



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MAGNÉTICO
ENTRE LOS COFACTORES PQQ Y EL CÚMULO [2Fe-2S] EN LA
ENZIMA ADH DE LA BACTERIA FIJADORA DE NITRÓGENO,
Gluconacetobacter diazotrophicus POR RESONANCIA
PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA**

T E S I S

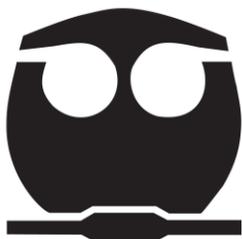
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

Lizbeth Anaid Rodríguez Cortés

CIUDAD DE MÉXICO, 2017





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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens

VOCAL: Dra. Martha Elena Sosa Torres

SECRETARIO: Dr. Alejandro Solano Peralta

1er. SUPLENTE: Q. Alan Ulises Mendieta Martínez

2do. SUPLENTE: Dr. José Carlos Páez Franco

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio 212, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, División de estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema

Dra. Martha Elena Sosa Torres

Sustentante

Lizbeth Anaid Rodríguez Cortés

A mis padres y a mis hermanas, como todo, como siempre...

*Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado
ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.*

— Marie Curie

A mi Universidad, por brindarme la oportunidad de aprender en sus aulas, a través de sus excelentes profesores

A la Dra. Martha Elena Sosa Torres, quien con todo su cariño y amor por la ciencia me introdujo al maravilloso mundo de la química bioinorgánica. Por haber creído en mí, por las discusiones llenas de aprendizaje y, sobre todo, por el tiempo que dedicó a corregir este trabajo.

Al Dr. Alejandro Solano Peralta, por haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo este proyecto. Por su disposición para aclarar dudas y sembrar ideas. Por sus atinados regaños y consejos.

Al Dr. Juan Pablo Saucedo Vázquez, por el tiempo, los consejos y las valiosas enseñanzas.

A la M. en C. Laurel Elidé Fábila Ibarra, por su apoyo incondicional en la realización de diversos procedimientos del procedimiento experimental.

Al Dr. Leobardo Serrano y al M. en C. Mario Cano por su apoyo y las facilidades que nos brindaron durante nuestra corta estancia en el Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM.

A mi familia, principal motor de mi vida, por creer en mí, por cobijarme e impulsarme siempre a cumplir mis metas, por su paciencia y cariño incondicional. A mis padres, quienes me han enseñado, con su ejemplo de vida digna y congruentes ideales, que todo es posible. A mis hermanas, Fátima y Brenda, por nunca soltarme y permanecer a mi lado en todo momento. Por las risas y las pláticas en las que me demostraron que no siempre se aprende del hermano mayor. Y aunque ahora estés allá y yo aquí, tu entusiasmo, generosidad, constancia y dedicación, seguirán siendo mi guía. ¡Lo hice!

A los integrantes del laboratorio 212, especialmente a Daniel y Alfonso, quienes han hecho de mi estadía una aventura única e inolvidable. Todas las risas, historias y momentos maravillosos permanecerán en mi memoria a pesar del inexorable paso del tiempo.

A Pedro David, por su amistad, compañerismo y complicidad a lo largo de este proyecto. Por los juegos de mesa, las películas, los chistes y las risas con las que matamos el tiempo y sobrevivimos a los largos procesos de purificación. Por la increíble persona que es, por su sonrisa franca y palabra certera.

A Malinali, por estar conmigo en los momentos más difíciles, gracias por todo tu cariño, apoyo y amistad incondicional amiga.

A Luis, por el maravilloso ser humano que es, por su apoyo incondicional en el ámbito académico y personal. Gracias por tu amistad, es de lo más valioso que tengo, por ayudarme a soñar con los pies en la tierra, por no dejar que me rindiera aun cuando el panorama no era el mejor.

Glosario de términos y abreviaturas

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Adenosíntrifosfato
<i>B</i>	Campo magnético
<i>E</i>	Energía
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
<i>g</i>	Factor espectroscópico o factor de desdoblamiento de Landé
<i>g_x, g_y, g_z</i>	Componentes <i>en x, y, z</i> del tensor- <i>g</i> .
<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
GDH	Glucosa deshidrogenasa
GADH	Gluconato deshidrogenasa
2KGDH	2-ceto-gluconato deshidrogenasa
<i>h</i>	Constante de Planck (6.63×10^{-34} J·s)
<i>I</i>	Espín nuclear
<i>J</i>	Constante de acoplamiento de intercambio
kDa	Kilodaltones
<i>m_s</i>	Momento de espín
<i>M</i>	Magnetización
NAD(P)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PQQ	Pirroloquinolina quinona
PQQ•	Radical semiquinona
PQQH ₂	Pirroloquinolina quinona reducida
PQQ-ADH	Alcohol deshidrogenasa dependiente de PQQ
RPE	Resonancia Paramagnética electrónica
<i>S</i>	Espín total
SUI	Subunidad I
SUII	Subunidad II
UQ	Ubiquinona
UQH ₂	Ubiquinona reducida
UV-Vis	Ultravioleta visible
[2Fe-2S] ⁺	Cúmulo tipo ferredoxina en estado reducido
<i>T</i>	Temperatura
<i>T₁</i>	Tiempo de relajación espín-red

Glosario de términos y abreviaturas

T_2	Tiempo de relajación espín-espín
μ_e	Momento magnético del electrón
ϵ	Coefficiente de absorptividad molar
λ	Longitud de onda
H	Campo magnético
μ_{ef}	Momento magnético efectivo
χ	Susceptibilidad magnética
k	Constante de velocidad
C	Constante de Curie
θ	Constante de Weiss
β	Magnetón de Bohr (9.2740×10^{-24} J/T)
\hat{s}	Operador de momento angular de espín
P1/2	Potencia media de saturación
\hat{H}_{HDV}	Hamiltoniano Heisenberg-Dirac-van Vleck

Contenido

Introducción	1
1. Antecedentes.....	3
1.1 Bacterias ácido acéticas	3
1.1.1 Taxonomía y fisiología de las bacterias ácido acéticas.....	3
1.1.2 Metabolismo y respiración de las bacterias ácido acéticas	6
1.1.2.1 Cadena respiratoria de las bacterias ácido acéticas	9
1.1.2.2 Oxidación de azúcares	9
1.1.2.3 Oxidación de alcoholes.....	11
1.1.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno dentro de la familia Acetobacteraceae	15
1.2 Gluconacetobacter diazotrophicus	16
1.2.1 Metabolismo y cadena respiratoria de Gluconacetobacter diazotrophicus.....	17
1.3 Fundamentos magnetismo.....	19
1.4 Fundamentos de RPE.....	25
1.5 Alcohol deshidrogenasa de Ga. diazotrophicus	30
1.5.1 Cofactores presentes en la alcohol deshidrogenasa de Ga. diazotrophicus.....	32
1.5.1.2 Pirroloquinolina quinona (PQQ)	32
1.5.1.3 Cúmulos [2Fe-2S].....	34
1.5.1.4 Hemos tipo c.....	37
1.5.2 Propiedades magnéticas de los cofactores presentes en la PQQ-ADH de Ga. diazotrophicus	40
1.5.2.1 Pirroloquinolina Quinona PQQ.....	40
1.5.2.2 Cúmulo [2Fe-2S]	41
1.5.3 RPE de los cofactores presentes en la PQQ-ADH de Ga. diazotrophicus.....	42
1.5.3.1 RPE de las proteínas Fe-S.....	42
1.4.2 RPE de los hemos tipo c.....	44
2. Objetivos.....	51
2.1 Objetivo general	51
2.2 Objetivos particulares.....	51
3. Procedimiento experimental.....	53
3.1 Crecimiento de la bacteria Ga. diazotrophicus	53

3.1.1 Medios de cultivo	53
3.1.3 Condiciones de crecimiento en el laboratorio	53
3.1.4 Condiciones de crecimiento en el biofermentador.....	54
3.1.5 Tinción de Gram	55
3.2 Obtención de membranas	55
3.2.1 Buffers empleados en la obtención de membranas	55
3.2.2 Lavado de células.....	56
3.2.3 Lisis celular y solubilización de la fracción membranal.....	56
3.3 Purificación de la enzima PQQ-ADH mediante cromatografía en columna	57
3.3.1 Buffers empleados en la purificación de la enzima PQQ-ADH.....	58
3.3.2 Columna QAE.....	58
3.3.3 Columna DEAE	58
3.3.4 Columna Ha	59
3.3.5 Columna S-100.....	59
3.4 Caracterización molecular	60
3.4.1 Buffers y disoluciones empleados.....	60
3.4.2 Electroforesis (SDS-PAGE)	61
3.5 Ensayos enzimáticos	62
3.5.1 Disoluciones empleadas	62
3.5.1.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry	62
3.5.2 Cuantificación de la actividad enzimática de alcohol deshidrogenasa	64
3.6 Caracterización espectroscópica	64
3.6.1 Espectroscopia de UV-Vis.....	64
3.6.2 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE)	64
4. Resultados y discusión.....	67
4.1 Crecimiento de la bacteria <i>Ga. diazotrophicus</i>	67
4.1.1 Tinción de Gram	69
4.2 Purificación de la proteína PQQ-ADH mediante cromatografía en columna.....	69
4.3 Caracterización espectroscópica	72
4.3.1 Espectroscopia de UV-Vis.....	72
4.3.2 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE)	73
4.6.2.1 Estudios RPE a temperatura variable	76
4.6.2.2 Estudios de saturación progresiva.....	82

Índice

Conclusiones.....	90
Referencias	92

Introducción

En el presente documento, se exponen los resultados de un trabajo de investigación enfocado al estudio de la interacción magnética entre los cofactores PQQ y el cúmulo [2Fe-2S] presentes en la enzima PQQ-ADH de la bacteria *Ga. diazotrophicus*.

En el capítulo 1, se detalla el sistema en estudio, el campo de aplicación del magnetismo molecular en sistemas biológicos, así como algunos fundamentos de RPE y su aplicación para determinar interacciones magnéticas entre cofactores, en los denominados centros activos de las proteínas, donde usualmente ocurre la transferencia de electrones o la catálisis redox.

En el capítulo 2, se plantea el objetivo general del proyecto del cual se desglosan los objetivos particulares necesarios para este fin.

En el capítulo 3, se describe detalladamente el procedimiento experimental y la metodología modificada para potenciar el crecimiento de la bacteria *Ga. diazotrophicus*, de la cual se obtiene la enzima PQQ-ADH completamente activa para su posterior caracterización molecular y espectroscópica.

En el capítulo 4, se exponen y discuten los resultados obtenidos a lo largo del proyecto. En primera instancia se dan los resultados del crecimiento de la bacteria empleando la metodología modificada, posteriormente se presentan los resultados de la purificación de la enzima PQQ-ADH y finalmente, se proporcionan los resultados de los estudios de RPE a temperatura variable y de saturación progresiva de microondas, los cuales proporcionan información sobre el ambiente magnético entre los cofactores de la PQQ-ADH.

El capítulo 5, reúne las conclusiones formuladas a partir de los resultados obtenidos con base en los objetivos planteados.

Capítulo 1

Antecedentes

1. Antecedentes

1.1 Bacterias ácido acéticas

Las bacterias ácido acéticas comprenden un extenso grupo monofilético dentro de la familia *Acetobacteraceae*, perteneciente al orden *Rhodospirillales* como parte de la *alfaproteobacteria* [1]. Son bacilos Gram-negativos, no formadores de esporas, su tamaño varía entre 0.4 a 1 μm , siendo aerobios estrictos, su metabolismo es principalmente oxidativo teniendo al oxígeno como aceptor final en la cadena respiratoria [2]. Pueden moverse debido a la presencia de flagelos peritricos o polares. El intervalo de pH óptimo de crecimiento es 5 - 6.5, aunque también son capaces de crecer en medios ácidos con valores de 3 y 4 [3].

Poseen una pronunciada tendencia a oxidar incompletamente una gran variedad de azúcares y alcoholes para producir los ácidos correspondientes, este proceso es conocido como “fermentación oxidante”, el sustrato es oxidado por deshidrogenasas de membrana y el producto es liberado al medio [4]. Uno de los procesos más importantes que llevan a cabo es la oxidación de etanol a ácido acético [5].

1.1.1 Taxonomía y fisiología de las bacterias ácido acéticas

Este tipo bacterias han sido ampliamente estudiadas, en un principio, la taxonomía de dichos microorganismos resaltó ciertos criterios morfológicos y fisiológicos. Una de las primeras clasificaciones que se utilizó fue el uso de flagelos [6].

En 1898 Beijerinck estableció el género *Acetobacter* y la especie *Acetobacter aceti* fue afiliada a él. Años más tarde, en 1935 el género *Gluconobacter* es propuesto por Asai [7], aunque el hecho de que sus artículos estuviesen escritos en japonés limitó su difusión, y las bacterias incluidas en este género eran capaces de oxidar, preferencialmente, glucosa a ácido glucónico

[8]. Asimismo, las especies provistas de flagelos polares fueron asignadas al género *Gluconobacter* mientras que aquellas con flagelos peritricos se clasificaron en el género *Acetobacter* [6] (figura 1.1).

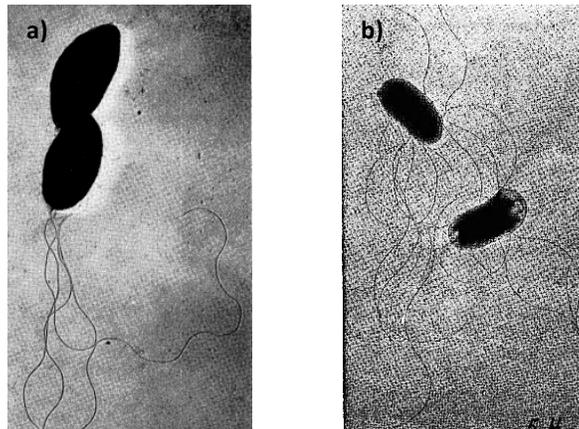


Figura 1.1 Micrografías electrónicas de *Gluconobacter* y *Acetobacter*. a) Flagelos polares de *Gluconobacter suboxydans*. b) Flagelos peritricos de *Acetobacter aceti* [9].

Posteriormente, en 1954, Leifson propone el género *Acetomonas* para cepas dotadas con flagelos polares e incapaces de llevar a cabo la oxidación de acetato [6]. La propuesta de los términos genericos, *Acetomonas* y *Gluconobacter*, provocó cierta confusion sobre microorganismos similares, no obstante, la prioridad del nombre *Gluconobacter* sobre *Acetomonas* se reconoció y *Gluconobacter oxydans* fue asignada como especie típica de este género [10].

Treinta años más tarde, 1984, *Acetobacter* fue dividido en dos subgéneros: *Acetobacter* y *Gluconoacetobacter*, provocando un cambio importante en la taxonomía de la familia *Acetobacteraceae*. Sin embargo, en el año 1998 se modificó nuevamente la taxonomía y *Gluconoacetobacter* fue reconocido como un género independiente [8].

La principal diferencia fisiológica entre estos géneros fue la capacidad de las especies *Acetobacter* para oxidar etanol a ácido acético y posteriormente, la oxidación de este último a CO₂ y agua mientras que las especies del género *Gluconobacter* no eran capaces de completar

la oxidación del ácido acético [11]

La presencia mayoritaria de distintos tipos de ubiquinona en estos sistemas sugirió otra característica importante. Las especies del género *Gluconobacter* con ubiquinona Q-10 (UQ₁₀) fueron claramente distinguibles de *Acetobacter*, con ubiquinona Q-9 (UQ₉) [12]. Mientras que, cultivos con prevalencia de Q-8 (UQ₈) y flagelos polares fueron clasificados como un nuevo género, *Frauteria aurantia* [13].

Debido a un estudio quimiotaxonómico, en 1984, se propone la presencia de un nuevo subgénero, *Gluconoacetobacter* (años más tarde corregido a *Gluconacetobacter*), dentro de *Acetobacter* [14]. Otro de los aspectos que debe resaltarse es la propuesta del género *Acidomonas*, para bacterias capaces de asimilar metanol, teniendo a *Acidomonas methanolicus* como especie típica [15]. Sin embargo, dichas modificaciones taxonómicas no fueron reconocidas hasta que, en 1997, Yamada y colaboradores realizaron un estudio filogenético, analizando las secuencias parciales del rRNA 16S, consiguiendo evidenciar la existencia del género *Acidomonas*, así como, elevar el subgénero *Gluconacetobacter* a nivel de género [16].

Este último fue dividido en dos grupos de acuerdo con una nueva caracterización fenotípica; el grupo de *Gluconacetobacter xylinus* y el de *Gluconacetobacter liquefaciens*. Durante la última década han sido integrados nuevos géneros al grupo de las bacterias ácido acéticas, tal es el caso de *Komagatabacter* cuya especie típica es *Komagatabacter xylinus* [17], generando un dramático cambio en la taxonomía.

