaliana, TOM-ACCO de jitomate (gel teñido con Azul de Comassie). B) protocolo de purificación descrito en esta tesis donde MPM-marcador de peso molecular, 1-ACCO de jitomate (gel se encuentra teñido con 0.5% de 2,2,2-tricloroetanol)</i>	<i>61</i>

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para la ACCO de jitomate</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 2. Limite de detección de la segunda generación de métodos espectrofotométricos para la detección de CN (modificado de (32))</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 3. Parámetros cinéticos para la reacción de la ACCO de jitomate obtenidos para la producción de etileno</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos para la producción de cianuro de la ACCO de jitomate</i>	<i>58</i>

Resumen

El etileno es una molécula clave en la industria química mundial, la cual se produce actualmente mediante el craqueo de hidrocarburos provenientes de fuentes fósiles. En la naturaleza, el etileno es producido en las plantas superiores por la oxidasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACCO). El reemplazo de los procesos químicos convencionales por alternativas biocatalíticas para la producción de etileno aun se encuentra lejano por su limitada competitividad. Además, la dispersión de los datos sobre la ACCO en la literatura añade incertidumbre para su introducción como un biocatalizador, en especial cuando se necesitan comparar bancos de mutantes o isoformas en un esquema de ingeniería de proteínas. En este trabajo proponemos un nuevo enfoque para la medición de la actividad de la ACCO fundamentado en la detección de cianuro. Los resultados aquí mostrados, indican que la detección de cianuro es un método más preciso, más sensible y más estable que cualquier otra metodología probada hasta ahora para la medición de la actividad de la ACCO. En resumen, el cianuro producido enzimáticamente puede ser detectado al derivatizarlo con naftalene-2,3-dicarbaldehído (NDA) para generar 1-cianobenz[f]isoindole (CBI), el cual posteriormente es detectado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia. Con esta metodología el cianuro puede ser detectado en un rango de 0.99 a 60.17 pmol, lo cual es tres órdenes de magnitud más sensible que el método actual, el cual detecta la producción de etileno.

Introducción

De Sustentabilidad y Etileno

Nuestro estilo de vida actual depende fuertemente de la industria química y sus productos se encuentran virtualmente en todas partes, satisfaciendo muchos de nuestros requerimientos fundamentales (41). La innovación industrial dirigida al reemplazo de procesos químicos convencionales por procesos biotecnológicos conduce a prácticas industriales más limpias (1). La fuerza motriz subyacente a estos cambios radica en consideraciones tanto energéticas como ambientales ya que los procesos biotecnológicos impactan directamente reduciendo la demanda de agua y energía, así como en una menor generación de productos secundarios (45).

La biocatálisis aventaja a su contraparte química por su inherente habilidad de realizar reacciones estereo, enantio y quimio-selectivas. Hoy en día existen diferentes reacciones biocatalíticas que han sido incorporadas exitosamente a procesos industriales (1;76). Por todas estas virtudes, las enzimas son elementos clave en las prácticas para una industria ambientalmente amigable (76). Uno de los campos de la industria química en los cuales la biocatálisis no ha permeado en la generación de un grupo de moléculas pequeñas que son importantes bloques de construcción como: metano, amonio, hidrocarburos y olefinas (20;96). Dentro del grupo de las olefinas, el etileno es la más simple, siendo una molécula clave en la síntesis orgánica (43;75). Es utilizado para la producción de otros intermediarios químicos de gran importancia en la industria como son el etilbenceno, óxido de etileno y dicloroetano, los que, junto con el etileno, se encuentran enlistados dentro de los 30 compuestos químicos con mayor volumen de producción en EUA (43;85). La mayoría de los químicos derivados del etileno así como sus derivados se muestran en la Figura 1. El etileno es principalmente utilizado en la industria de los plásticos, en 2010 aproximadamente el 61% del consumo total de etileno en los países de Europa del Este fue destinado a la producción de polietileno. El etileno también es utilizado en la producción de otros plásticos como poliestireno (PS) tereftalato de polietileno (PET) y policloruro de vinilo (PVC), que son ampliamente utilizados para las industrias textil, de la construcción y empaque (85).

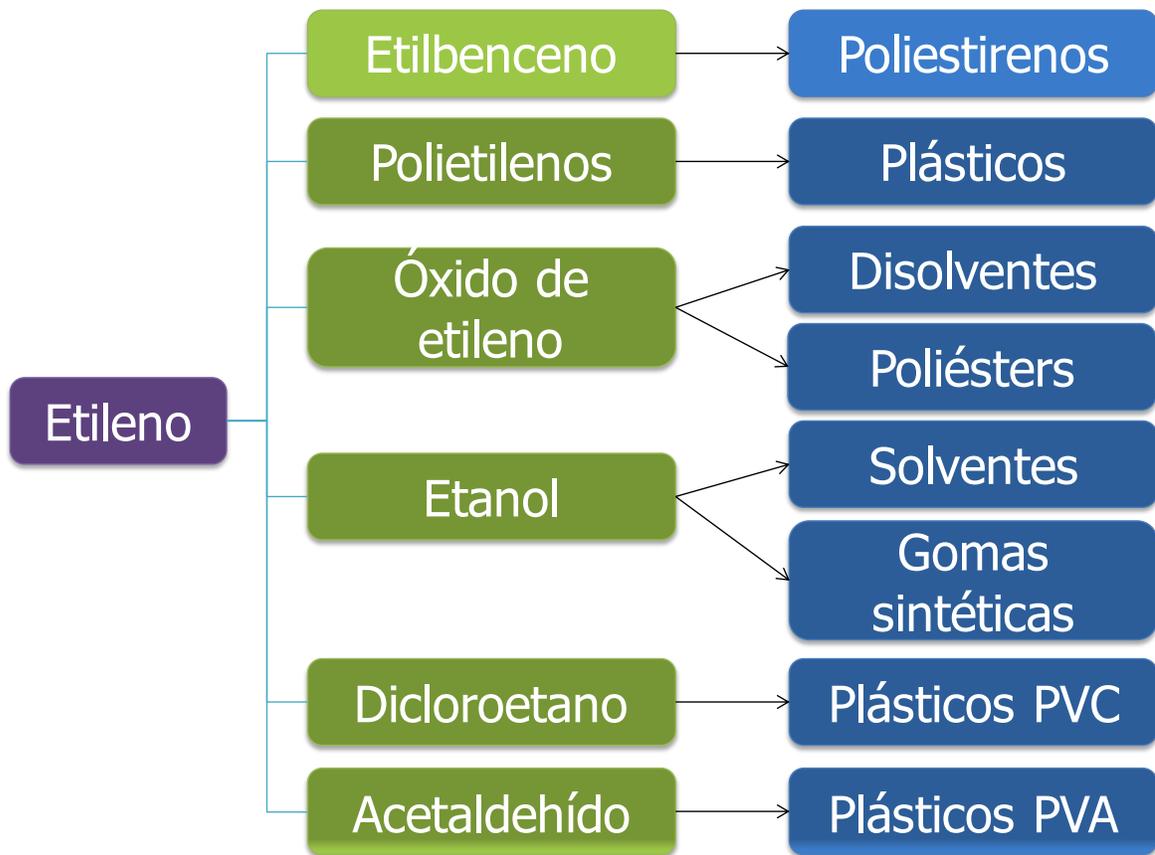


Figura 1. Etileno y sus derivados (modificado de (85))

La capacidad de producción de etileno en el mundo para 2008 fue aproximadamente de 120 millones de toneladas llegando a una producción de 150 millones de toneladas en 2010 (75;85). La producción regional de etileno se muestra en la Figura 2. Para 2010 la capacidad de producción se encontraba dominada por las economías desarrolladas de Norteamérica, la Unión Europea y Asia (principalmente Japón y Corea y algunas contribuciones significativas de países del sureste asiático). Algunas regiones con un rápido crecimiento en la producción de olefinas fueron China y el Medio Oriente (75).

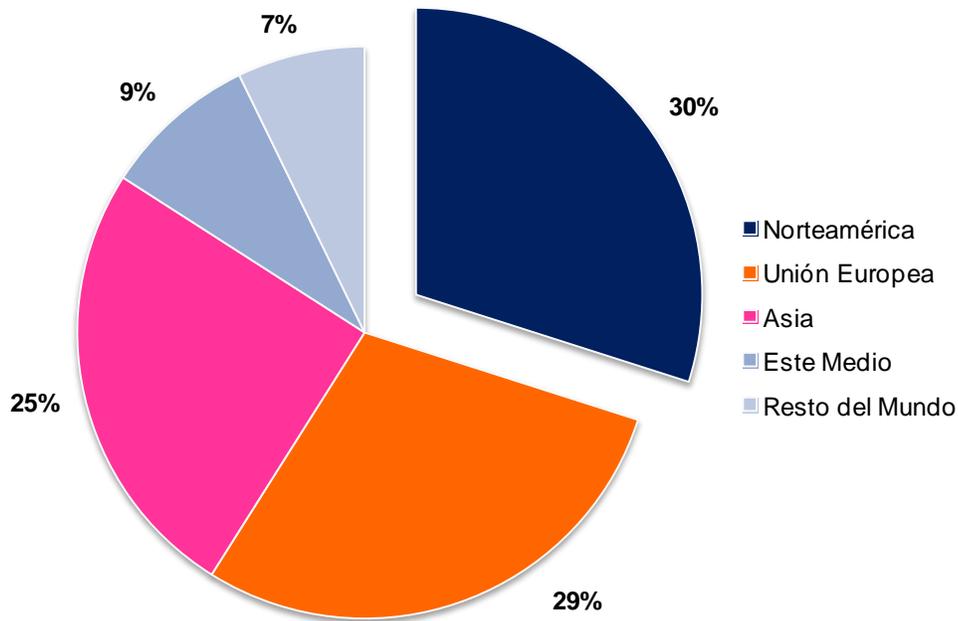


Figura 2. Distribución regional de la producción mundial de etileno (75)

Con base en la capacidad nominal mundial, la concentración relativa de materias primas utilizadas en la producción de etileno se muestra en la

Figura 3. Esta gráfica ilustra que las dos principales son el etano y la nafta que suman más del 50% de la demanda mundial, mientras que gases de petróleo licuado (LPG) propano y butano, así como el gasóleo, contribuyen en un porcentaje menor al 20% (75).

Una operación típica de craqueo de nafta utiliza aproximadamente 3.3 toneladas de nafta por tonelada de etileno. Con base en esto, la demanda mundial de nafta petroquímica es cercana a 200 millones de toneladas por año, o lo que es lo mismo, cerca de 5 millones de barriles de nafta al día (75). El etano requerido típicamente son 1.3 toneladas por tonelada de etileno, esto se traduce en 41 millones de toneladas de etano por año. La mayoría del etano se deriva de gas natural el cual contiene cerca del 10% de su peso en etano, por lo que se requiere procesar aproximadamente 400 millones de toneladas de gas natural para proveer el etano requerido en la petroquímica mundial. Aunado a la elevada necesidad de petroquímicos para la producción de etileno, las operaciones de craqueo producen emisiones de dióxido de carbono derivadas de los combustibles consumidos en los procesos de horneado, como consecuencia de diversas cuestiones operativas (quema). Con los datos previos,

se estima que las emisiones de dióxido de carbono mundiales derivadas del proceso de craqueo para la producción de etileno se encuentren cerca de 255 millones de toneladas por año (75).

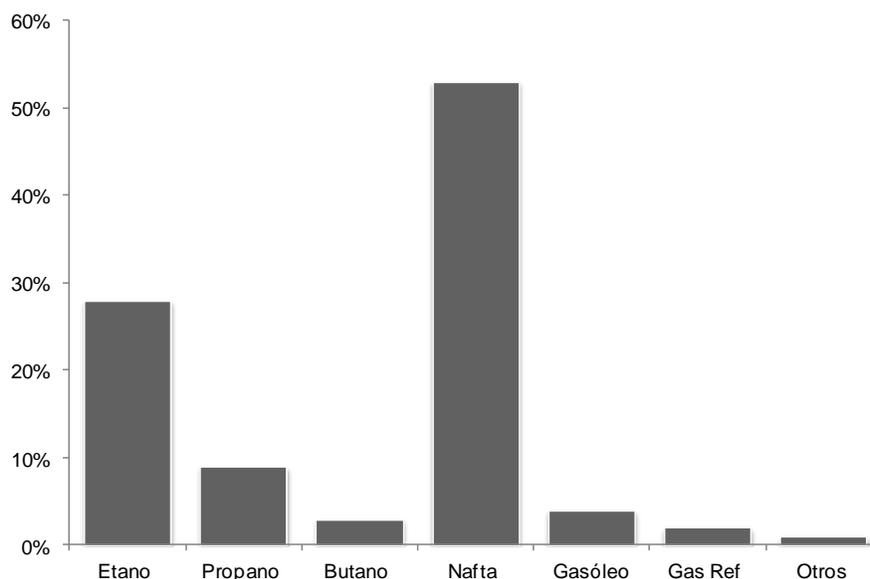


Figura 3. Concentración relativa de las materias primas utilizadas en la producción mundial de etileno (75)

La producción de etileno en Norteamérica es dominada por las grandes operaciones de craqueo de E.U.A. reflejando su posición como el mayor mercado de petroquímicos. En 2008 la capacidad de producción era cercana a 29 millones de toneladas por año lo cual abarca el 80% de la producción regional y 24% del total mundial. En el pasado, líquidos derivados de gas natural – etano, propano y butano – eran las materias primas favorecidas para la producción de etileno. Actualmente, se han desarrollado el craqueo de la nafta y el craqueo flexible de combustibles. Sin embargo, como se muestra en la Figura 4, los líquidos derivados de gas natural contribuyen en mayor proporción a la formación de etileno. El aumento de precio en el gas durante el 2000 resultó en un incremento del costo de materias primas, llegando a ser mayor el costo de gas que el de petróleo crudo en E.U.A. (75).

Por su parte, México tiene una capacidad nominal para generar etileno cercana a 1,384 millones de toneladas al año las cuales se producen en tres plantas operadas por Petróleos Mexicanos y todas utilizan etano como materia prima (75).

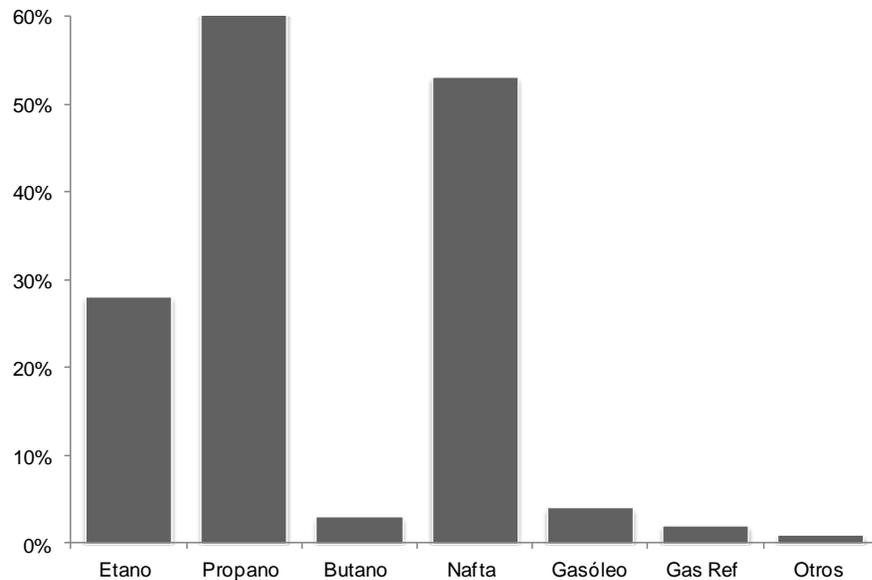


Figura 4. Concentración relativa de las materias primas utilizadas en la producción de etileno en Norteamérica (75)

La presión constante por la demanda de olefinas de bajo peso generó que las capacidades de producción global se duplicaran en los pasados 15 años (43;85). Durante 2008 y 2009 la demanda por etileno disminuyó debido al lento crecimiento económico global, sin embargo, la demanda repuntó para 2012. Se espera que nuevas industrias de craqueo de vapor abastezcan el suficiente etileno para satisfacer la creciente demanda del mismo (43). En la siguiente década, la demanda creciente de olefinas de bajo peso aumentará de forma inevitable y junto con ésta, la demanda de materia prima requerida para la industria petroquímica. El elevado costo actual del petróleo y las predicciones del mercado han dirigido la mira a la investigación y desarrollo de nuevas metodologías para la producción de olefinas de bajo peso a través de materias primas alternas (43;48;85). Además del elevado precio del petróleo, existen otras razones por las cuales investigar rutas de producción mediante materias primas alternas:

1. La producción de olefinas mediante el craqueo de vapor es uno de los diez procesos que requieren más energía dentro de la industria química y petroquímica.
2. Existe una creciente preocupación por el agotamiento de las reservas convencionales de petróleo. Algunos analistas sugieren que el consumo de petróleo superará el descubrimiento de nuevas reservas seguido del agotamiento de las reservas conocidas.
3. El petróleo contenido en reservas no convencionales es petróleo pesado. La extracción y purificación del petróleo no convencional hoy en día significaría mayores costos y mayores emisiones de CO₂ comparado con el petróleo convencional (21).
4. Existe una creciente presión para disminuir las emisiones de CO₂. La utilización de materias primas como la biomasa tienen una contribución de CO₂ neta menor comparada con las emisiones actuales.

Se han desarrollado algunos procesos para intentar resolver uno o más de los retos que encuentra la industria de las olefinas. Estos procesos están cimentados en la utilización de materias primas alternas como carbón, gas natural y biomasa (13;43;85).

Países que poseen grandes reservas de carbón trabajan en investigación y desarrollo de proyectos para la transformación de sintegas¹ a olefinas mediante la síntesis de metanol (MTO), vía dimetil éter o mediante el proceso sintegas a través de la generación de dimetileter a olefinas (SDTO por sus siglas en inglés). No obstante el gran potencial de la industria carbón a olefinas, existen muchos desafíos, la gasificación del carbón produce un exceso de CO₂ que debe de ser extraído de la síntesis de gas y liberado. La preocupación mundial ambiental sobre la disminución de las emisiones de CO₂ podría conducir al desarrollo de tecnologías para secuestrar el CO₂ que se implementen antes de que los procesos que utilizan carbón puedan establecerse globalmente (85).

¹ El gas de síntesis o Sintegas es un combustible gaseoso obtenido a partir de sustancias ricas en carbono (hulla, carbón, coque, nafta, biomasa) sometidas a un proceso químico a alta temperatura. Su nombre proviene de su uso como intermediario en la creación de gas natural sintético (GNS)⁹ y para la producción de amoníaco o metanol. El gas de síntesis está compuesto principalmente de hidrógeno, monóxido de carbono, y muy a menudo, algo de dióxido de carbono. Posee menos de la mitad de densidad de energía que el gas natural.

Algunos de los procesos alternativos para la producción de olefinas, son la deshidrogenación de alquenos (que utiliza sintegas) y otros específicos para productos blanco, como es el etileno a través de la deshidratación del etanol derivado de fuentes renovables (85). La Figura 5 muestra los diferentes procesos de conversión que utilizan sintegas derivado de carbón o biomasa como materia prima.

La utilización de biomasa para la gasificación es alentada por su naturaleza neutral en términos de carbono (85) lo cual conlleva a importantes beneficios financieros ya que puede verse beneficiada por los bajos costos de las materias primas (13;85). Estas materias primas pueden ser derivadas de material de desecho (desechos urbanos, residuos de cultivos); productos forestales (madera, residuos de la tala de árboles y arbustos); cultivos energéticos (con alto contenido de almidones como maíz, trigo y cebada, cultivos ricos en azúcar, pastos, aceites vegetales e hidrocarburos de plantas); o biomasa acuática (algas y hierbas acuáticas) (48). Sin embargo, este rubro puede verse afectado por los costos de recolección y transporte de biomasa a gran escala. La agronomía, la biotecnología y la ingeniería genética prometen desarrollar de forma más eficiente materiales vegetativos con tasas de crecimiento mayores y que requieran menor aportación energética en términos de fertilizantes. La materia prima derivada de biomasa para refinamiento puede ser clasificada en tres categorías de acuerdo a la fuente de obtención: biomasa celulósica, almidón o azúcares derivados de biomasa (o biomasa comestibles) y triglicéridos derivados de biomasa (48). La biomasa puede ser transformada mediante pirólisis y licuefacción para conseguir productos de alta densidad energética y después convertirlo a sintegas. Como en el caso del sintegas obtenido por la transformación de carbón, el sintegas obtenido de la biomasa es rico en CO y contiene diversas impurezas. El sintegas derivado de estas fuentes requiere una purificación extensiva para remover una serie de contaminantes como azufre que perjudican a los catalizadores utilizados en los procesos de transformación. Después de ajustar la relación H_2/CO , el sintegas puede ser utilizado para la producción de químicos y combustibles (43). Si la finalidad es producir selectivamente olefinas e hidrocarburos, tanto la deshidratación como la formación de hidrógeno y las reacciones de transferencia de hidrógeno deben estar correctamente equilibradas eligiendo condiciones de reacción y catalizadores adecuados (48).

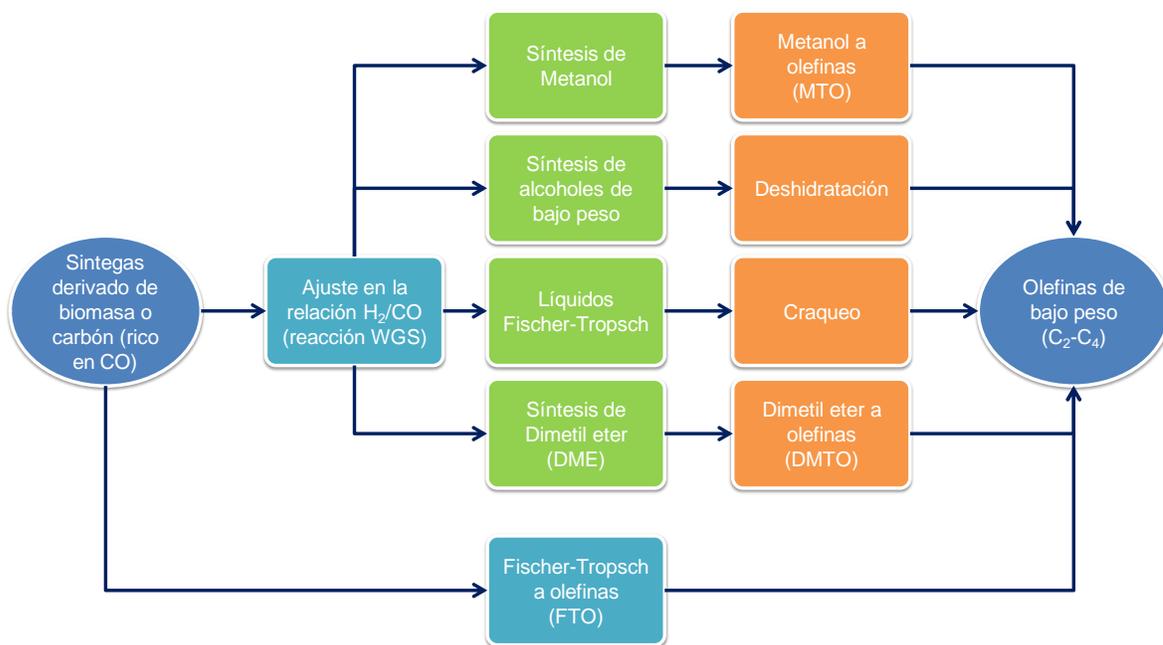


Figura 5. Procesos para la transformación de gases sintetizados ricos en CO en olefinas (85)

Los procesos de MTO y dimetileter-a-olefinas (DMTO) se aplican actualmente en la industria para la producción de olefinas derivadas de la síntesis de gas. Estos procesos son altamente selectivos a etileno y propileno y pueden ser una opción atractiva para suministrar materias primas a la industria de los polímeros. Los procesos MTO y DMTO requieren sintegas rico en hidrógeno de manera similar a la síntesis de metanol previamente descrita. Por esta razón, MTO y DMTO son una buena opción para utilizar gas natural como insumo. En el caso de sintegas ricos en CO producidos por gasificación de carbón o biomasa, se requiere un paso extra para ajustar la relación de H_2/CO mediante la reacción de desplazamiento de vapor de agua. Además, el sintegas derivado de carbón o biomasa contiene elevadas concentraciones de azufre y otros contaminantes que actúan como fuertes inhibidores de los catalizadores utilizados en la síntesis de metanol y dimetiléter. Esto implica la necesidad de un proceso de limpieza de los gases ricos en CO para acondicionarlos para la síntesis de metanol que resulta costoso por su rigor. También es necesario investigar y mejorar la actividad, selectividad y estabilidad de los catalizadores usados en MTO y DMTO ya que la mayoría exhiben una rápida desactivación derivada de la deposición de carbono (85).

El creciente interés por el suministro de olefinas C2-C4 es una fuerza motriz que conduce la investigación y desarrollo de procesos y catalizadores para la producción de compuestos químicos básicos de utilizados como materias primas no dependientes de petróleo (43;85).

Hacia una producción de etileno ambientalmente amigable

El etileno es producido naturalmente en las plantas superiores como un fitoregulador esencial en varios aspectos del ciclo de vida como son: desarrollo de raíces, germinación, senescencia y maduración de frutos, entre muchos otros (9;80). Durante el proceso de senescencia, el etileno induce la maduración de frutos climáticos (manzanas, bananas, melones y jitomates, entre otras), efecto que ha sido extensamente estudiado debido a su importancia agronómica (9). La maduración de frutos incluye una serie de eventos bioquímicos entre los que sobresalen la pérdida de clorofila, la formación de pigmentos, sabores y aromas, el suavizado de la pulpa y eventual desprendimiento de la planta. Pruebas con microarreglos permiten asociar la producción de etileno a la expresión de aproximadamente 214 genes en *Arabidopsis thaliana* que codifican principalmente para proteínas asociadas a metabolismo, defensa y transporte (9;22;36;80;90).

La ACCO

El etileno en plantas superiores es sintetizado a partir de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), un producto metabólico del ciclo de las metioninas (3) y transformado por la oxidasa de ACC (ACCO; EC 1.14.17.4) (25). La ACCO presenta un plegamiento DSBH (Double Stranded β -hélix, por sus siglas en inglés), con el sitio de hierro colocado de forma invariable en un extremo del plegamiento (Figura 6) (4). Este plegamiento es característico de la mayoría de las proteínas del grupo de oxidasas/oxigenasas no hémicas mononucleares dependientes de Fe^{2+} . El hierro divalente se encuentra coordinado por tres ligantes endógenos conformado por dos His localizadas en dos hojas β adyacentes y un residuo ácido (Asp o Glu) localizado en un asa contigua. Este arreglo denominado “2H-1C”, conforma los vértices de una fase triangular en una coordinación octaédrica (Figura 6) (7;12;98).

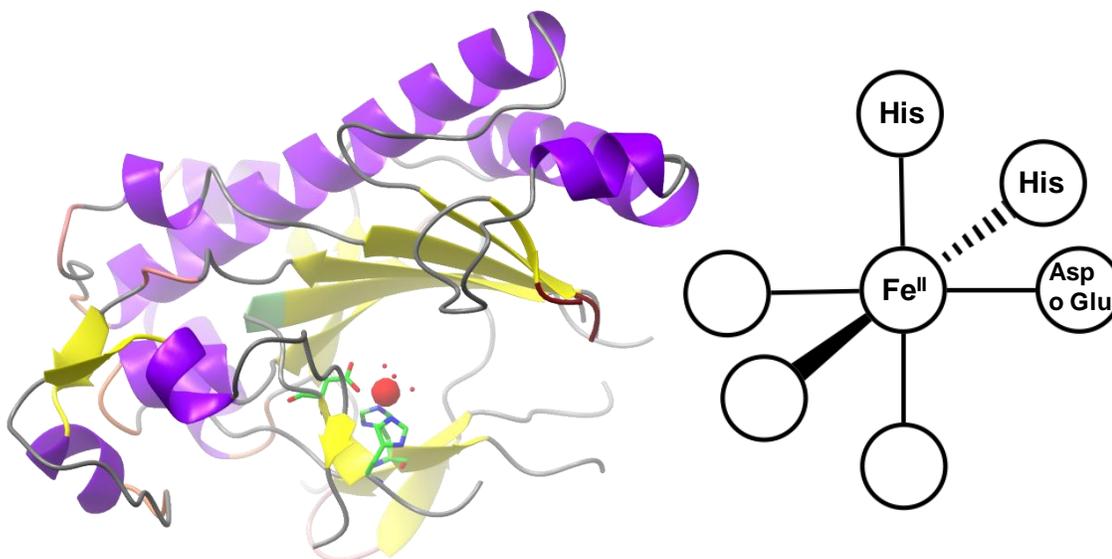


Figura 6. Estructura cristalográfica de la ACCO de *P. hybrida* en donde se muestra el plegamiento DSBH que comparte con la mayoría de las proteínas del grupo de las oxidasas/oxigenasas no hémicas mononucleares dependientes de Fe^{II} (Izquierda). Esquema representativo del motivo 2H-1C consistente en un arreglo mononuclear de Fe^{II} , en donde el hierro se encuentra coordinado por tres ligantes endógenos en los vértices de una fase triangular en un arreglo de coordinación octaédrica (Derecha)

La similitud bioquímica que presenta con las flavona-3-hidroxilasas sugiere que la ACCO es un miembro de la superfamilia de dioxigenasas dependientes de 2-oxoácido. Sin embargo, la ACCO no utiliza 2-oxoglutarato como cofactor (siendo el donador de electrones al ácido ascórbico (AA)), por lo que se piensa que posee mayor similitud con la isopenicilina-N sintasa (28;70;98). La secuencia proteica de diferentes ACCO se encuentra altamente conservada, siendo el extremo carboxilo terminal la región más variable. Diferentes estudios de mutagénesis sitio-dirigida permitieron identificar residuos importantes para la catálisis de la ACCO. Por ejemplo, sustituciones en los residuos His177, Asp179 y Lys158² abaten casi por completo la actividad. Tanto His177 como Asp179 participan en la coordinación del ion metálico, mientras que Lys158 parece tener un papel estructural aún no determinado. Posteriormente se identificó a la His234 como parte de los residuos que coordinan al ion metálico y se propuso que Arg244 y Ser246 son ligantes del ACC, mientras que Arg299 podría ser el

² La numeración de estos residuos corresponde a la secuencia de la ACCO de tomate (pTOM13)

sitio de unión del CO₂ (30). Con la primera estructura cristalográfica de una ACCO reportada por Zhang *et al.* (2004) fue posible proponer que los residuos Arg244 y Ser246 pertenecen a un motivo RXS y que, junto con Tyr162, se unen al grupo carboxilato del ACC (98). A pesar de la evidencia cristalográfica no ha sido fácil asignar con certeza un sitio de unión al bicarbonato. Con base en estas evidencias se establece entonces que el sitio activo de la ACCO está conformado por un ion Fe²⁺ coordinado por tres residuos de aminoácidos (His177, His234 y Asp179) que conforman la esfera de coordinación clásica de la familia de oxidasas/oxigenasas con hierro no hémico (7;98).

El mecanismo de reacción de la ACCO ha sido descrito como la activación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) mediante la oxidación de un electrón o la abstracción de un átomo de hidrógeno desde el grupo amino para dar lugar a la formación de un radical catiónico amino o radical aminilo (64;65). Se postula que el reacomodo espontáneo de los radicales resulta en la ruptura del anillo de ciclopropano y la eventual formación de etileno, CN⁻ y CO₂ (69). Sin embargo, no existen evidencias experimentales que sustenten todos los pasos de los mecanismos propuestos a la fecha. De lo que sí se tienen evidencias es de la formación de un estado de transición en el que el ACC se encuentra unido de forma bidentada al centro metálico en presencia de O₂ (71;84). La estequiometría de la reacción de oxidación del ACC ha sido determinada como se observa en la Figura 7.