Actualmente la familia *Acetobacteraceae* está conformada por 32 géneros divididos en un grupo acético y un grupo acidofílico, 16 géneros en cada grupo. En el primero se encuentran las bacterias ácido acéticas (*Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Endobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Neokomagataea*, *Nguyenibacter*, *Saccharibacter*, *Swaminathania* y *Tanticharoenia*), mientras que el segundo está integrado por géneros acidofílicos y neutrofílicos [8].

1.1.2 Metabolismo y respiración de las bacterias ácido acéticas

Generalmente, las bacterias ácido acéticas se desarrollan en hábitats que contienen una alta concentración de fuentes de carbono [2]. Su potencial metabólico se ve reflejado en la oxidación parcial de alcoholes y azúcares para obtener productos de valor agregado. Aunque suelen caracterizarse por la producción de ácido acético, a partir de etanol, también son capaces de oxidar glicerol a dihidroxiacetona, D-glucosa a los ácidos D-glucónico, 2-ceto-D-glucónico y 5-ceto-D-glucónico, D-manitol a D-fructosa y D-sorbitol a L-sorbosa [7].

El conjunto de reacciones por las cuales se lleva a cabo dicho proceso metabólico es conocido como *fermentación oxidante*, esta implica la oxidación incompleta del sustrato acompañada por la acumulación de grandes cantidades del producto de oxidación correspondiente en el medio de cultivo [18]. Por su naturaleza el O_2 es requerido, su disponibilidad repercutiría en la velocidad de la fermentación y, por ende, en su productividad [4].

Dos sistemas enzimáticos son capaces de efectuar las reacciones de deshidrogenación. Ambos difieren en ubicación y función dentro de la célula. Las denominadas vías oxidativas directas implican la fosforilación no oxidativa de azúcares, polioles, alcoholes alifáticos y cíclicos para un rendimiento casi cuantitativo.

Este tipo de reacciones son catalizadas por deshidrogenasas localizadas en el espacio periplásmico de la membrana citoplásmica de las bacterias y están directamente acopladas a la cadena respiratoria, los electrones son transferidos al oxígeno, aceptor final, generando bioenergía durante la oxidación del sustrato para el crecimiento de la bacteria. Dependiendo del grupo prostético que posean, pirroloquinolina quinona (**PQQ**) y flavina adenina dinucleótido (**FAD**), se pueden clasificar en quinoproteínas y flavoproteínas, respectivamente [7, 19, 20].

Para el segundo sistema enzimático, se requiere la captación del sustrato en la célula. Los

Antecedentes

sustratos son oxidados por enzimas citoplásmicas dependientes de NAD(P)^+ y los intermediarios resultantes son fosforilados y, además metabolizados a través de la vía de las pentosas fosfato.

En las últimas décadas se han identificado y caracterizado una serie de deshidrogenasas de membrana involucradas en la oxidación de sustratos (Tabla 1). Siendo las más importantes glucosa, alcohol, aldehído, sorbitol y glicerol deshidrogenasas, las cuales poseen pirroloquinolina quinona (PPQ) como grupo prostético [21, 20]

Tabla 1.1 Deshidrogenasas presentes en bacterias ácido acéticas [7].

Deshidrogenasas	Sustrato	Producto	Subunidades y grupo prostético	Especies
Alcohol deshidrogenasa	Etanol	Acetaldehído	72 Kd (PQQ/hemo c) 48 Kd (3 hemos c), ≈ 15 Kd	<i>G. suboxydans</i> <i>A. aceti</i>
Aldehído deshidrogenasa	Acetaldehído	Ácido acético	84 Kd (¿F-S /molibdopterina, citosina dinucleótido?), 49 Kd (3 hemos c), ≈ 17 Kd	<i>G. oxydans</i> <i>A. Polyoxogenes</i> <i>A. europaeus</i>
Glucosa deshidrogenasa	D-glucosa	D-glucono-δ-lactona	80 Kd (PQQ)	<i>G. oxydans</i>
Gluconato deshidrogenasa	D-gluconato	2-ceto-D-gluconato	64 Kd (FAD), 45 Kd (3 hemos c) ≈ 21 Kd	<i>G. dioxyceticus</i>
2-ceto-D-gluconato deshidrogenasa	2-ceto-D-gluconato	2,5-diceto-D-guconato	61 Kd (FAD), 47 Kd (3 hemos c) ≈ 25 Kd	<i>G. melanogenus</i>
D-fructosa deshidrogenasa	D-fructosa	5-ceto-D-fructosa	67 Kd (FAD), 51 Kd (3 hemos c) ≈ 20 Kd	<i>G. industrius</i>
L-sorbosa-5-deshidrogenasa	L-sorbosa	5-ceto-D-fructosa		<i>G. suboxydans</i>
L-sorbosa-1-deshidrogenasa	L-sorbosa	L-sorbosona	58 Kd (FAD)	<i>G. oxydans</i> <i>G. melanogenus</i>
L-sorbosa deshidrogenasa	L-sorbosona	2-ceto-L-gluconato	48 Kd	
Sorbitol deshidrogenasa	D-sorbitol	L-sorbosa	63 Kd (FAD), 51 Kd (3 hemos c) ≈ 17 Kd	<i>G. oxydans</i>
Glicerol deshidrogenasa	Glicerol, meso-eritrol, D-arabitol, D-sorbitol, etc.	Dihidroxiacetona, L-eritrosa, D-xilulosa, L-sorbosa, etc.	80 Kd (FAD), ≈ 14 Kd	<i>G. oxydans</i> <i>G. industrius</i>

1.1.2.1 Cadena respiratoria de las bacterias ácido acéticas

El hecho de que las bacterias ácido acéticas sean Gram-negativas implica que la fracción membranal está constituida por una membrana citoplásmica interna y una externa. En general, los componentes de la cadena respiratoria de este tipo de microorganismos están localizados en la membrana citoplásmica. En la figura 1.2 se puede observar que la cadena respiratoria de las bacterias ácido acéticas está conformada por una serie de deshidrogenasas primarias y ubiquinol oxidasas terminales conectadas mediante ubiquinona (UQ). Dos tipos de ubiquinona pueden estar presentes en las bacterias ácido acéticas, esto dependerá del género, ubiquinona-9 (UQ₉) en *Acetobacter* y ubiquinona-10 (UQ₁₀) para *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Acidomonas* [19, 22].

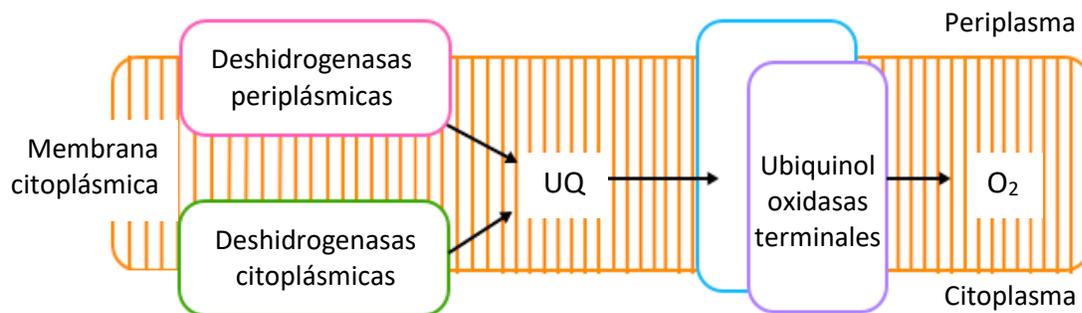


Figura 1.2 Cadena respiratoria de las bacterias ácido acéticas [22].

1.1.2.2 Oxidación de azúcares

En su mayoría, las bacterias aeróbicas suelen oxidar sus fuentes de carbono completamente a CO₂ y H₂O, únicamente bajo ciertas condiciones de crecimiento algunos microorganismos presentan una oxidación incompleta, especialmente cuando existe una alta disponibilidad de nutrientes en el medio. Por el contrario, las bacterias ácido acéticas realizan una oxidación incompleta de sustratos aún en condiciones normales de crecimiento, depositando los ácidos correspondientes en el medio [1].

Especies de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* carecen de la ruta metabólica Embden-Meyerhof-Parnas para llevar a cabo la oxidación de diversos azúcares [7]. Sin embargo, la ruta Entner-Doudoroff únicamente se muestra activa en cepas *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* que se encuentren sintetizando celulosa [23]. Por otra parte, los azúcares pueden ser metabolizados a CO₂ y H₂O por especies del género *Acetobacter*, de igual manera, éstas son capaces de efectuar una oxidación sobre ácido acético y otros ácidos orgánicos, denominada sobreoxidación de acetato, mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En contraste, las cepas de *Gluconobacter* no poseen un ciclo de ácidos tricarboxílicos funcional debido a deficiencias de dos enzimas clave; α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, siendo incapaces de metabolizar cualquier ácido orgánico. La vía de las pentosas fosfato ha sido reportada como la única ruta oxidativa terminal en especies de este género [21, 24, 25, 26].

A pesar de que existen enzimas dependientes de NAD(P)⁺ en el citoplasma como la D-glucosa deshidrogenasa y 2-ceto-D-gluconato reductasa, son las enzimas independientes de NAD(P)⁺ las que realmente están involucradas en la oxidación directa de la D-glucosa a D-gluconato, a 2-ceto-D-gluconato, y posteriormente a 2,5-diceto-D-gluconato. Tales oxidaciones son llevadas a cabo mediante las proteínas de membrana glucosa deshidrogenasa (GDH), gluconato deshidrogenasa (GADH) y 2-ceto-gluconato deshidrogenasa (2KGDH), respectivamente (figura 1.3) [22]. Enzimas como GDH y GADH no se encuentran únicamente en las bacterias de ácido acético, se han encontrado en una gran variedad de proteobacterias incluyendo aerobios estrictos y anaerobios facultativos sin embargo, 2KGDH únicamente está presente en especies del género *Gluconobacter* [19] (figura 1.3).

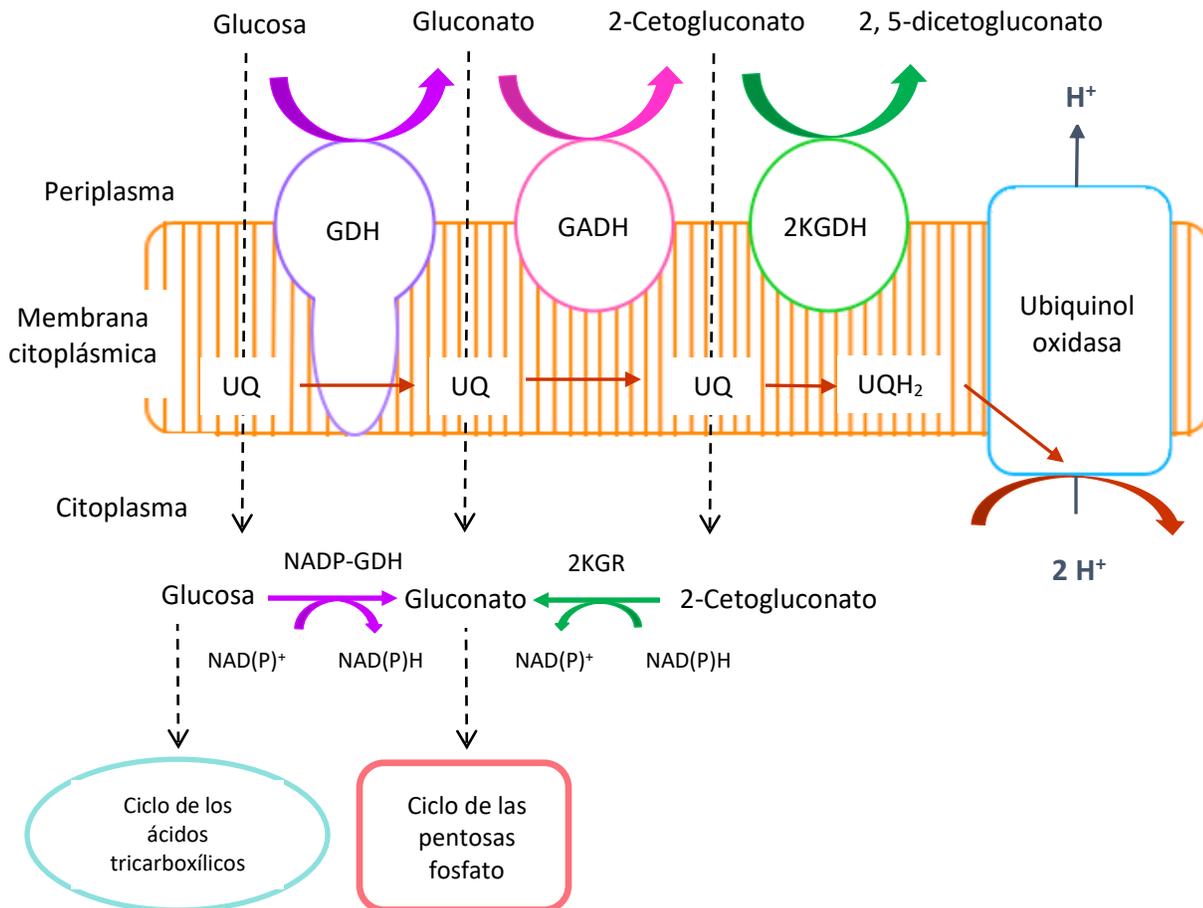


Figura 1.3 Oxidación de glucosa en las bacterias ácido acéticas. *GHD* glucosa deshidrogenasa, *GADH* gluconato deshidrogenasa y *2KGDH* 2-ceto-gluconato deshidrogenasa se localizan en la superficie de la membrana citoplásmica y funcionan como deshidrogenasas primarias de la cadena respiratoria. *NAD(P)-GDH* glucosa deshidrogenasa dependiente de NAD(P)^+ y *2KGR* 2-ceto-gluconato reductasa están situadas en el citoplasma e intervienen en la asimilación del sustrato [19, 22].

1.1.2.3 Oxidación de alcoholes

Existen diversas enzimas oxidorreductasas capaces catalizar la oxidación de alcoholes y se pueden clasificar en tres grupos (figura 1.4) [27]:

1. Alcohol deshidrogenasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) (NAD(P))

- Alcohol deshidrogenasas que emplean pirroloquinolino quinona (PQQ) como prostético y algunos grupos hemo tipo c. Estas son conocidas como quinoproteínas.
- Alcohol deshidrogenasas que contienen flavina adenina dinucleótido (FAD)

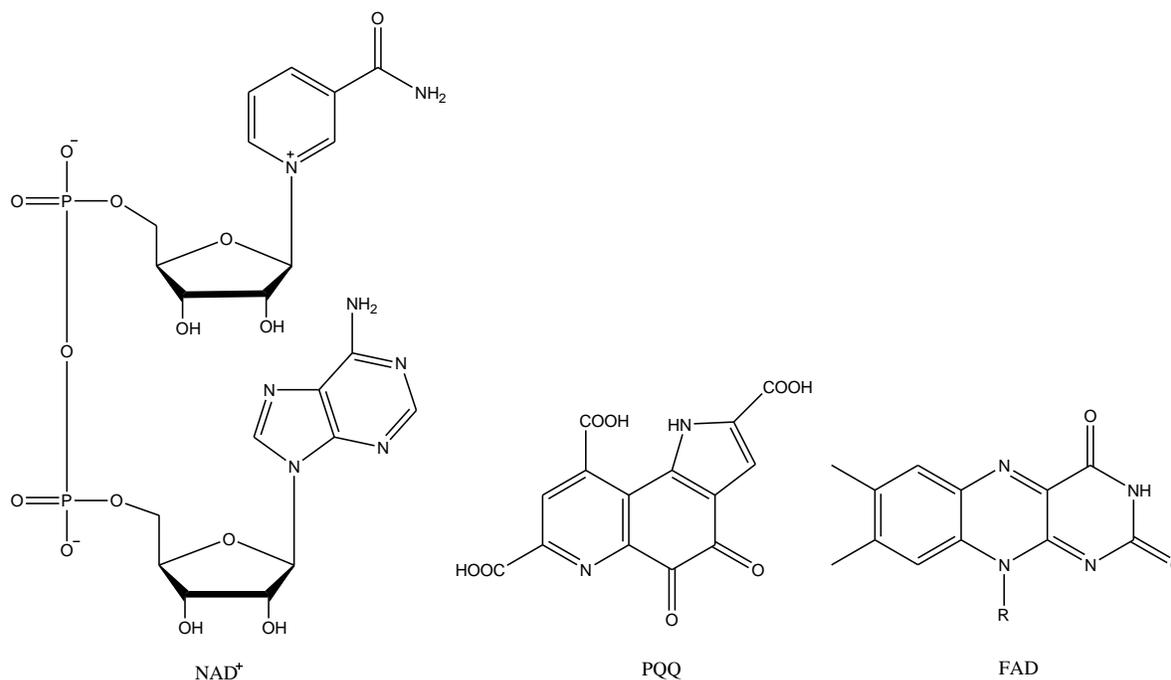


Figura 1.4. Cofactores de las enzimas oxidorreductasas capaces de catalizar la oxidación de alcoholes.