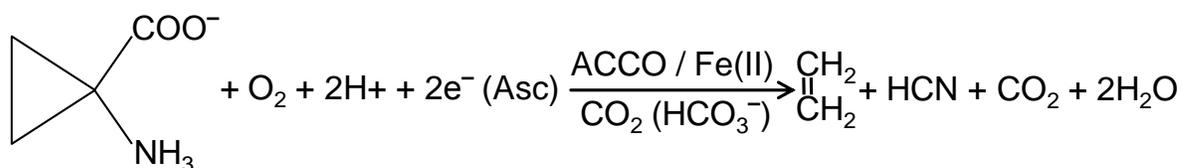


Figura 7. Reacción catalizada por la oxidasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACCO) (28)

Catálisis de la ACCO

La primera aproximación hacia la caracterización catalítica de la ACCO fue realizada por Konze y Kende (1979) con extractos germinales de guisantes (51). A este reporte le siguen diversos artículos que tratan la actividad enzimática relacionada a la

formación de etileno de muestras *in vivo* (8;62;93;99). No es sino hasta los experimentos de Hamilton *et al.* (1991) que se logró identificar el cDNA de la ACCO de jitomate (pTOM13) (46). Una vez aislado el gen, fue expresado en levaduras y la actividad como ACCO probada *in vitro* (94). Ververidis y John (1991) desarrollaron un protocolo de purificación para la ACCO de melón basados en la similitud que presenta el pTOM13 con las oxigenasas dependientes de 2-oxo-ácido (88). La obtención de esta isoforma de ACCO fue seguida de los reportes de obtención de ACCOs de diferentes fuentes como manzana y aguacate (29;62;92). Posteriormente se identificó a la ACCO como la enzima responsable de la producción de etileno en plantas lo que impulsó su estudio y caracterización derivado de un interés agroindustrial.

Peiser *et al.* (1984) demostraron, al estudiar el metabolismo del ACC en relación con la producción de etileno en tejidos de plantas, que el carbón carboxílico del ACC se libera en forma de CO₂, mientras que el C-1 es incorporado a conjugados de β-cianoalanina en concentraciones equivalentes al etileno producido (68). Sin embargo, no fue sino hasta la obtención de una preparación cercana a homogeneidad que fue posible establecer la estequiometría de la reacción. Dong *et al.* (1992), trabajando con una isoforma proveniente de *Malus domestica* (*Borkhm* cv. Golden delicious), establecieron que por cada mol de ACC consumido se utiliza un mol de O₂ y se forman cantidades equimolares de dehidroascorbato, etileno, HCN y CO₂ (29). Las concentraciones de etileno y CO₂ del espacio aéreo de la muestra se determinaron por cromatografía de gases y análisis infrarrojo, respectivamente. La producción de CO₂ radioactivo se logró utilizando [carboxyl-¹⁴C] ACC. El consumo de O₂ fue determinado utilizando un electrodo de oxígeno. La cuantificación de dehidroascorbato siguió el método de Terada *et al.* (1978) (28) para el ensayo de cianuro, la reacción se detuvo mediante la adición de ácido láctico al 50%; el HCN liberado en la fase gaseosa fue adsorbido a un disco de papel filtro previamente remojado en una solución 1M de NaOH y colgado en el tubo de reacción con una aguja, éste se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente y posteriormente se determinó la concentración de HCN colorimétricamente utilizando piridina y ácido barbitúrico (28;94). El consumo de ACC se estimó mediante la transformación química del ACC en etileno y la medición del etileno según la metodología de Lizada y Yang (28;59).

A continuación se resumen algunas de las evidencias espectroscópicas y cinéticas de la catálisis de la ACCO, la forma en la que interaccionan sustratos y co-factores en

el sitio activo. Se tienen evidencias experimentales que apoyan por un lado la entrada azarosa de sustratos y por otro, un mecanismo secuencial (15). El primer modelo, que surge a partir de cinéticas de estado estacionario y del estudio con inhibidores, sugiere un mecanismo de unión al azar en donde el ACC o el ácido ascórbico pueden unirse en primer lugar, seguidos del oxígeno y la especie restante (ácido ascórbico o ACC) en tercer término (83). En este caso parece ser que la mayoría de las veces es el ácido ascórbico el sustrato que se une en primer término al sitio activo. Alternativamente, el mecanismo secuencial se basa en cinéticas de estado estacionario y estudios de resonancia paramagnética de electrónica (EPR) y doble resonancia nuclear electrónica (ENDOR) para aductos de la parte nitrosilo del ACC. Este mecanismo propone que el ACC se une primero coordinando el hierro de una forma bidentada mediante la unión de los grupos α -amino y α -carboxilo. Los estudios espectroscópicos interpretan el siguiente paso como la unión del oxígeno gracias a una disminución en el potencial redox como consecuencia de la coordinación del ACC al centro metálico (15). Sin embargo, es difícil discriminar si el punto de entrada del ácido ascórbico es anterior a la unión del ACC o posterior a la unión al oxígeno molecular (71). A partir de estas evidencias se han propuesto diversos mecanismos catalíticos donde todos ellos involucran la formación de un intermediario catiónico ACC-amino radical pero difieren en la naturaleza de las rutas por las cuales se generan los productos(42).

A continuación se describe el mecanismo catalítico sugerido de un consenso de las diferentes fuentes y evidencias que se encuentran en la literatura; cabe reiterar que este mecanismo catalítico no se encuentra perfectamente elucidado y que la mayoría de los intermediarios son teóricos. En general la catálisis de la ACCO puede describirse como la activación del ACC mediante la oxidación de un electrón o la abstracción de un átomo de hidrógeno desde el grupo amino para dar lugar a la formación de un catión radical amino o radical aminilo. El reacomodo rápido de radicales resulta en la ruptura del anillo de ciclopropano y la eventual formación de etileno, CN^\cdot y CO_2 (Figura 8) (64;65).

En el estado basal el metal se encuentra tetra-coordinado como Fe^{II} (A). La unión de ACC al Fe^{II} disminuye el potencial redox del intermediario penta-coordinado permitiendo la unión del oxígeno como sexto ligante. Los electrones de este nuevo compuesto se redistribuyen generando un radical libre superoxo-ferril ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^\cdot$). Una molécula de bicarbonato (HCO_3^-) se posiciona en la vecindad del complejo

estabilizando al radical superóxido, sin embargo, esta especie no es lo suficientemente reactiva para oxidar el ACC (B). En un paso subsecuente, el radical superóxido se rescata como consecuencia de la donación de un electrón por un reductor externo, dando lugar a un intermediario inestable formado por una especie peroxil-ferril ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$) (C). La transferencia de dos protones (uno del carbonato y otro del ACC) acelera la ruptura del enlace O-O, la salida de una molécula de agua y la formación de la especie catalítica oxo- Fe^{IV} (D). Durante la formación de este último compuesto se genera un radical aminilo (radical libre en el nitrógeno del ACC unido al Fe). Lipscomb, Que y colaboradores sugieren que la oxidación del ACC involucra la transferencia de un átomo de hidrógeno a un $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ o una previa heterólisis del enlace O-O para generar la especie $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ como especie oxidante (71), sin embargo, Simaan hipotetiza esta situación solo en el caso de que la ruptura del oxígeno sea heterolítica (comunicación personal). En sus ejemplos, la especie $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ debe formarse de manera concomitante con la activación del sustrato. Se han postulado múltiples especies ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$, $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, o $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$) como probables oxidantes dentro del mecanismo de reacción aunque no se cuenta con evidencias directas de la especie Fe^{V} , sin embargo se espera que esta dé lugar al intermediario Fe^{IV} si se encuentra en presencia de semi-dehidroascorbato (64).

La especie catalítica (D) sufre entonces una redistribución de electrones la cual promueve la ruptura del anillo ciclopropano del ACC y la liberación de etileno, CO_2 y un ión cianuro, dejando al metal como Fe^{III} tetra-coordinado (E). Para restaurar el estado basal, indispensable para continuar con el recambio enzimático, se utiliza un segundo electrón y se postula que ésta es una de las funciones del ácido ascórbico como co-sustrato (7;71).

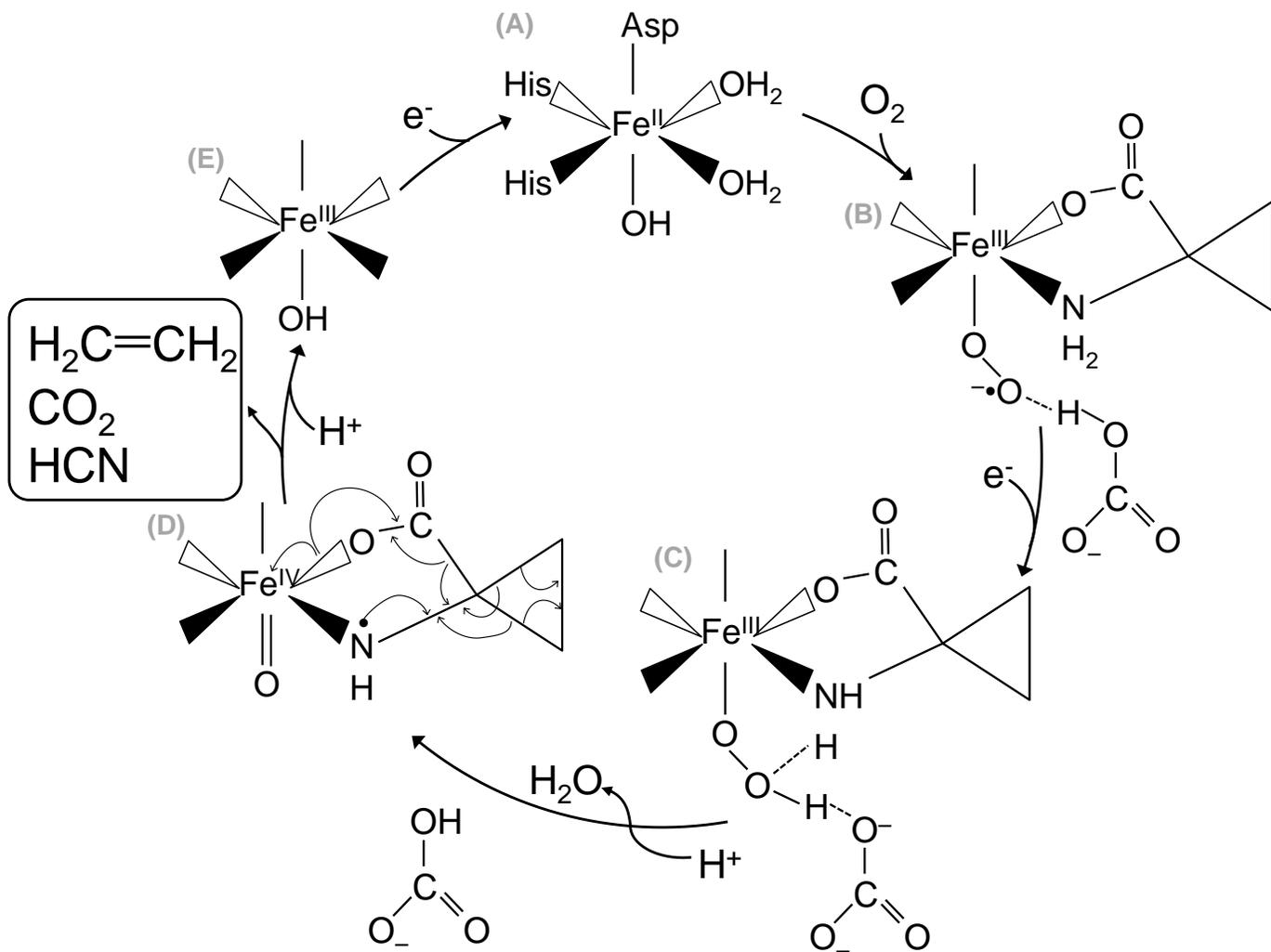


Figura 8. Mecanismo catalítico propuesto para la oxidasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACCO) (30)

Inconsistencias en los estudios de la ACCO

Como se mencionó anteriormente existen evidencias que pueden sustentar mecanismos alternativos. El mecanismo catalítico propuesto por Mirica *et al.* (2008), basado en efecto cinético isotópico (KIE) y efecto de isótopo en el solvente (SIE) postula que aunque el evento de la unión del sustrato y el oxígeno se den de una manera ordenada, la interacción del ácido ascórbico con la enzima es al azar y dependiente de la concentración (64). En concentraciones de saturación de ácido

ascórbico, se propone que este compuesto se une en primer término, seguido del ACC y en último lugar el oxígeno (65). Para tal mecanismo cinético, el paso limitante de la reacción sería la formación de la especie $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ en un proceso que involucra la transferencia de un electrón acoplada a un protón. La oxidación de la especie $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^-$ a la especie $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$ es posiblemente reversible. Cuando la concentración del ácido ascórbico se encuentra por debajo del valor de su K_m , se propone que este se unirá en último término, subsecuente al oxígeno con esta última unión como limitante. A diferencia del sustrato coordinado directamente al hierro, la unión del ácido ascórbico al sitio activo de la ACCO no es indispensable para la conversión del centro metálico de una coordinación hexa a penta y la reducción inicial del O_2 para formar la especie $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^-$ (64;65). Es pertinente mencionar que ambos mecanismos convergen en la entrada del oxígeno en un paso intermedio de tal forma que se permite limitar la formación de especies oxidantes hasta que el sustrato se encuentra presente, de esta forma se reduce el daño potencial a la enzima por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) previo a la unión con oxígeno (15;82).

Otro aspecto del mecanismo catalítico que ha generado controversia es el papel del CO_2 o del bicarbonato como co-factor de la catálisis, sin tener claro cuál de las dos formas es la que se utiliza durante la reacción, su localización o sitio de unión. Diferentes autores argumentan que la utilización de CO_2 es preferencial al observar un incremento en la V_{max} y la K_m aparente cuando la concentración de CO_2 se eleva en el intervalo de 5 a 20% en comparación con la utilización de bicarbonato (38;100). De igual manera se conoce que el bicarbonato actúa como activador ya que estimula la catálisis de manera independiente a las propiedades redox, incrementa la k_{cat} y protege a la ACCO de la desactivación. También se sabe que en presencia del bicarbonato el ACC se une al hierro de manera bidentada (38). Otras propuestas involucran al bicarbonato en la formación de especies reactivas por procesos de protonación específicos; en particular Rocklin *et al.* (2004) proponen que el bicarbonato se une a una Ser y Arg conservadas cerca del sitio activo dentro del motivo estructural DSBH (12;15;71). Estudios de espectroscopía de infrarojo cercano, dicroísmo circular y dicroísmo circular magnético dan evidencia de que en presencia de CO_2 se observa una geometría de cinco coordinaciones piramidal cuadrada distorsionada cuando el ACC y el ácido ascórbico se encuentran unidos al hierro (100). Al CO_2 también se le adjudica un papel estabilizador complementario en la geometría octaédrica distorsionada del complejo $\text{ACCO}/\text{Fe}^{\text{II}}/\text{ACC}$. Cuando no se añade CO_2 a la reacción,

aproximadamente el 30% del complejo octaédrico se transforma a una geometría piramidal cuadrada en donde solamente el ACC se encuentra coordinando el complejo y que se asocia a la desactivación de la enzima por una posible vía de daño oxidante (70).

Tradicionalmente, se ha incorporado bicarbonato en la mezcla de reacción para monitorear la actividad de la ACCO; la utilización diferencial de bicarbonato o CO_2 no ha sido resuelta aún. La implicación de que el CO_2 sea el co-factor o activador y no el bicarbonato trae como consecuencia que las condiciones de ensayos previos a esta observación hayan sido hechas bajo condiciones sub-óptimas. Esta observación deja clara la necesidad de hacer una revisión del mecanismo antes propuesto. De igual manera, el papel del ácido ascórbico permanece sin ser resuelto. Thrower *et al.* (2001) proponen que el ácido ascórbico se une en un sitio lejano al hierro, posiblemente en los residuos del sitio activo Arg224 y Ser246 (con base en la secuencia de la ACCO de jitomate) (83). Al ácido ascórbico también se le adjudica el papel de un co-sustrato (100) favoreciendo la formación del complejo enzima sustrato-dioxígeno (12;71). Por otra parte se ha sugerido un papel como regulador de la unión de las moléculas al hierro limitando el acceso a moléculas pequeñas. El ácido ascórbico parece no ser indispensable en condiciones de recambio sencillo siempre y cuando el bicarbonato se encuentre presente (71). Sin embargo, el ácido ascórbico incrementa de manera dramática la producción de etileno y la oxidación del hierro (15;16;71). Los estudios cinéticos de Thrower *et al.* (2006) no reportan cambios considerables en la k_{cat} observada al utilizar diferentes análogos de ACC tanto cíclicos como acíclicos (82). Estos resultados predicen un paso determinante de la reacción precedente a la activación del sustrato y la especie de valencia elevada $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ como responsable de la química subsecuente. Estos datos son congruentes con los resultados obtenidos mediante KIE y SIE por Mirica *et al.* (2008), siendo la única variante la concentración de ácido ascórbico (65).

El electrón necesario para la reducción del enlace superóxido proviene de un radical semi-dehidroascórbato por un mecanismo de esfera externa. Este mecanismo difiere de aquel propuesto por Rocklin *et al.* (2004), cuyos estudios de cinética transitoria muestran la producción de etileno durante un ciclo sencillo de recambio catalítico sin la presencia de ácido ascórbico (71). En este último caso, se propone que el sustrato provee los electrones para la reducción del oxígeno con la reducción del

especie $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$, de igual manera la ruptura del enlace O-O conduce a la formación de la especie $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (12).

Adams y Yang (1979) hipotetizaron que la conversión enzimática del ACC en etileno se da mediante la formación de un intermediario N-hidroxil-ACC inestable que se fragmenta en etileno y cianoformato que se descompone en un paso posterior a HCN y CO_2 (3;7). Hoy en día, se acepta de manera general que la conversión de ACC a etileno procede vía este mecanismo radical, una vez formado este intermediario se proponen dos rutas posibles: A) la apertura directa del anillo del catión ACC-amino radical por la abstracción de un protón desde el grupo amino o B) la abstracción de un protón por el grupo amino seguida por la apertura del anillo de un radical ACC-aminilo (Figura 10). Utilizando cálculos de química cuántica se estimó que la ruta A) es más favorable que la B) por lo que se cree que la síntesis de etileno debe de proceder principalmente por esta vía (42).

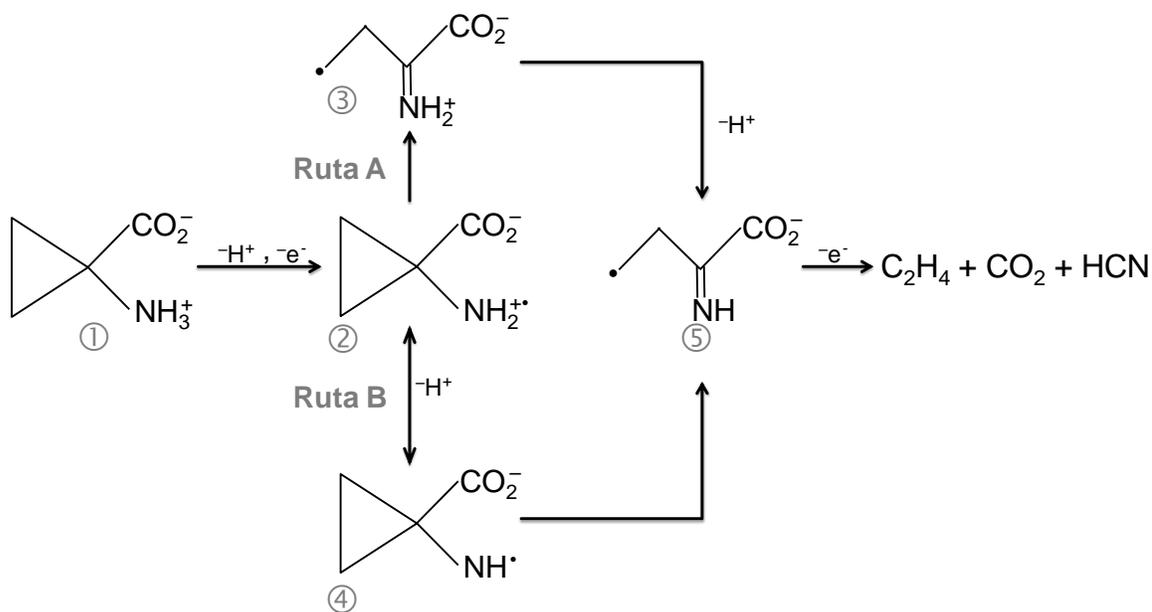


Figura 10. Posibles mecanismos de oxidación del ACC por la ACCO. Ruta A) apertura directa del anillo y ruta B) abstracción de un protón del amino seguida de la ruptura (42)

Aunado a las inconsistencias en el mecanismo catalítico, en el caso de la ACCO existen abundantes reportes que indican que es una oxidasa particularmente lábil bajo condiciones de recambio catalítico. Se reporta una vida media en el rango de 15 a 25

min para la enzima de jitomate hasta 2h para las preparaciones obtenidas de manzana dependiente de las condiciones de reacción, siguiendo una cinética de desactivación de primer orden (El Bakkali y Simaan, comunicación personal) (Figura 11). Se ha reportado previamente que la desactivación de la ACCO no es un efecto de inhibición por producto, ya sea dehidroascorbato o cianuro, ocurriendo siempre la máxima desactivación bajo condiciones catalíticas (34). El modelo de desactivación de la ACCO más documentado se basa en la observación de proteólisis concurrente con la desactivación en condiciones aerobias y en presencia de hierro y ácido ascórbico mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (Figura 12). La proteólisis que sufre la ACCO al incubarla en las diferentes condiciones de reacción procede por cinco minutos, con un estimado de fragmentación menor al 10%. Si se adiciona peróxido de hidrogeno al 0.1% (v/v) el porcentaje de fragmentación no aumenta pero la intensidad de algunas bandas se altera (la observación de la proteólisis con un porcentaje mayor de peróxido de hidrogeno hace difícil el análisis debido a la aparición de bandas difusas en el gel desnaturalizante). La inclusión de BSA o catalasa no altera los patrones de fragmentación ni su porcentaje. Los niveles de fragmentación parecen ser dependientes de la concentración de ácido ascórbico utilizado cuando se modifica la relación hierro/ácido ascórbico (5). Lo que se mantiene como una observación constante es que la desactivación de la ACCO es irreversible y general para todas las ACCO estudiadas, independientemente de la fuente.

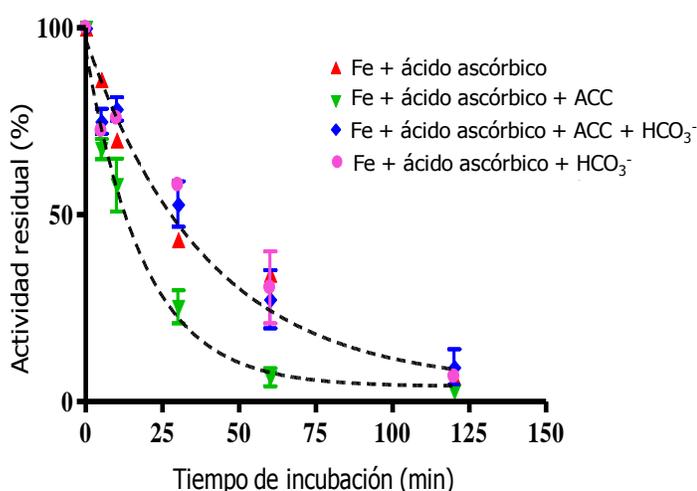


Figura 11. Cinética de desactivación de la ACCO de jitomate (El Bakkali y Simaan, comunicación personal)

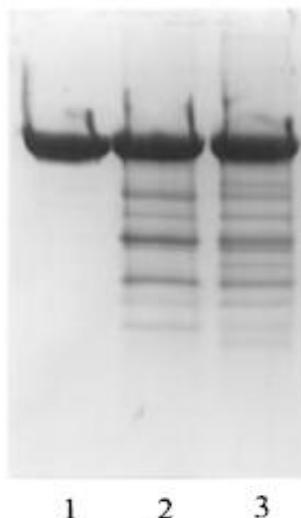


Figura 12. SDS-PAGE Fragmentación de la ACCO después de 5 minutos de incubación en diferentes condiciones. Carril 1. Sin tratamiento, Carril 2. ACCO/Fe/ácido ascórbico, Carril 3. ACCO/Fe/ácido ascórbico/ACC (5).

Estudios de la ACCO

La ACCO es un enzima que ha sido extensamente estudiada, existen en la literatura diversos reportes que tratan sobre la filogenia, estructura y catálisis de diferentes isoformas de ACCO (5;7;64;71;97-99). La actividad de la ACCO es usualmente determinada mediante el método propuesto por Mitchell *et al.* (1988) en donde la producción de etileno es cuantificado en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de flama (66). La actividad de la ACCO también se ha determinado, aunque por pocos autores, mediante la cuantificación del consumo de oxígeno utilizando un electrodo de Clark (83). A continuación describiremos algunos de los estudios cinéticos realizados para la ACCO.

Los primeros parámetros obtenidos con una preparación de la ACCO de jitomate codificada en el plásmido pTOM13 en *E. coli* distan de aquellos obtenidos previamente con otras ACCO y su comparación se dificulta, en virtud de que estas preparaciones no fueron ensayadas en condiciones óptimas (28;94). Por ejemplo, la K_m aparente para la ACCO de jitomate en presencia de L-ácido ascórbico y 10 mM de HCO_3^- es de 0.0232 mM comparada con el valor de 0.032 mM para la isoforma de aguacate en ausencia de

HCO_3^- (62), 0.028 y 0.121 mM (0.03% y 4% CO_2 , respectivamente) para la enzima de manzana (38) y 0.062 mM para la enzima de melón ensayada en condiciones similares que la recombinante (94).

Una de las caracterizaciones de la ACCO de jitomate recombinante exhaustiva es la realizada por Thrower *et al.* (83). En este estudio se comparan diferentes aspectos de la ACCO de jitomate como son: la respuesta de la velocidad en presencia de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, la afinidad de la enzima por el Fe^{2+} , el carácter inhibitorio de una elevada concentración de ACC, entre otros. A diferencia de los demás trabajos que utilizan la producción de etileno para medir la actividad de la ACCO, este trabajo monitorea el consumo de O_2 con un electrodo tipo Clark que, a decir de los autores, permite una medición continua de la reacción haciendo posible monitorear el tiempo completo en que ocurre la reacción (Tabla 1). Con los datos obtenidos en éste último estudio los autores proponen un mecanismo mínimo en el que la unión del ACC y el O_2 se da de forma ordenada, mientras que el ácido ascórbico puede unirse antes o después del ACC (Figura 13). Uno de los retos al medir la actividad de la ACCO utilizando un electrodo de Clark son las reacciones ocasionadas por condiciones saturantes de ácido ascórbico en presencia de Fe^{II} en el medio de reacción y el consumo de fondo de O_2 del electrodo que puede enmascarar las señales de la reacción enzimática.

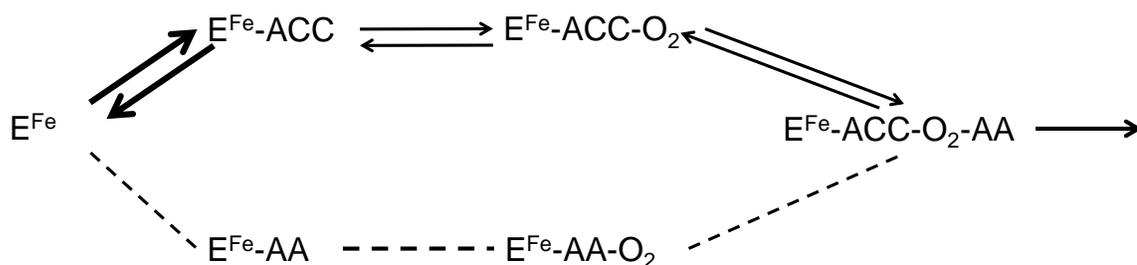


Figura 13. Esquema de la formación del complejo Enzima-Sustrato en el mecanismo catalítico de la ACCO en donde AA se refiere al ácido ascórbico (83)

Otras isoformas de la ACCO de jitomate fueron caracterizadas por Bidonde *et al.* (1998) mediante la expresión del cDNA en levaduras. En este trabajo se comparó la actividad relativa (midiendo la generación de etileno) de dos isoformas de ACCO de jitomate con el gen de la ACCO contenido en el plásmido pTOM13, dichas isoformas

denominadas ACCO2 y ACCO3 poseen una similitud con pTOM13 del 89 y 95%, respectivamente. Las Km obtenida para las tres isoformas se muestra en la Tabla 1 en donde se comparan dos diferentes condiciones de reacción. Las tres isoformas presentan un rango de actividad máxima entre pH 6.8-7.2 y una temperatura entre 28-30° C. La concentración óptima de ácido ascórbico para las tres isoformas fue de 3 mM y la actividad enzimática decae dos veces en una concentración reportada sub-óptima de 20mM. En cuanto a la concentración optima de hierro, el máximo de actividad se encuentra en presencia de 10 μ M de FeSO₄ (8). De este trabajo cabe resaltar la baja actividad observada en la isoforma ACCO2 que, a decir de los autores, puede sugerir una estructura distinta a juzgar por los datos obtenidos comparando la secuencia obtenida de las tres isoformas y mediante el análisis estructural comparando con las estructuras cristalográficas de isopenicilina-N-sintasa.

Recientemente, Brisson (2010) determinó los parámetros cinéticos de la ACCO de jitomate (Tabla 1). Aunque los valores son congruentes con otros reportados, éste conjunto de experimentos de cinética enzimática no permite una mayor comprensión del mecanismo catalítico ya que los valores obtenidos responden a un sustrato variable obteniendo de esta forma parámetros cinéticos aparentes, de igual manera que los parámetros obtenidos por Bidonde *et al.* (1998) a fin de conocer más a fondo la enzima la autora realizó un ensayo cooperativo entre los diferentes sustratos y co-sustratos, concluyendo que el HCO₃⁻ se une de forma aleatoria a la ACCO. Sin embargo, aun queda como una interrogante la forma en que esto sucede (10).

Tabla 1. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para la ACCO de jitomate

Autor	Condiciones	K_m (mM)	k_{cat} (min⁻¹)
Zhang <i>et al.</i> <i>Biochem J.</i> 1995	Ácido Ascórbico 5 mM FeSO ₄ 80 μM NaHCO ₃ 10mM	0.023	ND
Trower <i>et al.</i> <i>Biochemistry</i> 2001	Ácido Ascórbico 30mM Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ equimolar NaHCO ₃ 20 mM	0.099	36.4
		0.067 (pTOM13)	ND
Bidonde <i>et al.</i> <i>Eur. J. Biochem.</i> 1998	Ácido Ascórbico 3mM FeSO ₄ 10 μM NaHCO ₃ 10 mM	0.029 (ACCO2)	ND
		0.030 (ACCO3)	ND
		0.030 (pTOM13)	ND
Bidonde <i>et al.</i> <i>Eur. J. Biochem.</i> 1998	Ácido Ascórbico 3mM FeSO ₄ 10 μM	0.012 (ACCO2)	ND
		0.013 (ACCO3)	ND
Brisson, L. 2010	Ácido Ascórbico 8mM Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ ·6H ₂ O 40 μM NaHCO ₃ 18mM	0.150	11.3

* ND = no determinado

El grupo de Yang caracterizó a principios del 2000 una de las isoformas de ACCO de manzana recombinante (19). En dicho trabajo el cDNA obtenido en un experimento previo se amplificó del pAE12 y se expresó de forma heteróloga en *E. coli*. Se obtuvieron los datos de la estequiometría de la reacción de oxidación de un sustrato alterno, el ácido α-aminoisobutírico (AIB) y la caracterización de los productos de la reacción (acetona, amonio y CO₂), encontrando que se producen en concentraciones equimolares al AIB consumido. En los estudios cinéticos se observó una Km para el AIB de 14.7 mM mientras que para el ACC fue de 0.23 mM y una kcat para el AIB de

0.07 s⁻¹, similar a la obtenida para el ACC. Se concluye que la oxidación del AIB se produce mediante un mecanismo de reacción de dos electrones como en el caso del ACC. Estos datos son parecidos a los obtenidos en un trabajo posterior utilizando la ACCO de manzana en donde se caracterizan diferentes mutantes de la ACCO. Los valores reportados de Km para el ACC son de 0.105 mM y de *k*_{cat} de 0.0539 s⁻¹, consistentes con los reportes previos. De igual manera se reporta una Km para Fe^{II} de 2.092 μM y una Km para el ácido ascórbico de 3.179 mM, éste último parámetro es aproximadamente 21 veces más grande que el mayor valor obtenido para la ACCO de jitomate que se muestra en la Tabla 1 (19).

En resumen, los parámetros catalíticos de preparaciones nativas de la enzima provenientes de diferentes fuentes reportan valores de Km entre 0.032 y 2.87 mM (38;62;79;89). La diferencia de dos órdenes de magnitud entre estos datos podría deberse a particularidades en los protocolos de purificación, las condiciones de reacción, la incertidumbre propia de los métodos de detección, o a las diferencias existentes en cada una de las proteínas. Sin embargo, incluso con la utilización de la misma isoforma (pTOM13 proveniente de jitomate) expresada en *E. coli*, se observan grandes variaciones en los parámetros cinéticos obtenidos con valores de Km de 0.03 a 0.130 mM mientras que la *k*_{cat} aparente se reporta en un intervalo de 6.1 a 354 min⁻¹ (11;99). La dispersión de los datos en la literatura ha limitado la introducción de la ACCO como un biocatalizador, en especial bajo un esquema de ingeniería de proteínas en donde diferentes variantes tienen que ser evaluadas. Por lo tanto creemos que es necesaria la generación de metodologías más robustas y sensibles para la evaluación de la actividad de la ACCO.

Cianuro, el patito feo

Como se mencionó en la sección anterior, los estudios de la ACCO se abocan a la medición de la actividad por medio de la producción de etileno o consumo de oxígeno, los cuales generaron una serie de parámetros cinéticos con una amplia dispersión en los datos. Para poder generalizar y conocer al detalle la catálisis de la ACCO, en este trabajo se planteó la búsqueda de metodologías más robustas y sensibles para estimar la actividad de la ACCO, de las cuales sobresale la cuantificación de cianuro. A continuación, se presenta una breve revisión de las metodologías más empleadas y su importancia para la determinación de la concentración de cianuro.

Los compuestos cianogénicos están ampliamente distribuidos en plantas (94;95). A la fecha se conocen más de 60 diferentes glucósidos cianogénicos en más de 2500 especies de plantas (95). Dichos compuestos han sido causantes de envenenamiento tanto en humanos como en animales, debido a la ingesta de plantas que los contienen. Los tejidos de plantas forman HCN como resultado de la hidrólisis de compuestos cianogénicos y como productos derivado de la biosíntesis de etileno (77). En plantas superiores la enzima encargada de detoxificar el HCN es L-3-cianoalanina sintasa (EC. 4.4.1.9) que cataliza la reacción: L-cisteína + HCN \rightarrow L-3-cianoalanina la cual se metaboliza a su vez en asparagina o γ -glutamyl-L-3-cianoalanina (94). El HCN restante se encuentra formando parte de reacciones de señalización principalmente durante estrés biótico y abiótico, siendo los mecanismos celulares de esta respuesta aun desconocidos (77).

Para el año 2000 existían en la literatura no menos de 60 diferentes métodos colorimétricos para la determinación de cianuro libre (6). La determinación espectrofotométrica de este compuesto se lleva a cabo desde 1947 con la publicación del método de Epstein que se basa en la conversión de cianuro en cloruro de cianógeno a través de la adición de cloramina T y la reacción del cloruro de cianógeno con una mezcla de piridina conteniendo 0.1% de bis-pirazolona y 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (35). Esta metodología fue mejorada posteriormente al desarrollarse metodologías más rápidas y simples como la reacción de Aldrige, la cual se basa en la formación de bromuro de cianógeno y su posterior reacción con piridina y bencidina (32;33). La reacción de halogenuros de cianógeno para romper la piridina y generar aldehído glutacónico fue descrita en la síntesis de colorantes por König (55) y posteriormente adaptada en la determinación de HCN mediante la oxidación de CN⁻ a halogenuro de cianógeno (CNX) en donde CN⁺ es la especie que reacciona con piridina, generando el intermediario que dará lugar al aldehído. El aldehído glutacónico se acompleja posteriormente con una amina o con otro compuesto que contenga metilenos con hidrógenos reactivos (55). Existen variantes de estas metodologías en donde se han utilizado pirazolona o ácido barbitúrico en lugar de bencidina. La reacción de HCN con cloramina T, piridina y pirazolona genera un cromóforo azul denominado (4E)-3-metil-4-[(2Z,2E)-4-(3-metil-5-oxo-1-fenil-1H-pirazol-4(5H)-ylidina]but-2-enylidina)-1-fenil-1H-pirazol-5(aH)-ona que absorbe a 630nm y que permite cuantificar concentraciones de CN⁻ entre 0.2 y 1.2 μg , con un porcentaje de recuperación del 99% y un límite de detección cercano a 0.01 mg L⁻¹. Posteriormente,

la piridina fue reemplazada por ácido isonicotínico/ácido barbitúrico. La principal limitante en estas metodologías es la baja estabilidad del cromóforo (33).

El análisis de formación de complejos de cianuro con metales de transición también puede ser realizado mediante metodologías que incorporan la utilización de luz UV como una herramienta previa al análisis de la concentración de HCN. Para 1981, Grieve y Syty reportan la cuantificación más sensible y directa de HCN mediante la conversión de CN^- a amonio. El HCN es primero convertido en cianato con KMnO_4 a pH elevado (en 10N de NaOH). El cianato es convertido entonces al ion amonio en un exceso de ácido sulfúrico (16N H_2SO_4). El análisis se completa al generar amoniaco con un álcali para su medición en la fase gaseosa con espectroscopia de absorción. El límite de detección se estableció en 1.153 mmol de CN^- en la solución original previo a la reacción de transformación a amonio (44).

Otro tipo de metodologías que utilizan la luz UV son aquellas en las que la concentración de HCN es determinada de forma amperométrica (como se explica posteriormente). Para promover la ruptura del complejo que se forma con los metales de transición se utiliza luz UV y dependiendo de la longitud de onda empleada es el resultado obtenido. Entre 180 y 260 nm el tiocianato es oxidado y se forma HCN. Longitudes de onda cercanas a 260-320 nm se utilizan para liberar el HCN del complejo metálico, siendo un proceso más suave en el cual el tiocianato no se descompone, promoviendo solo la descomposición del complejo metal-CN (6). De igual manera la reacción generada con los iones de níquel y el HCN ha sido explotada ya que genera un complejo iónico tetracianoniquelado(II) con un espectro UV característico. Estas metodologías están limitadas por la baja estabilidad de los compuestos coloridos requiriendo tiempos muy cortos de medición (74).

Las técnicas previamente mencionadas fueron reemplazadas por una nueva generación de métodos espectrofotométricos como las que se mencionan en la Tabla 2 (33). De éstos, uno de los más prometedores por su nivel de detección es aquel en que se utiliza ninhidrina formando un intermediario rojizo cuando reacciona con HCN en presencia de carbonato de sodio (Figura 14). Esta reacción tolera la presencia de ácido ascórbico hasta 50 mg ml^{-1} y no se ve interferencia en presencia de aminoácidos y amonio (32), tres compuestos que se encuentran presentes en la mezcla de reacción de la ACCO, permite analizar niveles cercanos a 1 mmol de HCN, sin embargo, es un método sensible a la presencia de O_2 . A pesar de ser una reacción rápida, simple y

altamente selectiva se reporta interferencia en las mediciones por la presencia de algunos metales, aunado a la necesidad de un medio alcalino por lo que descartamos la utilización directa de ninhidrina para la estimación espectrofotométrica de CN en la reacción de la ACCO.

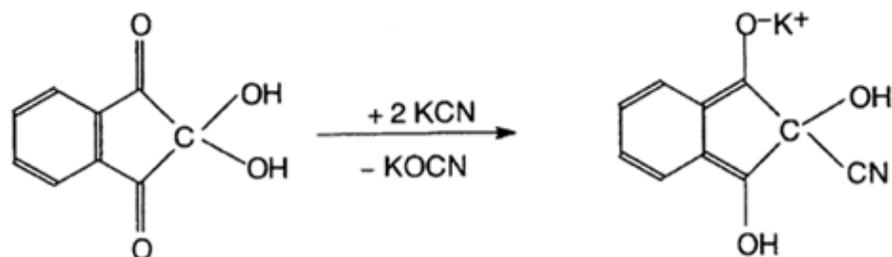


Figura 14. Representación esquemática de la reacción de cianuro con 2,2-dihidroxi-1,3-indanediona (ninhidrina) (32)

Por su parte, Kaur *et al.* (2009) proponen la utilización del colorante verde-azul monosódico soluble en agua {4-[(4-dietilaminofenil)-(3,6-disulfonaftalen-1-yl)metileno]ciclohexa-2,5-dienilideno}dietilamonio también conocido como “Lissamina”. El análisis espectrofotométrico de la lissamina muestra tres bandas características a 634, 453, y 308 nm las cuales disminuyen en presencia de CN^- mientras que se observa la aparición de una nueva banda a 280 nm (Figura 15). A simple vista es notable la desaparición del color azul-verde de la solución. El límite de detección de la lissamina es cercano a 38.5 nmol de CN^- . Las pruebas realizadas con esta técnica demostraron que no existía interferencia en presencia de diferentes aniones y un rango de pH útil que va de 1.2-10.7 haciendo posible su utilización a pH fisiológico (50).

Tabla 2. Límite de detección de la segunda generación de métodos espectrofotométricos para la detección de CN⁻ (modificado de (33))

Metodología	Límite de detección ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\text{CN}^-$)
Ensayo ninhidrina (590 nm)	0.001
Reacción con ácido isonicotínico	0.005
Ensayo ninhidrina (485 nm)	0.003
Reacción de Berthelot	0.013
Ensayo con resorcinol y ácido pícrico	0.029
Método del fluoroglucinol	0.028
Método basado en ácido pícrico	0.183

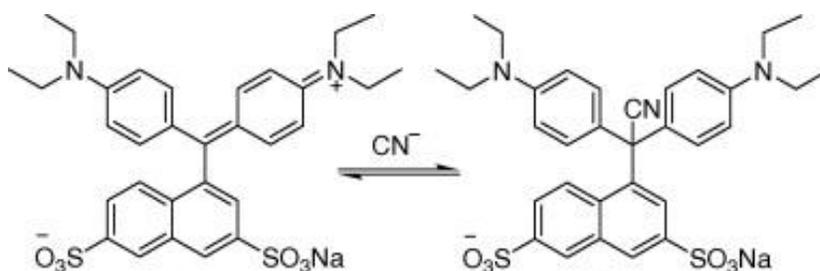


Figura 15. Representación esquemática de la reacción de cianuro con Lissamina (50)

Tanto el ensayo con ninhidrina como la prueba de Kaur presentan cualidades en la detección de niveles relativamente bajos de HCN. Inclusive la detección de HCN podría realizarse utilizando alícuotas de la mezcla de reacción para evitar interferencia de los reactivos o el pH de la solución para la detección. Sin embargo, las concentraciones de producción de HCN para las diferentes ACCO recombinantes caracterizadas (*Actinidia chinensis*, *Lycopersicon esculentum* y *Malus domestica*) es cercana a 200 nmol por min de reacción, es decir tres órdenes de magnitud por debajo de los límites de detección de la metodología de ninhidrina y cercana al límite de detección del método de Kaur el cual puede verse afectado por la interferencia ocasionada por el Fe^{II} libre en la reacción.

Otras metodologías pueden ser más sensibles a bajas concentraciones de HCN como por ejemplo la cromatografía de gases (GC), la cual ha sido descrita por diversos autores. La extracción del HCN se da mediante acidificación para después tomar una muestra del espacio aéreo del recipiente de reacción y analizarla en el GC (33;49). Esta volatilización del HCN se encuentra sujeta a limitaciones cinéticas para lo cual se han generado diversas variantes que incluyen procedimientos automatizados, trampas criogénicas en el horno y detección de captura de electrones (33). La cromatografía de gases se utilizan diferentes formas para el análisis de CN como la reportada por Valentour *et al.* (1974) basada en la conversión de CN a cloruro de cianógeno utilizando un detector de captura de electrones (86). Estas variantes reportan tan solo una recuperación de la muestra problema cercana a 80% debido a que el tratamiento previo a la medición requiere de una gran cantidad de reactivos.

Alternativamente, se ha reportado la utilización de métodos electroquímicos para la determinación de HCN que pueden clasificarse en métodos potenciométricos y amperométricos. Dentro de los métodos potenciométricos, Thoth y Pungor (1970) reportan la reacción entre nitrato de plata y cianuro mediante el uso de electrodos de platino u oro. Estas metodologías incluyen también la medición de diferencia de potencial generada mediante el HCN y un electrodo sensible a iones (ISE por sus siglas en inglés), dichos electrodos son generalmente de estado sólido y desarrollan un potencial a través de una membrana el cual es proporcional a la concentración de HCN en solución. Las metodologías basadas en ISE pueden utilizarse con soluciones en todos los rangos de pH y poseen una sensibilidad a concentraciones de cianuro que oscila entre mili y micro mol de CN^- . Los métodos amperométricos se basan en la detección de la corriente generada en un electrodo de plata utilizando una disolución de plata en HCN. Debido a la complejidad en la que la química de la formación del aducto metal de transición-CN, estas metodologías requieren un paso previo de separación de los compuestos presentes en las muestras a analizar ya sea destilación, pervaporación, extracción con solventes o alguna cromatografía. Christison y Rohrer (2007) separan el HCN mediante cromatografía de intercambio aniónico y determinan la concentración de HCN mediante amperometría pulsada utilizando un electrodo de plata llegando a detectar concentraciones cercanas a $38 \mu\text{mol}$ de CN^- como límite de la detección (6;23).

Se han realizado otros intentos para utilizar electrodos en la detección de HCN al acoplar la detección de la actividad de catalasa a un electrodo de Clark para determinar la inhibición de cianuro en la actividad enzimática, si bien es posible detectar la presencia de HCN de forma dependiente de la concentración, no se encontró una relación lineal de dicha dependencia (81). De igual manera se han utilizado electrodos acoplados a diferentes polifenol oxidasas en electrodos de doble capa de Zn-Al para la detección de HCN. Las mediciones se llevan a cabo con ácido 3,4-dihidroxifenilacetico como substrato de la enzima, el quinoide generado enzimáticamente es electro reducido a -0.2 V (33).

También se ha publicado la detección de HCN mediante cromatografía de intercambio iónico en HPLC y utilizando un detector de fluorescencia (Figura 16) (18;31;39;73). Desde 1987 de Montigny *et al.* reportaron el diseño racional del naftalene-2,3-dicarbaldehído (NDA) para la determinación de aminas primarias utilizando CN⁻ como nucleófilo y generando un derivado 1-cianobenz[*f*]isoindole (CBI) (26). Posteriormente, Matuszewski *et al.* (1987) evaluaron la eficiencia del CBI como fluoróforo, observando que el máximo de emisión de fluorescencia así como el ancho y la media de altura del pico de la señal que corresponde al derivatizado no presenta un impacto considerable por cambios en la estructura del grupo R proveniente de la amina primaria al reaccionar con el anillo de isoindol (61). Felscher y Wulfmeyer (1998) reportaron la utilización de esta metodología para la medición de cianuro en fluidos corporales y muestras totales de sangre, presentado un comportamiento de detección lineal entre 75 pmol y 200 μmol de CN⁻ y una estabilidad de la especie fluorescente cercana a 1h a temperatura ambiente (37).

Recientemente, Driesener *et al.* (2010) proponen la utilización de este sistema de derivatización para la caracterización de los productos de la reacción del subcluster HydG de la hidrogenasa-[Fe-Fe]. En su artículo demuestran que el HCN es parte de los productos generados durante la ruptura de tirosina por la HydG. Para la derivatización del HCN se utilizó NDA y como amina primaria taurina generando CBI, siendo el primer reporte de la utilización de esta metodología en la caracterización de una enzima. Una vez que la reacción enzimática procedió, las proteínas se precipitan con ácido perclórico y la solución se lleva inmediatamente después a pH 7.5 mediante la adición de un sistema amortiguador y la cantidad necesaria de NaOH para neutralizar el ácido añadido seguido de un pulso de centrifugación. El sobrenadante de la mezcla

es utilizado en la reacción de derivatización para la cuantificación del CN⁻ (31). Para este ensayo se reporta un límite de detección cercano a 3 nmol de CN⁻ y como ya se había reportado con anterioridad, el cambio en la fase móvil no produce variaciones significativas (a diferencia de los primeros ensayos reportados en donde se utiliza acetonitrilo como fase móvil aquí se utiliza metanol) (31;61).

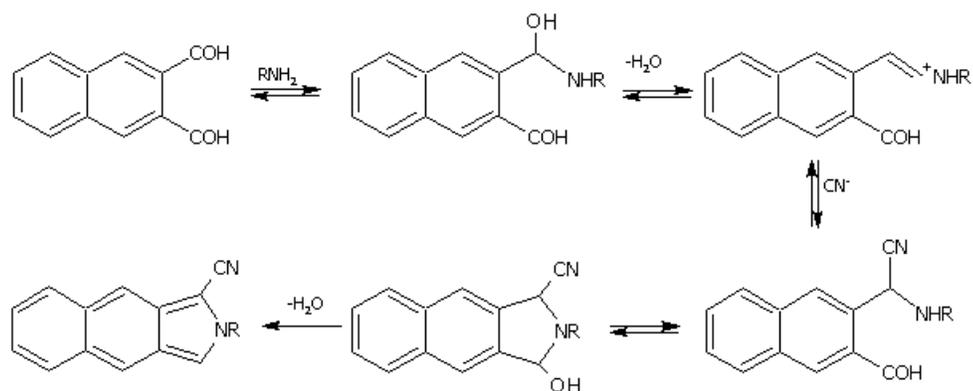


Figura 16. Esquemización de la reacción de formación de CBI a partir de NDA y CN⁻ (18)

Hipótesis

La cuantificación de cianuro como método de medición de la actividad de la oxidasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACCO) permitirá un análisis más eficiente de variantes en un esquema de ingeniería de proteínas comparado con las metodologías de producción de etileno y consumo de oxígeno.

Objetivo General

Articular la metodología necesaria para la determinación de la actividad de la oxidasa de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico dirigida a la investigación de la biosíntesis de etileno con fines industriales.

Objetivos particulares

- Clonar, expresar y purificar la ACCO de tomate en *E. coli*.
- Establecer la metodología para la medición de la concentración de hierro intrínseco en la ACCO.
- Desarrollar los protocolos necesarios para la medición de la actividad de la ACCO como cuantificación de etileno, consumo de oxígeno y producción de cianuro.
- Estimar la actividad enzimática con las diferentes metodologías y obtener los parámetros cinéticos de la ACCO.

Materiales y Métodos

Todos los reactivos utilizados para la realización de este proyecto fueron de calidad analítica y provinieron de Sigma-Aldrich, a reserva de que se indique lo contrario en el texto. Las enzimas de restricción y ligasa para los experimentos de biología molecular se obtuvieron de New England Biolabs, y el pET32a(+) de Novagen.

Electroforesis

DNA.

Los geles de agarosa (grado DNA) se prepararon al 1% (para fragmentos menores a 800 pares de bases) en amortiguador TAE50X.

242 g Tris base
57.1 mL ácido acético glacial
100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Aforado a 1 L

Proteínas.

Los geles de proteínas se prepararon con poliacrilamida al 12%.

	Gel (10 mL)	Pregel (4 mL)
Agua	3.25	2.7
Acrilamida 30%	4.0	0.66
Amortiguador Tris*	2.5	0.5
SDS 10%	0.1	0.04
Persulfato de amonio 10%	0.01	0.04
TEMED	0.004	0.004
2,2,2-tricloroetanol	0.05	-

*El pH de este amortiguador es de 8.8 para el gel y 6.8 para el pregel.

Cepas y medios de cultivo

Las cepas *E. coli* DH5 α y *E. coli* BL21 (Novagen) se crecieron en medio LB (NaCl 171 mM, peptona 1%, y extracto de levadura 0.5%); para el medio sólido se adicionó agar al 1.5%) a temperaturas variables.

Purificación de DNA plasmídico

Se inoculó una colonia aislada en 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente y se incubó a 30° C por 16 h posteriormente se cosechó el paquete celular por centrifugación y se purificó el plásmido por lisis alcalina con el estuche GeneJet Plasmid Miniprep (Fermentas). Después de la purificación la pastilla de DNA fue disuelta en 50 μ L de H₂O tetradestilada y se almacenó a -20° C para su posterior utilización.

Construcción del vector de expresión de la ACCO

La ACCO de tomate fue subclonada en el pET32a(+). Para lo cual el vector fue digerido con las enzimas NdeI y BamHI y posteriormente purificado con el estuche GeneJet extraction kit (Fermentas). El gen de la ACCO contenido en el plásmido pET-21a fue digerido con el mismo par de enzimas, el fragmento de 945bp liberado después de la digestión se purificó de gel utilizando el mismo estuche previamente descrito. El fragmento codificante de la ACCO y el vector ya digeridos y purificados se ligaron utilizando la ligasa T4 DNAligasa generando el vector de expresión pET32ACCO (Figura 17) (87).

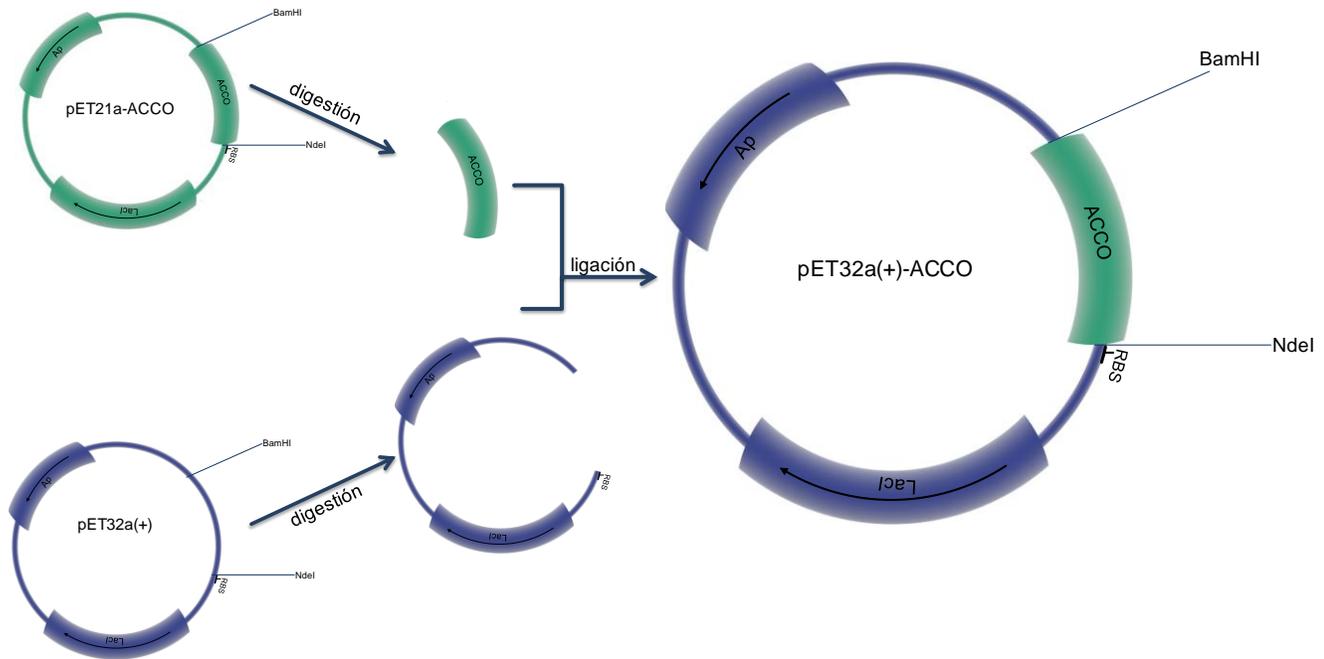


Figura 17. Estrategia de subclonación del gen de la ACCO en el vector pET32a(+)

Transformación de *E. coli*.

La construcción pET32a-ACCO que se purificó previamente se desaló mediante precipitación con butanol y etanol, la pastilla resultante fue disuelta en 10 μ l de H₂O tetradestilada. La transformación se realizó por electroporación de aprox. 100 ng de vector en 60 μ L de células competentes *E. coli* DH5 α sometidas a un choque eléctrico de 1.8 V en un electroporador (Bio-Rad) ajustado a 25 μ F y 200 Ω . Las células se recuperaron agitando durante una hora a 37°C en 1mL de medio LB. Un número determinado de colonias fueron cultivadas y analizadas para la ACCO mediante restricción utilizando las enzimas de restricción BamHI y NdeI. Las colonias que liberaron el fragmento esperado fueron posteriormente analizadas mediante secuenciación del plásmido. El plásmido con la secuencia correcta de la ACCO es denominado pET32ACCO.

Posteriormente se inocularon en placas de medio LB con el/los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37° C hasta encontrar colonias aisladas. Para la

expresión de la ACCO el vector fue transformado en la cepa *E. coli* BL21 (Novagen) siguiendo el protocolo de electroporación previamente descrito.

Expresión de la ACCO

El cultivo para la expresión de la ACCO se realizó en 1 L de LB suplementado con 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina a 37° C en matraces Fernbach a 500 rpm en una incubadora MRC LOM150 hasta tener una densidad óptica A_{600} entre 0.4 y 0.6, una vez alcanzada la densidad deseada se adicionó isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. La temperatura de cultivo se disminuyó hasta 28° C y el crecimiento se continuó durante tres horas.

Para la expresión de la ACCO se utilizó un fermentador de 10L, el inóculo se creció en 250 mL de cultivo en LB suplementado con ampicilina a 37° C por 12 h. El inóculo se adicionó a un fermentador de 10L operado a 37° C, 300 rpm y 0.33 vvm. Una vez que el cultivo llegó a la densidad óptica (A_{600} entre 0.4 y 0.6) se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM. La temperatura de cultivo se disminuyó hasta 28° C y el crecimiento se continuó durante tres horas.

El paquete celular fue cosechado en línea usando una centrifuga Minisharpless, el sobrenadante se desechó y el paquete celular se utilizó para los pasos de purificación que se describen a continuación.

Purificación de la ACCO

El paquete celular fue resuspendido en amortiguador HEPES 25 mM pH 8, NaCl 50 mM, DL-Dithiothreitol (DTT) 5 mM, 10% glicerol, DNAsa I 10 U mL^{-1} , lisozima 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e inhibidor de proteasas Complete EDTA-Free (Roche). Las células resuspendidas se rompieron mediante tres pulsos ultrasónicos de 1 min cada uno en un Sonicador 450 (Beckman), el extracto obtenido fue centrifugado a 4° C y 13000 rpm (centrifuga Eppendorf 5804 R con rotor KL-102) durante 30 min.

El sobrenadante obtenido después de la ruptura del paquete celular fue colectado y se precipitó añadiendo sulfato de amonio a una concentración del 60%, ésta mezcla fue centrifugada a 4° C y 13000 rpm (centrifuga Eppendorf 5804 R con rotor KL-102) y el sobrenadante fue colectado. La mezcla obtenida del paso previamente descrito fue saturada de sulfato de amonio hasta una concentración de 80% y la mezcla

centrifugada de la misma forma previamente descrita. Después del proceso de centrifugación se recuperó la pastilla y se resuspendió en amortiguador HEPES 25 mM pH 8 y 3 M de sulfato de amonio.

Como primer paso de la purificación³ se utilizó una columna de interacción hidrofóbica Macro-Prep t-butyl (Bio Rad) previamente equilibrada con amortiguador HEPES 25 mM pH 8 y sulfato de amonio 3 M. La columna se cargó con la mezcla obtenida de la precipitación fraccionada y fue lavada con el amortiguador de equilibrio (HEPES 25 mM pH 8 y sulfato de amonio 3 M) utilizando un flujo de 1 mL min⁻¹. La fracción retenida se eluyó con un gradiente lineal de sulfato de amonio 3M - 0M en el mismo amortiguador.

Las fracciones seleccionadas se dializaron en HEPES 25 mM pH 8, DTT 5mM y 10% de glicerol. Posteriormente, la mezcla se cargó en una columna de intercambio aniónico Q-Sepharose Fast Flow (Sigma) equilibrada con el mismo amortiguador. La columna fue lavada con el mismo amortiguador y las fracciones retenidas eluidas con un gradiente lineal de NaCl de 0M - 0.5 M.

Las fracciones seleccionadas después de los diferentes pasos cromatográficos fueron dializadas en amortiguador HEPES 25 mM pH 7.2 y se concentraron en un Centricon 10K MWCO (Millipore).

Para todos los pasos de purificación las fracciones conteniendo la ACCO fueron seleccionadas mediante electroforesis en un gel desnaturizante (SDS-PAGE). Los geles fueron preteñidos adicionando 2,2,2-tricloroetanol a la mezcla del gel (54), las imágenes de los geles se obtuvieron mediante el sistema Gel DocTM EZ (Bio Rad) utilizando una charola para geles preteñidos, a no ser que se indique lo contrario en el texto. La concentración de la proteína fue determinada mediante el ensayo de Bradford utilizando albumina de suero bovino (BSA) como estándar.

Cuantificación de hierro

El contenido de hierro de la preparación de ACCO fue determinado mediante una modificación de la metodología de Hennessy *et al.*(47) Para cuantificar el contenido de hierro se desnaturizó la enzima como se describe a continuación; a 23

³ Todos los pasos de la purificación se realizaron en un FPLC Biologic LP de BioRad a excepción de que se indique lo contrario en el texto.

nmol de ACCO se les añadió 20 μL de HCL 1M, esta solución desnaturalizada se neutralizó inmediatamente después añadiendo 20 μL de NaOH 1M. La mezcla obtenida se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min (microcentrifuga Heraeus de Thermo) y el sobrenadante obtenido fue reducido utilizando 200 μL de ácido ascórbico 1 M llevando la mezcla a un volumen final de 1 mL utilizando amortiguador Acetatos 50 mM pH 4.5 con Fereno S (a una concentración final de 0.630 M) (47). Se permitió la formación de color en la mezcla de reacción dejando incubar durante 5 min. a temperatura ambiente. La absorbancia de la reacción se determinó a 593 nm ($\lambda_{593} = 34\ 500\ \text{L cm}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific.

Ensayos de actividad de la ACCO

La actividad de la ACCO se midió utilizando ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, sulfato ferroso amoniacal hexahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), NaHCO_3 , y L-ácido ascórbico (11). La actividad de la ACCO se evaluó de tres diferentes maneras.

Producción de Etileno. La determinación de la concentración de etileno se realizó dentro de viales de 1.7 mL herméticamente cerrados y a temperatura ambiente. La reacción enzimática se ajustó a 200 μL y una reacción típica contenía 102.8 μg de ACCO, NaHCO_3 18 mM, ácido ascórbico 8 mM, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 80 μM y ACC 5 mM en amortiguador HEPES 100 mM; pH 7.2. La reacción se dejó proceder durante 2 min. después de los cuales se extrajeron 250 μL de gas del espacio aéreo del vial utilizando una jeringa gas-tight y la producción de etileno se cuantificó mediante cromatografía de gases. La cromatografía de gases se realizó en un cromatografo Agilent 6890N equipado con una columna capilar de sílica Gas-Pro (J & W, 30 m x 0.32 mm) y un detector de ionización de flama. Las siguientes condiciones fueron utilizadas: He (99.999%) como gas acarreador (1.4 mL min^{-1}), en modo split (20:1), $T_{\text{injector}} = 250$, $T_{\text{oven}} = 90$, $T_{\text{detector}} = 260\ ^\circ\text{C}$. El etileno se cuantificó utilizando un estándar externo de etileno 99.99% obtenido de Sigma. Las mediciones se realizaron variando la concentración de ACC mientras los otros sustratos se mantuvieron a concentraciones constantes. Para obtener los parámetros cinéticos se realizó un ajuste no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el programa Sigma Plot 11.0.

Consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno se evaluó utilizando un electrodo de oxígeno Oxygraph (Hansatech Instrument, King's Lynn, UK) equipado con una tapa

gas-tight y una barra agitadora de Teflón. El Oxygraph fue controlado y configurado desde una computadora personal mediante el paquete informático del proveedor, el cual registra el consumo de oxígeno en la cámara a través del tiempo. El instrumento fue calibrado según las instrucciones del fabricante utilizando el mismo amortiguador que para las reacciones enzimáticas burbujeado con nitrógeno al 99.5%. La temperatura se mantuvo constante a 19° C. La mezcla de reacción típica fue de 1 mL y contenía 205.6 µg de ACCO, NaHCO₃ 18 mM, ácido ascórbico 8 mM, y ACC 5 mM en amortiguador HEPES 100 mM; pH 7.2. La ACCO se reconstituyó con un exceso molar de 0.74 moles de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂•6H₂O y esta mezcla fue utilizada para comenzar la reacción. Las tasas de consumo de oxígeno fueron calculadas al sustraer el consumo de oxígeno de fondo (83). Las diferentes mediciones se realizaron variando la concentración de ACC mientras que la concentración de los otros sustratos se mantuvo fija. Para obtener los parámetros cinéticos se realizó un ajuste no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el programa Sigma Plot 11.0.