Debido a su notable capacidad para oxidar etanol a ácido acético y la alta resistencia al mismo, especies de los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* son utilizadas para la producción industrial de vinagre, ejemplo típico de la fermentación oxidante. El mecanismo molecular de la oxidación del etanol ha sido ampliamente investigado y se ha establecido que se lleva a cabo mediante dos reacciones sucesivas, catalizadas por las deshidrogenasas de membrana dependientes de PQQ; alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH) [22].

Los complejos ADH y ALDH están estrechamente ligados a la cadena respiratoria, la cual transfiere electrones a través de la ubiquinona (UQ) y una ubiquinol oxidasa terminal al oxígeno, aceptor final de electrones, lo que resulta en la formación de agua y una fuerza motriz

de protones, necesarios para la producción de energía a través de una ATPasa unida a la membrana [24, 22].

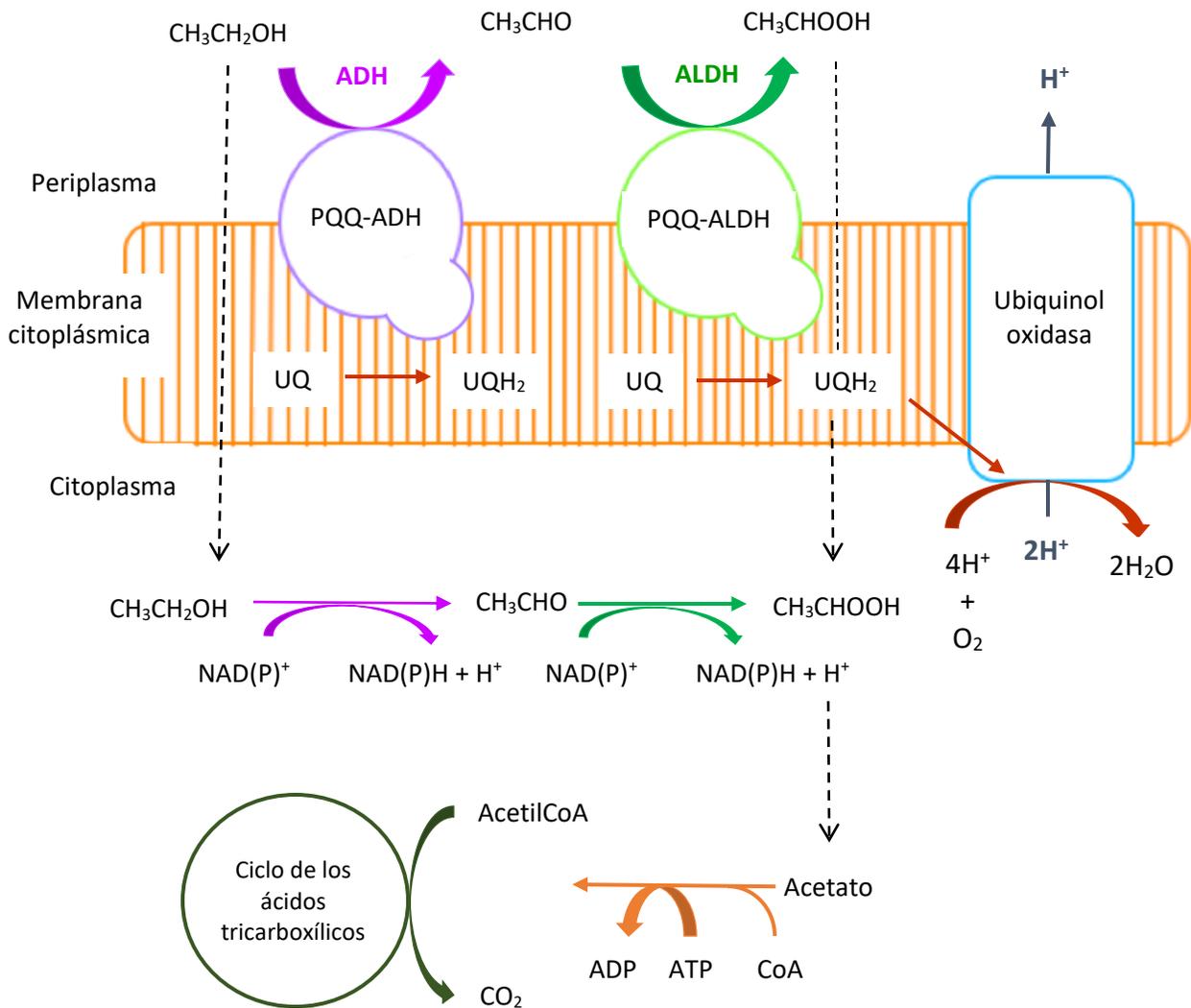
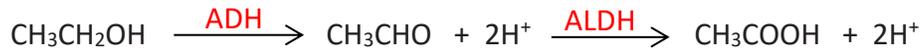


Figura 1.5 Oxidación de alcoholes en las bacterias ácido acéticas [22]

La oxidación completa del sustrato (específicamente etanol) ocurre a nivel del citoplasma por medio de deshidrogenasas dependientes de NAD(P)⁺ (NAD(P)-ADH y NAD(P)-ALDH), el ácido

acético resultante puede ser utilizado por la acetil CoA sintasa para ser ingresado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (figura 1.5) [4, 24]. Con base en experimentos realizados con mutantes de especies *Acetobacter* carecientes de ADH de membrana, ha sido posible probar que la expresión de las enzimas ADH y ALDH dependientes de NAD(P)⁺ incrementa considerablemente en presencia de etanol sin que la producción de ácido acético sea observable, comprobando así que las deshidrogenasas citoplásmicas utilizan el etanol únicamente como fuente de carbono, mientras que las enzimas periplásmicas se ven involucradas directamente en la producción de ácido acético [28].

Las alcohol deshidrogenasas dependientes de PQQ de muchas bacterias ácido acéticas se encuentran tanto en el espacio periplásmico como unidas a la membrana citoplásmica. Éstas se pueden clasificar en tres tipos [29]:

- *PQQ-ADH de tipo I*, posee dos subunidades, generalmente solubilizadas en el periplasma y contiene PQQ como único grupo prostético. La enzima mejor caracterizada de este tipo es la metanol deshidrogenasa de *Methylobacterium extorquenses*.
- *PQQ-ADH de tipo II*, la enzima es un monómero que contiene dos grupos prostético; un hemo tipo c y un PQQ.
- *PQQ-ADH de tipo III*, estas deshidrogenasas se encuentran unidas a la membrana y son específicas de las bacterias ácido acéticas. Generalmente pueden estar formadas por tres subunidades, la subunidad I (de 72-80 kDa) contiene un PQQ y un hemo tipo c. La subunidad II (de 45 a 55 kDa) posee tres hemos tipo c y la subunidad III (de 8 a 16 kDa) es la más pequeña y ayuda mantener asociadas a las subunidades funcionales (I y II) a la membrana, además de contribuir a la conformación correcta de la ADH para una transferencia electrónica funcional [30]

Diversas PQQ-ADHs han sido purificadas a partir de distintos géneros de bacterias ácido acéticas; *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* y *Acidomonas* (tabla 1.2). Suelen estar formadas por tres subunidades, a excepción de las ADHs de los géneros *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*.

Tabla 1.2 PQQ-ADHs de diversos géneros de bacterias ácido acéticas [31].

Especie	Masas moleculares de las subunidades (kDa)		
	I	II	III
<i>A. lovaniensis</i>	72	50	15
<i>A. pasteurianus</i>	72	44	20
<i>Ga. diazotrophicus</i>	71	44	-
<i>G. europaeus</i>	72	45	-
<i>G. intermedius</i>	72	45	-
<i>G. xylinus</i>	71	44	-
<i>G. oxydans</i>	85	49	14
<i>A. methanolica</i>	80	54	8

1.1.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno dentro de la familia *Acetobacteraceae*

Históricamente las bacterias ácido acéticas han sido ampliamente estudiadas debido a su capacidad para oxidar sus fuentes de carbono, generando productos altamente valorados a nivel industrial. Aunado a esto, algunos géneros de la familia *Acetobacteraceae* son capaces de fijar nitrógeno.

En un principio parecía que esta característica estaba restringida solamente a tres géneros; *Gluconacetobacter* (*Gluconacetobacter johannae* y *Gluconacetobacter azotocaptans*) [32], *Swaminathania* (*Swaminathania salitolerans*) [33] y *Acetobacter* (*Acetobacter nitrogenifigens*

[34] y *Acetobacter peroxydans* [35]). Recientemente se han reportado especies de los géneros *Asaia* (*Asaia bogorensis* y *Asaia siamensis*) [36] y *Nguyenibacter* (*Nguyenibacter vanlangensis*) capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno [7, 37, 38].

La primera bacteria ácido acética reportada como fijadora de nitrógeno fue *Ga. diazotrophicus* [39, 40]. A diferencia de otros diazotrofos cuyo crecimiento es anulado a valores de pH menores a 5, *Ga. diazotrophicus* logra crecer aún en condiciones ácidas (pH 3) [41]. Además, es capaz de excretar cerca del 50 % del nitrógeno fijado [42]. A pesar de carecer de la nitrato reductasa, la fijación de nitrógeno es viable aún en presencia de NO_3^- (25 mM) [43] y a altas concentraciones de sacarosa (30 %) [39, 44], indicando una adaptación para crecer dentro de la caña de azúcar [45]. Únicamente ocurre una inhibición parcial en la actividad de la nitrogenasa en presencia de NH_4^+ (20 mM) y algunos aminoácidos [46, 47].

1.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Fue aislada por primera vez en 1988 a partir de raíces y tallos de la caña de azúcar en diversas regiones de Brasil, por Johanna Döbereiner y Vladimir Cavalcante (figura 1.6) [39]. En un principio recibió el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans*, pero en 1989 fue renombrada como *Acetobacter diazotrophicus* (posteriormente corregido a *Gluconacetobacter diazotrophicus*) [40]. A pesar de ser descrita como una bacteria endófito de la caña de azúcar, tolerante al ácido y capaz de llevar a cabo la FBN, también se ha encontrado en cultivos de café [48], piña [49], rábano, raíces de remolacha [50], arroz [51] y plátano [52].

Es un bacilo Gram negativo provisto de flagelos peritricos, mide entre 0.7-0.9 μm y 2 μm de longitud. Puede verse al microscopio solo o formando cadenas [52]. Su temperatura y pH óptimos de crecimiento son 30 °C y pH 5.5, no crece a pH 7 aunque en condiciones de FBN crece hasta en pH 3. Es capaz de utilizar diversos sustratos como fuentes de carbono; glucosa, sacarosa, galactosa, fructosa, etanol, manitol, glicerol, entre otros [39].

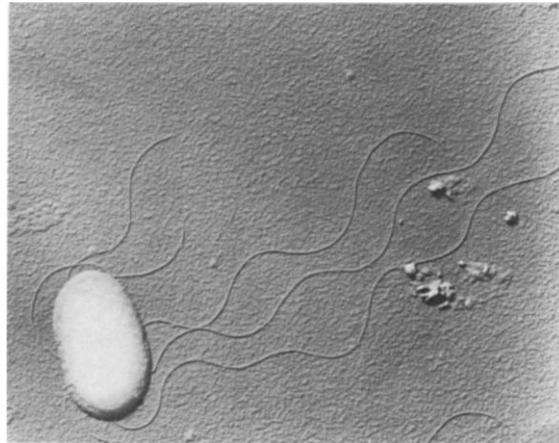


Figura 1.6 Micrografía electrónica de *Ga. diazotrophica* [39].

1.2.1 Metabolismo y cadena respiratoria de *Gluconacetobacter diazotrophica*

Al igual que la mayoría de las bacterias ácido acéticas, *Ga. diazotrophica* posee diversas deshidrogenasas de membrana (quinoproteínas y flavoproteínas). Algunas se encuentran orientadas hacia el periplasma (PQQ-GDH, PQQ-ADH y PQQ-ALDH) y otras hacia el citoplasma (enzimas dependientes de NADH). Dichas deshidrogenasas están acopladas a la cadena respiratoria mediante la UQ₁₀, (véase 1.1.2 Metabolismo y respiración de las bacterias ácido acéticas), asegurando el flujo de electrones para la síntesis de ATP requerido y el consumo de oxígeno [53]. La UQ₁₀ actúa como el pozo de electrones que posteriormente serán transferidos a las oxidasas terminales presentes (figura 1.7).

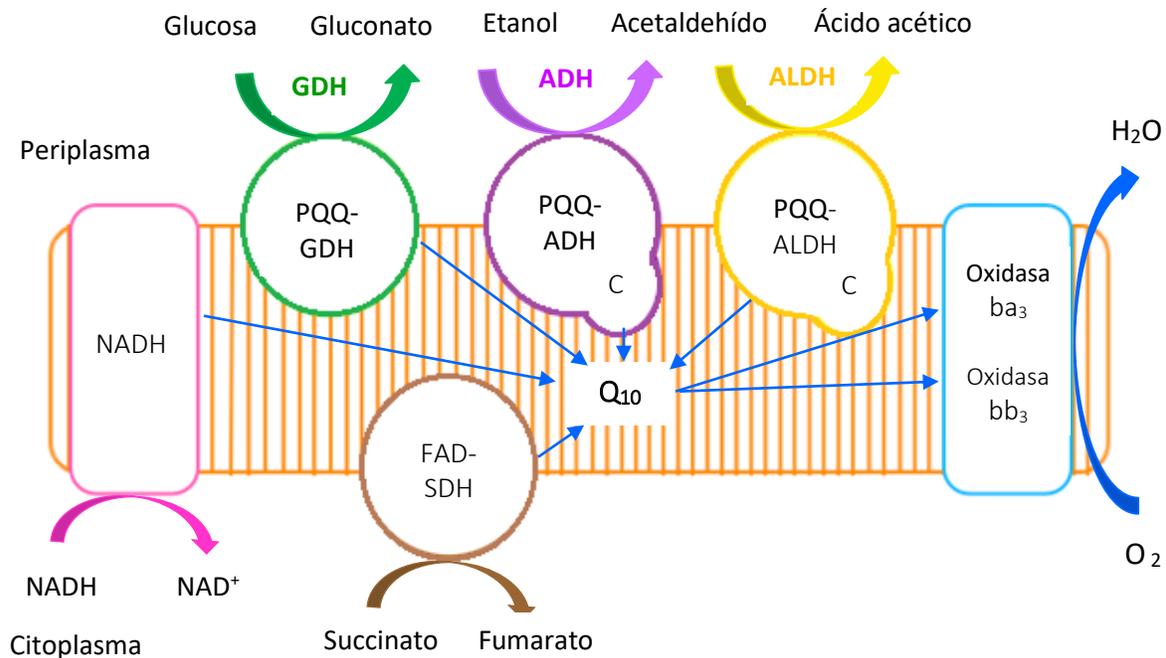


Figura 1.7 Cadena respiratoria de *Ga. diazotrophica*, conformada por las distintas deshidrogenasas membranales que proveen de electrones a la ubiquinolona Q₁₀. Las oxidasas ba₃ y bb₃ únicamente están presentes en condiciones de fijación de nitrógeno. (Adaptado de [53])

La concentración inicial de amonio, en el medio de cultivo, juega un papel determinante en la expresión de ciertos componentes en la cadena respiratoria de la bacteria [53]. En condiciones de fijación de nitrógeno (baja concentración de amonio) se expresan dos ubiquinol oxidasas; citocromo ba₃ (a₁) y citocromo bb₃, mientras que a alta concentración de amonio se expresa el citocromo bd [54]. Aunado a esto, la membrana de *Ga. diazotrophica* posee citocromos tipo c estructuralmente acoplados a deshidrogenasas membranales.

Por otro lado, el metabolismo de azúcares y otras fuentes de carbono procede exclusivamente por la vía de las pentosas monofosfato, las vías Embden-Meyerhof-Parnas y Entner-Doudoroff no son funcionales en la bacteria [55].

1.3 Fundamentos magnetismo

El magnetismo molecular es un campo cuyo interés ha ido en aumento en los sistemas biológicos, proporcionando información sobre la estructura molecular de complejos mono y polinucleares, haciendo posible el estudio de las interacciones entre los centros metálicos a partir del análisis de la susceptibilidad magnética y su dependencia con la temperatura. La presencia de más de una especie paramagnética en diversos sitios activos de múltiples metaloproteínas ha promovido la investigación de sus propiedades magnéticas y el desarrollo de compuestos modelo [56].