Determinación de la producción de Cianuro. El cianuro producido por la reacción enzimática fue cuantificado después de una derivatización modificada del método de Driesener *et al.* (31) en donde el cianuro actúa como un anión con el naftalen-2,3-dicarbaldéhid (NDA) y una amina primaria generando un derivado fluorescente 1-cianobenz[f]isoindol (CBI) (Figura 16) (18). Una mezcla de reacción estándar (100 µL) está compuesta por 1.29 µg de ACCO, NaHCO₃ 18 mM, ácido ascórbico 8 mM, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂•6H₂O 80 µM y ACC 5 mM en amortiguador HEPES 100 mM; pH 7.2. Las velocidades iniciales de la producción de cianuro se midieron a 18° C, la reacción enzimática se terminó después de añadirle EDTA a una concentración final de 50 mM pH 8. Las concentraciones de cianuro producido fueron determinadas después de sustraer a todas las mediciones la producción de cianuro en el fondo de la reacción. La derivatización se dejó proceder por 5 min a 95° C en viales herméticamente cerrados. Posterior a la derivatización la fluorescencia de la muestra se midió después de una separación cromatográfica en HPLC (HPLC Perkin Elmer Series 200). Para la derivatización de las reacciones se añadió NDA 3.44 mM en metanol y ACC 1.9 mM en amortiguador HEPES 100 mM pH 7.2. Una alícuota de 20µL se inyectó en una columna de fase reversa Hypersil C18 ZORBAX Eclipse (4.6 x 100 mm). Los amortiguadores para la cromatografía fueron (solvente A) formato de amonio 2 mM pH 3 y (solvente B) metanol. La fase móvil inicial consistió de 20% de solvente B por 5 min seguido por un gradiente de 20% a 65% de solvente B por 20 min para

posteriormente llevarlo hasta 100% de solvente B por 2 min. donde permaneció isocráticamente durante 10 min. El derivado de CBI eluyó con un tiempo de retención cercano a 27 min y fue detectado fluorométricamente por su señal emitida a λ_{ex} 418 nm- λ_{em} 454 nm (Detector de fluorescencia Perkin Elmer Series 200a). Para establecer el gráfico de calibración se utilizaron estándares de cianuro de potasio (entre 1-99 pmol) en amortiguador HEPES 100 mM pH 7.2 y se derivatizaron de la misma forma que los ensayos de la ACCO previamente descritos.

Resultados

Clonación, Expresión y Purificación de la ACCO

El gen de la ACCO de jitomate fue proporcionado por la Dra. Jalila Simaan del Instituto de Ciencias Moleculares de Marsella (ISm2), Universidad Aix Marsella, Francia. La construcción proporcionada es el gen de la ACCO clonado dentro del plásmido pET21a, y aunque dicho plásmido es ampliamente utilizado para la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* (71;82;97;99), después de diferentes ensayos de expresión utilizando esta construcción, al analizar electroforéticamente en geles SDS-PAGE no se observa la banda de sobreexpresión esperada según nuestra experiencia en el laboratorio (40;72). Para obtener un mayor rendimiento en la expresión de la ACCO se decidió subclonar el gen de la ACCO en el vector pET32a(+) tal como se describe en la Figura 17 (87). Con esta estrategia se obtuvo la construcción pET32ACCO con la cual se obtiene una producción de proteína tres veces mayor que con la construcción anterior (10 mg L⁻¹ comparada con 3.33 mg L⁻¹ de proteína), lo cual mejora la capacidad de purificación con alto grado de pureza.

El protocolo de producción de la proteína recombinante consistió en: 1) Inducción de la expresión del gene una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.4-0.6 utilizando IPTG en una concentración final de 0.5 mM a 37 °C y 500 rpm; 2) Disminución de la temperatura hasta 28° C; y 3) Incubación durante tres horas a 500 rpm. En todos los casos la expresión de la proteína se verificó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

La metodología comúnmente empleada para la purificación de la ACCO genera suficiente material para la caracterización de la proteína (11). Sin embargo, identificamos dos áreas de oportunidad en este procedimiento: 1) por lo general la preparación obtenida no es de alta pureza y eso ciertamente tiene un impacto notable en la determinación de las constantes catalíticas, y 2) el hierro presente de forma natural en el sitio activo de la ACCO es removido como resultado de la adición de EDTA en la pasos de extracción de la proteína previos a la purificación (11). Para contender con los problemas que identificamos en dicho protocolo de purificación se desarrolló un nuevo proceso de purificación sin EDTA el cual permite la purificación rápida de volúmenes elevados de cultivo, lo cual es de gran importancia ya que evita el

manejo excesivo de la proteína, reduciendo el daño y obteniendo una mayor cantidad de ACCO (83).

Como primer paso de la purificación se realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio para después cargar la fracción seleccionada en una matriz de interacción hidrofóbica (t-Butyl), las fracciones en donde se encontró a la ACCO se sometieron a diálisis para remover el exceso de sulfato de amonio. Como paso final de la purificación, la mezcla obtenida de los pasos previos se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico (Q-sepharosa). En todos los casos, las fracciones conteniendo la ACCO se identificaron de acuerdo a su patrón electroforético en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Después del procedimiento descrito se obtuvo una preparación con una concentración de 10 mg prot L⁻¹ de cultivo y una pureza aproximada al 98% (Figura 18).

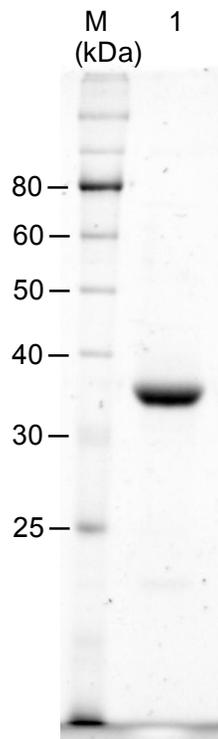


Figura 18. Electroforesis SDS-Page para la preparación obtenida después de los diferentes pasos cromatográficos en la purificación de la ACCO. M) marcador de peso molecular en kDa y 1) la mezcla obtenida de la ACCO de jitomate

La preparación proteica obtenida con este nuevo protocolo presentó una actividad de 16.5 mol de etileno por mol de enzima por minuto (99), la cual se encuentra en el

mismo rango de actividad que la preparación obtenida por Thrower *et al.* (2006) y que es reportada como aquella con la mayor actividad (82).

Cuantificación de Hierro

En el sitio activo de la ACCO se encuentra un centro de Fe^{II} no hémico. Según nuestra experiencia en el laboratorio, el centro metálico es muy lábil y puede fácilmente ser sustituido por otro metal presente en la solución. De forma tradicional, previo a la purificación la preparación de ACCO se ha tratado con ácido etildiamino-tetra-acético (EDTA), con el fin de quelar cualquier metal presente en la mezcla y evitar así daños ocasionados por especies reactivas de oxígeno (ROS). Debido a que el ion de hierro es el sitio de unión a los sustratos, la geometría del sitio activo está determinada por la presencia de este metal.

En ausencia del sustrato la ACCO posee un sistema de protección que se explicó anteriormente en la sección “Catálisis de la ACCO”. En resumen, la ausencia del sustrato evita la unión del oxígeno y así se previene la formación de ROS que puedan dañar el andamiaje proteico. Por lo cual en nuestra purificación no añadimos EDTA y obtenemos de esta manera una preparación con hierro intrínseco. Una vez que se cuantificó el hierro intrínseco de la preparación después de la purificación, se encontró un valor cercano al 35% (47). Un alto rendimiento de la purificación de la proteína y una elevada actividad específica indican que no existe desactivación durante el proceso de purificación, lo que demuestra que no se requiere añadir EDTA durante la purificación de la ACCO.

Actividad de la ACCO

Si observamos la estequiometría (Figura 7) reportada para la ACCO existen cinco posibilidades para monitorear su actividad ya sea la estimación del consumo de sustratos (ACC y O₂) o de la generación de productos (CN⁻, C₂H₄ y CO₂). Sin embargo, la mayoría de los reportes se basan en la producción de etileno y unos cuantos en el consumo de O₂ (30). Para poder comparar los resultados obtenidos con los reportes existentes en la literatura ambas metodologías, producción de etileno y consumo de O₂, se utilizaron para la medición de la actividad de la ACCO. Los diferentes lotes de enzima fueron caracterizados mediante al menos dos de los siguientes métodos de

determinación de la actividad de la ACCO: producción de etileno, consumo de oxígeno o producción de cianuro.

Producción de Etileno

La producción de etileno se midió de acuerdo a los reportes en la literatura (11), variando en la concentración de ACC y manteniendo todos los demás sustratos a concentraciones fijas y de saturación. Al inyectar la muestra estándar de etileno se observó un único pico con un tiempo de retención de 2.4 min. Para cuantificar la cantidad de etileno producido por la ACCO se generó una curva de calibración utilizando diferentes diluciones de un estándar comercial de etileno, que va desde 0.81 hasta 801,000 pmol y que se modeló con la ecuación de la línea recta. La gráfica de calibración generada abarca siete órdenes de magnitud a lo largo del rango de detección del detector de fotoionización del GC (Figura 19). Para estimar de forma más precisa la concentración de etileno en las muestras de las reacciones de la ACCO, el gráfico se acotó al rango dinámico de las mediciones de las reacciones de ACCO. Como podemos observar es un rango bastante amplio y sólo quedó fuera uno de los puntos de nuestra curva estándar inicial (Figura 20).

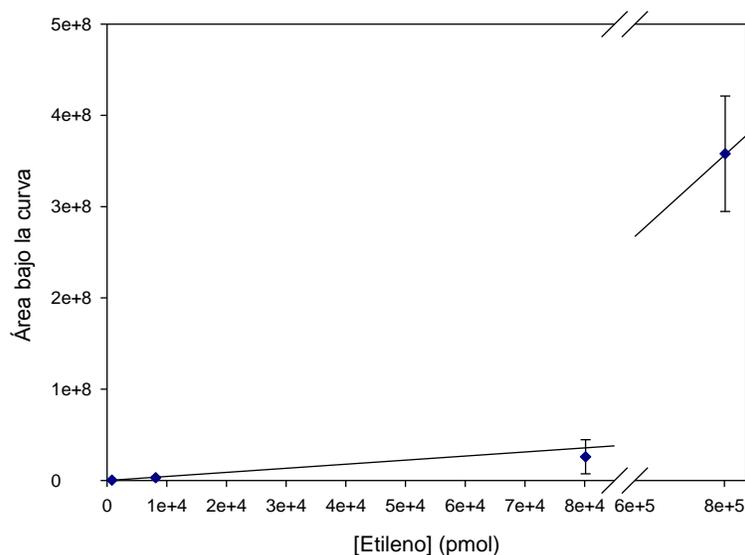


Figura 19. Gráfico de calibración para los estándares de etileno.

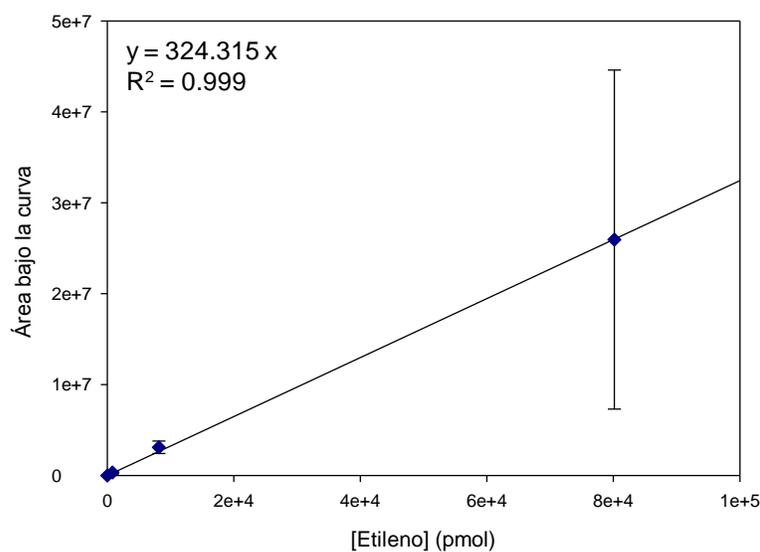


Figura 20. Gráfico de calibración para los estándares de etileno en el rango dinámico de las reacciones de la ACCO

Para determinar los valores de velocidad de producción de etileno y confirmar que siguen una cinética de estado estacionario, se determinaron los valores bajo condiciones de velocidad inicial que se describen en la sección de materiales y métodos. Para identificar el tiempo de reacción dentro del cual se estimará velocidad inicial, se determinó la producción de etileno en un curso temporal estableciendo dos minutos de reacción como el tiempo máximo en el cual la curva aun se encuentra en su fase lineal (Anexo 1). Las tasas de producción de etileno de tres diferentes lotes de ACCO se analizaron bajo las mismas condiciones de reacción utilizando el modelo de Michaelis-Menten (Figura 21) y se obtuvieron los parámetros cinéticos que se muestran en la Tabla 3. Los tres lotes corresponden a la nomenclatura M2, F1 y F2. La muestra F1 corresponde a un lote con una pureza cercana al 80% mientras que la muestra F2 posee un grado de pureza cercano al 95%. La muestra M2 es la de mayor grado de pureza y que corresponden al gel que se muestra en la Figura 18.

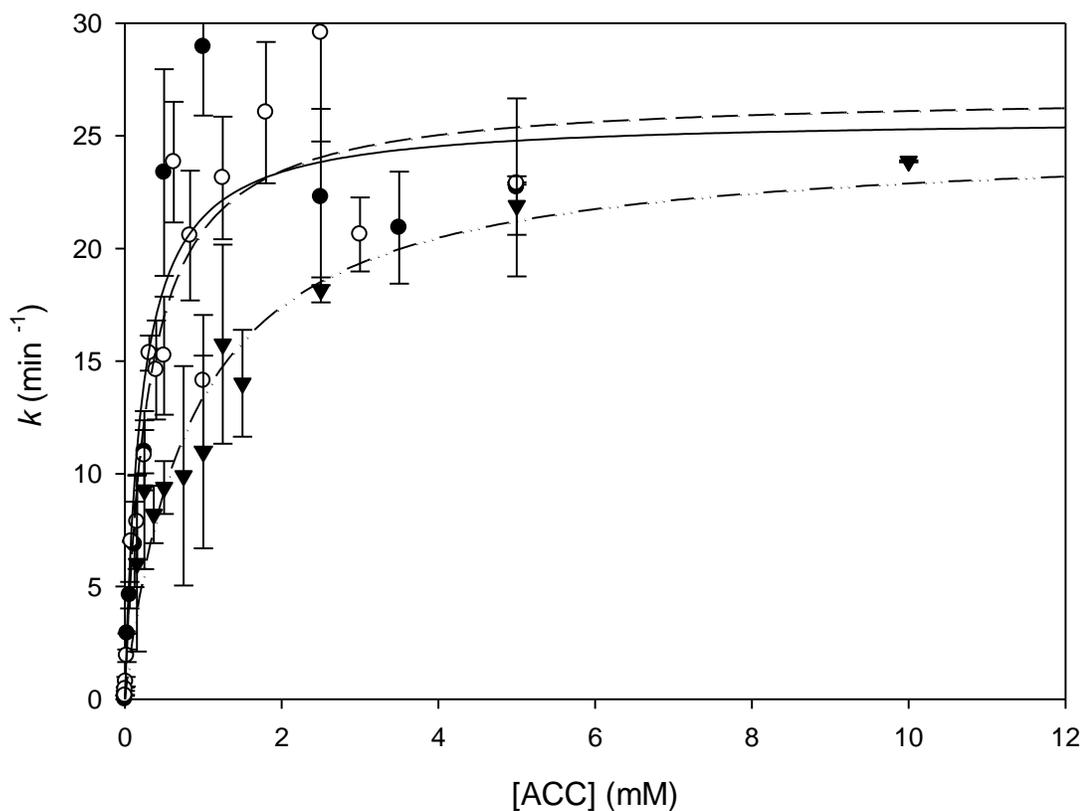


Figura 21. Ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten de los datos de producción de etileno de la ACCO de jitomate utilizando diferentes concentraciones de ACC. Para las preparaciones M2 (●), F1 (○), F2 (▼). Los ajustes a la ecuación se muestran en líneas solidas (M2), guiones (F1) y guiones con puntos (F2)

Tabla 3. Parámetros cinéticos para la reacción de la ACCO de jitomate obtenidos para la producción de etileno

Preparación	Km (mM)	k _{cat} (min ⁻¹)	R ²
M2	0.206 ± 0.089	25.81 ± 2.6	0.874
F1	0.293 ± 0.079	26.86 ± 2.0	0.913
F2	0.854 ± 0.182	24.84 ± 1.82	0.91

Como se puede observar en los parámetros cinéticos obtenidos con tres preparaciones diferentes, los valores convergen a excepción del valor de Km obtenido

para el experimento F2. Siendo este último el que mayor desviación muestra para los cálculos de K_m comparado con las desviaciones de las preparaciones M2 y F1.

Consumo de Oxígeno

Para las mediciones de consumo de oxígeno se siguió la metodología descrita por Thrower *et al.* (83) y la reacción enzimática se inició con la proteína previamente cargada con un equivalente de hierro. Tomando en cuenta que la preparación enzimática contaba con un 30% de hierro, la relación final de hierro en la preparación contenía un exceso molar de 0.74 de hierro. Considerando que la ACCO presenta una baja afinidad por el metal, se adicionó un exceso de hierro de aproximadamente el 30% para asegurar la ocupación de todos los sitios activos. Dicho tratamiento se realiza para disminuir el consumo de oxígeno por la existencia de hierro libre en el medio de reacción (83). No obstante, se registra un consumo de oxígeno incluso en ausencia del sustrato (ACC) (Figura 22). Por lo cual fue necesario hacer un ajuste a los datos de consumo de oxígeno tomando en cuenta este consumo no enzimático.

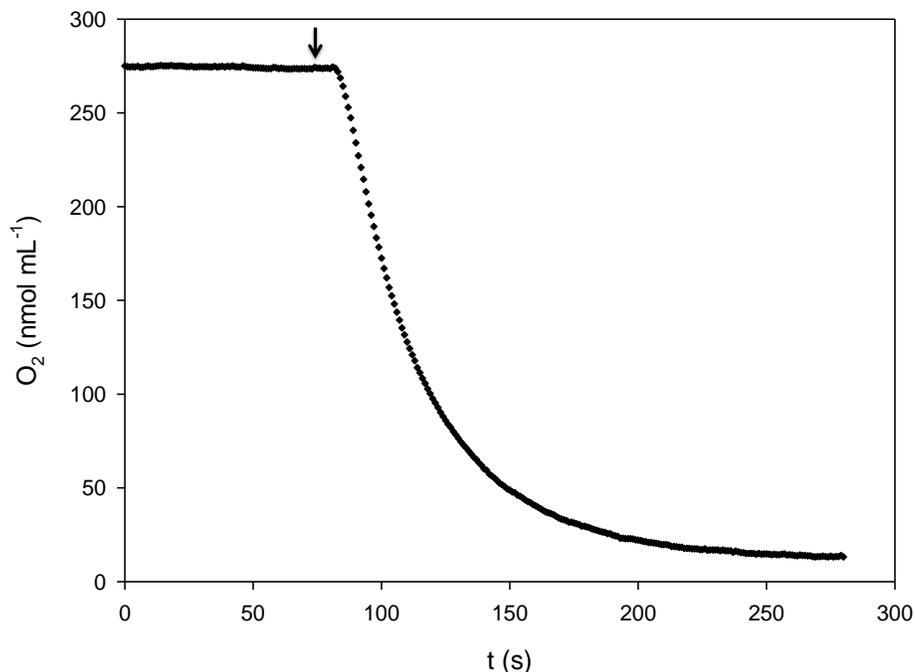


Figura 22. Curso temporal para la reacción de consumo de oxígeno en la mezcla de reacción en ausencia de ACC (Enzima y hierro en concentraciones equimolares). La flecha indica el tiempo al cual se inicio la reacción añadiendo la mezcla enzimática

Para las reacciones enzimáticas se procedió de la misma forma que para el control antes mostrado (Figura 22). Después de iniciada la reacción se monitoreó el consumo de oxígeno durante varios minutos, subsecuentemente, las diferentes tasas de actividad se determinaron de acuerdo a los principios de la cinética de estado estacionario. Para tener valores de manera más precisa, se tomó el intervalo de la curva de decaimiento en el cual se observa un comportamiento lineal de acuerdo al programa Oxygraph Plus V1.01 (Hansatech Instruments Ltd). La única muestra de ACCO analizada por consumo de oxígeno corresponde a M2 debido a la elevada concentración de proteína requerida. Las tasas de consumo de oxígeno fueron sometidas al mismo tratamiento que los datos para producción de etileno, determinando así los parámetros cinéticos como se muestra en la Figura 23 ($K_m = 0.60 \pm 0.23 \text{ mM}$ y $k_{cat} = 3.98 \pm 0.46 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0.84$)).

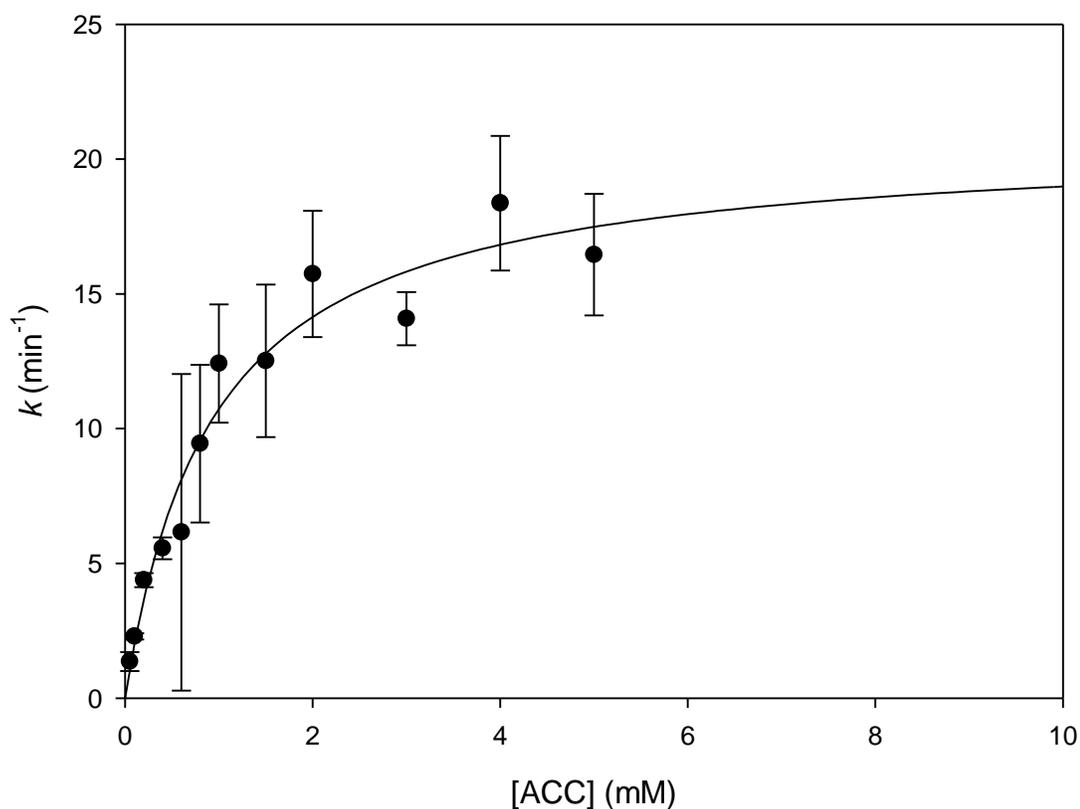


Figura 23. Ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten para los datos de consumo de oxígeno de la ACCO de jitomate utilizando diferentes concentraciones de ACC

Producción de CN⁻

Tomando en cuenta los retos de la actual metodología para evaluar la actividad de la ACCO, proponemos utilizar un método analítico con fundamentos en el reporte de Driesener *et al.* (2010) (26;31) donde el cianuro producido enzimáticamente se detecta después de derivatizarlo con naftalen-2,3-dicarboxialdehído (NDA) para generar 1-cianobenz[f]isoindol (CBI). Los componentes de la mezcla de reacción se separan mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y el CBI es cuantificado por su señal de fluorescencia. El método de Driesener *et al.* (2010) fue diseñado originalmente para la cuantificación de cianuro en una mezcla donde ninguno de los reactantes presentaba una amina primaria por lo que se añadió taurina como proveedor de este grupo funcional. En el caso de la ACCO, es el sustrato principal el que, por su carácter de aminoácido, presenta un grupo amino y por lo tanto cuando la reacción de derivatización se realiza en presencia de taurina y de ACC los cromatogramas presentan un patrón complejo debido a los diferentes intermediarios de la reacción y a las dos variantes de CBI, una con cada uno de los dos grupos amino presentes. En la Figura 24 se muestra el esquema representativo de los posibles diferentes intermediarios de la reacción de derivatización (18).

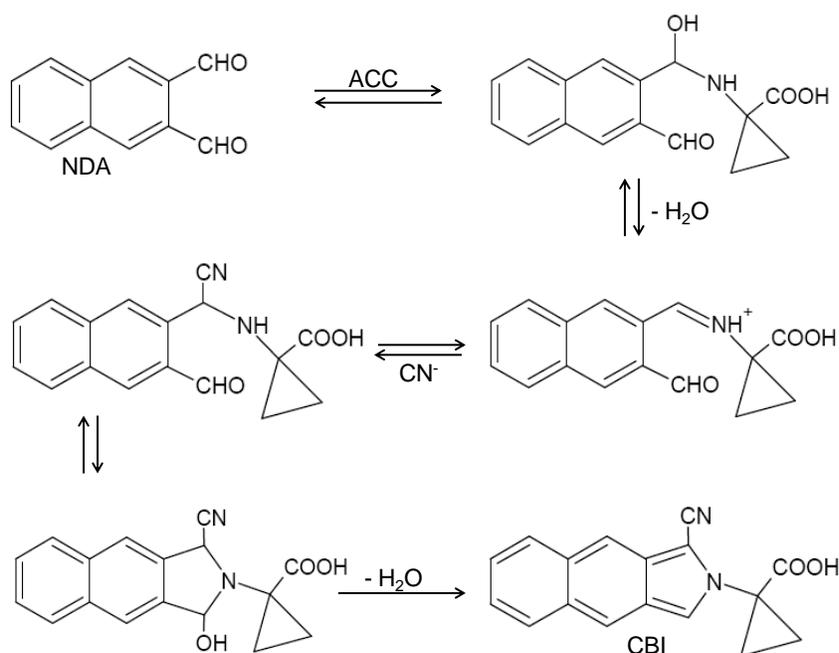


Figura 24. Representación esquemática de la reacción de derivatización de NDA y CN en presencia de ACC (modificado de (18))

Los tiempos de retención para los aductos de CBI en presencia de ACC o taurina son de 26 y 22 min, respectivamente (Figura 25). Para establecer la identidad de los picos en los cromatogramas se realizaron todos los controles en donde cada uno de los reactantes presentes en la mezcla de reacción de la ACCO se probaron de manera individual, así como en todas sus posibles combinaciones, para asegurar que ninguno de ellos interfiere con la detección del cianuro (Anexo 2). Como se puede observar al comparar ambos paneles en la Figura 25 los cromatogramas presentan mayor número de especies formadas en presencia de taurina y ACC, con la finalidad de reducir la complejidad de la mezcla de reacción se modificó la metodología utilizando el ACC como sustrato de la reacción enzimática así como proveedor de la amina primaria para la derivatización. La diferencia en los tiempos de retención entre cada uno de los paneles en la Figura 25 puede explicarse por una diferencia en el número de especies presentes en cada una de las muestras lo cual genera diferencias en la viscosidad y en la forma en la cual interaccionan durante la cromatografía.

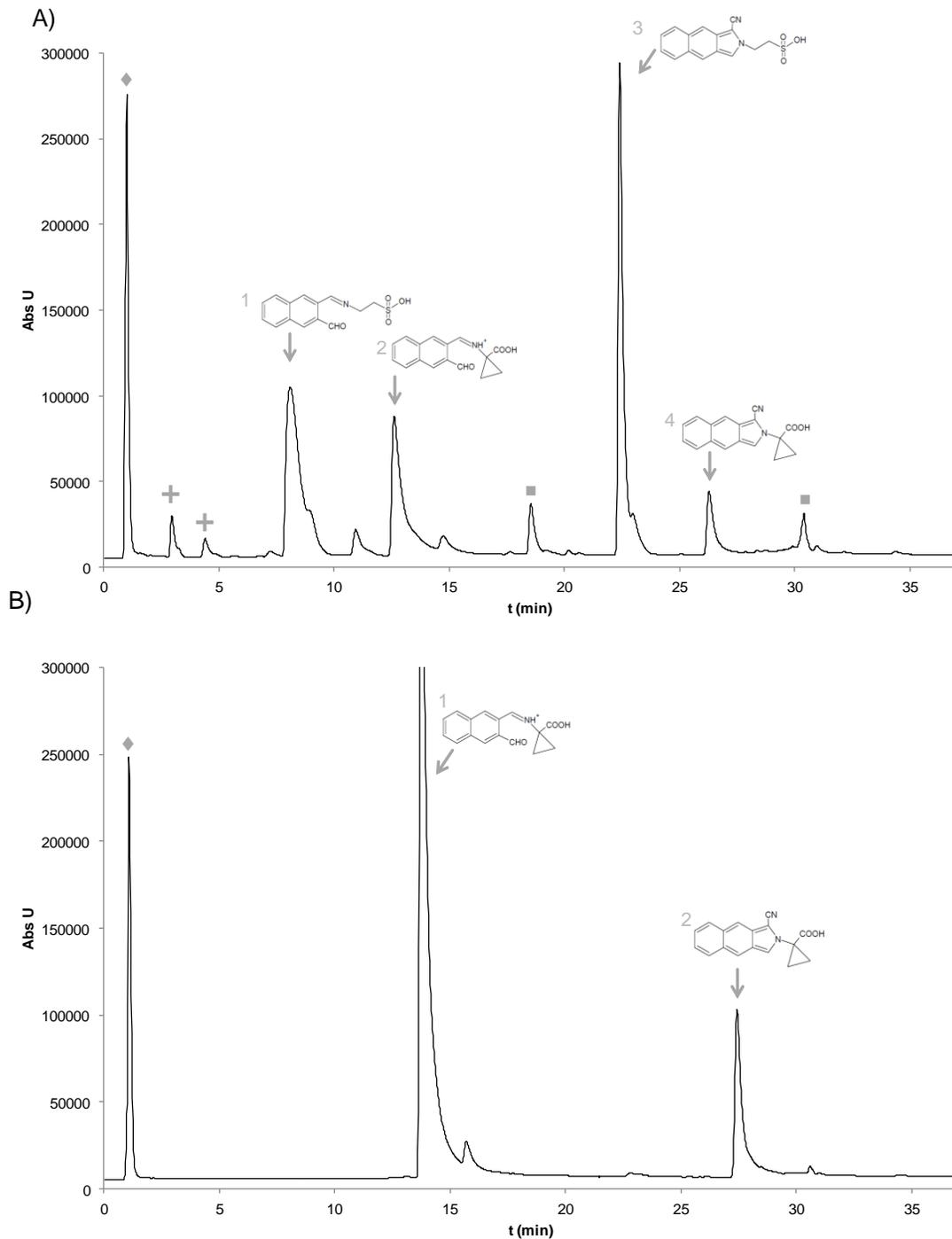


Figura 25. Cromatograma del análisis de la actividad de la ACCO derivatizada con:

A) NDA, taurina y ACCO 1) Ion imino del aducto Tau, 2) ion imino del aducto ACC, 3) enamina-Tau, 4) enamina-ACC, (♦) aducto formado en presencia de todos los componentes de la reacción, (+) aductos formados en presencia de taurina, (■) aductos formados por la presencia de ACCO y taurina en la reacción.

B) NDA, y ACCO 1) ion imino del aducto ACC, 2) enamina-ACC, (♦) aducto formado en presencia de todos los componentes de la reacción.