Al aplicar un campo magnético externo H a una muestra se generará un nuevo campo magnético intrínseco, conocido como inducción magnética, el cual es directamente proporcional al campo magnético aplicado.

$$M = \chi H$$

Donde χ es la susceptibilidad magnética, la cual indica cuantitativamente la respuesta de un material magnético en presencia de un campo magnético [56].

Existen diferentes tipos de comportamiento magnético observables en los materiales; en el caso del paramagnetismo, el momento magnético inducido se encuentra paralelo al campo aplicado, de modo que los espines están orientados al azar y no interactúan entre sí. Mientras que, en el caso de un material diamagnético, contrario al paramagnetismo, los momentos magnéticos se encuentran alineados de forma antiparalela al campo, de modo que su susceptibilidad magnética tendrá un valor negativo. Si los momentos magnéticos interactúan entre sí se tendrán fenómenos magnéticos cooperativos [57]:

- Ferromagnetismo, se caracteriza por el alineamiento paralelo de los momentos magnéticos, generando un momento magnético total.

- Antiferromagnetismo, existe un alineamiento antiparalelo de los momentos magnéticos, provocando que exista un momento magnético total nulo, si los momentos magnéticos son iguales, o que sea un momento magnético total menor, si son distintos.
- Ferrimagnetismo, es un tipo de antiferromagnetismo, también está presente un alineamiento antiparalelo de los momentos magnéticos, pero en este caso el alineamiento no es proporcional por lo que existirá un momento magnético pequeño.

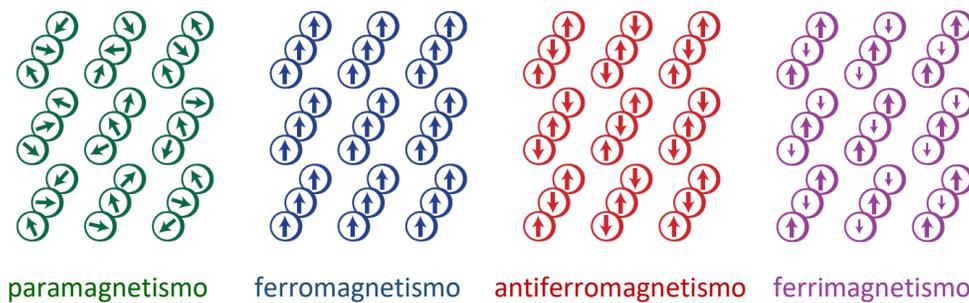


Figura 1.8 Alineamiento de los momentos magnéticos para los diferentes tipos de comportamiento magnético [58, 59].

Generalmente, el paramagnetismo es mucho más fuerte que el diamagnetismo. Este último es independiente de la temperatura, mientras que el paramagnetismo es linealmente proporcional al inverso de la temperatura. Dicho comportamiento es descrito por la ley de Curie.

$$\chi = \frac{C}{T}$$

Donde T es la temperatura y C es la constante de Curie, la cual puede ser empleada para caracterizar las propiedades magnéticas de cada sistema en particular [56].

La forma más conveniente de establecer experimentalmente que los sistemas obedecen la ley de Curie es graficar el comportamiento de la susceptibilidad magnética en función de la temperatura, de modo que se ajuste a una hipérbola, o bien, graficar el inverso de la susceptibilidad contra la temperatura para ajustarlo a una línea recta que cruza por el origen y cuya pendiente será $m = 1/C$. La desviación de esta relación lineal y la ley de Curie se observa en sistemas que exhiben efectos magnéticos cooperativos [56, 60].

En la figura 1.9 se muestran las gráficas que se obtendrían al realizar los tratamientos anteriormente descritos.

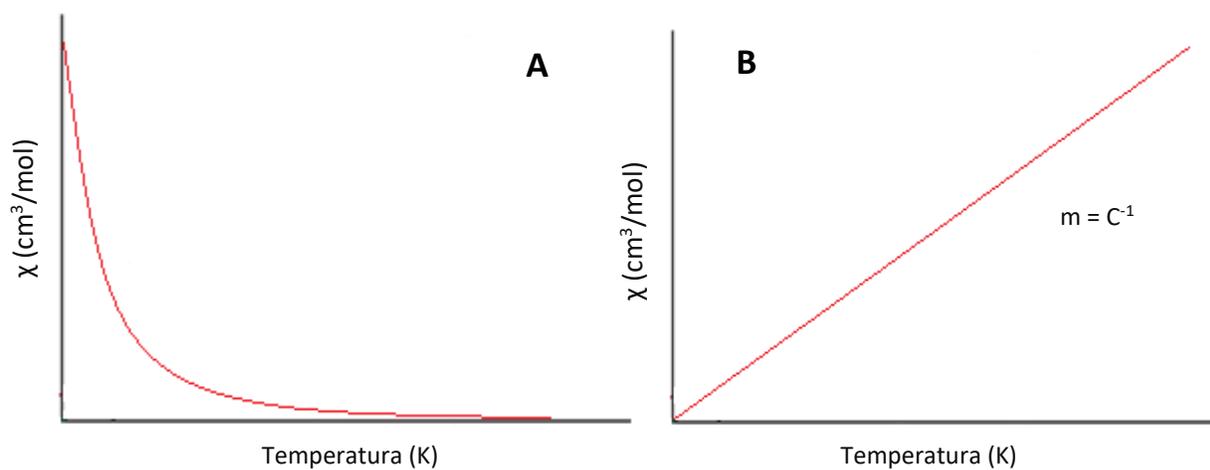


Figura 1.9 A) Susceptibilidad magnética en función de la temperatura y B) Inverso de la susceptibilidad magnética en función de la temperatura, la respuesta de ambos comportamientos es característica para un sistema paramagnético [61].

Existen sistemas que no exhiben un comportamiento tipo Curie, este hecho puede deberse a la presencia de uno o más centros paramagnéticos en la molécula. Diversos procesos biológicos son catalizados por metaloproteínas que tienen una, dos o más especies paramagnéticas, comúnmente suelen ser metales de transición y radicales orgánicos, en sus denominados sitios activos donde usualmente se lleva a cabo la transferencia de electrones o la catálisis redox. Este hecho ha promovido la investigación de sus propiedades magnéticas.

Cuando dos momentos magnéticos de espín interactúan, se define un número cuántico de espín total, S . Si se tienen ligantes puente que unen a dos o más centros magnéticos, los espines electrónicos pueden anularse o reforzarse mutuamente, generando así, acoplamientos de tipo anti y ferromagnéticos, respectivamente. El primero es el más común en sistemas biológicos y usualmente se le conoce como superintercambio.

La presencia interacciones de tipo ferro y antiferromagnéticas pueden identificarse mediante graficas de χ vs T . Este tipo de comportamiento está descrito por la ley de Curie-Weiss, la cual es aplicable únicamente a altas temperaturas:

$$\chi = \frac{C}{T + \theta}$$

Donde θ es la temperatura de Weiss. Si $\theta = 0$, el sistema es paramagnético, pero si $\theta > 0$ se trata de un sistema ferromagnético y si, por el contrario, $\theta < 0$, se trata de un sistema paramagnético (figura 1.10) [56, 61].

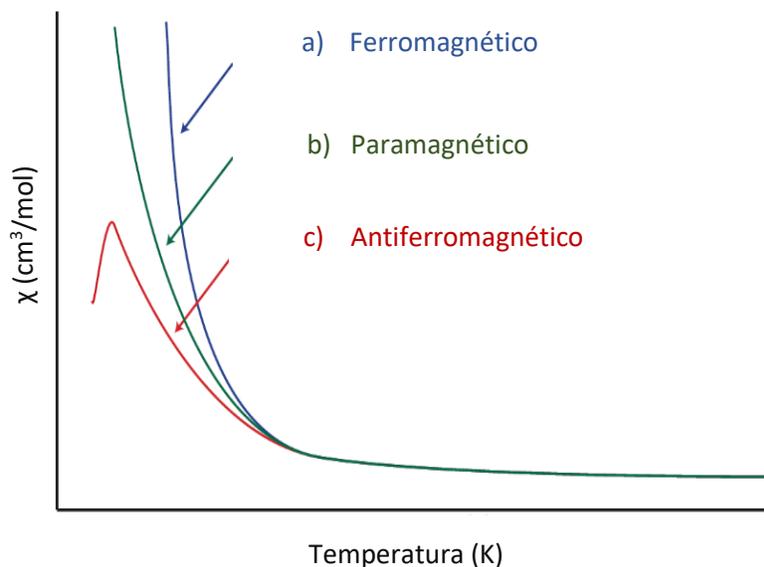


Figura 1.10 Gráfica de la susceptibilidad magnética vs la temperatura para un sistema de dos espines, $S_A = S_B = \frac{1}{2}$ con $J = 0$ (— paramagnético), $J > 0$ (— antiferromagnético) y $J < 0$ (— ferromagnético) [56].

Al graficar el inverso de la susceptibilidad magnética ($1/\chi$) en función de la temperatura, el conjunto de datos experimentales se ajusta a una línea recta y se compara con la ecuación de Curie-Weiss

$$\frac{1}{\chi} = \frac{T - \theta}{C} = \frac{T}{C} - \frac{\theta}{C}$$

Donde, $m = 1/C$ será la pendiente de la recta y $\theta/C = -b$ la ordenada al origen. De este modo, es posible obtener los valores de las constantes de Curie (C) y de Weiss (θ) (figura 1.11) [61].

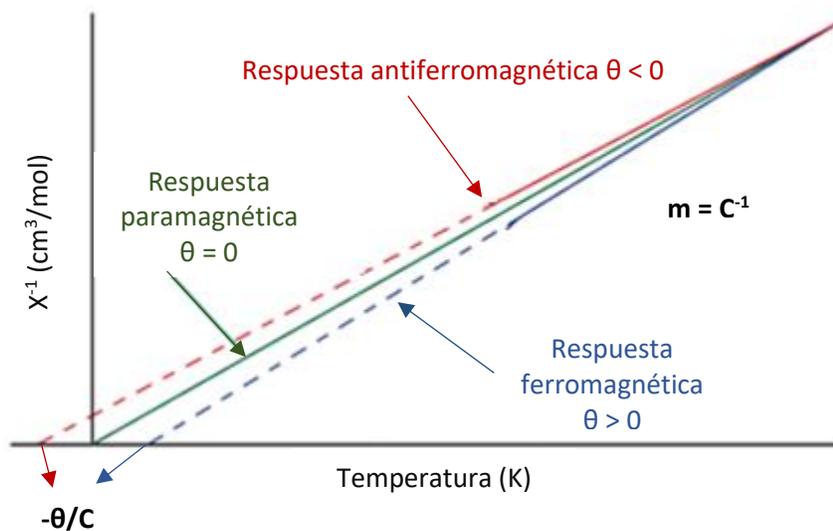


Figura 1.11 Gráfica χ^{-1} vs T para sistemas que obedecen la ley de Curie-Weiss de tipo antiferromagnético (—) y ferromagnético (—), ley de Curie (—). (Adaptado de [61]).

Matemáticamente, la interacción de intercambio (J) para un sistema de dos electrones desapareados está descrita por el Hamiltoniano Heisenberg-Dirac-van Vleck (HDvV) [56]:

$$\hat{H}_{\text{HDvV}} = -2J \hat{S}_1 \cdot \hat{S}_2$$

Donde \hat{s}_1 y \hat{s}_2 son los operadores de momento angular de espín para los dos electrones y J es la constante de acoplamiento de intercambio, la cual suele expresarse en unidades de cm^{-1} . En una interacción de intercambio entre dos especies con $S = \frac{1}{2}$ se pueden obtener dos estados de multiplicidad diferente: singulete ($S = 0$) y triplete ($S = 1$) (figura 1.12), la magnitud de la interacción magnética (J) entre los dos electrones desapareados es proporcional a la diferencia de energía entre ambos estados, de bajo y alto espín, respectivamente [62].

Un valor negativo de J (el estado singulete es de mayor energía que el estado triplete) corresponde a una interacción ferromagnética, por el contrario, si J posee un valor positivo (el estado triplete es de mayor energía que el estado singulete) se tiene una interacción antiferromagnética [62].

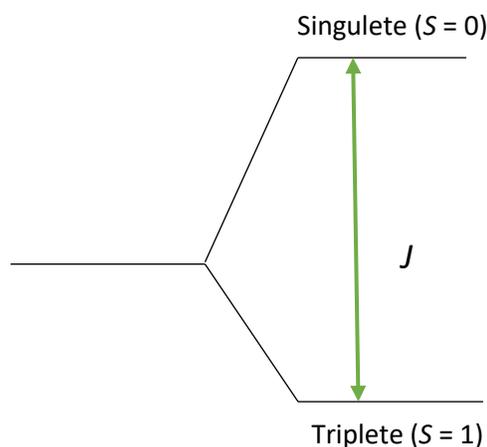


Figura 1.12 La interacción de intercambio separa la energía del sistema en dos estados: triplete y singulete. El diagrama corresponde a una interacción ferromagnética ($J < 0$) [62].

Además, la magnitud de la constante de acoplamiento de intercambio J , dependerá directamente de la distancia a la que se encuentren los centros paramagnéticos, así como de la geometría y la naturaleza de los ligantes que interactúen con el mismo. Distancias cortas, o una unión directa entre las especies paramagnéticas, conducirá a un acoplamiento muy fuerte, mientras que los centros paramagnéticos que se encuentren más lejanos exhibirán un acoplamiento moderado a débil [63].

A una distancia igual o menor a 10 Å, entre el radical orgánico y otro centro paramagnético, como por ejemplo un centro metálico, se puede generar una interacción de intercambio. A distancias menores a 5 Å dichos intercambios magnéticos son anisotrópicos mientras que a distancias más grandes son isotrópicos [64].

A continuación, en la tabla 1.3, se presentan algunos ejemplos de sistemas biológicos en los que se ha observado una interacción de intercambio, siendo los acoplamientos antiferromagnéticos los más comunes.

Tabla 1.3 Acoplamientos magnéticos entre radicales y centros metálicos

Sistema	J	Tipo de acoplamiento
Catalasa [65]	< 0	ferromagnético
Trimetilamina deshidrogenasa [66]	> 0	antiferromagnético
Citocromo bo_3 [67]	> 0	antiferromagnético

1.4 Fundamentos de RPE

La química bioinorgánica de diversos metales como V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Mo y W resulta interesante debido a su paramagnetismo, el cual ha sido posible estudiarlo a través de la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica.

El fenómeno de RPE fue descubierto en 1945 por Zavoisky y durante la siguiente década fue desarrollado por físicos para hacerlo un método práctico de espectroscopia. Es una herramienta sutil para estudiar especies paramagnéticas, debido a la sensibilidad de la técnica, permite identificar el tipo de ambiente de un centro paramagnético definiendo tamaño y forma del momento magnético producido por un electrón desapareado. Tales electrones desapareados pueden provenir de un ion metálico de transición o bien, de ciertos radicales orgánicos. Al ser una técnica no destructiva y muy versátil permite obtener información

estructural, funcional y dinámica del sistema en estudio. Además, mediante la espectroscopia de RPE se puede determinar cuantitativamente la cantidad de especie paramagnética presente en un determinado sistema, así como, el estado de espín de la especie paramagnética [68, 69].

Una vez obtenido el espectro de RPE se puede obtener información sobre el sistema en estudio; (i) estado de oxidación del centro metálico; (ii) cuantificación de la concentración paramagnética; (iii) caracterización estructural; (iv) identificación de los ligandos basándose en la interacción hiperfina de los átomos con su primera esfera de coordinación; (v) caracterización funcional, tal como determinar la saturación del ion metálico dentro de un sitio específico de la proteína [70].

Las frecuencias requeridas para que se genere el efecto de resonancia se encuentran en la región de microondas, siendo la frecuencia de 9.5 GHz (Banda X) la más común en todos los equipos de resonancia paramagnética electrónica (tabla 1.4) [69, 71]. Para un electrón libre en el vacío el valor de $g_e = 2.00232$ a un campo magnético de resonancia de 3390 Gauss para una frecuencia de banda X de 9.5 GHz.

Tabla 1.4 Bandas y Frecuencias empleadas en RPE (Adaptado de [60])

Banda	Intervalo (GHz)	Frecuencia (GHz)
L	0.39 – 1.55	1.5
S	1.55 – 3.90	3.0
C	3.90 – 6.20	6.0
X	6.20 – 10.9	9.5
K	10.9 – 32	23
Q	32 – 46	35.4
V	45 – 56	50
W	75 – 110	95
D	110 – 130	120

El espectro de RPE usualmente es representado como la primera derivada del espectro de absorción, además se pueden caracterizar en base a diferentes parámetros como la intensidad, ancho de la señal, valor de g (de acuerdo a la posición) y el desdoblamiento de la señal [72].