Con base en estas observaciones, las mezclas para los ensayos de cuantificación de cianuro en las reacciones de ACCO se establecieron con un volumen de reacción estándar de 100 μ l conteniendo 1.29 μ g ACCO, NaHCO_3 18 mM, L-ácido ascórbico 8mM, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 80 μ M, y ACC 5mM en amortiguador 100 mM HEPES; pH 7.2. Las velocidades iniciales se estimaron a 19° C. La reacción se detuvo añadiendo EDTA hasta una concentración de 50 mM; pH 8. Es importante mencionar que en ninguno de los ensayos reportados en la literatura existe una forma de detener la reacción que sea lo suficientemente eficiente para poder después procesar la muestra sin interferencias de generación de productos o consumo de sustratos. Si intentamos detener las reacciones para los ensayos de producción de etileno o de consumo de oxígeno debemos forzosamente romper el sello de los viales para agregar EDTA lo cual implicaría la pérdida de producto o ruido en el electrodo de oxígeno si la muestra no es desgasificada exhaustivamente.

Una vez detenida la reacción se le adiciona NDA 3.44 mM en metanol y ACC 1.9 mM en amortiguador HEPES pH 7.2 en un volumen final de 200 μ l. La derivatización se deja proceder durante 5 min a 95°C en viales herméticamente cerrados para evitar la pérdida de volumen por evaporación (61;73). Una vez derivatizada, la mezcla es sometida a una separación cromatográfica en HPLC la cual consistió en inyectar 20 μ l de muestra a una columna de fase reversa Hypersil C18 ZORBAX Eclipse (4.6 x 100 mm). Para la cromatografía fase móvil utilizada fue formato de amonio 2 mM pH 3 (Solvente A) y metanol (Solvente B). La fase móvil inicial contenía 20% de solvente B por 5 min seguida de un gradiente lineal de 20% hasta 65% de solvente B por 20 min para posteriormente dejar llevar el gradiente hasta 100% de solvente B por 2 min. Una vez terminado el gradiente las condiciones se sostuvieron por 10 minutos más. La detección de los productos se realizó por fluorescencia λ_{ex} 418nm – λ_{em} 454nm. Todas las tasas de reacción se calcularon substrayendo la señal de fondo del cianuro presente en una reacción con enzima previamente tratada con EDTA.

Una vez que se estableció la metodología de derivatización se generó una gráfica de calibración utilizando un estándar de cianuro de potasio (KCN) en el rango de 0.99 - 60.17 pmol la cual se ajustó a la ecuación de una línea recta (Figura 26).

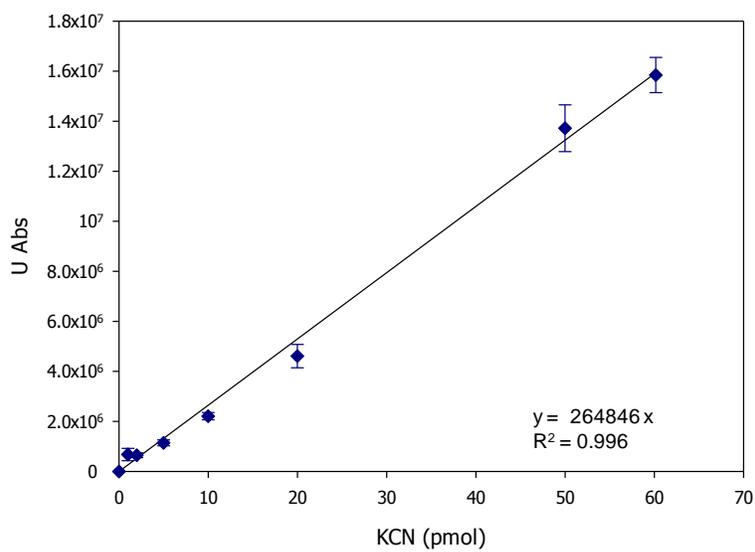


Figura 26. Gráfico de calibración para los estándares de KCN en el rango de 0.99 - 60.17 pmol la cual se ajustó a la ecuación de una línea recta.

De igual manera que con la gráfica generada para la cuantificación de etileno, la gráfica patrón generada abarca varios órdenes de magnitud estableciendo así el rango de detección del detector de fluorescencia utilizado. La metodología establecida en este trabajo tiene sensibilidad para detectar hasta 0.99 pmol de cianuro, muy por debajo de los métodos publicados que se han utilizado para la determinación de CN en la ACCO que sólo detectan por arriba de 3,500 pmol (6;50).

Para tener una estimación con menor dispersión al momento de transformar los datos obtenidos a partir de la reacción de la ACCO se decidió acotar esta curva al rango dinámico de las mediciones de las reacciones de ACCO (Figura 27).

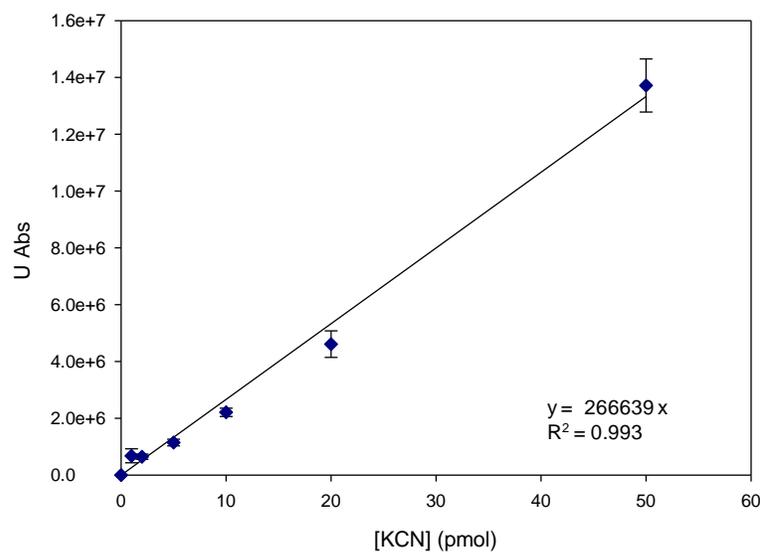


Figura 27. Gráfico de calibración para los estándares de KCN en el rango dinámico de las mediciones para las reacciones de la ACCO

La actividad de la ACCO se estimó como la producción de cianuro a 1 min de reacción variando la concentración de ACC y manteniendo la concentración de los demás reactantes fija y en saturación. La concentración de cianuro producida se tomó como la velocidad de producción por minuto y los datos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Figura 28), obteniendo los parámetros cinéticos para las preparaciones M1) $K_m = 0.72 \pm 0.15$ mM y $k_{cat} = 27.72 \pm 1.40$ min⁻¹ ($R^2 = 0.95$), y M2a) $K_m = 0.15 \pm 0.09$ mM y $k_{cat} = 23.38 \pm 2.10$ min⁻¹ ($R^2 = 0.76$).

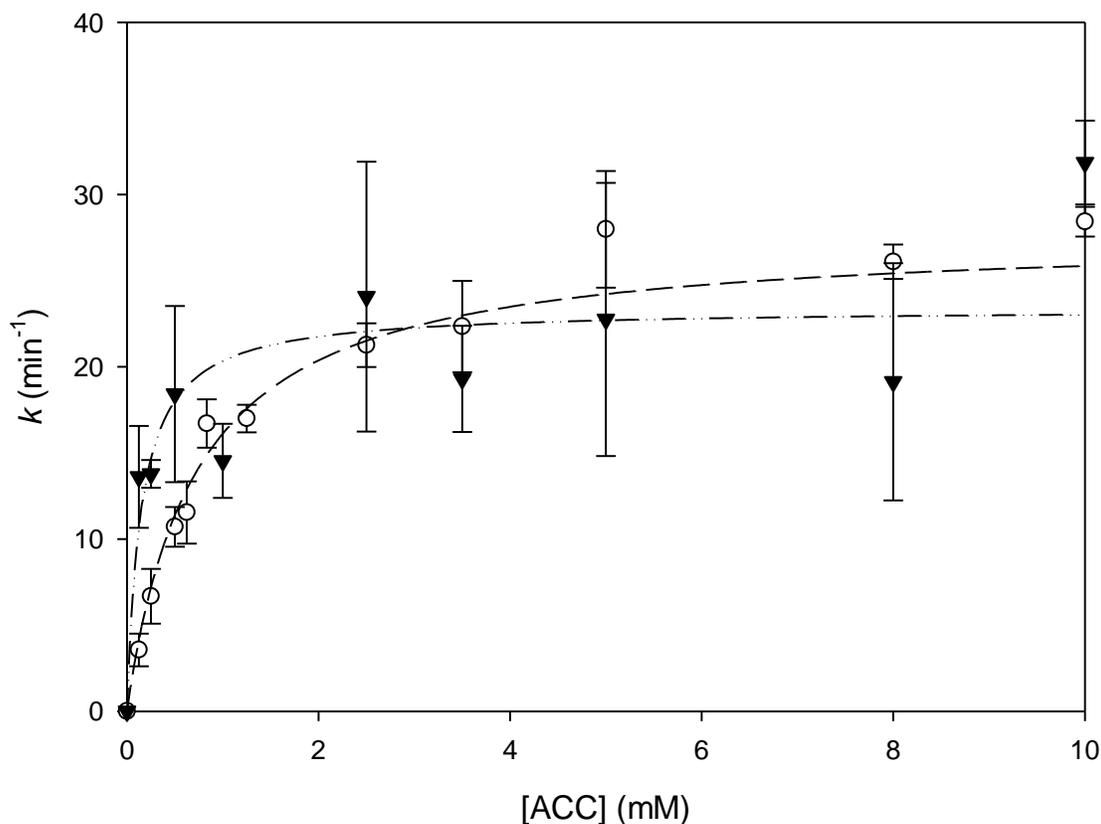


Figura 28. Gráfica para el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten de los datos de producción de cianuro de la ACCO de jitomate utilizando diferentes concentraciones de ACC para las muestras M1 (○) y M2a (▼). Los ajustes a la ecuación se muestran en guiones (M1) y guiones con puntos (M2a)

No obstante los datos obtenidos en la muestra M1 presentan un ajuste de determinación cercano a 1 para el modelo de Michaelis-Menten, debido a que este fue el primer estudio de cinética enzimática realizado para la detección de cianuro en la reacción de la ACCO, para corroborar los datos obtenidos se utilizó el lote M2. Para describir con mayor exactitud la cinética de producción de cianuro se generó un segundo conjunto de datos con esta preparación (M2a), determinando la velocidad de producción de cianuro en una distribución diferente de las concentraciones de ACC utilizadas para la muestra M1. Sin embargo, la dispersión que se observa en los datos para la muestra M2a es muy elevada y esto se traduce en un valor pequeño para el ajuste de determinación. El valor de la dispersión en el área de V_{max} se disminuyó

como era la intención, sin embargo la dispersión de la K_m aumentó. Para contender con la elevada dispersión que se observa en el segundo set de datos, se realizó una tercera medición de la actividad de la ACCO.

Para el siguiente set de datos se utilizó el lote M2 y la muestra se denominó M2b. Para esta cinética se decidió un cambio sustancial para medir la actividad de la ACCO como producción de CN^- no como un simple punto a un tiempo específico sino como la determinación de la tasa de velocidad de producción de cianuro. Para obtener este dato fue necesario tomar alícuotas de la producción de CN^- a diferentes tiempos de reacción. Con esto esperamos contender con la dispersión observada en el experimento previo.

Para determinar la velocidad de producción de cianuro en la muestra M2b se muestreó a diferentes tiempos (0, 30s, 1, 1.5, 2, 5 y 10 min) y se determinó la velocidad inicial para cada concentración de ACC utilizada (Anexo 3). La tasa de producción de cianuro se obtuvo al ajustar los datos a una ecuación de la recta. En la Figura 28 se muestran los datos obtenidos para la producción de cianuro y su ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten, los parámetros cinéticos obtenidos para este ajuste son $K_m = 0.92 \pm 0.17$ mM y $k_{cat} = 20.76 \pm 1.51$ min⁻¹ ($R^2 = 0.96$).

En la Tabla 4 se agrupan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la producción de cianuro con los diferentes lotes de ACCO.

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos para la producción de cianuro de la ACCO de jitomate

Preparación	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	R^2
M1	0.72 ± 0.15	27.72 ± 1.4	0.95
M2a	0.15 ± 0.09	23.38 ± 2.1	0.76
M2b	0.92 ± 0.17	20.76 ± 1.51	0.96

Los primeros informes de identificación de cianuro en la reacción ACCO buscan determinar la relación estequiométrica de los productos (38). De acuerdo con lo establecido previamente, se encontró la formación de una cantidad similar de productos medidos de forma independiente, la reacción de la ACCO liberó: $17.44 \pm 1.84 \text{ pmol CN}^- / \text{pmol ACCO} \cdot \text{min}$ y $1.53 \pm 2.87 \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ pmol} / \text{pmol ACCO} \cdot \text{min}$.

Para probar la estabilidad de esta metodología se monitoreó la concentración de CN^- residual una vez detenida la reacción de la ACCO, encontrando que el cianuro producido en la reacción es estable hasta 40 min. después de añadido el EDTA. Esto ofrece una ventana temporal para la manipulación de la muestra que no se observa en las otras metodologías aquí comparadas. También medimos la estabilidad de la muestra una vez derivatizada, el CBI generado es estable durante 1 h. después de generado.

Como producto de los resultados obtenidos en esta tesis se publicó el artículo que se muestra en el Anexo 4

Discusión

Clonación, Expresión y Purificación de la ACCO

Como se menciona en los resultados, la subclonación de la ACCO en el vector pET32a(+) aumenta la producción de la proteína por un factor de tres. Ambos vectores, tanto el pET32a(+) y pET21a derivan de la misma familia y del mismo proveedor. Si analizamos los sitios para el promotor de T7 y la secuencia de unión al ribosoma no encontramos diferencias entre ambos vectores ni los elementos que regulan la expresión de la secuencia de interés muestran diferencias que puedan explicar un cambio en la expresión de la ACCO. La explicación probable a este fenómeno es que pudiera tratarse de un efecto imprevisto de la topología diferencial adquirida por la zona regulatoria en cada una de las construcciones. Una elevada producción es una característica deseable para contar con material suficiente en los posteriores pasos para la purificación.

La decisión de la modificar el protocolo de purificación, de un paso único por cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose) al protocolo descrito en la sección de materiales y métodos, radica en la necesidad de muestras con alto grado de pureza para evitar algún efecto negativo al determinar los parámetros cinéticos. En la Figura 29 se muestran los productos obtenidos después de los protocolos de purificación para la ACCO, el protocolo previamente publicado (11) y el protocolo que se describe en materiales y métodos.

Con el protocolo establecido en este trabajo se obtiene un mayor rendimiento en la producción de la ACCO, así como una preparación con un elevado grado de pureza comparada con la generada con el protocolo pre-existente.

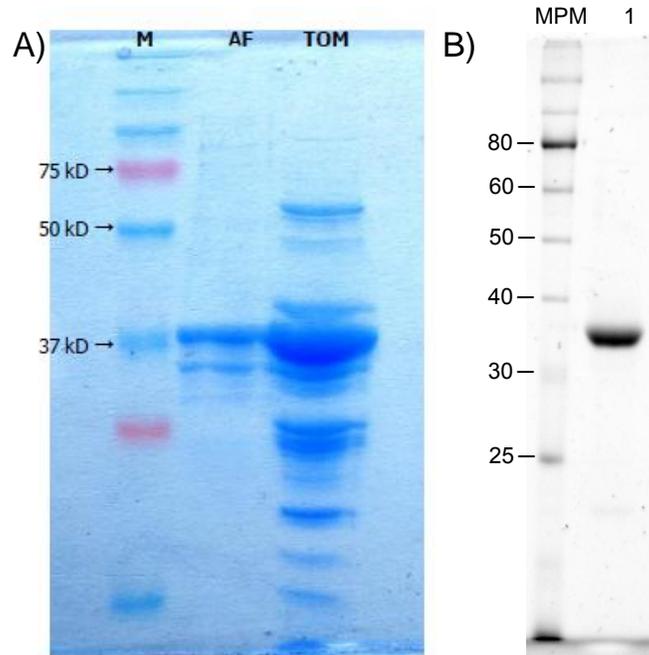


Figura 29. Comparación de las metodologías de purificación de la ACCO. Electroforesis SDS-Page para las preparaciones obtenidas después de: A) protocolo de purificación publicado previamente Brisson *et al.* (2012), donde M-marcador de peso molecular, AF-ACCO de *A. thaliana*, TOM-ACCO de jitomate (gel teñido con Azul de Comassie). B) protocolo de purificación descrito en esta tesis donde MPM-marcador de peso molecular, 1-ACCO de jitomate (gel se encuentra teñido con 0.5% de 2,2,2-tricloroetanol)

Una de las principales modificaciones realizadas al protocolo de purificación es que se prescinde de EDTA durante la extracción de la proteína. Después de considerar las razones expuestas en la literatura para la introducción del EDTA (30;79), hipotetizamos que en lugar de proteger a la ACCO de una inactivación por daño oxidativo, este podría generar problemas en el plegamiento de la proteína al retirar el metal del sitio activo de la ACCO. La mezcla de ACCO obtenida con nuestro protocolo de purificación, presenta una actividad cercana a la que se reporta previamente en la literatura (82), lo que sugiere que no existe ningún fenómeno de desactivación de la enzima durante el proceso de purificación y por lo tanto se demuestra que no se requiere la adición de EDTA.

Actividad de la ACCO

Si comparamos los datos de consumo de oxígeno con los de la Tabla 1, encontramos que con excepción de la *k_{cat}* obtenida por consumo de oxígeno para M2

los datos ser aproximan a los reportados en la literatura para la misma isoforma de ACCO en el rango de 11.3 a 354 min⁻¹ (11;99). Por otro lado, con excepción del valor de Km obtenido para la muestra F2 por producción de etileno, los valores se aproximan a los reportados en la literatura en un rango de 0.03 a 0.15 mM (10;99). Es importante notar que en estos reportes existe por lo menos un orden de magnitud de diferencia, situación que no observamos en nuestros datos, inclusive cuando utilizamos diferentes lotes de ACCO. Lo anterior puede genera un control interno que confiere confianza al manejo experimental y a la manipulación de los datos crudos para cada uno de los lotes.

Cuando se comparan los parámetros cinéticos aquí obtenidos para la producción de etileno contra el consumo de oxígeno encontramos que la Km es cuatro veces mayor, en cambio la *k*_{cat} es cerca de siete veces menor entre consumo de oxígeno y producción de etileno. Los parámetros cinéticos obtenidos entre experimentos para la estimación de producción de etileno muestran una dispersión dentro del error esperado para los valores de Km. Contrario a lo anterior, la diferencia observada entre las *k*_{cat} no es un fenómeno dentro de los valores de dispersión esperados. Estas tendencias posiblemente se deben a diferencias técnicas entre metodologías las cuales se discuten adelante.

Como característica sobresaliente, se encontró que la metodología para determinar consumo de oxígeno es estrechamente dependiente de la temperatura y es un método poco sensible ($0.01 \times 10^6 - 8.4 \times 10^6$ pmol oxígeno min⁻¹) (27) lo cual demanda elevadas concentraciones de ACCO (27). Adicionalmente, un electrodo de Clark presenta fragilidades inherentes a su uso tales como daño a la membrana (63) y deterioro del electrodo por deposición de AgCl en el electrodo de plata (57). La utilización del electrodo debe realizarse por periodos cortos de tiempo y se han documentado fallas en la regeneración del electrodo que provocan una respuesta no lineal a la variación de las concentraciones de oxígeno (57). Los daños ocasionados tanto en la membrana como en el electrodo pueden distorsionar las mediciones de consumo de oxígeno incluso antes de 12 h de haber realizado un mantenimiento al electrodo y haber cambiado la membrana (27).

Por otra parte las mediciones de consumo de oxígeno en reacciones complejas que involucren metales como hierro, están sujetas al consumo de oxígeno no enzimático dado por la reacción de Fenton (en nuestro caso exacerbada por la

existencia de ácido ascórbico en el medio) (16;17;52;53;82). La tasa de consumo de oxígeno para cada uno de los casos es dependiente de la concentración de metal libre en el medio y la presencia de otros reactantes, para estos supuestos es difícil aplicar alguna corrección a los datos obtenidos ya que no se encuentran formalmente establecidas en la literatura y pueden ser el origen de las desviaciones observadas en nuestros datos.

Por su parte, los problemas para la detección de etileno comienzan con el manejo de los productos en donde se tiene que ser cuidadoso en el sellado de los viales y que el producto de la reacción no se libere al medio. De igual manera, la extracción del etileno para su posterior inyección en el GC, debe de ser cuidadosa para no perder muestra durante este proceso. Dejando de lado los problemas derivados de la manipulación de la muestra, el principal problema que presenta la estimación de etileno es la necesidad de saturar la fase líquida de la reacción para que posteriormente se libere a la fase aérea (2). Por lo tanto, este ensayo no provee un valor directo de la concentración de etileno formado por la ACCO, sino de la tasa a la cual el etileno forma un equilibrio entre la mezcla de reacción y la fase aérea contenida dentro del vial (91). Esta metodología al igual que la medición de consumo de oxígeno posee una baja sensibilidad, con un intervalo de certeza entre 210 y 420 pmol etileno mL⁻¹.

La utilización de una metodología que no tenga estas deficiencias es clave para evaluar de forma más precisa la catálisis de la ACCO y así poder llegar a su utilización como un biocatalizador en la industria del etileno. Aquí proponemos la utilización de una metodología más sensible y centrada en un producto de la reacción que se encuentra en la fase líquida que no tiene las desventajas de manipulación de un gas, permitiendo una mejor cuantificación del producto generado por la reacción. Después de establecida la metodología para la determinación de cianuro como se describe en materiales y métodos se obtuvieron los parámetros cinéticos para varios lotes de ACCO.

Los primeros informes de identificación de cianuro en la reacción ACCO buscaron determinar la relación estequiométrica de los productos (38). En este trabajo se reporta por primera vez la utilización de cianuro para la estimación de los parámetros cinéticos de la ACCO.

Cuando comparamos los datos obtenidos por producción de cianuro con los parámetros cinéticos obtenidos por los otros dos métodos (Anexo 4) encontramos que la K_m es similar a la que se obtiene por consumo de oxígeno, mientras que la k_{cat} es prácticamente idéntica a los valores obtenidos en los análisis de producción de etileno. Mientras que los valores de K_m de los tres métodos se encuentran en el mismo orden de magnitud, los de k_{cat} son claramente diferentes cuando se calculan mediante consumo de oxígeno.

El valor obtenido de k_{cat} para las reacciones de consumo de oxígeno pueden verse alteradas por consumo rápido de oxígeno presente en la mezcla de reacción debido a las reacciones no enzimáticas; principalmente la reacción de Fenton, este fenómeno debe ser previo a la medición de la actividad limitando el oxígeno presente en la celda de reacción. Al encontrarse el medio de reacción en condiciones limitantes de oxígeno, la actividad está limitada por un fenómeno de transferencia de masas en la interfase oxígeno-agua el cual es menor a los requerimientos enzimáticos (67).

Por otra parte, las diferencias entre las K_m observadas en la producción de etileno pueden explicarse por el requerimiento de la reacción de utilizar temperaturas más elevadas para la reacción de producción de etileno, lo cual es conocido puede impactar la K_m de las reacciones enzimáticas. Sin embargo, al comparar las k_{cat} entre producción de etileno y de cianuro se esperaría que el aumento en la temperatura necesario para los ensayos de producción de etileno tendría un efecto directo en este valor. Es importante resaltar este fenómeno aunque los datos aquí descritos no permiten hacer mayores hipótesis al respecto.

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que la metodología que desarrollamos para la determinación de cianuro es más precisa, más sensible y más estable comparada con las otras dos metodologías para la estimación de la actividad de la ACCO que se probaron en este estudio.

La metodología para la cuantificación de cianuro puede aplicarse de manera directa a un número de otras reacciones enzimáticas que producen cianuro. Por ejemplo, algunas a partir de aminoácidos tales como la decarboxilación oxidativa de

glicina por parte de *P. aeruginosa* (58) o a partir de otros sustratos como tiocianato (24). Este resultado podrá impactar directamente en el establecimiento de esta metodología para la detección de cianuro tanto producido enzimáticamente como para evaluar muestras ambientales, como es el caso de la explotación ilegal de organismos acuáticos mediante la utilización de Cianuro (60). Así mismo cabe resaltar la necesidad de metodologías de mayor sensibilidad y específicas para la detección de cianuro debido a su toxicidad y ubicuidad, siendo un producto secundario en diversos procesos industriales como el plateado electrolítico, la minería y en procesos de síntesis orgánica (78).

La producción enzimática de etileno tiene implicaciones en química verde lo cual impactará en un futuro cercano al postularse como una alternativa amigable con el medio ambiente a diferencia de los métodos de producción actual. La metodología aquí descrita permitirá avances substanciales en la generación e ingeniería de la ACCO con mejores rendimientos para la producción de etileno.

Perspectivas

La metodología aquí descrita puede ser utilizada en el análisis de diferentes isoformas de ACCO para la obtención de sus parámetros cinéticos. Es necesario analizar otras isoformas de ACCO para poder hacer generalizaciones sobre las propiedades fisicoquímicas de la enzima. Hoy en día se han analizado variantes provenientes de manzana, kiwi, aguacate y petunia, pero si ampliamos la gama podríamos tener un mejor entendimiento de la catálisis de la ACCO. La obtención de los parámetros cinéticos es fundamental para la adecuada caracterización de la ACCO, de aquí la necesidad de sensibilidad en las pruebas para medir la actividad. La metodología aquí descrita permite dejar de lado las ambigüedades que se han discutido a lo largo del texto.

Para un mejor análisis de la catálisis de la ACCO es recomendable utilizar una serie de inhibidores competitivos y no competitivos para la generación de cinéticas de estado estacionario que ayudarían al esclarecimiento del ciclo catalítico de la ACCO. Por su parte es necesario evaluar diferentes donadores de electrones para esclarecer el papel del ácido ascórbico, y el sitio de entrada de los electrones en el ciclo catalítico.

Una de las propuestas de esta tesis es la utilización industrial de la ACCO como alternativa para la producción de etileno. Sin embargo, es necesario realizar ingeniería de proteínas para obtener una enzima con mejores propiedades catalíticas. Para conseguir estas mejoras es necesario conferir estabilidad al andamiaje proteico, lo cual puede realizarse mediante mutaciones puntuales en los sitios de proteólisis de la ACCO o mediante mutagénesis al azar. Una vez adquirida una mayor estabilidad proponemos realizar mutaciones puntuales para alterar la reactividad del sitio activo. Para determinar los cambios a realizar es necesario tomar en cuenta el análisis del mecanismo catalítico. Se conoce que la coordinación del ion metálico con la proteína es muy lábil, por lo cual proponemos que un primer paso para conseguir una reactividad modificada es generar variantes con mayor afinidad al centro metálico. Una vez que se obtengan variantes con mayor estabilidad y afinidad al centro metálico podemos continuar la mutagénesis sitio-dirigida para generar variantes con reactividades modificadas.

En cuanto a la generación de variantes de ACCO con mayor reactividad, sabemos que la Lys158 observada en las estructuras cristalográficas se encuentra conservada en muchas otras secuencias por lo que este sitio parece ser de gran importancia para la catálisis, tal como se observó en estudios de mutagénesis de la ACCO de kiwi (56). Proponemos entonces que una modificación cercana a este sitio podría ayudar estéricamente a la catálisis facilitando la interacción del O₂ con el ACC. Para poder establecer las modificaciones adecuadas, se cuenta con la estructura cristalográfica de la ACCO de *Petunia hybrida* en donde es posible modelar los cambios que surjan como propuesta.

Una permutación en la Lys158 hacia un sitio más cercano al sitio de coordinación, en específico a la hoja β adyacente, formada por los residuos 245 a 252 (correspondientes a la secuencia de la ACCO de jitomate). Esta modificación podría favorecer la interacción del residuo con el O₂ y modificar la reactividad del centro alterando la dependencia de HCO₃⁻. Dentro de las modificaciones a los residuos que se tiene evidencia de su participación en la catálisis de la ACCO destaca la Asn216. Ésta posición se encuentra cercana al ión metálico en la cavidad en donde se posiciona el ACC. Si se realiza un cambio en este residuo la modificación estérica podría favorecer las interacciones del sustrato con el O₂ o la forma de coordinación del sustrato alterando la reactividad de la ACCO.

De igual manera, para conocer más a detalle los sitios de importancia para la modificación de la reactividad de la ACCO es importante contar con estructuras cristalográficas que describan la unión de los diferentes sustratos. Esto puede lograrse remojando los cristales de ACCO en mezclas con los diferentes sustratos. De esta forma podríamos establecer el papel de los supuestos sitios de enlace para el ácido ascórbico, entre otros.