La interacción que se observa en RPE se debe a la alineación del momento magnético del electrón con un campo magnético externo aplicado, de este modo la energía del sistema está dada por:

$$E = -\mu_e \cdot B_0$$

Donde B_0 es el campo magnético externo aplicado y μ_e el momento magnético del electrón.

Para un electrón el momento magnético es proporcional a la proyección del espín:

$$\mu_e = -g_e \beta S$$

Donde β es el magnetón de Bohr, g es el factor espectroscópico de desdoblamiento del electrón ($g_e = 2.002319$) y S es el espín total de un electrón ($S = 1/2$). Debido a que las energías están cuantizadas, un electrón desapareado únicamente puede presentar dos estados de energía permitidos ($+1/2$ y $-1/2$). De modo que, al aplicar un campo magnético, el electrón puede estabilizarse ($M_s = -1/2$) o desestabilizarse ($M_s = +1/2$) y la magnitud de este efecto varía linealmente con respecto a la intensidad de B_0 . Esta interacción es conocida como Efecto Zeeman electrónico [69, 71].

La diferencia de energía entre los dos estados, debida a la interacción del espín electrónico y el campo magnético, está dada por:

$$\Delta E = g \mu_B B_0 \Delta M_s = g \mu_B B_0$$

Donde μ_B es el magneton de Bohr, h la constante de Planck. De esta forma el campo magnético aplicado B_0 , es inversamente proporcional al factor g , un parámetro espectroscópico característico de los sistemas paramagnéticos en estudio [69].

La absorción de energía ocurre cuando el campo magnético diverge los dos estados de espín, M_s , de tal manera que la diferencia de energía coincide con la energía de radiación aplicada. Este campo se denomina campo de resonancia, B_r (figura 1.13).

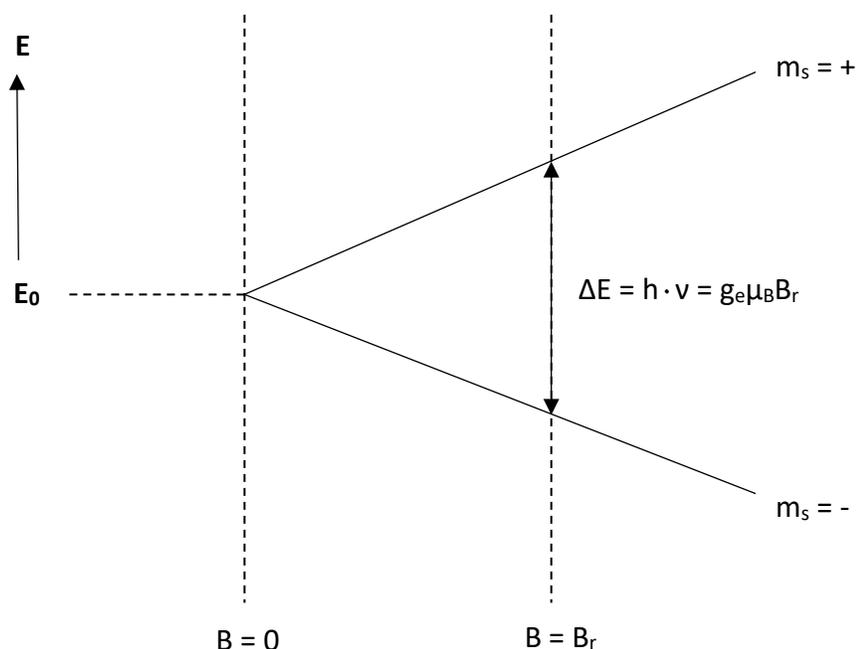


Figura 1.13 Esquema del efecto Zeeman electrónico en función del campo magnético. Condición de resonancia. Siendo g el factor g , β el magnetón de Bohr mientras que, $E_{+1/2}$ y $E_{-1/2}$ indican la energía de los estados de espín $M_s = +1/2$ y $M_s = -1/2$, respectivamente [68].

Las transiciones que dan lugar el espectro de RPE son de naturaleza dipolar magnética y la regla de selección para el número cuántico magnético, M_s , es [71]:

$$\Delta M_s = \pm 1$$

En la mayoría de los sistemas biológicos, el valor de g es anisotrópico con una dependencia de orientación que significa que el valor efectivo g es diferente dependiendo de la orientación de la molécula con respecto al campo magnético aplicado. Con respecto a la simetría del tensor- g se pueden identificar tres casos (figura 1.14) [73, 69]:

- Isotrópica, cuando los tres valores de los componentes del tensor g son iguales ($g_x = g_y = g_z$). El valor de g es invariante con respecto a la medición y el espectro resultante es una señal simétrica.
- Axial, un único valor del tensor g difiere con el valor de los otros dos componentes ($g_x = g_y \neq g_z$)
- Rómbica, ocurre cuando todos valores de los componentes del tensor g son diferentes ($g_x \neq g_y \neq g_z$)

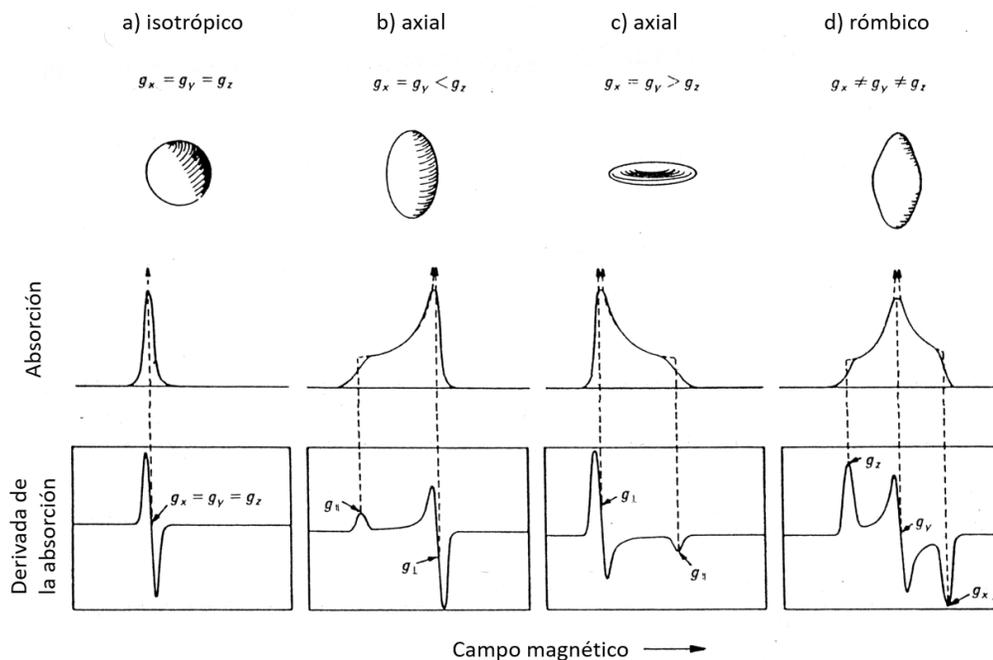


Figura 1.14 Representación esquemática de los tres tipos de espectros de RPE resultantes que se obtienen de acuerdo con la simetría y el valor de g [69].

Además de la anisotropía, otro factor importante a resaltar en la RPE es que, al existir más de un electrón desapareado surgen otras propiedades a tomar en cuenta, como en el caso de los metales de transición. Cuando una especie paramagnética posee más de un electrón desapareado, un electrón puede sentir un campo magnético generado por los otros electrones desapareados aún en ausencia de un campo magnético externo. Debido a esto, existirá una diferencia de energía entre diferentes los estados de espín en la especie paramagnética, tal fenómeno se conoce como desdoblamiento de campo cero o interacción espín-espín [69, 71].

La presencia de un núcleo ($I \neq 0$) que interactúa con un electrón del centro paramagnético, dará como resultado un espectro RPE con múltiples desdoblamientos de la señal en $2nI + 1$ líneas donde n es el número de núcleos con espín nuclear $I \neq 0$. Dicha interacción es llamada, interacción hiperfina. Ésta proporciona mayor información sobre el sistema en estudio, tal como la identidad y el número de centros metálicos que integran la molécula o el complejo, así como la densidad electrónica de espín. De igual forma, si el electrón interactúa con el núcleo de algún átomo vecino, la interacción se denominará superhiperfina [60, 69, 68].

1.5 Alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*

Desde hace varios años se ha estudiado ampliamente la PQQ-ADH de esta bacteria. Siendo una quinoxalona periplásmica es la responsable de catalizar el primer paso de la oxidación de etanol y transferir los electrones a la ubiquinona (Q_{10}), generando acetaldehído, el cual será utilizado como sustrato de la enzima ALDH para generar el ácido acético en el segundo paso de la fermentación de etanol. [74] Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la PQQ-ADH también puede llevar a cabo la oxidación de etanol ácido acético sin liberar acetaldehído al medio.

A pesar de que la especificidad del sustrato de las ADH de tipo III se restringe únicamente a oxidar alcoholes primarios (C_2-C_6), no oxidan metanol, alcoholes secundarios ni aldehídos, la

ADH de *Ga. diazotrophicus* es capaz de oxidar eficientemente formaldehído, propionaldehído y acetaldehído, siendo este último tan buen sustrato como etanol (tabla 1.5).

Tabla 1.5. Especificidad de la ADH de *Ga. diazotrophicus* para diversos sustratos [74].

Sustrato	Actividad relativa %
Metanol	9
Etanol	95
n-Propanol	90
n-Butanol	98
Alcohol alílico	100
Isopropanol	18
Formaldehído	4
Acetaldehído	87
Glutaraldehído	25
Propionaldehído	42

Debido a que la bacteria crece en cierto intervalo de pH se determinó el efecto de éste sobre la actividad enzimática de la PQQ-ADH. El resultado fue un perfil simétrico donde se puede observar que el pH óptimo es 6 (figura 1.15). El punto isoeléctrico (pI) obtenido experimentalmente fue 6.1, siendo menos ácido que el reportado para otras ADH de distintas bacterias ácido acéticas.

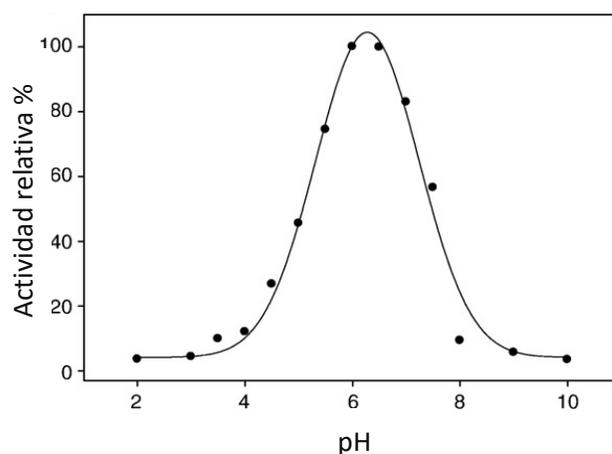


Figura 1.15 Dependencia con el pH de la actividad de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* con etanol-ferricianuro reductasa [74].

1.5.1 Cofactores presentes en la alcohol deshidrogenasa de *Ga. diazotrophicus*

La PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* posee dos subunidades: SUI (72 kDa) y la SUII (44 kDa) y hasta el momento se han encontrado tres grupos prostéticos que llevan a cabo la transferencia electrónica en la oxidación de etanol efectuada por la bacteria *Ga. diazotrophicus*: hemos tipo *c*, cúmulo [2Fe-2S] tipo ferredoxina y el grupo pirroloquinolina quinona (PQQ) como cofactor [74].

1.5.1.2 Pirroloquinolina quinona (PQQ)

Entre las quinoproteínas destaca un grupo de deshidrogenasas, distintas a las enzimas dependientes de flavina y nicotinamida, cuyo mecanismo catalítico involucra cofactores *o*-quinona en su centro activo para llevar a cabo la oxidación de azúcares, alcoholes y aminas en el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas. Las amino deshidrogenasas contienen TTQ (triptófano triptofilquinona) y CTQ (cisteína triptofilquinona) como grupos prostéticos, mientras que las alcohol deshidrogenasas son dependientes de PQQ (figura 1.16) [75].

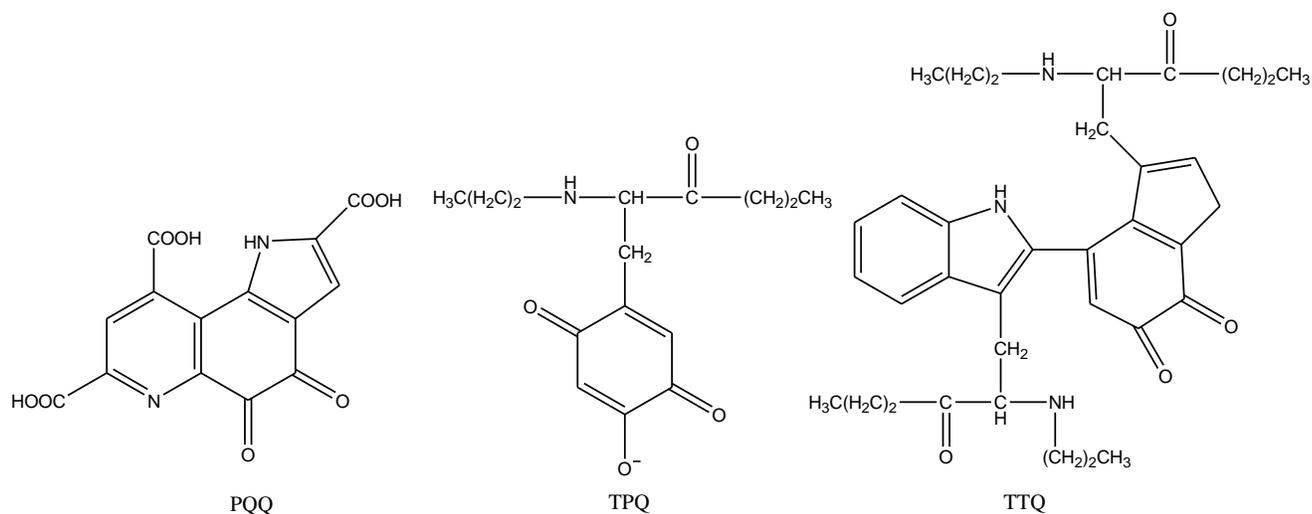


Figura 1.16 Estructuras de los distintos cofactores *o*-quinona, PQQ (Pirroloquinolina quinona), TTQ (triptófano triptofilquinona) y CTQ (cisteína triptofilquinona).

Un gran número de alcohol deshidrogenasas en bacterias son dependientes de NAD(P) y llevan a cabo su función en el citoplasma. Sin embargo, algunas bacterias gram negativas oxidan alcoholes o aldosas mediante enzimas que contienen PQQ como grupo prostético.

Anthony y Zatman reportaron en 1967 un nuevo grupo prostético, PQQ, aislado por primera vez en las enzimas glucosa y metanol deshidrogenasa. La estructura del PQQ es una o-quinona, los carbonilos en las posiciones C4 y C5 del anillo de la quinona se reducen a semiquinona y a quinol durante la catálisis [75].

Las PQQ-deshidrogenasas pueden ser monoméricas o multiméricas, pudiendo contener hemos como un segundo grupo prostético (quinohemoproteínas) [29], se encuentran solubles en el periplasma o ancladas a la membrana. Dependiendo de la deshidrogenasa, la transferencia electrónica se puede generar del PQQ hacia un citocromo tipo *c*, citocromo tipo *b*, proteínas azules de cobre, cúmulos [2Fe-2S] o a la quinona membranal (Q) [75].

Todas las deshidrogenasas dependientes de PQQ requieren Ca^{2+} [76] para su actividad, excepto la enzima de membrana glucosa deshidrogenasa (mGDH), en cuyo caso forma complejos con Mg^{2+} . Se llevaron a cabo diversos experimentos con la enzima soluble glucosa deshidrogenasa y metanol deshidrogenasa (MDH y s-GDH) en los que se reemplazó el calcio por otro catión divalente de la misma familia como Sr^{2+} o Ba^{2+} sin embargo, se observaron alteraciones en las propiedades cinéticas, indicando la importancia que posee el calcio en la catálisis, ya que contribuye a la polarización del enlace C5-O5 del PQQ (figura 1.17) [29].

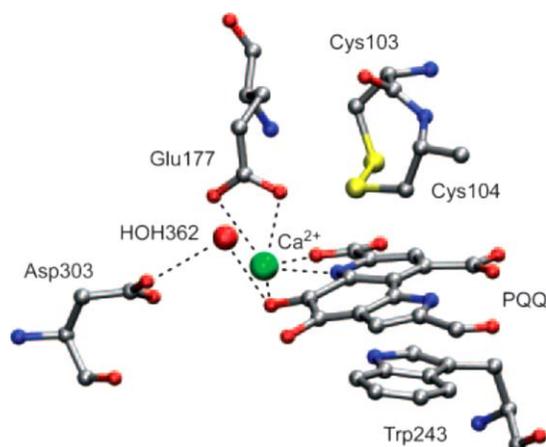


Figura 1.17 Sitio activo de la enzima metanol deshidrogenasa proveniente de *Methylobacterium extorquens*. Se puede observar al PQQ coordinado a un átomo de Ca²⁺ [77]

El espectro UV-Vis de las quinohemoproteínas dependientes de PQQ posee bandas de absorción características entre 300 y 420 nm, debidas al enlace del PQQ, dichos valores se ven afectados por el entorno molecular y no es conveniente emplearlos para la identificación definitiva del grupo prostético [75].

1.5.1.3 Cúmulos [2Fe-2S]

Las proteínas hierro-azufre constituyen una de las clases más grandes de proteínas no hemo, generalmente poseen una geometría tetraédrica, encontrándose comúnmente coordinados a sulfuros provenientes de residuos de cisteína o tioles, aunque también se ha observado la presencia de otros residuos. Los cúmulos Fe-S con diferentes núcleos se encuentran en el sitio activo de un gran número de metaloproteínas, fueron detectados en primera instancia mediante la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica. Los cúmulos de Fe-S se pueden clasificar en: Rubredoxinas ([Fe-S]), Ferredoxinas (cúmulos [2Fe-2S], [3Fe-4S] y [4Fe-4S] de bajo potencial), Rieske (cúmulos [2Fe-2S] de alto potencial) y HiPIPs (proteínas hierro-azufre de alto potencial [4Fe-4S]). Los hierros generalmente poseen geometría tetraédrica,

encontrándose comúnmente coordinados a sulfuros provenientes de residuos de cisteína o tioles, aunque también se ha observado la presencia de otros residuos (tabla 1.6) [78, 79].

Los cúmulos Fe-S, llevan a cabo diversas funciones que incluyen transferencia de electrones, catálisis enzimática, regulación. Ejemplos pueden encontrarse en las ferredoxinas [2Fe-2S] pertenecientes a las bacterias fijadoras de nitrógeno, así como, en las proteínas tipo Rieske, elementos esenciales para la conversión de energía, de las cadenas transportadoras de electrones respiratoria y fotosintética. Generalmente, cada cúmulo es capaz de transferir un electrón a la vez [80].

Todas las ferredoxinas [2Fe-2S] poseen un espectro de UV-vis muy similar, con bandas situadas en 280 nm y 320 nm, además de absorciones en la región del visible en 420 y 460 nm (figura 1.18). En su forma oxidada presenta un hombro en 560 nm. Otra característica a notar es que, usualmente tienen bajos potenciales de reducción, entre -460 mV y -300 mV, dependiendo del tipo de cúmulo, estructura de proteína, enlaces de hidrógeno, solubilidad y ligantes coordinados al hierro [81].

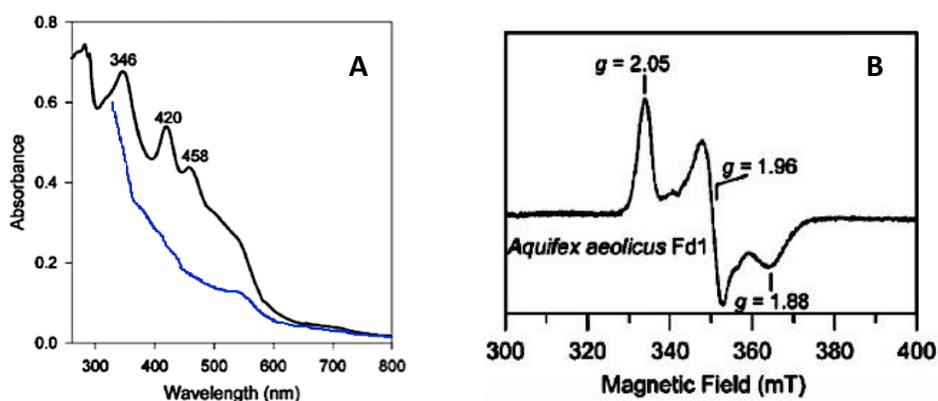
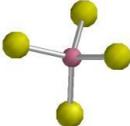
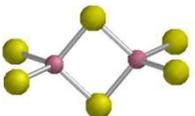
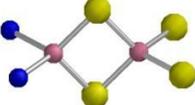
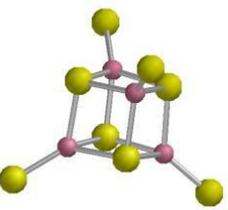


Figura 1.18 Espectros representativos del cúmulo [2Fe-2S]⁺ tipo ferredoxina de la especie *Aquifex aeolicus*. (A) Espectro UV-vis de la forma reducida (línea en negro) y oxidada (línea en azul) del cúmulo. (B) Espectro de RPE en banda X del cúmulo [2Fe-2S]⁺ [82].

Tabla 1.6 Cúmulos Fe-S [78]

Cúmulo	Clase	Estructura	Estados redox	Transición	Espín total
1Fe	Rubredoxina		Fe ^{2+/3+}	Fe ²⁺	2
				Fe ³⁺	5/2
2Fe-2S	Ferredoxina		[2Fe-2S] ^{1+/2+}	2Fe ³⁺	0
	Rieske		[2Fe-2S] ^{1+/2+}	2Fe ³⁺	0
3Fe-4S	Ferredoxina		[2Fe-2S] ^{1+/2+}	2Fe ^{2.5+} Fe ³⁺	2
				3Fe ³⁺	½
4Fe-4S	Ferredoxina		[4Fe-4S] ^{1+/2+}	4Fe ^{2.5+}	0
				2Fe ^{2.5+} 2Fe ³⁺	1/2
	HiPIP		[4Fe-4S] ^{2+/3+}	4Fe ^{2.5+}	0
				2Fe ^{2.5+} 2Fe ³⁺	1/2

1.5.1.4 Hemos tipo *c*

Dentro de las hemoproteínas, los hemos integran el grupo más grande y versátil que ha sido estudiado a nivel bioquímico e inorgánico debido a su intervención en numerosos procesos biológicos vitales incluyendo; la transferencia electrónica, oxidación de sustratos, almacenamiento de iones metálicos, ligantes de detección, biosíntesis de esteroides, respiración aeróbica e incluso en la apoptosis [83].

Inicialmente, fueron descritos en 1884 por MacMunn como pigmentos respiratorios, sin embargo, en 1925 David Keilin les dio el nombre de citocromos y los clasificó de acuerdo al espectro de absorción obtenido en su estado reducido [84]. Actualmente, se han descubierto más de 70,000 citocromos diferentes. Están presentes en la membrana interna de la mitocondria, así como en una amplia variedad de bacterias [78].

La palabra “hemo” describe específicamente al complejo ferroso del ligante macrocíclico tetrapirrólico, protoporfirina IX. El hierro del grupo hemo juega un papel indispensable en la actividad de los citocromos ya que cambia su estado de oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , durante su actividad [C⁸]. De acuerdo a la naturaleza del grupo hemo que contengan los citocromos se pueden clasificar en hemos de tipo *a*, *b*, *c*, *d*, *f* y *o* (figura 1.19) [78].

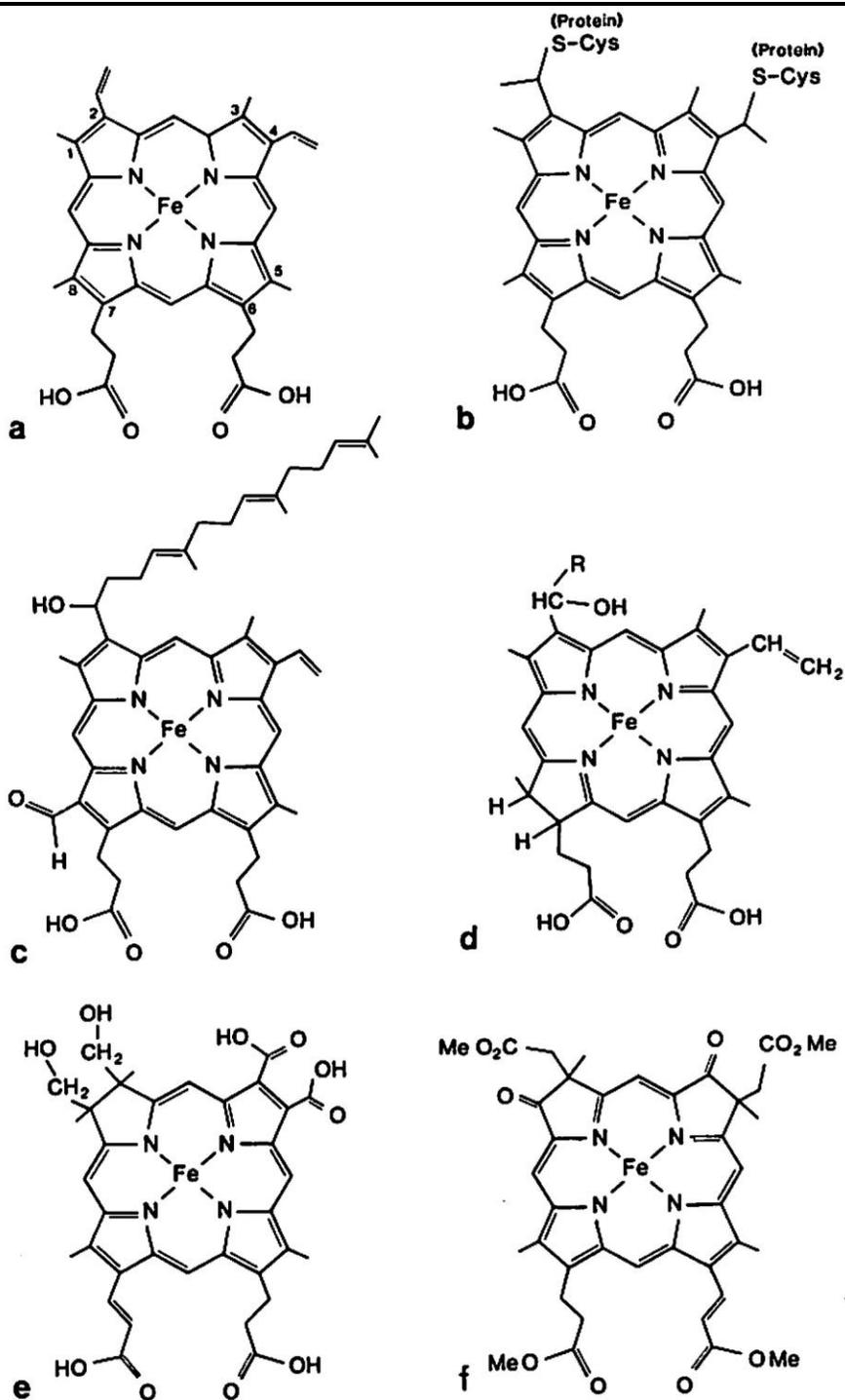


Figura 1.19 Estructuras de los diferentes tipos de hemo (tomada de [78]).

Los hemos tipo *b* poseen grupos vinilo en las posiciones 2 y 4, los hemos tipo *a* tienen un grupo formilo y largas cadenas hidrofóbicas de isopreno unidas a la porfirina. Estructuralmente los

hemos tipo *c* son similares a los tipo *b*, excepto por los enlaces tioéter a residuos de cisteína proteínicos que reemplazan a los grupos vinilo (figura 1.19) [85].

Dependiendo de los sustituyentes del grupo hemo, en las especies reducidas, se producen cambios característicos en los máximos de absorción de los citocromos en el espectro de UV-Vis. Cabe resaltar que el espectro electrónico de los citocromos tipo *c* está dominado por la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ que dan origen a una banda intensa alrededor de 410 nm (banda Soret o γ) y dos bandas débiles en el intervalo de 500 a 600 nm (tabla 1.5 y figura 1.20) [78].

Tabla 1.7 Parámetros de los espectros UV-VIS de distintos citocromos en estado reducido [78].

Hemo	Banda α (nm)	Banda α de la proteína reducida (nm)*	ϵ_{mM}
tipo <i>a</i>	587	587 - 611	
tipo <i>b</i>	557	557 – 563	26
tipo <i>c</i>	550	549 – 561	34.4
tipo <i>d</i>	613	630 – 635	29.1
tipo <i>d</i> ₁	620	620 – 625	
tipo <i>o</i>	553	553 - 560	24

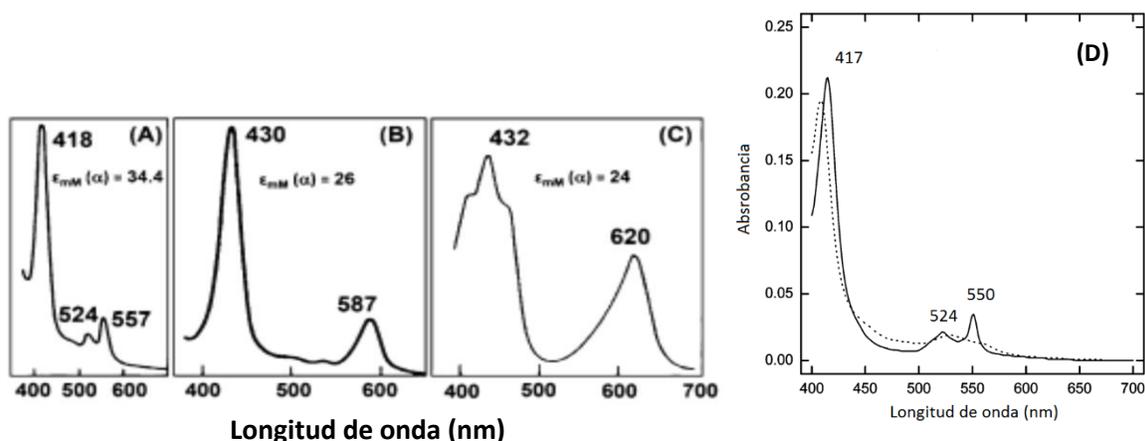


Figura 1.20 Espectros de UV-Visible característicos de los: A) hemos tipo *b*, B) hemos tipo *a*, C) hemos tipo *d*₁ y D) hemos tipo *c* [78, 86].

1.5.2 Propiedades magnéticas de los cofactores presentes en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

1.5.2.1 Pirroloquinolina Quinona PQQ

Los estados redox del cofactor PQQ que poseen mayor relevancia a nivel biológico son: quinona (PQQ), semiquinona (PQQH[•]) y quinol (PQQH₂) (figura 1.21). Las formas reducidas son inestables a condiciones fisiológicas (excepto cuando están enlazadas a la enzima): bajo condiciones aeróbicas, la oxidación del PQQH₂ por O₂ únicamente es posible a pH ácido, mientras que PQQH[•] solamente muestra estabilidad a valores altos de pH y condiciones anaeróbicas [87]. Cabe resaltar que el cofactor PQQ en la PQQ-ADH se encuentra en estado reducido, únicamente por un electrón, por lo que se encuentra como un radical orgánico, teniendo un $S = \frac{1}{2}$.

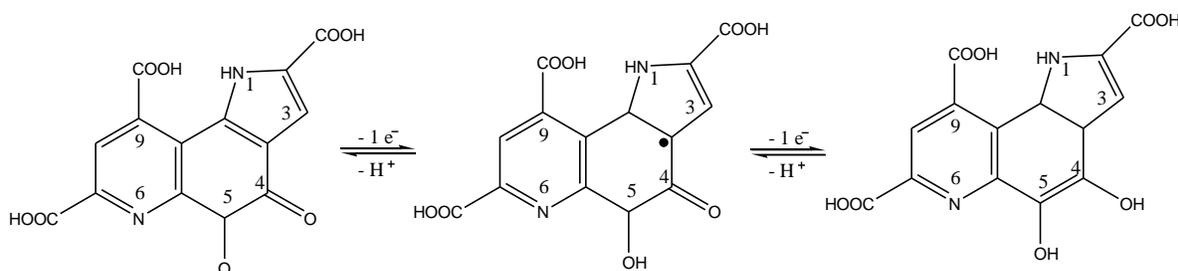


Figura 1.21 Estructuras del cofactor PQQ: quinona (PQQ), semiquinona (PQQH[•]) y quinol (PQQH₂).

1.5.2.2 Cúmulo [2Fe-2S]

Las ferredoxinas [2Fe-2S], funcionan como agentes redox en el metabolismo oxidativo de diversos sistemas. En estado oxidado, ambos centros metálicos son Fe^{3+} de alto espín, debido a que ambas especies se acoplan antiferromagnéticamente, el espín total del cúmulo en estado oxidado es $S = 0$ (figura 1.22) [80, 79] .