Referencias

1. (2007) *Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, Springer US,
2. Abeles, F. B., Morgan, P. W., and Saltveit, M. E. (1992) Ethylene Analysis and Properties of the Gas. *Ethylene in Plant Biology*, Academic Press Inc., San Diego, Cal.
3. Adams, D. O. and Yang, S. F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 170-174
4. Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Najmanovich, R. J., and Thornton, J. M. (2009) *J. Mol. Biol.* **388**, 356-380
5. Barlow, J. N., Zhang, Z., John, P., Baldwin, J. E., and Schofield, C. J. (1997) *Biochemistry* **36**, 3563-3569
6. Barnes, D. E., Wright, P. J., Graham, S. M., and Jones-Watson, E. A. (2000) *Geostandards Newsletter* **24**, 183-195
7. Bassan, A., Borowski, T., Schofield, C. J., and Siegbahn, P. E. (2006) *Chemistry*. **12**, 8835-8846
8. Bidonde, S., Ferrer, M. A., Zegzouti, H., Ramassamy, S., Latche, A., Pech, J. C., Hamilton, A. J., Grierson, D., and Bouzayen, M. (1998) *Eur. J. Biochem.* **253**, 20-26
9. Bleecker, A. B. and Kende, H. (2000) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 1-18
10. Brisson, L. (2010) Relations structure-fonction de l' ACC oxydase et de l'antocyanidine synthase. Analogies et différences. AixMarseille Université,
11. Brisson, L., El Bakkali-Taheri, N., Giorgi, M., Fadel, A., Kaizer, J., Reglier, M., Tron, T., Ajandouz, e. H., and Simaan, A. J. (2012) *J. Biol. Inorg. Chem.* **17**, 939-949
12. Bruijninx, P. C., van, K. G., and Klein Gebbink, R. J. (2008) *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2716-2744
13. Bruijninx, P. C. A. and Roman-Leshkov, Y. (2014) *Catal. Sci. Technol.* **4**, 2180-2181
14. Brunhuber, N. M., Mort, J. L., Christoffersen, R. E., and Reich, N. O. (2000) *Biochemistry* **39**, 10730-10738
15. bu-Omar, M. M., Loaiza, A., and Hontzeas, N. (2005) *Chem. Rev.* **105**, 2227-2252

16. Buettner, G. R. and Jurkiewicz, B. A. (1996) *Radiat. Res.* **145**, 532-541
17. Burkitt, M. J. and Gilbert, B. C. (1990) *Free Radic. Res. Commun.* **10**, 265-280
18. Carlson, R. G., Srinivasachar, K., Givens, R. S., and Matuszewski, B. K. (1986) *The Journal of Organic Chemistry* **51**, 3978-3983
19. Charng, Y. Y., Chou, S. J., Jiaang, W. T., Chen, S. T., and Yang, S. F. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **385**, 179-185
20. Chemier, J. A., Fowler, Z. L., Koffas, M. A., and Leonard, E. (2009) *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* **76**, 151-217
21. Chen, G. Q. (2012) *Microbial Cell Factories* **11**, 111
22. Chen, Y. F., Etheridge, N., and Schaller, G. E. (2005) *Ann. Bot. (Lond)* **95**, 901-915
23. Christison, T. T. and Rohrer, J. S. (2007) *Journal of Chromatography A* **1155**, 31-39
24. Chung, J. and Wood, J. L. (1971) *Journal of Biological Chemistry* **246**, 555-560
25. Costas, M., Mehn, M. P., Jensen, M. P., and Que, L., Jr. (2004) *Chem. Rev.* **104**, 939-986
26. De Montigny, P., Stobaugh, J. F., Givens, R. S., Carlson, R. G., Srinivasachar, K., Sternson, L. A., and Higuchi, T. (1987) *Analytical Chemistry* **59**, 1096-1101
27. del Río, L. A., Ortega, M. G., López, A. L., and Gorgé, J. L. (1977) *Analytical Biochemistry* **80**, 409-415
28. Dong, J. G., Fernandez-Maculet, J. C., and Yang, S. F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 9789-9793
29. Dong, J. G., Olson, D., Silverstone, A., and Yang, S. F. (1992) *Plant Physiol* **98**, 1530-1531
30. Dorling, S. J. and McManus, M. T. (2012) The Fate of ACC in Higher Plants. In McManus, M. T., editor. *Annual Plant Reviews Volume 44: The Plant Hormone Ethylene*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
31. Driesener, R. C., Challand, M. R., McGlynn, S. E., Shepard, E. M., Boyd, E. S., Broderick, J. B., Peters, J. W., and Roach, P. L. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*
32. Drochioiu, G. (2002) *Talanta* **56**, 1163-1165
33. Drochioiu, G., Popa, K., Humelnicu, D., Murariu, M., Sandu, I., and Cecal, A. (2008) *Toxicological & Environmental Chemistry* **90**, 221-235

34. El Bakkali-Taheri, N. (2011) *Oxydase de l'acide 1-aminocyclopropane carboxylique: mode d'action et inactivation*,
35. Epstein, J. (1947) *Analytical Chemistry* **19**, 272-274
36. Etheridge, N., Chen, Y. F., and Schaller, G. E. (2005) *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **3**, 372-381
37. Felscher, D. and Wulfmeyer, M. (1998) *J. Anal. Toxicol.* **22**, 363-366
38. Fernandez-Maculet, J. C., Dong, J. G., and Yang, S. F. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 1168-1173
39. Gamoh, K. and Sawamoto, H. (1988) *Analytical Sciences* **4**, 665-666
40. Gasteazoro, F. (2009) Expresión Heteróloga de la ACCO de *Arabidopsis thaliana* en *Escherichia coli*: hacia la producción catalítica de etileno. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
41. Gavrilesco, M. and Chisti, Y. (2005) *Biotechnol. Adv.* **23**, 471-499
42. Goger, S., Bogath, D., Barath, G., Simaan, A. J., Speier, G., and Kaizer, J. (2013) *J. Inorg. Biochem.* **123**, 46-52
43. Gong, F., Yang, Z., Hong, C., Huang, W., Ning, S., Zhang, Z., Xu, Y., and Li, Q. (2011) *Bioresource Technology* **102**, 9247-9254
44. Grieve, S. and Syty, A. (1981) *Analytical Chemistry* **53**, 1711-1712
45. Gupta, M. N. and Raghava, S. (2007) *Chem. Cent. J.* **1**, 17
46. Hamilton, A. J., Bouzayen, M., and Grierson, D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 7434-7437
47. Hennessey, D. J., Reid, G. R., Smith, F. E., and Thompson, S. L. (1984) *Can. J. Chem.* **62**, 721-724
48. Huber, G. W. and Corma, A. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **46**, 7184-7201
49. Kage, S., Nagata, T., and Kudo, K. (1996) *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **675**, 27-32
50. Kaur, P., Sareen, D., Kaur, S., and Singh, K. (2009) *Inorganic Chemistry Communications* **12**, 272-275
51. Konze, J. and Kende, H. (1979) *Planta* **146**, 293-301
52. Koppenol, W. H. (2001) *Redox. Rep.* **6**, 229-234
53. Kurniawati, S. and Nicell, J. A. (2006) *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 1198-1208

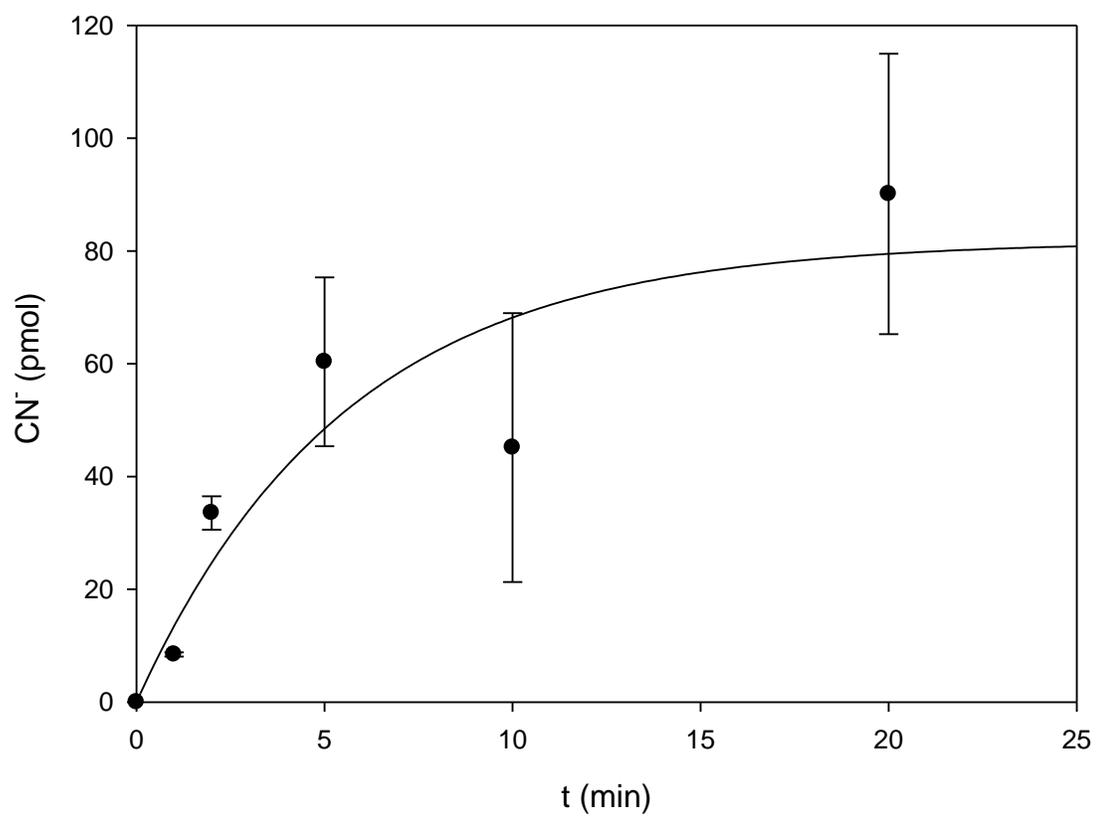
54. Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., and Edwards, R. A. (2004) *Analytical Biochemistry* **326**, 13-20
55. Lambert, J. L., Ramasamy, J., and Paukstelis, J. V. (1975) *Analytical Chemistry* **47**, 916-918
56. Lay, V. J., Prescott, A. G., Thomas, P. G., and John, P. (1996) *Eur. J. Biochem.* **242**, 228-234
57. LeFevre, M. E., Wyssbrod, H. R., and Brodsky, W. A. (1970) *BioScience* **20**, 761-764
58. Lenney, W. and Gilchrist, F. J. (2011) *European Respiratory Journal* **37**, 482-483
59. Lizada, M. C. and Yang, S. F. (1979) *Anal. Biochem.* **100**, 140-145
60. Mak, K. K. W., Yanase, H., and Renneberg, R. (2005) *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 2581-2593
61. Matuszewski, B. K., Givens, R. S., Srinivasachar, K., Carlson, R. G., and Higuchi, T. (1987) *Anal. Chem.* **59**, 1102-1105
62. McGarvey, D. J. and Christoffersen, R. E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5964-5967
63. Miniaev, M. V., Belyakova, M. B., Kostiuk, N. V., Leshchenko, D. V., and Fedotova, T. A. (2013) *J. Anal. Methods Chem.* **2013**, 249752
64. Mirica, L. M. and Klinman, J. P. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 1814-1819
65. Mirica, L. M., McCusker, K. P., Munos, J. W., Liu, H. W., and Klinman, J. P. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8122-8123
66. Mitchell, T., Porter, A. J. R., and John, P. (1988) *New Phytol* **109**, 313-319
67. Mölder, E., Mashirin, A., and Tenno, T. (2005) *Env Sci Poll Res Int* **12**, 66-70
68. Peiser, G. D., Wang, T. T., Hoffman, N. E., Yang, S. F., Liu, H. W., and Walsh, C. T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 3059-3063
69. Pirrung, M. C. (1999) *Acc. Chem. Res.* **32**, 711-718
70. Prescott, A. G. and John, P. (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **47**, 245-271
71. Rocklin, A. M., Kato, K., Liu, H. W., Que, L., Jr., and Lipscomb, J. D. (2004) *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 171-182
72. Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Dao-shan, C., Lin, S. W., Dunn, J. J., and Studier, F. W. (1987) *Gene* **56**, 125-135

73. Sano, A., Takezawa, M., and Takitani, S. (1987) *Talanta* **34**, 743-744
74. Scoggins, M. W. (1972) *Analytical Chemistry* **44**, 1294-1296
75. Seddon, D. (2014) *Petrochemical Economics. Technology Selection in a Carbon Constrained World*, Imperial College Press,
76. Sheldon, R. A. (2005) *Green Chem.* **7**, 267-278
77. Siegie+ä, I. and Bogatek, R. (2006) *Acta Physiologiae Plantarum* **28**, 483-497
78. Smit, M. H. and Cass, A. E. G. (1990) *Analytical Chemistry* **62**, 2429-2436
79. Smith, J. J., Zhang, Z., Schofield, C. J., John, P., and Baldwin, J. E. (1994) *Journal of Experimental Botany* **45**, 521-527
80. Soares A.L. and Mello-Farias P.C. (2006) *Genetics and Molecular Biology* **29**, 508-512
81. Stein, K. and Hain, J. U. (1995) *Microchimica Acta* **118**, 93-101
82. Thrower, J., Mirica, L. M., McCusker, K. P., and Klinman, J. P. (2006) *Biochemistry* **45**, 13108-13117
83. Thrower, J. S., Blalock, R., III, and Klinman, J. P. (2001) *Biochemistry* **40**, 9717-9724
84. Tierney, D. L., Rocklin, A. M., Lipscomb, J. D., Que, L., Jr., and Hoffman, B. M. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7005-7013
85. Torres Galvis, H. M. and de Jong, K. P. (2013) *ACS Catal.* **3**, 2130-2149
86. Valentour, J. C., Aggarwal, V., and Sunshine, I. (1974) *Analytical Chemistry* **46**, 924-925
87. Vázquez, G. (2013) Uso alternativo de las rutas de secreción Sec y Tat en metaloproteínas recombinantes en *Escherichia coli* y su impacto en la ocupación del sitio activo. Universidad Autónoma del Estado de Morelos,
88. Ververidis, P. and Jhon, P. (1991) *Phytochemistry* **30**, 725-727
89. Vioque, B. and Castellano, J. M. a. (1998) *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1706-1711
90. Wang, K. L., Li, H., and Ecker, J. R. (2002) *Plant Cell* **14 Suppl**, S131-S151
91. Ward, T. M., Wright, M., Roberts, J. A., Self, R., and Osborne, D. J. (1978) Analytical procedures for the assay and identification of ethylene. In Hillman, J. R., editor. *Isolation of plant growth substances*, Cambridge University Press, Cambridge
92. Wilson, I. D., Zhu, Y., Burmeister, D. M., and Dilley, D. R. (1993) *Plant Physiol* **102**, 783-788

93. Yang, S. F. and Hoffman, B. M. (1984) *Ann. Rev. Plant Physiol* **286**, 179-185
94. Yip, W. K. and Yang, S. F. (1998) *Bot. Bull. Acad. Sin.* **39**, 1-7
95. Zagrobelny, M., Bak, S., and Moller, B. L. (2008) *Phytochemistry* **69**, 1457-1468
96. Zeng, A.-P. and Biebl, H. (2002) Bulk Chemicals from Biotechnology: The case of 1,3-Propanediol Production and the NewTrends. In Schüger, K., Zeng, A.-P., Aunins, J. G., Bader, A., Bell, W., Biebl, H., Biselli, M., Carrondo, M. J. T., Castilho, L. R., Chang, H. N., Cruz, P. E., Fuchs, C., Han, S. J., Han, M.-R., Heinzle, E., Hitzmann, B., Köster, D., Jasmund, I., Jelinek, N., Lang, S., Laatsch, H., Lee, J., Miirkl, H., Maranga, L., Medronho, R. A., Meiners, M., Nath, S., Noll, T., Scheper, T., Schmidt, S., Stäirk, E., Tholey, A., Wagner-Döbler, I., Wandrey, C., Wittman, C., and Yim, S.-C., editors. *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*, Springer Berlin Heidelberg,
97. Zhang, Z., Barlow, J. N., Baldwin, J. E., and Schofield, C. J. (1997) *Biochemistry* **36**, 15999-16007
98. Zhang, Z., Ren, J. S., Clifton, I. J., and Schofield, C. J. (2004) *Chem. Biol.* **11**, 1383-1394
99. Zhang, Z., Schofield, C. J., Baldwin, J. E., Thomas, P., and John, P. (1995) *Biochem. J.* **307 (Pt 1)**, 77-85
100. Zhou, J., Rocklin, A. M., Lipscomb, J. D., Que, L., Jr., and Solomon, E. I. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 4602-4609

Anexo 1

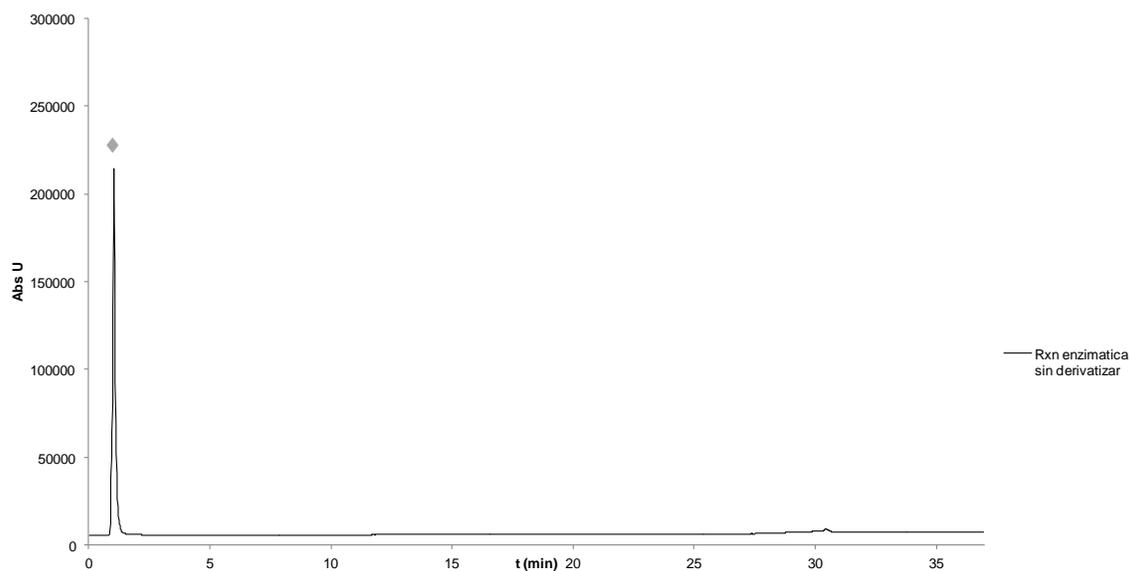
Ejemplo de las curvas obtenidas para los cursos temporales en la determinación de la producción de etileno de la ACCO para una concentración de 10 mM de ACC.

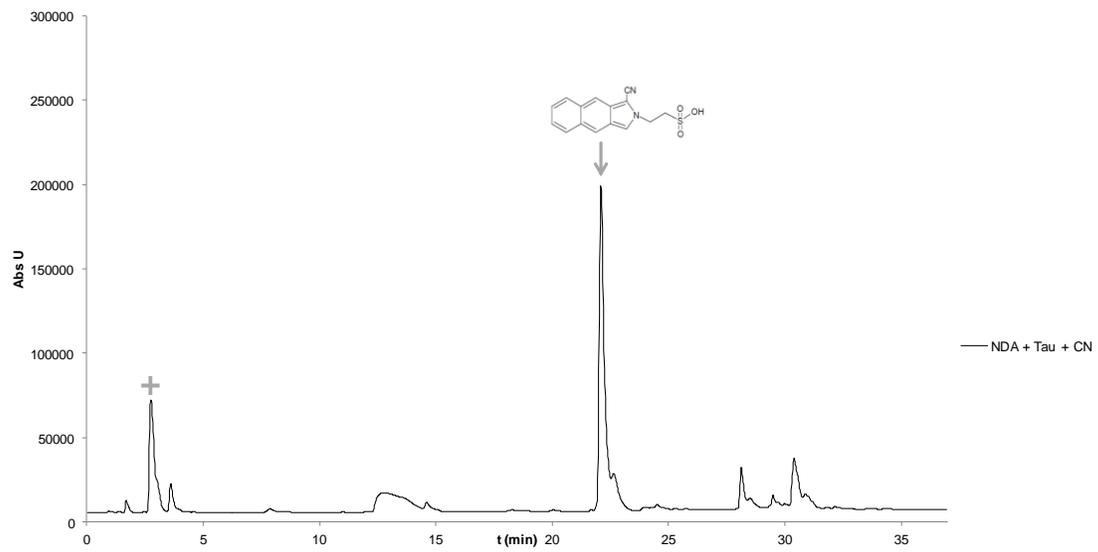
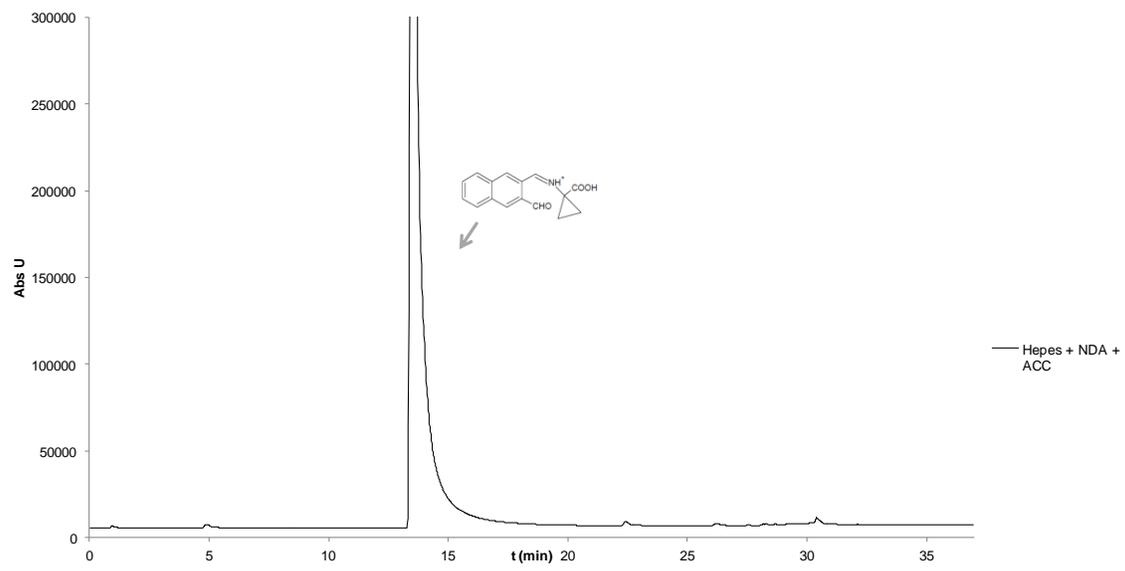
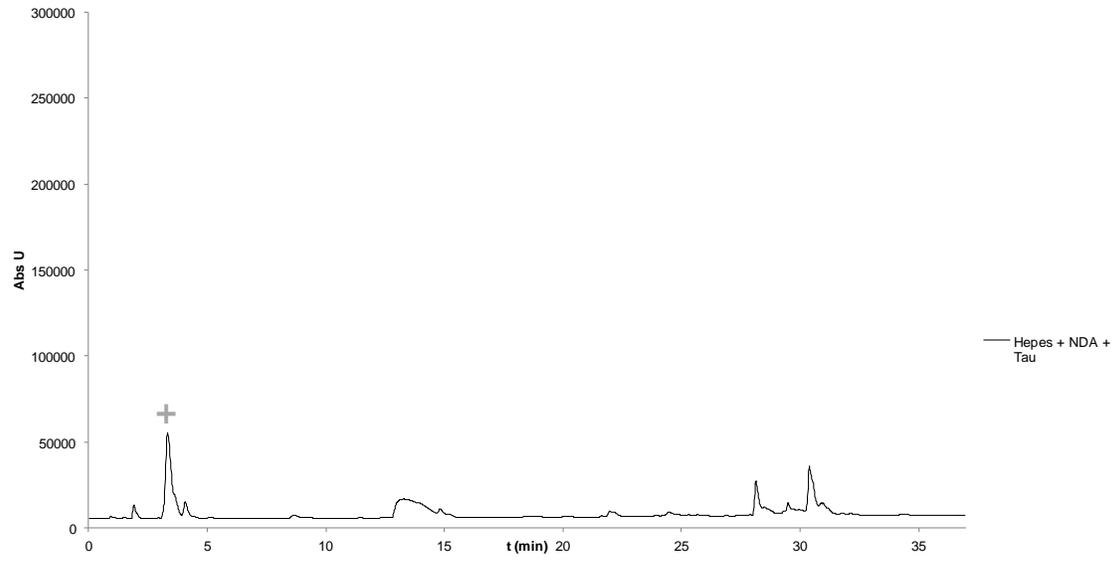


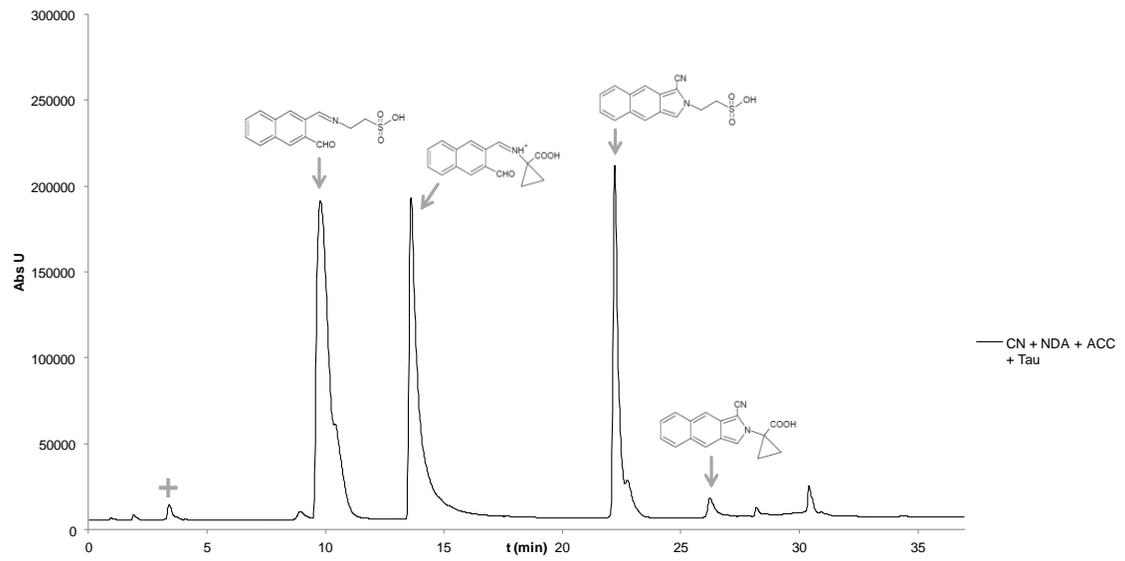
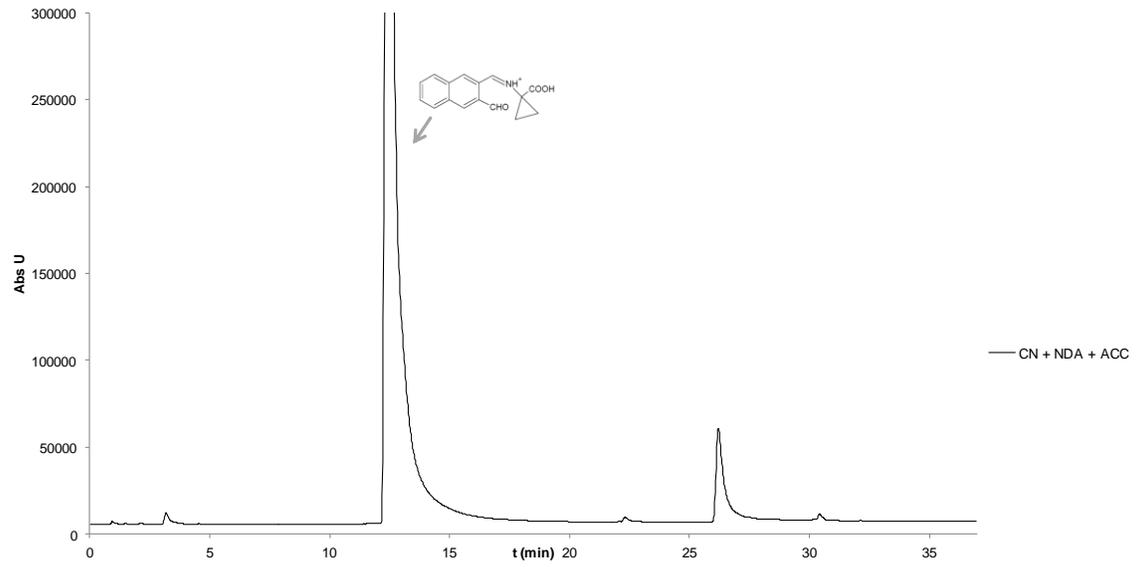
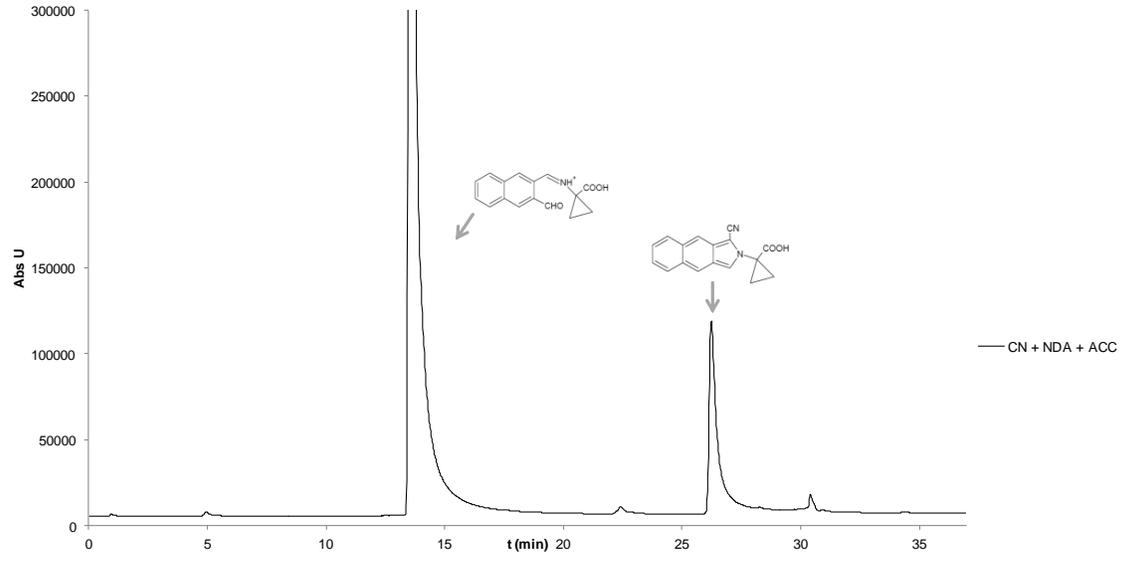
Anexo 2

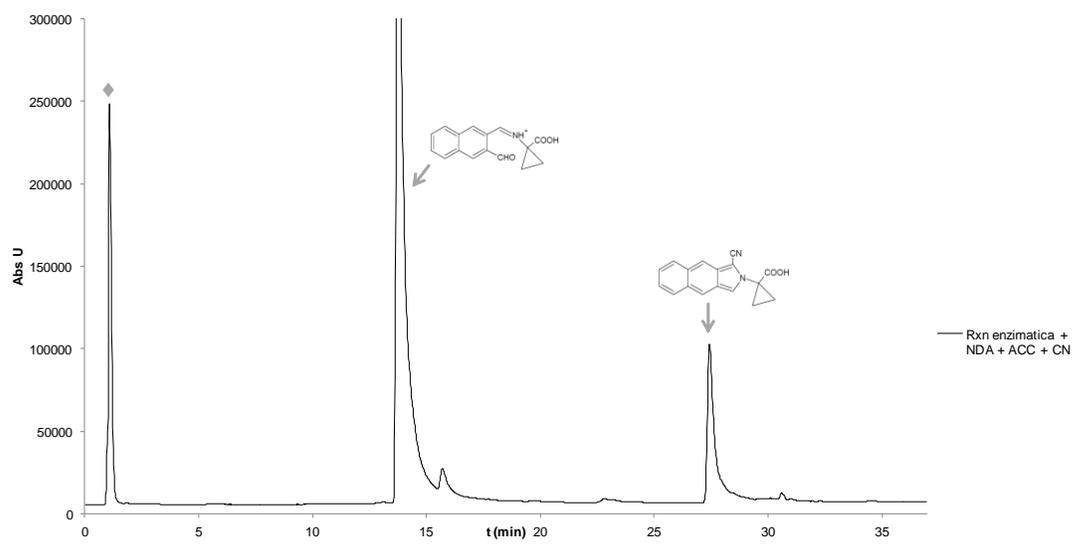
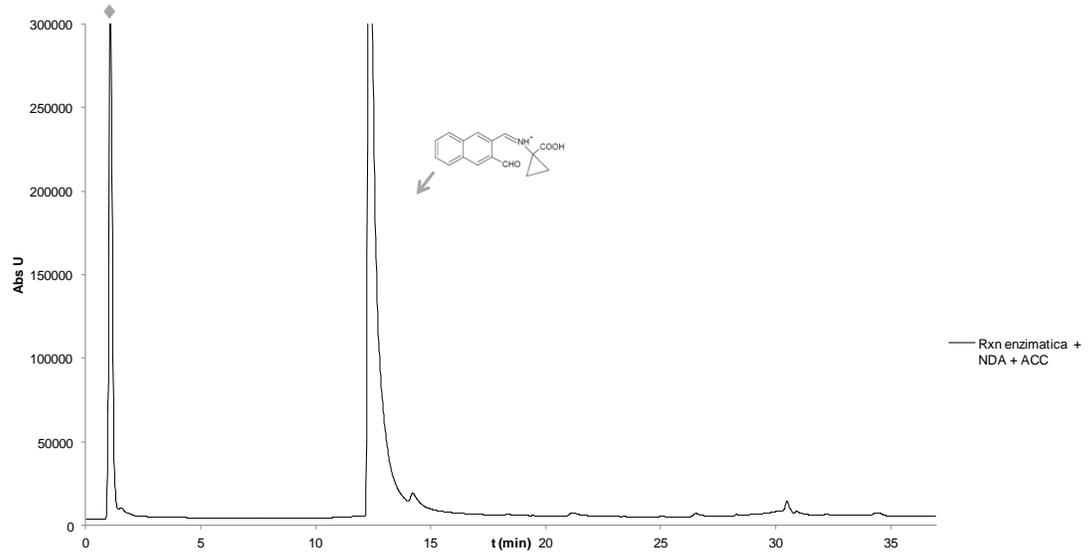
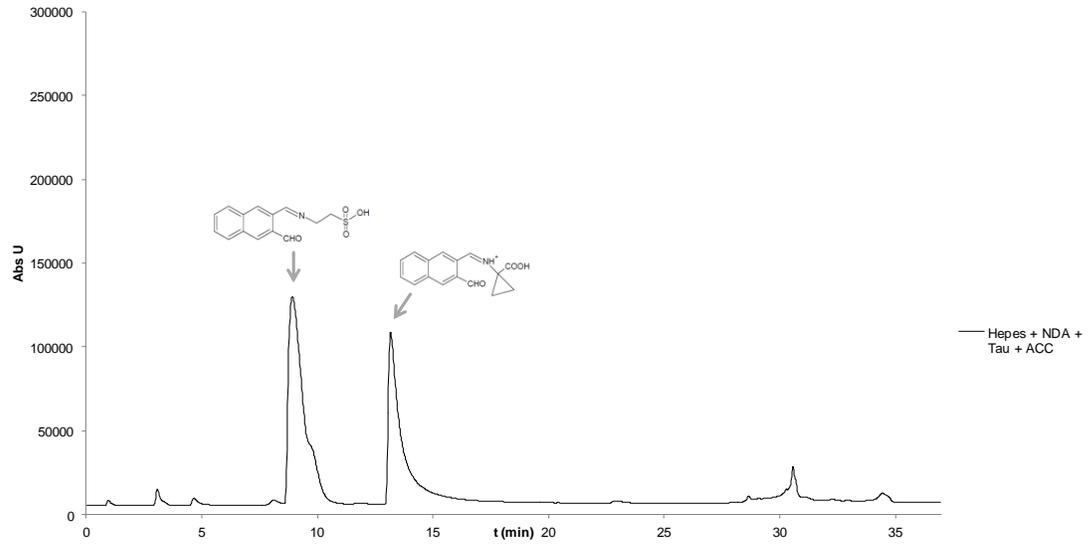
Conjunto de cromatogramas derivados de las reacciones de derivatización para diferentes combinaciones de los reactantes encontrados dentro de la reacción de la ACCO. Todas las derivatizaciones y cromatografías se realizaron bajo las condiciones de derivatización que se describen en la sección de Materiales y Métodos.

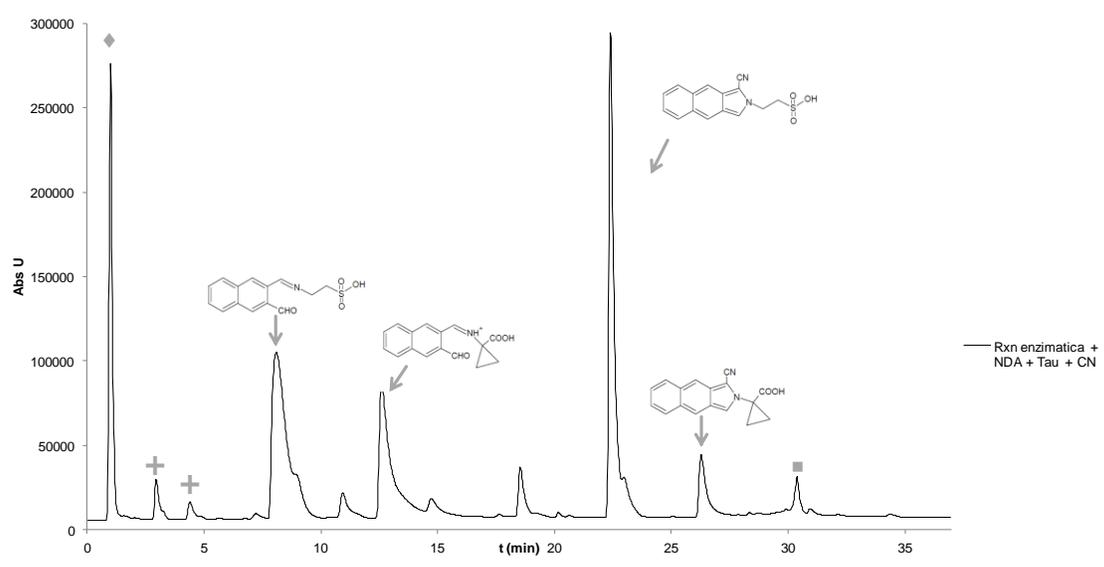
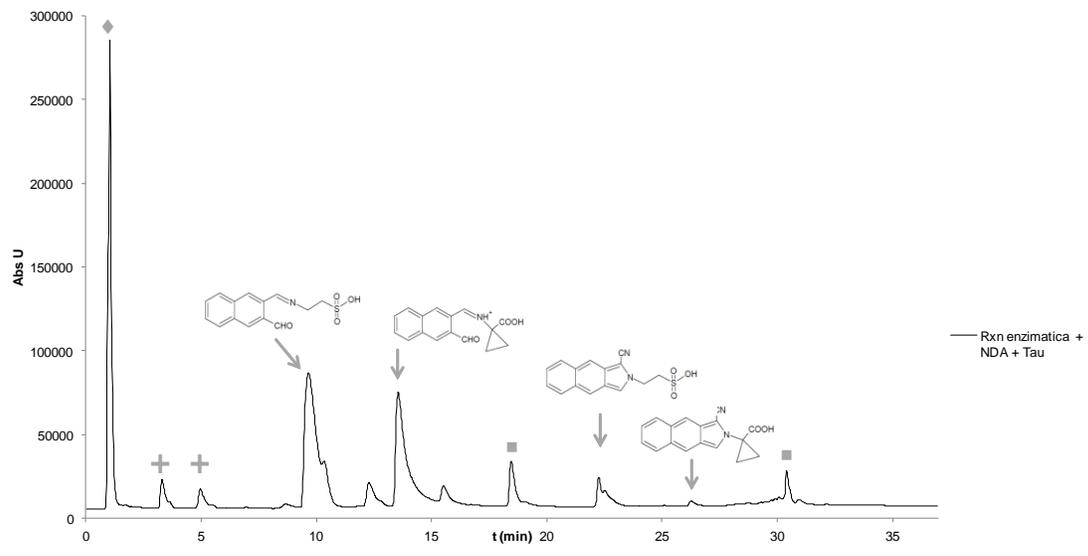
Los cromatogramas tienen la misma nomenclatura que la Figura 25. Ion imino del aducto Tau, ion imino del aducto ACC, enamina-Tau, enamina-ACC Todas estas representadas por su estructura química correspondiente. (♦) aducto formado en presencia de todos los componentes de la reacción, (+) aductos formados en presencia de taurina, (■) aductos formados por la presencia de ACCO y taurina en la reacción





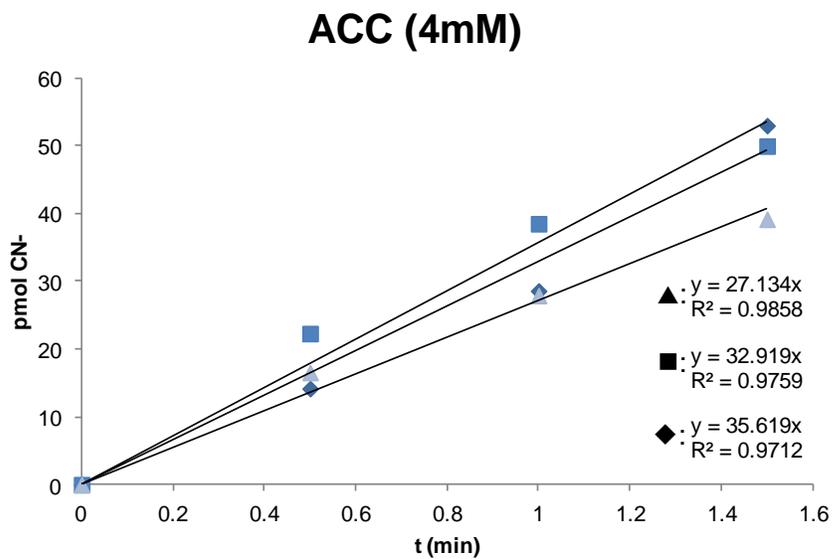
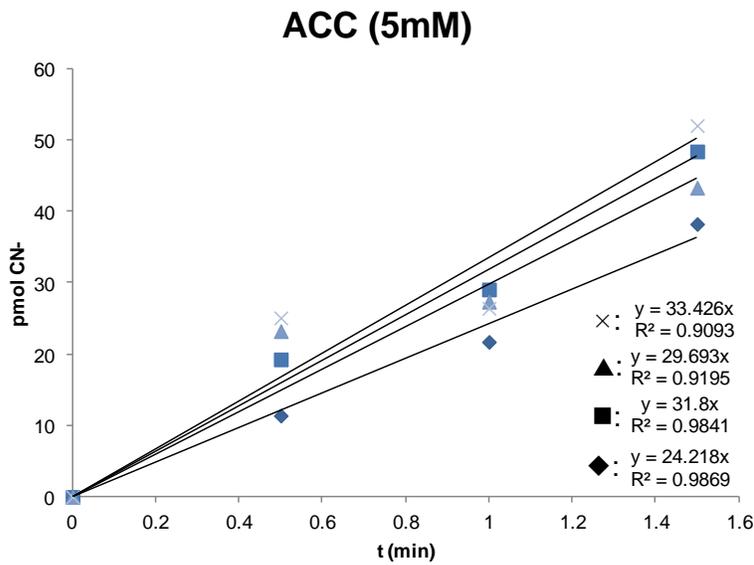




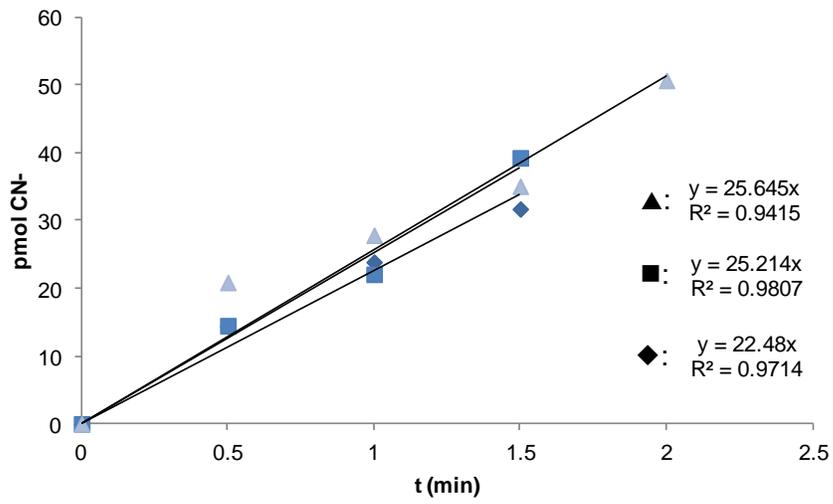


Anexo 3

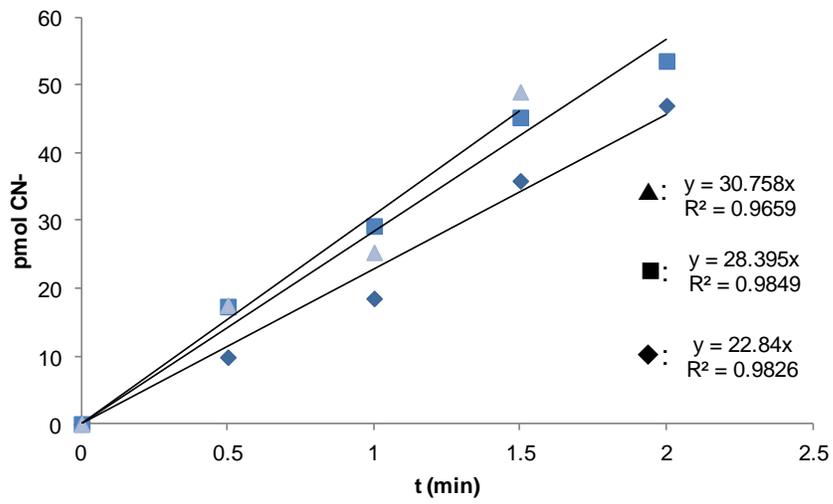
Conjunto de gráficos para los cursos temporales de la reacción de la ACCO a diferentes concentraciones de ACC. En las gráficas se muestra el intervalo temporal para el cual se puede describir una línea recta. El ajuste para cada una de las rectas se encuentra en los insertos de las graficas.



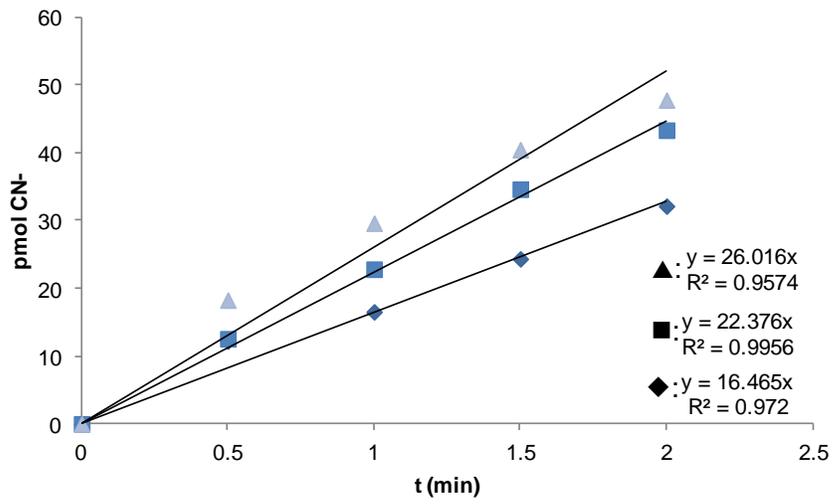
ACC (3mM)



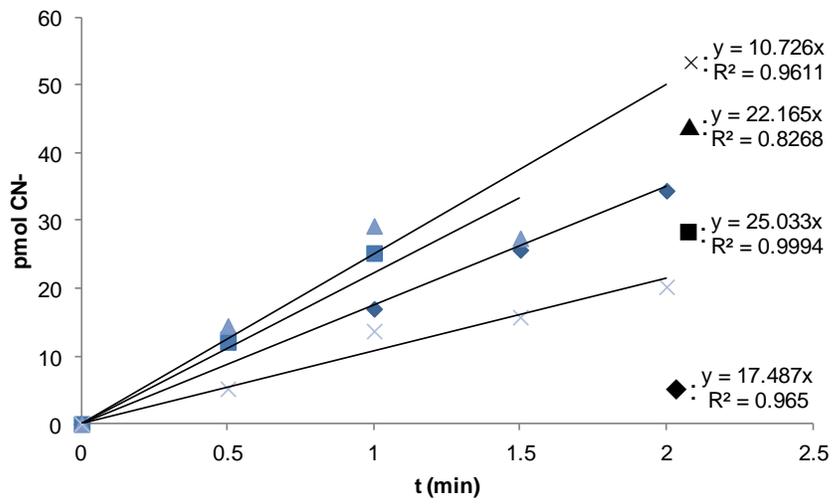
ACC (2mM)



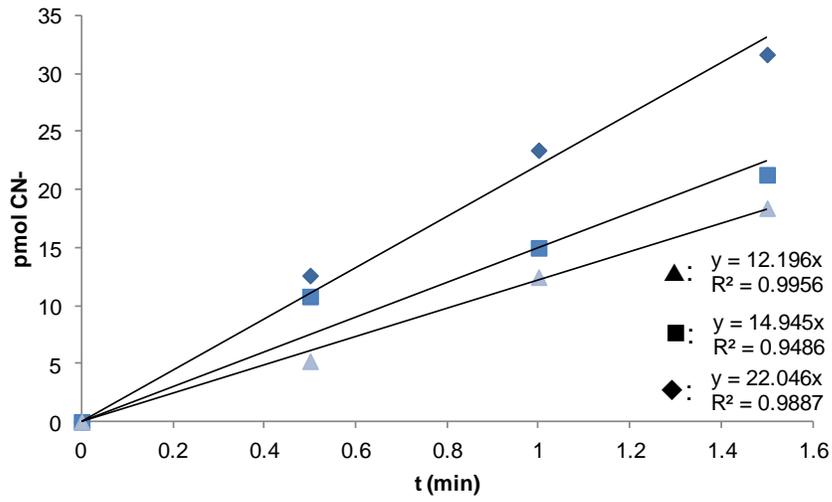
ACC (1.5mM)



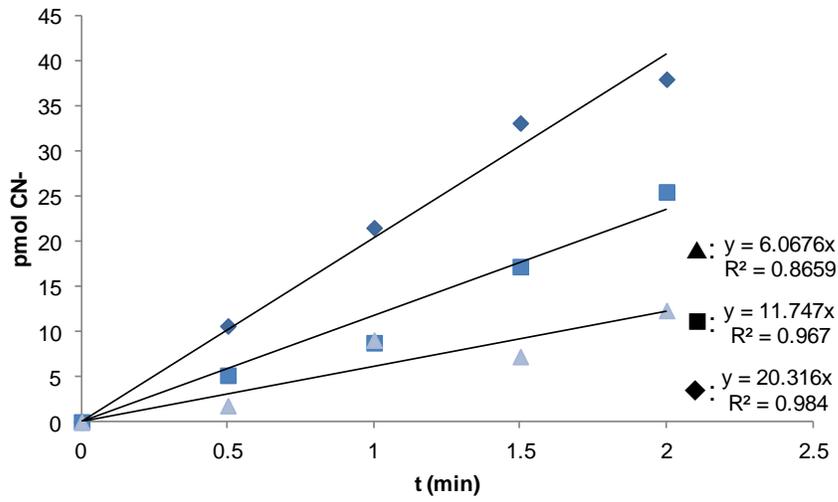
ACC (1mM)



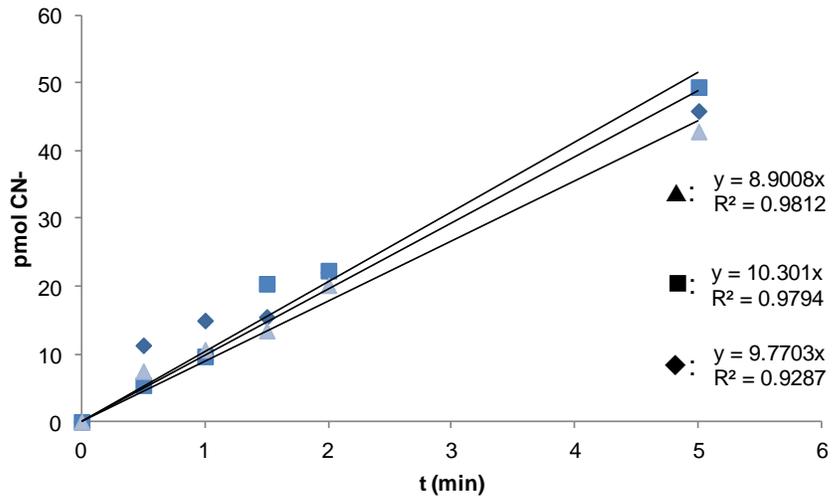
ACC (0.8mM)



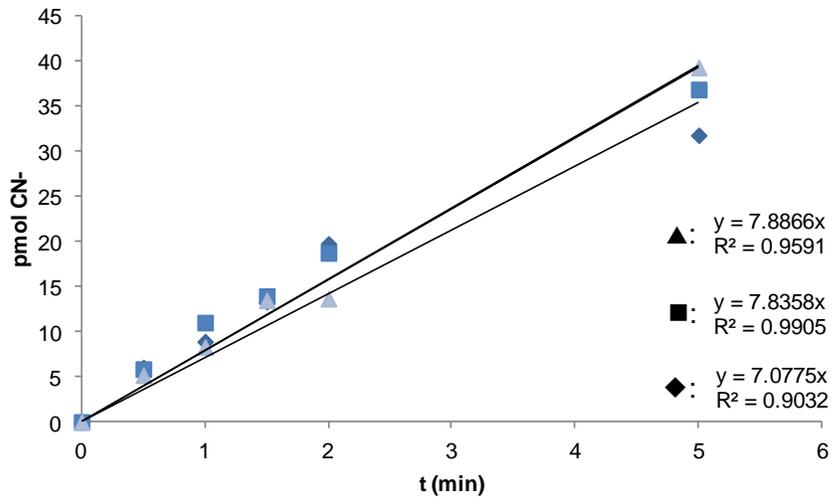
ACC (0.6mM)



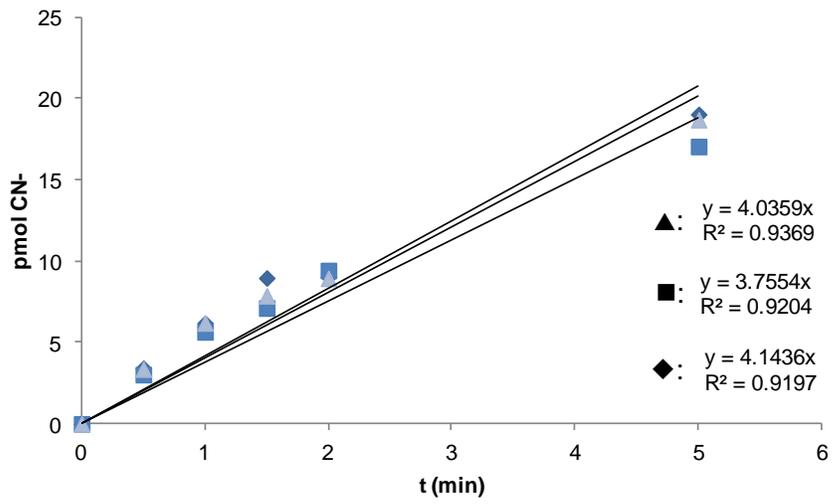
ACC (0.4mM)



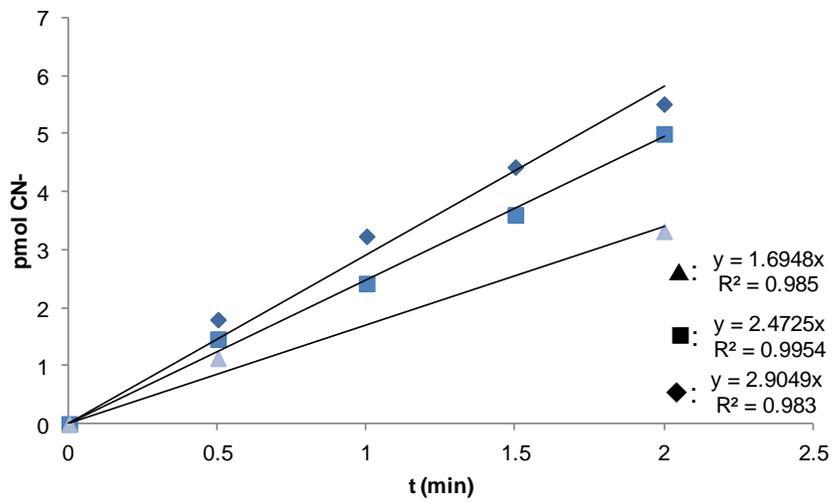
ACC (0.2mM)



ACC (0.1mM)



ACC (0.05mM)



Anexo 4

Tabla comparativa de los diferentes parámetros cinéticos obtenidos para la ACCO.

Preparación	Producción de Etileno			Producción de Cianuro			Consumo de O ₂		
	Km (mM)	<i>k</i> _{cat} (min ⁻¹)	R ²	Km (mM)	<i>k</i> _{cat} (min ⁻¹)	R ²	Km (mM)	<i>k</i> _{cat} (min ⁻¹)	R ²
F1	0.293 ± 0.08	26.86 ± 2.0	0.913	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F2	0.854 ± 0.18	24.84 ± 1.82	0.91	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M1	ND	ND	ND	0.72 ± 0.15	27.72 ± 1.4	0.95	ND	ND	ND
M2a	ND	ND	ND	0.15 ± 0.9	23.38 ± 2.1	0.76	ND	ND	ND
M2b	0.206 ± 0.089	25.81 ± 2.6	0.874	0.92 ± 0.17	20.76 ± 1.51	0.96	0.60 ± 0.23	3.98 ± 0.46	0.84

* ND = no determinado

Anexo 5



Validation of a general method for activity estimation of cyanide evolving oxidoreductases



Francisco Gasteazoro^a, Ariane Jalila Simaan^b, Raunel Tinoco-Valencia^c, Brenda Valderrama^{a,*}

^aDepartamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

^bInstitut des Sciences Moléculaires de Marseille, Aix Marseille Université, Centrale Marseille, CNRS, iSm2, UMR 7313, 13397 Marseille, France

^cUnidad de Escalamiento y Planta Piloto, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2014

Received in revised form 8 September 2014

Accepted 13 October 2014

Available online 15 November 2014

Keywords:

Biocatalysis

Enzymes

Ethylene

Gas chromatography

Liquid chromatography

ABSTRACT

Ethylene is a key molecule in organic synthesis currently produced by steam cracking of fossil hydrocarbons. In nature, ethylene is produced in higher plants by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACCO). Biocatalytic alternatives for ethylene production are still far from being competitive with traditional production plants. Furthermore, data dispersion shown in the literature adds uncertainty to the introduction of ACCO as a biocatalyst, especially when larger numbers of isoforms or mutants are to be compared. Here we propose a new method for measuring ACCO activity based on cyanide detection. Data provided here indicate that cyanide detection is more precise, more responsive, and much more stable than any other method tested for ACCO activity estimation so far. Briefly, enzymatically produced cyanide can be detected by its derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde (NDA) to generate 1-cyanobenz[*f*]isoindole (CBI), which is further detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a fluorescence detector. Cyanide can be detected in the range between 0.99 and 60.17 pmol, which is three orders of magnitude more sensitive than the currently used ethylene estimation method.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

The transition of conventional industries toward cleaner alternatives relies on the development of suitable biocatalytic processes. Biocatalysis excels over chemical counterparts due to its inherent ability to perform reactions stereo-, enantio-, and chemospecifically. There are a number of biocatalytic reactions that have been successfully incorporated into industrial processes with the concomitant reduction of required water and energy and also in the generation of byproducts [1,2]. One of the many fields of the chemical industry that may be displaced by biocatalytic processes is the production of a group of small molecules that are important feedstock for the chemical industry: methanol, ammonia, aromatics, and olefins [3–5].

Ethylene, the simplest olefin, is a key molecule in organic synthesis [6]. Global ethylene production in 2011 was close to 142 million metric tons, and it is forecasted to reach 165 million metric tons by 2015, surpassing all other organic petrochemicals in production and in the amount sold [1,7]. Ethylene is used as a raw material for a great number of commercial synthetic organic chemical products (e.g., polyethylene, acetaldehyde, ethylene oxide, eth-

anol), being mainly produced by steam cracking of hydrocarbons in the petrochemical industry, a process that requires high pressure and high temperature. Although biocatalytic alternatives for ethylene production are still far from competitive with traditional production plants, they offer new opportunities in accordance with the principles of green chemistry [2,7,8]. Ethylene, an essential hormone for many aspects of plant life such as root development, germination, senescence, fruit ripening, and defense mechanisms [9], is naturally produced by higher plants from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC),¹ a metabolite of methionine [10], and the last step of its biosynthesis is catalyzed by ACC oxidase (ACCO) (Fig. 1) [11].

There is a significant amount of information regarding the sequence, structure, and catalytic mechanism of ACCO [12–17], and this enzyme arises as a natural target for further catalytic improvement by protein engineering methods. ACCO activity is usually measured following Mitchell and coworkers, where the

¹ Abbreviations used: ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; ACCO, ACC oxidase; DTT, dl-dithiothreitol; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, ammonium iron(II) sulfate hexahydrate; NDA, naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde; CBI, 1-cyanobenz[*f*]isoindole; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HPLC, high-performance liquid chromatography; KCN, potassium cyanide.

* Corresponding author.

E-mail address: brenda@ibt.unam.mx (B. Valderrama).

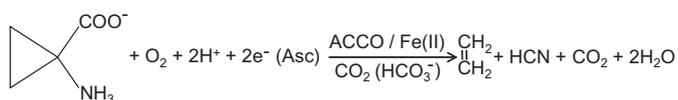


Fig.1. Reaction catalyzed by ACCO.

production of ethylene formed is determined on a gas chromatograph attached to a flame ionization detector [18]. Seldom has the determination of oxygen consumption using a Clark electrode been reported as well [19]. By using these methodologies, catalytic parameters of native enzymes from different sources have been reported with K_m values for ACCO ranging from 0.032 to 2.87 mM [20–23]. The two orders of magnitude variation among these data may arise from differences in the purification protocol, in the reaction conditions, or in the detection uncertainty. Strong variation on the catalytic parameters is shown even for the same isoform expressed in *Escherichia coli* with K_m values ranging from 0.03 to 0.130 mM, whereas apparent k_{cat} values ranged from 6.1 to 354 min^{-1} [24,25]. Data dispersion shown in the literature adds uncertainty to the introduction of ACCO as a biocatalyst, especially when larger numbers of isoforms or mutants are to be compared. Therefore, it is necessary to obtain more robust and sensitive methodologies for the screening of ACCO in a protein engineering scheme.

Here we propose a new method for measuring ACCO activity based on cyanide detection. Indeed, data provided here indicate that cyanide detection is more precise, more responsive, and much more stable than any other method tested for ACCO activity estimation so far.

Materials and methods

All chemical supplies were of reagent-grade purity and purchased from Sigma–Aldrich unless otherwise stated. Restriction enzymes and ligase were purchased from New England Biolabs, and pET32a(+) was purchased from Novagen.

All experiments presented in this article were performed with the same enzyme batch and are representatives of at least three rounds of experiments performed with the same number of pure samples.

Vector construction for ACCO expression

ACCO was subcloned in pET32a(+). The vector was first digested with *NdeI* and *BamHI* and then purified with a GeneJet Gel Extraction Kit from Fermentas. The ACCO gene contained in pET-21a was restricted with the same pair of enzymes; the 945-bp fragment liberated was purified from gel. The ACCO fragment was then ligated into the previously restricted pET32a(+) and transformed into *E. coli* DH5 α cells. A number of colonies were picked and screened for the ACCO gene by restriction, and the ACCO gene was further confirmed by sequencing. Expression of ACCO was placed under the control of a T7 promoter. The vector also includes the *E. coli* ampicillin resistance gene. The expression construction is referred to as pET32ACCO. This plasmid was then transformed into *E. coli* BL21 for protein expression.

ACCO expression

A 0.25-L LB broth inoculum flask (supplemented with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin) was grown at 37 °C in a shaker for 12 h. The inoculum was added to a 10-L fermenter operated at 37 °C, 300 rpm, and 0.33 vvm to an A_{600} between 0.4 and 0.6, at which time isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a

final concentration of 0.5 mM. Growth was continued at 28 °C for an additional 3 h, and cells and supernatant were separated by centrifugation.

Purification of ACCO

Cells were resuspended in 25 mM Hepes (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM dl-dithiothreitol (DTT), 10% glycerol, DNase I (10 U/ml), lysozyme (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), and protease inhibitor Complete EDTA-Free (Roche). Three ultrasonic pulses were used to lyse the resuspended cells. The lysate was centrifuged at 13,000 rpm at 4 °C for 30 min. The supernatant was precipitated with ammonium sulfate to a saturation concentration of 60%, this mixture was again centrifuged at 13,000 rpm at 4 °C, and the supernatant was collected. Ammonium sulfate was added to 80% saturation, and the mixture was centrifuged with the same conditions. The pellet was recovered and resuspended in 25 mM Hepes (pH 8.0) and 3 M ammonium sulfate and loaded onto Macro-Prep t-Butyl Resin (Bio-Rad) equilibrated with buffer (25 mM Hepes, pH 8.0) and 3 M ammonium sulfate. The column was washed with the same buffer. ACCO was eluted from the column in a linear gradient (3–0 M ammonium sulfate in buffer (25 mM Hepes)).

Fractions containing ACCO were dialyzed in 25 mM Hepes (pH 8.0), 5 mM DTT, and 10% glycerol to further load onto Q-Sepharose Fast-Flow (Sigma) equilibrated with the same buffer. The column was washed with this buffer, and the retained fractions were eluted with a 0- to 0.5-M NaCl linear gradient. The fractions containing ACCO were dialyzed in 25 mM Hepes (pH 7.2) to further concentration in a Centricon 10K MWCO (molecular weight cutoff) device (Millipore). In all of the purification steps, ACCO fractions were selected as determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). Gels were prestained by adding 0.5% of 2,2,2-trichloroethanol into gel mixture [26], and gel images were obtained with a Gel Doc EZ System (Bio-Rad) using the stain-free tray filter. Protein concentration was determined by Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Iron quantification

ACCO preparation iron content was determined by a modification of the Hennessy and coworkers methodology [27]. To quantify iron content in the enzymatic preparation, 250 μl of ACCO mixture was denatured by the addition of 20 μl of HCl (1 M), and this denatured solution was instantly neutralized with 20 μl of NaOH (1 M). The obtained mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The supernatant was reduced with 200 μl of a solution of ascorbic acid (1 M) and completed to a 1-ml final volume of buffer acetate (pH 4.5) with ferene S (final concentration of 0.638 mM). The mixture was incubated for 5 min at room temperature to allow color development. Absorbance of the sample was measured at 593 nm ($\lambda_{593} = 34,500 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) using a Thermo Scientific spectrophotometer.

ACCO activity assays

ACCO activity was measured using ACC, ammonium iron(II) sulfate hexahydrate $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, NaHCO_3 , and L-ascorbic acid [25].