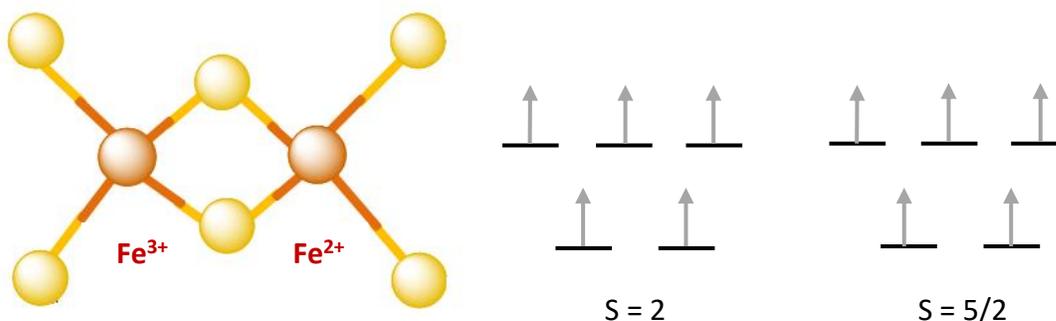


Figura 1.22 Desdoblamiento de los orbitales d para un cúmulo [2Fe-2S] tipo ferredoxina en estado oxidado. Los dos hierros de alto Fe^{3+} espín se encuentran acoplados antiferromagnéticamente, de modo que el espín total será $S = 0$.

Mientras que en estado reducido se presenta una valencia mixta, teniendo un Fe^{2+} y un Fe^{3+} , ambos de alto espín (figura 1.23). Los hierros Fe^{2+} y un Fe^{3+} interactúan a través de los ligantes sulfuro generando una interacción antiferromagnética, de modo que se tiene un espín total $S = \frac{1}{2}$.

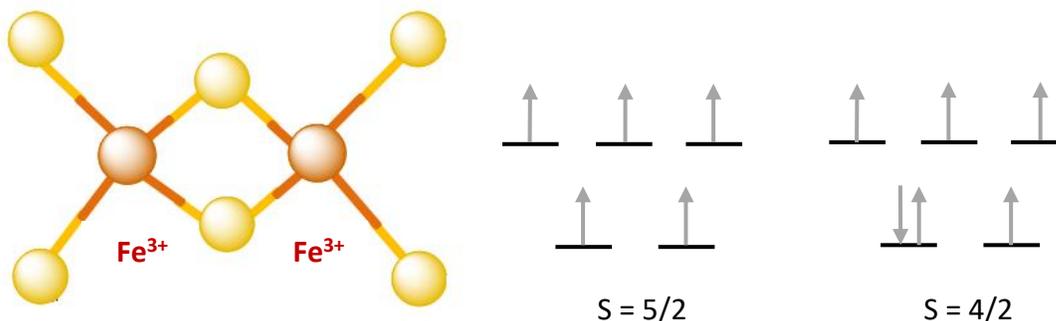


Figura 1.23 Desdoblamiento de los orbitales d para un cúmulo [2Fe-2S] tipo ferredoxina en estado reducido. El Fe^{2+} y el Fe^{3+} , ambos en configuración de alto espín, se encuentran acoplados antiferromagnéticamente, de modo que el espín total será $S = \frac{1}{2}$ [80, 79].

1.5.3 RPE de los cofactores presentes en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

1.5.3.1 RPE de las proteínas Fe-S

La resonancia paramagnética electrónica ha sido ampliamente utilizada en la elucidación estructural y funcional de diversas proteínas de hierro, además al complementarse con otras técnicas ha proporcionado información sobre el estado de oxidación del hierro, así como, el tipo de ligantes a los que se encuentra coordinado. Dicha espectroscopia es particularmente implementada en sistemas que tengan una mezcla de proteínas hierro-azufre [79].

Cada cúmulo genera un espectro característico con un valor de $g_{prom} = 1.94$, el cual ha sido ampliamente utilizado para la identificación de este tipo de especies paramagnéticas en diversos sistemas biológicos ya que cada cúmulo genera un espectro característico que actúa como una huella digital (figura 1.24 y 1.25). Éste, usualmente es observable a temperaturas criogénicas ($T < 100$ K) y típicamente presentan un espectro rómbico o axial. El espectro típico posee tres valores observables de g , $g_z = 2.03-2.04$, $g_y = 2.00 - 1.90$; $g_x = 11.95-1.80$. Además, ya que ni el ^{32}S ni el ^{56}Fe poseen espín nuclear ($I = 0$), el espectro de RPE de los cúmulos Fe-S no presentará estructura hiperfina [88].

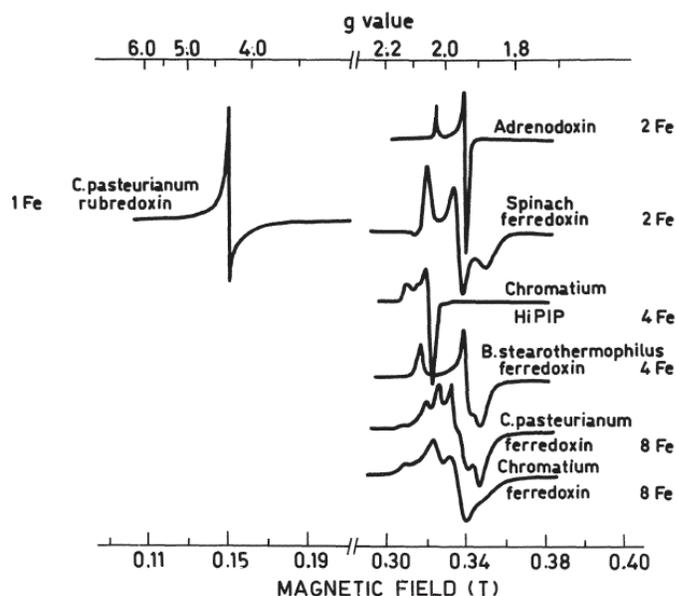


Figura 1.24 Espectros RPE en banda X de las proteínas Fe-S y su diferente nuclearidad, presentes en bacterias y plantas [79].

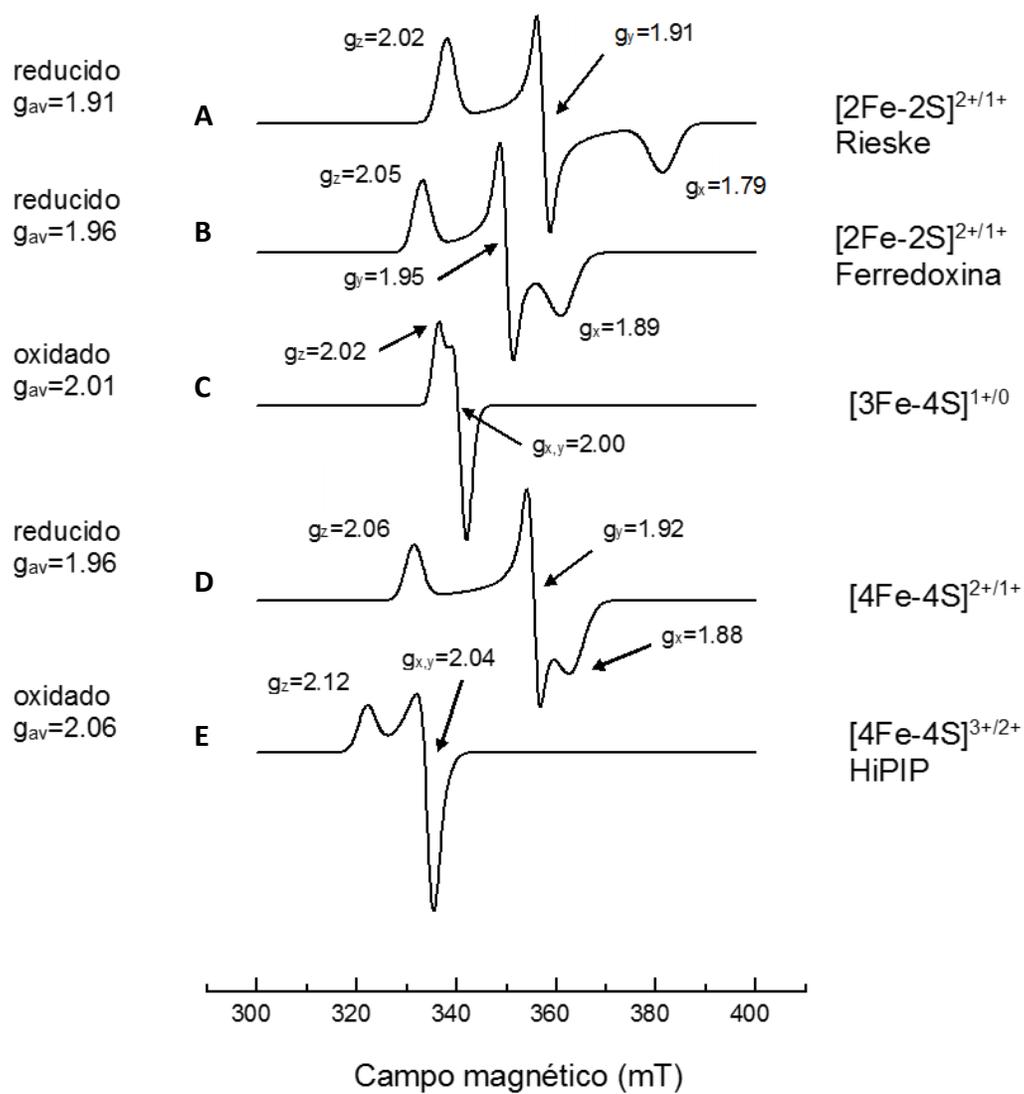


Figura 1.25 Espectros de RPE de distintos cúmulos Fe-S obtenidos entre 10 y 20 K. A) *Clostridium pasteurianum*. B) *Desulfovibrio gigas* C) *Bacillus stearothermophilus* D) *Chromatium vinosum* HiPIP E) *Mastigocladus laminosus*. [89, 90].

1.4.2 RPE de los hemos tipo c

El grupo hemo es un complejo de hierro porfirinato que posee una geometría octaédrica, los estados de oxidación más comunes para el átomo metálico son (II) y (III), cada uno de los cuales puede tener varios estados de espín diferentes. De hecho, el hierro (II), que tiene una configuración electrónica de valencia d^6 , puede tener un espín total $S = 0$ y 2 , mientras que el hierro (III), que es un ion d^5 , puede tener $S = 1/2$ y $5/2$. Todos estos diferentes estados de espín se han observado. Desde el punto de vista de la RPE, los hemos importantes son los derivados del hierro (III) [79].

En el caso de las proteínas multihemo, se han llevado a cabo diversos estudios de RPE. La figura 1.26 muestra el espectro RPE de los citocromos tipo c con Fe^{3+} de alto espín de las especies *Desulfovibrio gigas* y *Desulfovibrio vulgaris* [91].

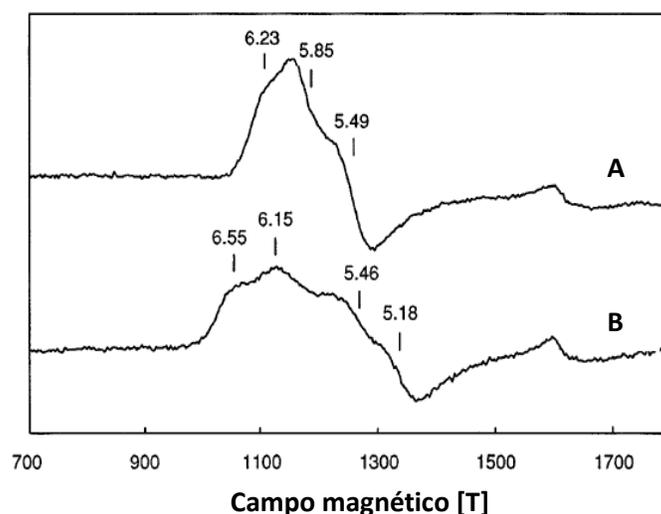


Figura 1.26 Espectro de EPR de los hemos tipo c de la bacteria reductora de sulfato *Desulfovibrio gigas* y *Desulfovibrio vulgaris* A) Espectro RPE de los hemos tipo c de alto espín de la especie *Desulfovibrio gigas* en la que se observan dos señales rómbicas con valores de $g_y = 6.55$ y $g_x = 5.18$ para una de ellas y de $g_y = 6.23$ y $g_x = 5.49$. B) Se observa una señal axial para los citocromos c de alto espín de la especie *Desulfovibrio vulgaris* con un valor de $g_{xy} = 5.85$ asimismo, se observa una señal rómbica con los valores de $g_y = 6.15$ y $g_x = 5.46$. Condiciones: temperatura de 4.2 K, frecuencia de 9.63 GHz, potencia de 2.4 mW y amplitud 0.9 mT (Adaptado de [91]).

De manera similar, en el espectro RPE del citocromo P450 se observa una señal rómbica para un hemo de bajo espín con valores de $g = 2.42, 2.25$ y 1.92 (figura 1.27) [92].

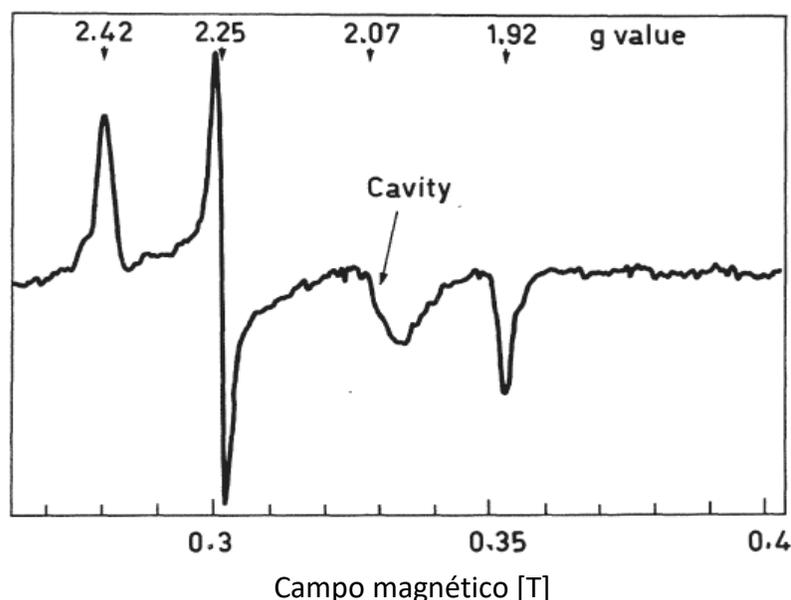


Figura 1.27 Espectro de RPE en banda X del citocromo P450. Se aprecian las señales con $g = 2.42, 2.25$ y 1.92 al Fe^{3+} de bajo espín [92].

1.5 Estudio y caracterización de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

Los grupos de Escamilla y Sosa-Torres han aislado, estudiado y caracterizado la proteína PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Determinaron la composición oligomérica de la enzima, encontrando que tiene una masa molecular de 115 kDa y está formada por dos subunidades; SUI (72kDa) y SUII (44 kDa). Por medio de espectroscopia UV-Vis se identificó el grupo prostético PQQ (con bandas en 317 y 350 nm) y los citocromos tipo *c* reducidos (con la banda Soret en 417 y las bandas α y β en 523 y 553 nm, respectivamente (figura 1.28) [74].

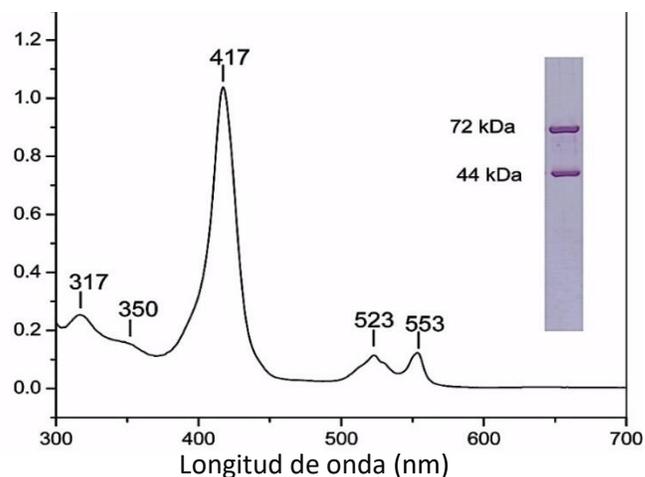


Figura 1.28 Espectro Uv-Vis de la PQQ-ADH recién aislada de *Ga. diazotrophicus*. Inserto: SDS-PAGE donde se observan la SUI (72 kDa) y la SUII (44 kDa) de la enzima [74].