Ethylene determination was performed at room temperature in 1.7 ml of hermetically sealed vials. The total assay volume was 200 μl and contained 100 mM Hepes buffer at pH 7.2, 102.8 μg of ACCO, 18 mM NaHCO_3 , 8 mM L-ascorbic acid, 80 μM $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, and 5 mM ACC. After 2 min of reaction, 250 μl of headspace gas was removed using a gas-tight syringe and ethylene production was quantified by gas chromatography. Measurements

were performed by varying the concentration of ACC while maintaining the concentration of the other substrates. Nonlinear curve fitting to the Michaelis–Menten equation was performed using SigmaPlot 11.0 to determine kinetic parameters. Gas chromatography measurements were performed with an Agilent 6890N gas chromatograph equipped with a fused silica capillary column Gas-Pro (J & W, 30 m × 0.32 mm) and a flame ionization detector. The following conditions were used: He (99.999%) as a carrier gas (1.4 ml min⁻¹), in split mode (20:1), $T_{\text{injector}} = 250$, $T_{\text{oven}} = 90$, and $T_{\text{detector}} = 260$. Ethylene was quantified versus an external standard of ethylene (99.99%) from Sigma.

Oxygen consumption was measured using an Oxygraph device (Hansatech Instrument, King's Lyan, UK) equipped with an oxygen electrode, a gas-tight cap, and a Teflon-coated stirrer bar. The Oxygraph was controlled by and configured from a personal computer, via custom software supplied by the manufacturer, which also recorded oxygen concentration in the chamber over time. Instrument calibration was performed according to the manufacturer's instructions using the same buffer for the enzymatic reactions and 99.5% nitrogen. Temperature was maintained at 19 °C. Standard reaction mixture (1 ml) contained 100 mM Hepes (pH 7.2), 205.6 µg of ACCO, 18 mM NaHCO₃, 8 mM L-ascorbic acid, and 5 mM ACC. Reconstituted ACCO with 0.74 Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O molar excess was used to start the reactions. All rates were calculated subtracting background oxygen consumption [19]. Measurements were performed by varying the concentration of ACC while maintaining the concentration of the other substrates. Nonlinear curve fitting to the Michaelis–Menten equation was performed using SigmaPlot 11.0 to determine kinetic parameters.

Cyanide was quantified after derivatization by a modification of the method of Driesener and coworkers [28], in which the cyanide anion reacts with naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde (NDA) and a primary amine, generating the fluorescent 1-cyanobenz[*f*]isoindole (CBI) derivative (Fig. 2) [29]. Standard reaction mixture (100 µl) contained 100 mM Hepes (pH 7.2), 1.29 µg of ACCO, 18 mM NaHCO₃, 8 mM L-ascorbic acid, 80 µM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, and 5 mM ACC. Initial velocities were measured at 18 °C. Reactions were ended with the addition of 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, pH 8.0). All rates were calculated subtracting background cyanide production. For derivatization, 3.44 mM NDA in methanol and 1.9 mM ACC in buffer (100 mM Hepes, pH 7.2) were added to the ACCO reaction. Derivatization proceeded for 5 min at 95 °C. After derivatization, fluorescence was measured by

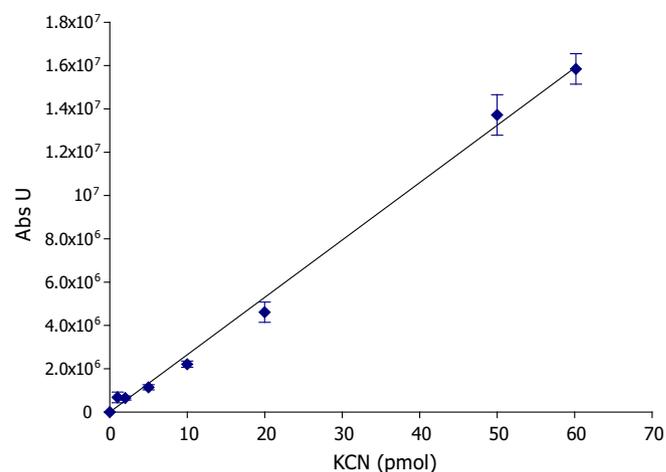


Fig. 3. Calibration plot of KCN derivatized with NDA and ACC. Lower and higher dots on plot are detection and quantification limits for CBI under working conditions.

high-performance liquid chromatography (HPLC). Chromatographic separation was achieved by injecting 20 µl of derivatized supernatant into a Hypersil C18 ZORBAX Eclipse reverse phase column (4.6 × 100 mm). The chromatography buffers were 2 mM ammonium formate (pH 3.0) (solvent A) and methanol (solvent B), and the initial mobile phase contained 20% solvent B for 5 min, followed by a gradient to 65% solvent B over 20 min and then 100% solvent B over 2 min, where it was held isocratically for 10 min. The CBI derivative eluted with a retention time of approximately 27 min and was detected fluorometrically by the signal emitted at $\lambda_{\text{ex}} = 418$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 454$ nm. To establish a cyanide calibration plot, potassium cyanide (KCN) standards (1–99 pmol) in 100 mM Hepes (pH 7.2) were prepared and subjected to the same conditions as ACCO assays (Fig. 3).

Results and discussion

The tomato ACCO gene codified in pET-21a has been widely used for the heterologous expression of the enzyme in *E. coli* [12,17,24,30]; however, the resulting ACCO was lower than expected based on the literature and on our experience [31]. To increase the yield, the tomato ACCO gene was subcloned into pET32a(+), acquiring the expected ability to produce three times more protein than with the previous construction, which is crucial for an optimal purification methodology. The current protocol used for ACCO purification generates enough material for protein characterization; however, we identified two weaknesses: (i) the preparation obtained was not high purity, and this will certainly affect the determination of the catalytic parameters, and (ii) the Fe naturally present on the active site of the enzyme is removed as a result of the EDTA addition at the protein extraction stage of the purification [25]. Because ACCO catalysis is Fe dependent, this ion must be provided again in the reaction medium, with the unavoidable generation of reactive oxygen species.

To relieve these restrictions, we developed an EDTA-free protein purification protocol that allowed fast purification from large culture volumes, important to avoid excessive handling procedures that can damage the protein [19], and with higher yields of protein (10 mg/L of ~98% relative purity) (Fig. 4). We obtained a highly active protein preparation with 16.5 mol ethylene/mol enzyme/min [24], which is in the activity range described by using the methodology previously reported by Thrower and coworkers [19]. The natural Fe content of 35% in ACCO was conserved because purification was performed without EDTA. High protein yield with

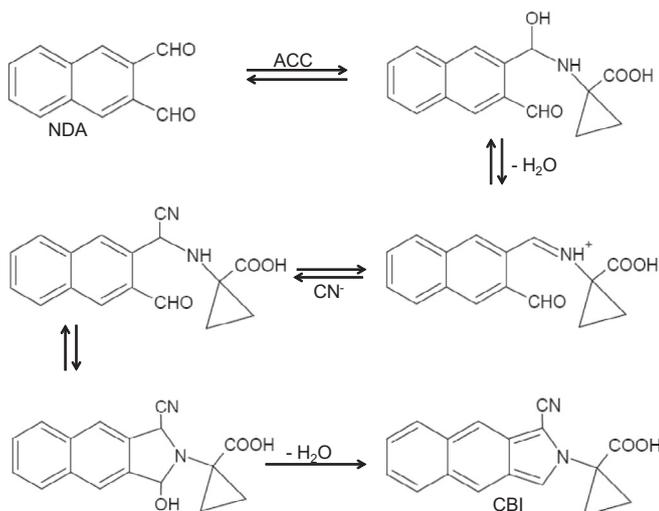


Fig. 2. Scheme of cyanide derivatization with NDA and ACC. (Modified from Carlson et al. [29].)

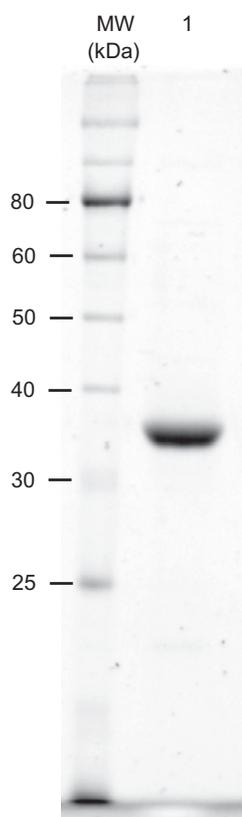


Fig. 4. Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) revealed by 2,2,2-trichloroethanol molecular weight ladder (MW) and ACCO preparation after EDTA-free purification protocol (lane 1).

good specific activity indicated that no deactivation took place during purification and, therefore, that no EDTA addition is required throughout the process.

The enzyme preparation was characterized using the following methods: production of ethylene, oxygen consumption, and cyanide production. Ethylene production was measured as reported elsewhere, varying ACC while keeping all other substrate concentrations fixed at saturation [25]. Ethylene was quantified using a calibration plot ranging from 0.81 to 801 nmol that fits into a linear equation. Steady-state kinetics of ethylene production was determined using velocity rates for ethylene production under initial velocity conditions. Ethylene production rates were analyzed using the Michaelis–Menten model, and kinetic parameters obtained were $K_m = 0.17 \pm 0.07$ mM and $k_{cat} = 17.45 \pm 1.41$ min⁻¹ ($R^2 = 0.85$).

For oxygen consumption, we followed the methodology described by Thrower and coworkers [19], and the enzymatic reaction was started with protein previously charged with 0.74 molar excess of ferrous iron to avoid oxygen consumption in the electrode due to free iron in the reaction medium. The reaction was followed for several minutes, and activity rates were measured in accordance with steady-state kinetics. Oxygen consumption rates were subjected to the same treatment as ethylene production data, and kinetic parameters obtained were $K_m = 0.60 \pm 0.23$ mM and $k_{cat} = 3.98 \pm 0.46$ min⁻¹. Although these data sets presented significant dispersion, they satisfactorily fulfilled the Michaelis–Menten model ($R^2 = 0.84$).

All of our results but k_{cat} obtained with oxygen consumption approached those found in the literature for the same ACCO isoform, where K_m values ranged from 0.03 to 0.15 mM and apparent k_{cat} ranged from 11.3 to 354 min⁻¹ [24,25]. It is important to note that there is at least one order of magnitude difference between

reports. When we compare the catalytic parameters reported here, we find that K_m is nearly 4 times larger and k_{cat} and approximately 4 times smaller between oxygen consumption and ethylene production. These differences may arise from physical or chemical differences between methods. For instance, ethylene detection is dependent on accumulation of the product in vials, on saturation of the liquid phase of the reaction, and on further manipulation of the sample until its detection in the gas chromatograph [32,33]. Therefore, this assay does not necessarily provide a direct value for concentration of ethylene but does so for the rate at which the ethylene equilibrates between the reaction mixture and the enclosing air phase [34]. In addition, the sensitivity of this method is lower, with a confidence interval between 210 and 420 pmol ethylene ml⁻¹. On the other side, precision of oxygen measurements using Clark electrode deviations have been reported to depend on different aspects such as membrane damage [35], deterioration of the electrode by deposition of AgCl in the silver anode [36], and the occurrence of nonenzymatic oxygen consumption exacerbated by ascorbic acid [19,37–40]. In addition, oxygen detection is highly dependent on the temperature and is a time-consuming method not suitable for the analysis of a large number of samples. Finally, it is not a sensitive method (0.01×10^6 to 8.4×10^6 pmol oxygen min⁻¹) [41], demanding large amounts of ACCO to detect a significant signal.

Taking into account the drawbacks of the two methodologies available for ACCO activity assays, we propose a methodology based on the method of Driesener and coworkers [28,42]. Briefly, enzymatically produced cyanide can be detected by its derivatization with NDA to generate CBI, which is further detected by HPLC coupled with a fluorescence detector. Modifications needed to be developed for the use of ACC as primary amine instead of taurine. When the enzymatic activity was tested in the presence of taurine and ACC, the chromatogram presented a complex pattern due to different CBI isoforms, one for each R-amine group present. In the chromatograms with and without taurine (Fig. 5A and B, respectively), compound identification was assigned by systematic exclusion of one or more reactants. The retention time for CBI formed with the R-amine group of ACC presents a retention time close to 26 min and is clearly distinguishable from that formed with taurine that appears at 22 min. The retention time shift observed among chromatograms may be due to the different viscosity of individual samples. ACC was added to the reaction in excess, as were the substrates for ACCO activity reaction and for HCN detection. Besides, controls where all reagents present at the ACCO reaction mixture were added individually or in different combinations were run to ensure that none of them interfered with cyanide measurement. It is important to note that complete derivatization required 5 min at 95 °C and pH control with Hepes (100 mM, pH 7.2) [43,44]. Once the derivatization methodology was settled, a calibration plot was established with a KCN standard in the range between 0.99 and 60.17 pmol that fitted into a linear equation, making this method three orders of magnitude more sensitive than ethylene estimation [42] and all other colorimetric cyanide determination methodologies reported to date [45,46]. A highly sensitive methodology allows a better quantification of the released product; the estimation is performed at the liquid phase, striving against the ethylene assay weaknesses described previously.

Different ACCO concentrations were tested to confirm the linear character of the cyanide production rate (Fig. 6). To obtain steady-state kinetic values for cyanide production, experiments were performed varying ACC content while keeping all other substrates at saturation levels. For each ACC concentration, reactions were allowed to proceed for 2 min at 19 °C, samples were taken every 30 s for derivatization, and initial velocity was determined by feeding data into a linear equation fitting (Fig. 7). Nonlinear curve

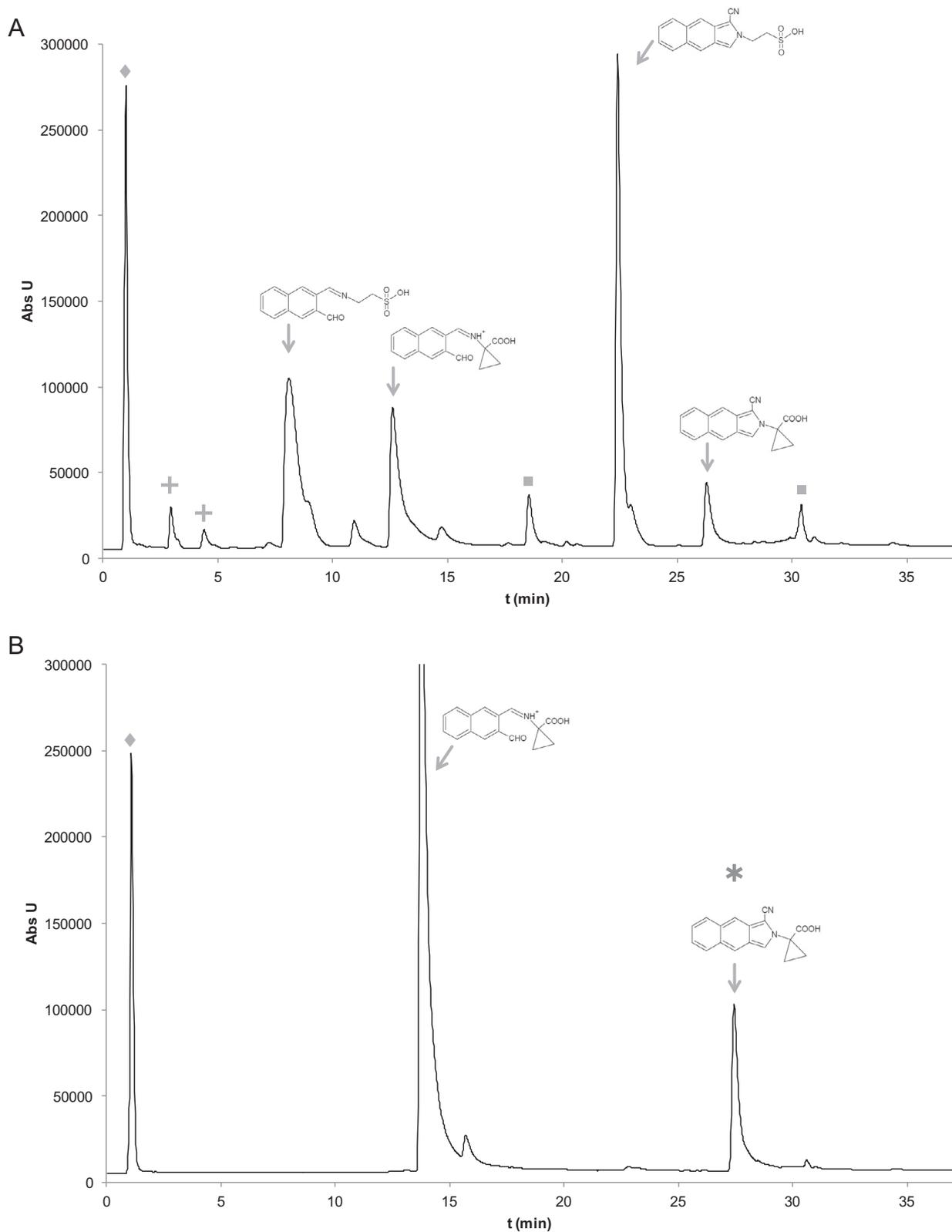


Fig.5. Fluorescent HPLC analysis of CBI from ACCO reaction supplemented with KCN derivatized with taurine and ACC (A) and derivatized with ACC (B). ◆, Adduct formed when the reaction mixture is complete; +, taurine adducts; ■, adducts formed when ACCO and taurine present in the reaction; *, CBI-ACC adduct.

fitting into the Michaelis–Menten model was performed to initial velocities using the data presented in Fig. 8, where $K_m = 0.88 \pm 0.14$ mM and $k_{cat} = 10.52 \pm 0.55$ min⁻¹ ($R^2 = 0.97$) values were obtained.

When we compared these kinetic parameters with those obtained in other experiments, we found that K_m was similar to that obtained with the oxygen consumption methodology; on the other hand, k_{cat} resembled that obtained with ethylene production

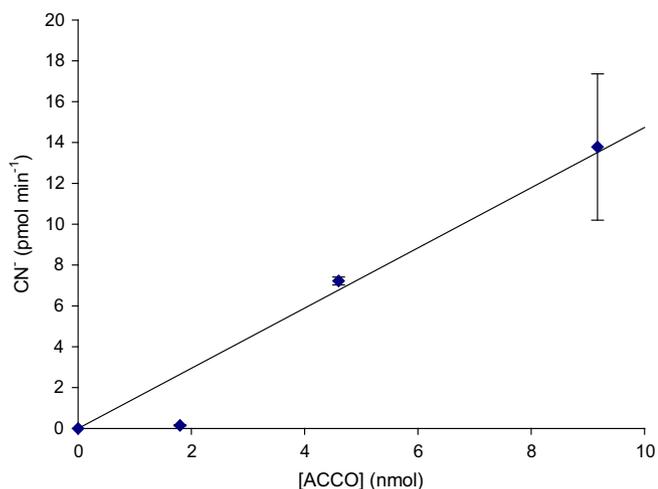


Fig. 6. Cyanide (CN⁻) production rate at different ACCO concentrations. Data were fitted to an exponential equation ($R^2 = 0.94$).

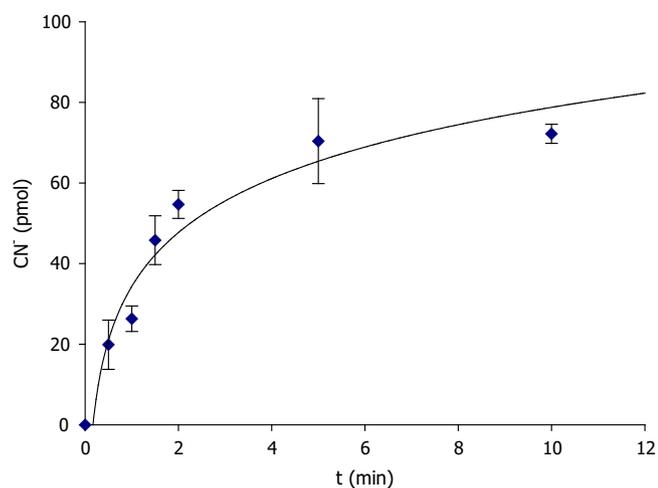


Fig. 7. Time course of the ACCO reaction at substrate excess (ACC, 5 mM). As described in the text, the linear range was established during the first 2 min of enzyme activity. Background cyanide (CN) generation in the absence of enzyme remained less than 5 pmol during all of the experiments. Data were fitted to an exponential equation ($R^2 = 0.95$).

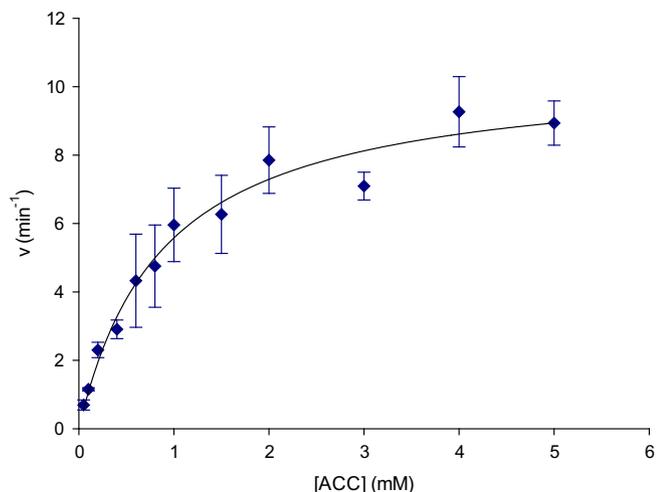


Fig. 8. Michaelis-Menten fitting for the initial velocities determined for the ACCO activity measure by cyanide production.

Table 1

Comparison of kinetic parameters among experiments.

Activity measurement	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	R^2
Cyanide production	0.88 ± 0.14	10.52 ± 0.55	0.97
Ethylene production	0.17 ± 0.07	17.45 ± 1.41	0.85
Oxygen consumption	0.60 ± 0.23	3.98 ± 0.46	0.84

analysis (Table 1). Regarding the disparity in K_m value, we suggest that it is due to differences in the reaction temperature for ethylene production, although perhaps not by stabilization of the enzyme-substrate complex. Regarding the lower k_{cat} value obtained by oxygen consumption, it is relevant to note that this measurement is obscured by the simultaneous occurrence of at least three different reactions in the vessel—enzymatic, Fenton, and electrode consumption—with most of the oxygen in the reaction depleted by side reactions before activity measurement.

Ethylene determination is further hampered by loss of the molecule through seals when stored in vessels and during handling. Our data suggest that the cyanide method is more precise, more responsive, and more stable than other methods tested here for estimating ACCO activity, looming as a robust methodology for activity estimation not only for ACCO but also for other cyanide evolving oxidoreductases. After the enzymatic reaction was stopped by EDTA addition, cyanide content was stable for up to 40 min of incubation at 19 °C before derivatization. Once derivatized, CBI content is stable for up to 1 h at room temperature.

Early reports of cyanide identification in ACCO reaction dealt with stoichiometric determinations [47]. In accordance, we found that similar amounts of products, independently measured, were released for the ACCO reaction: 17.44 ± 1.84 pmol cyanide/pmol ACCO/min and 16.53 ± 2.87 pmol ethylene/pmol ACCO/min were formed.

Acknowledgments

This project was funded by SEP-Conacyt 128156 and DGAPA IN-213010 grants. We recognize the technical support of Guadalupe Paredes Valdés, Georgina Hernández Montes, and Gloria Vázquez Castro.

References

- [1] J.A. Kent (Ed.), *Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, Springer, New York, 2007.
- [2] E. Scott, F. Peter, J. Sanders, *Biomass in the manufacture of industrial products: the use of proteins and amino acids*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (2007) 751–762.
- [3] J.A. Chemier, Z.L. Fowler, M.A. Koffas, E. Leonard, *Trends in microbial synthesis of natural products and biofuels*, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 76 (2009) 151–217.
- [4] A.-P. Zeng, H. Biebl, *Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends*, in: K. Schüger, A.-P. Zeng, J.G. Aunins, A. Bader, W. Bell, H. Biebl (Eds.), *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*, Springer, Berlin, 2002.
- [5] V.J. Lay, A.G. Prescott, P.G. Thomas, P. John, *Heterologous expression and site-directed mutagenesis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from kiwi fruit*, *Eur. J. Biochem.* 242 (1996) 228–234.
- [6] H.M. Torres Galvis, K.P. de Jong, *Catalysts for production of lower olefins from synthesis gas: a review*, *ACS Catal.* 3 (2013) 2130–2149.
- [7] C. Eckert, W. Xu, W. Xiong, S. Lynch, J. Ungerer, L. Tao, R. Gill, P.C. Maness, J. Yu, *Ethylene-forming enzyme and bioethylene production*, *Biotechnol. Biofuels* 7 (2014) 33.
- [8] N. Johansson, P. Quehl, J. Norbeck, C. Larsson, *Identification of factors for improved ethylene production via the ethylene forming enzyme in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae**, *Microb. Cell Fact.* 12 (2013) 89.
- [9] A.B. Bleecker, H. Kende, *Ethylene: a gaseous signal molecule in plants*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000) 1–18.
- [10] D.O. Adams, S.F. Yang, *Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1979) 170–174.

- [11] M. Costas, M.P. Mehn, M.P. Jensen, L. Que Jr., Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates, *Chem. Rev.* 104 (2004) 939–986.
- [12] A.M. Rocklin, K. Kato, H.W. Liu, L. Que Jr., J.D. Lipscomb, Mechanistic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: single turnover reaction, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 171–182.
- [13] L.M. Mirica, J.P. Klinman, The nature of O₂ activation by the ethylene-forming enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 1814–1819.
- [14] A. Bassan, T. Borowski, C.J. Schofield, P.E. Siegbahn, Ethylene biosynthesis by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: a DFT study, *Chemistry* 12 (2006) 8835–8846.
- [15] Z. Zhang, J.S. Ren, I.J. Clifton, C.J. Schofield, Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: the ethylene-forming enzyme, *Chem. Biol.* 11 (2004) 1383–1394.
- [16] J.N. Barlow, Z. Zhang, P. John, J.E. Baldwin, C.J. Schofield, Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase involves oxidative modifications, *Biochemistry* 36 (1997) 3563–3569.
- [17] Z. Zhang, J.N. Barlow, J.E. Baldwin, C.J. Schofield, Metal-catalyzed oxidation and mutagenesis studies on the iron(II) binding site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, *Biochemistry* 36 (1997) 15999–16007.
- [18] T. Mitchell, A.J.R. Porter, P. John, Authentic activity of the ethylene-forming enzyme observed in membranes obtained from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), *New Phytol.* 109 (1988) 313–319.
- [19] J.S. Thrower, R. Blalock III, J.P. Klinman, Steady-state kinetics of substrate binding and iron release in tomato ACC oxidase, *Biochemistry* 40 (2001) 9717–9724.
- [20] D.J. McGarvey, R.E. Christoffersen, Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 5964–5967.
- [21] J.C. Fernandez-Maculet, J.G. Dong, S.F. Yang, Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193 (1993) 1168–1173.
- [22] J.J. Smith, Z. Zhang, C.J. Schofield, P. John, J.E. Baldwin, Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, *J. Exp. Bot.* 45 (1994) 521–527.
- [23] B. Vioque, J.M. Castellano, In vivo and in vitro 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in pear fruit: role of ascorbate and inactivation during catalysis, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1706–1711.
- [24] Z. Zhang, C.J. Schofield, J.E. Baldwin, P. Thomas, P. John, Expression, purification, and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from tomato in *Escherichia coli*, *Biochem. J.* 307 (1995) 77–85.
- [25] L. Brisson, N. El Bakkali-Taheri, M. Giorgi, A. Fadel, J. Kaizer, M. Reglier, T. Tron, E.H. Ajandouz, A.J. Simaan, 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: insight into cofactor binding from experimental and theoretical studies, *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012) 939–949.
- [26] C.L. Ladner, J. Yang, R.J. Turner, R.A. Edwards, Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining, *Anal. Biochem.* 326 (2004) 13–20.
- [27] D.J. Hennessy, G.R. Reid, F.E. Smith, S.L. Thompson, Ferene—a new spectrophotometric reagent for iron, *Can. J. Chem.* 62 (1984) 721–724.
- [28] R.C. Driesener, M.R. Challand, S.E. McGlynn, E.M. Shepard, E.S. Boyd, J.B. Broderick, J.W. Peters, P.L. Roach, [FeFe]-hydrogenase cyanide ligands derived from S-adenosylmethionine-dependent cleavage of tyrosine, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49 (2010) 1687–1690.
- [29] R.G. Carlson, K. Srinivasachar, R.S. Givens, B.K. Matuszewski, New derivatizing agents for amino acids and peptides: 1. Facile synthesis of N-substituted 1-cyanobenz[*f*]isoindoles and their spectroscopic properties, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 3978–3983.
- [30] J. Thrower, L.M. Mirica, K.P. McCusker, J.P. Klinman, Mechanistic investigations of 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase with alternate cyclic and acyclic substrates, *Biochemistry* 45 (2006) 13108–13117.
- [31] A.H. Rosenberg, B.N. Lade, C. Dao-shan, S.W. Lin, J.J. Dunn, F.W. Studier, Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase, *Gene* 56 (1987) 125–135.
- [32] D. Lanneluc-Sanson, C.T. Phan, R.L. Granger, Analysis by reverse-phase high-pressure liquid chromatography of phenylisothiocyanate-derivatized 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in apple extracts, *Anal. Biochem.* 155 (1986) 322–327.
- [33] F.B. Abeles, P.W. Morgan, M.E. Saltveit Jr., Ethylene analysis and properties of the gas, in: *Ethylene in Plant Biology*, Academic Press, San Diego, 1992, pp. 14–55.
- [34] T.M. Ward, M. Wright, J.A. Roberts, R. Self, D.J. Osborne, Analytical procedures for the assay and identification of ethylene, in: J.R. Hillman (Ed.), *Isolation of Plant Growth Substances*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1978, pp. 135–151.
- [35] M.V. Miniaev, M.B. Belyakova, N.V. Kostjuk, D.V. Leshchenko, T.A. Fedotova, Non-obvious problems in Clark electrode application at elevated temperature and ways of their elimination, *J. Anal. Methods Chem.* 2013 (2013) 249752.
- [36] M.E. LeFevre, H.R. Wyssbrod, W.A. Brodsky, Problems in the measurement of tissue respiration with the oxygen electrode, *Bioscience* 20 (1970) 761–764.
- [37] G.R. Buettner, B.A. Jurkiewicz, Catalytic metals, ascorbate, and free radicals: combinations to avoid, *Radiat. Res.* 145 (1996) 532–541.
- [38] M.J. Burkitt, B.C. Gilbert, Model studies of the iron-catalysed Haber–Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction, *Free Radic. Res. Commun.* 10 (1990) 265–280.
- [39] W.H. Koppenol, The Haber–Weiss cycle—70 years later, *Redox Rep.* 6 (2001) 229–234.
- [40] S. Kurniawati, J.A. Nicell, A pseudo-steady state model of the kinetics of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 (2006) 1198–1208.
- [41] L.A. del Río, M.G. Ortega, A.L. López, J.L. Gorgé, A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode: application to the kinetic study of the pea leaf enzyme, *Anal. Biochem.* 80 (1977) 409–415.
- [42] P. De Montigny, J.F. Stobaugh, R.S. Givens, R.G. Carlson, K. Srinivasachar, L.A. Sternson, T. Higuchi, Naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1096–1101.
- [43] A. Sano, M. Takezawa, S. Takitani, Fluorometric determination of cyanide with 2,3-naphthalenedialdehyde and taurine, *Talanta* 34 (1987) 743–744.
- [44] B.K. Matuszewski, R.S. Givens, K. Srinivasachar, R.G. Carlson, T. Higuchi, N-substituted 1-cyanobenz[*f*]isoindole: evaluation of fluorescence efficiencies of a new fluorogenic label for primary amines and amino acids, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1102–1105.
- [45] D.E. Barnes, P.J. Wright, S.M. Graham, E.A. Jones-Watson, Techniques for the determination of cyanide in a process environment: a review, *Geostand. Newsl.* 24 (2000) 183–195.
- [46] P. Kaur, D. Sareen, S. Kaur, K. Singh, An efficacious “naked-eye” selective sensing of cyanide from aqueous solutions using a triarylmethane leuconitrile, *Inorg. Chem. Commun.* 12 (2009) 272–275.
- [47] J.G. Dong, J.C. Fernandez-Maculet, S.F. Yang, Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 9789–9793.