Mediante resonancia paramagnética electrónica (RPE) a 77 K se observó la señal característica de un radical orgánico, atribuida al grupo prostético PQQ en su forma de semiquinona, teniendo una señal con un valor de $g = 2.0034$. Al realizar este mismo estudio a baja temperatura (20 K) fue posible observar un conjunto de señales atribuibles a un cúmulo ferredoxina [2Fe-2S] con un valor de $g_x = 2.007$; $g_y = 1.941$ y $g_z = 1.920$. Cabe resaltar que ambos cofactores se encuentran en estado reducido, lo cual es consistente con los resultados obtenidos a partir del espectro electrónico de la proteína (figura 1.29) [74].

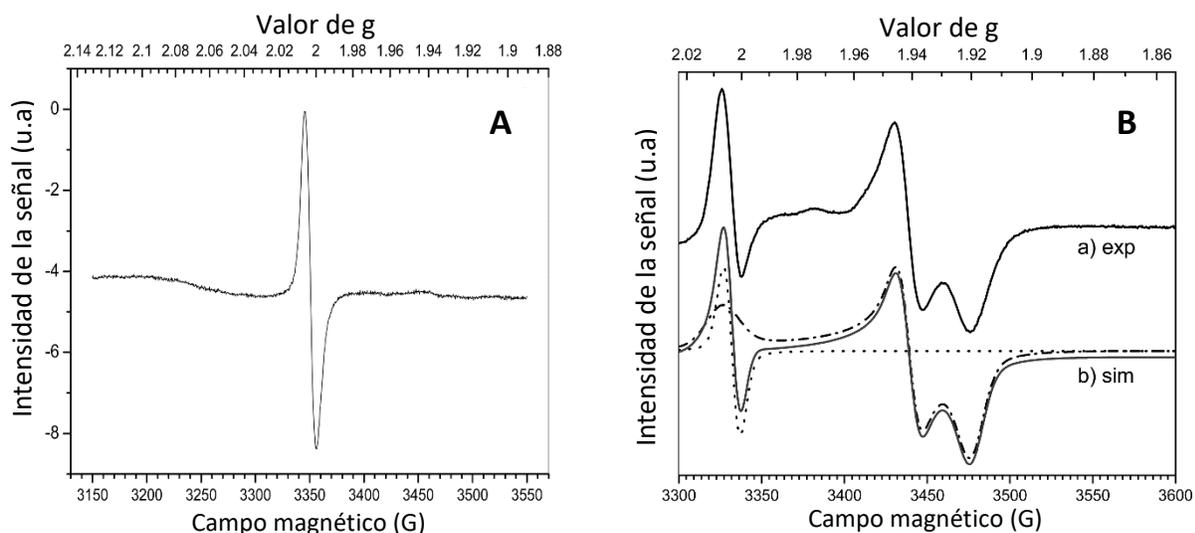


Figura 1.29 Espectros de RPE de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* recién aislada. A) Espectro en banda X del radical semiquinona a 77 K B) Espectro en banda X del cúmulo [2Fe-2S] de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* a 20 K, a) línea sólida: espectro experimental; b) línea punteada: espectro simulado de la semiquinona PQQ; línea discontinua: espectro simulado del cúmulo [2Fe-2S]⁺ [74].

Adicionalmente, se determinaron los potenciales de reducción para los cuatro citocromos tipo *c* mediante una titulación espectro-electroquímica por UV-Vis siguiendo el cambio de la banda α en 553 nm mientras que, la determinación de los potenciales para el PQQ y el cúmulo se llevó a cabo mediante una titulación espectro-electroquímica por RPE (figuras 1.30 y 1.31) [74].

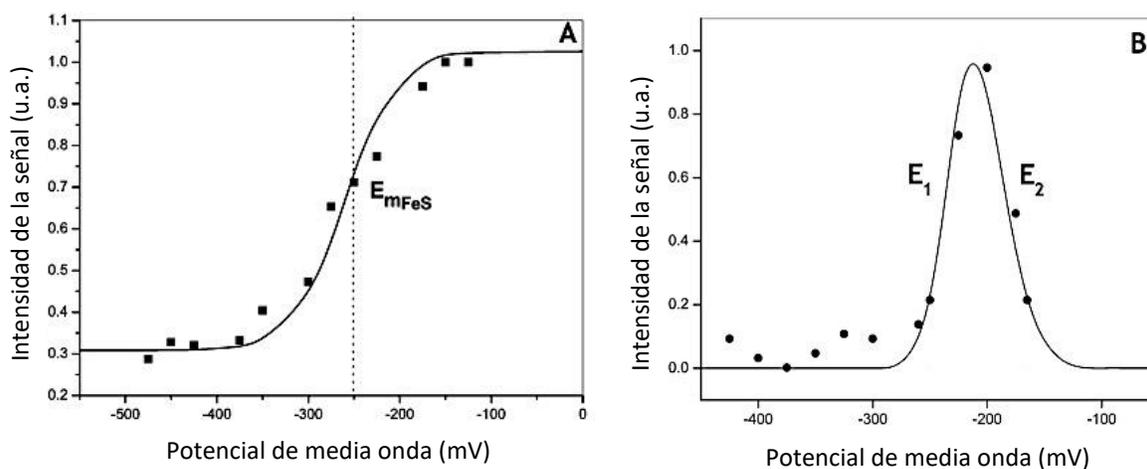


Figura 1.30 Titulación espectro-electroquímica mediante EPR de A) el cúmulo [2Fe-2S]⁺ tipo ferredoxina a 20 K y B) el PQQ• a 77 K [74].

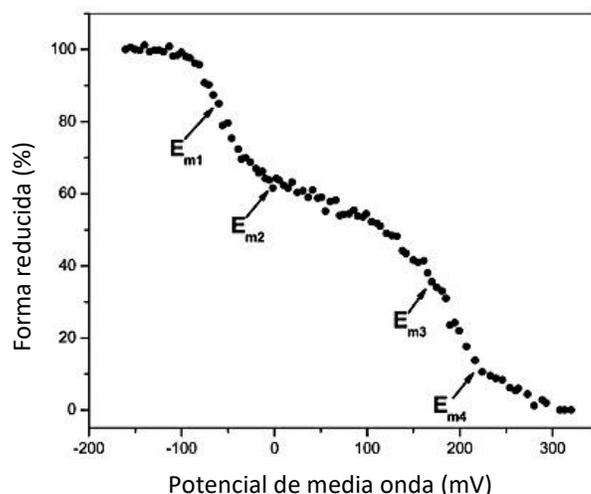


Figura 1.31 Titulación potenciométrica de los cuatro hemos tipo *c* de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. $E_{m1} = -64$ mV, $E_{m2} = -10$ mV, $E_{m3} = 170$ mV, $E_{m4} = 218$ mV [74].

Con los potenciales redox de los cofactores determinados (tabla 1.8) fue posible proponer un mecanismo para la transferencia de electrones intra e intermolecular llevada a cabo en la PQQ-ADH de la bacteria *Ga. diazotrophicus* (figura 1.32) [74].

Tabla 1.8 Potenciales determinados mediante titulaciones espectro-electroquímicas para los grupos prostéticos de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* [74].

Potenciales redox vs ENH a pH = 6 (mV) [74]	
PQQ	-240 (±5) / -180 (±5)
[2Fe-2S] ^{+ / 2+}	-250 (±5)
cl	-64 (±5)
cl ₁	-8 (±5)
cl ₂	+185 (±5)
cl ₃	+210 (±5)

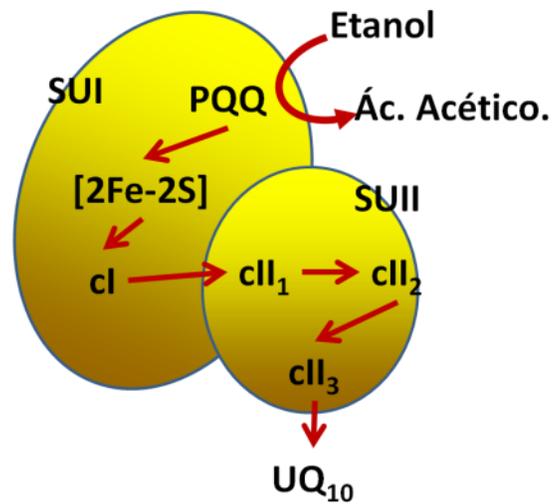


Figura 1.32 Mecanismo propuesto para la transferencia de electrones en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* durante la oxidación de etanol. Se asignan el PQQ, cúmulo [2Fe-2S] y el hemo cl para la SUI, mientras que los hemos cII₁, cII₂ y cII₃ se asignan a la SUII. [74].

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Mediante estudios de resonancia paramagnética electrónica, RPE a diferentes temperaturas y potencias, determinar el tipo de interacción magnética entre los cofactores PQQ y el cúmulo [2Fe-2S], presentes en la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) de la bacteria *Ga. diazotrophicus* ya que ambos exhiben paramagnetismo ($S = \frac{1}{2}$) únicamente cuando la proteína se encuentra en estado reducido.

2.2 Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de cultivo para obtener la más alta expresión de la bacteria *Ga. diazotrophicus*
- Obtener las enzimas de membrana solubles presentes en la bacteria *Ga. diazotrophicus* a partir de lisis celular.
- Empleando cromatografía en columna, obtener de manera pura y concentrada la PQQ-ADH de otras proteínas presentes en la membrana de la bacteria *Ga. diazotrophicus*.
- Aplicar la técnica de RPE a temperatura variable para estudiar el acoplamiento magnético entre los cofactores PQQ y el cúmulo [2Fe-2S].
- Llevar a cabo, mediante la técnica de RPE, un estudio de saturación progresiva de frecuencia de microondas para obtener información sobre la interacción magnética entre las especies paramagnéticas presentes en la PQQ-ADH en estado reducido.

Capítulo 3

Procedimiento experimental

3. Procedimiento experimental

3.1 Crecimiento de la bacteria *Ga. diazotrophicus*

Para llevar a cabo el crecimiento de la bacteria *Ga. diazotrophicus* se partió de un liofilizado de la cepa PAL 5 ATCC[®] 49037[™] y se modificaron las condiciones descritas por [93] a modo de obtener la mayor expresión de la bacteria en el medio de cultivo.

3.1.1 Medios de cultivo

La bacteria se cultivó en un medio líquido LGIP modificado (enriquecido con sacarosa al 5% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) [93]. Dicho medio contiene: 5 g de K_2HPO_4 , 5 g de KH_2PO_4 , 200 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 2.64 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 mM) y 30 g de sacarosa en 1 L de agua, el pH se ajusta a 5.5.

Para corroborar la pureza de la cepa, la bacteria fue crecida también en medio LGIP sólido, el cual contiene 100 mg de K_2HPO_4 , 300 mg de KH_2PO_4 , 100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 g de sacarosa y 8 g de agar en 500 mL.

3.1.3 Condiciones de crecimiento en el laboratorio

A partir del liofilizado de la cepa PAL5 se realiza un preinóculo de la bacteria *Ga. diazotrophicus* en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio LGIP, se incuban por 24 horas a 30 °C y 220 rpm. Al finalizar este tiempo se toman alícuotas de 25 mL del preinóculo y se inoculan cuatro matraces Fernbach que contienen 1.5 L de medio LGIP. Los medios inoculados fueron incubados bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. A las 36 horas (fase exponencial) se adiciona etanol al 0.5% v/v para favorecer la sobreexpresión de la enzima involucrada en la oxidación de alcoholes. Finalmente, a las 48 horas (fase estacionaria tardía) las células son recuperadas por medio de una centrifuga (*Beckman J2-21*) a 8,000 rpm durante 15 minutos.

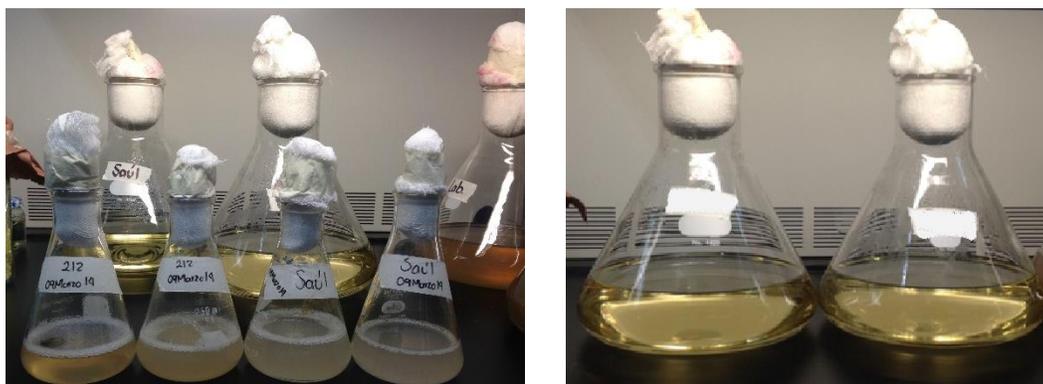


Figura 3.1 Preinóculos de la bacteria *Ga. diazotrophicus* y medios de cultivo LGIP en matraces Fernbach empleados para el crecimiento de la bacteria.

3.1.4 Condiciones de crecimiento en el biofermentador

Para llevar a cabo el crecimiento a gran escala de *Ga. diazotrophicus* se utilizó un fermentador de tipo Mobile Pilot (*Fermentor BIOFLO 5000, New Brunswick Scientific*) con 350 L de medio LGIP modificado y 20 L de preinóculo. El cultivo fue crecido a 30 °C, con agitación constante de 320 rpm y aireación de 32 L de aire por minuto. A las 39 horas se adicionó etanol para la sobreexpresión de la enzima en estudio. El pH fue controlado durante el crecimiento de tal forma que se observó un valor de $\text{pH} = 6 \pm 1$. Finalmente, las células fueron obtenidas a las 50 horas por medio de una centrífuga tubular marca Sharpless a 15000 rpm y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser utilizadas posteriormente. Todo este procedimiento se llevó a cabo en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto (UEPP) perteneciente al Instituto de Biotecnología, ubicado en Cuernavaca, Morelos.



Figura 3.2 Fermentador en el que se llevó a cabo el crecimiento a gran escala de la bacteria *Ga. diazotrophicus*.

3.1.5 Tinción de Gram

Para corroborar la pureza de la cepa antes de inocular el medio en el fermentador tipo Mobile Pilot se empleó la tinción de Gram. De esta manera se garantizó que en el preinóculo únicamente se encontrara un microorganismo, en este caso la bacteria *Ga. diazotrophicus*.

3.2 Obtención de membranas

3.2.1 Buffers empleados en la obtención de membranas

Buffer PCM 30 mM, se disolvieron 1.9215 g de KH_2PO_4 , 152 mg de K_2HPO_4 , 3.0525 g de

Procedimiento experimental

MgCl₂.6H₂O y 2.205 g de CaCl₂.2H₂O en 500 mL de agua. Se ajusta a pH = 6.0

Buffer PCM 30 mM con Tritón X-100 al 0.7% v/v, se disolvieron 1.9215 g de KH₂PO₄, 152 mg de K₂HPO₄, 3.0525 g de MgCl₂.6H₂O y 2.205 g de CaCl₂.2H₂O. Se ajusta a pH = 6.0 y se adicionan 3.5 mL de Tritón X-100 (0.7 % v/v).

3.2.2 Lavado de células

Se tomó un lote de 200 g de células y se descongelaron lentamente hasta alcanzar una temperatura promedio de 4 °C, posteriormente fueron lavadas con *buffer PCM* y se recuperaron por centrifugación a 8,000 rpm.



Figura 3.3 Fracción membranal de *Ga. diazotrophicus* solubilizada en *buffer* de fosfatos 0.03 M

3.2.3 Lisis celular y solubilización de la fracción membranal

Para la obtención de membranas, las células fueron resuspendidas nuevamente en *buffer PCM* a una temperatura de 4 °C, se les adicionó DNAsas y PMS-F (15 µg/mL) como inhibidor de proteasas endógenas. Se incubaron durante 2 horas con agitación lenta a la misma temperatura. Posteriormente fueron sonicadas para romperlas utilizando un sonicador (*Vibracell 75115 Bioblock*) por 30 minutos, se realizaron ciclos de 59 segundos de pulsación y 10 segundos de descanso. Las membranas fueron recuperadas mediante ultracentrifugación

Procedimiento experimental

(*Ultracentrifuge Beckman LB-70M*) a 40, 000 rpm por 60 minutos. La fracción membranal (pellet) se resuspendió para solubilizarla en *buffer* de fosfatos 0.03 M, pH 6 con Tritón X-100 al 0.7% v/v y se incubó por 24 horas a 4 °C con agitación constante. Se centrifugó a 40, 000 rpm por 1 hora, en esta ocasión se obtuvo un sobrenadante rojizo.



Figura 3.4 Sobrenadante rojizo que sirvió como fuente de la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

3.3 Purificación de la enzima PQQ-ADH mediante cromatografía en columna

El sobrenadante rojizo obtenido fue utilizado como fuente de la enzima PQQ-ADH para el proceso de purificación. Se emplearon columnas de intercambio aniónico QAE y DEAE, la columna de afinidad a hidroxapatita y por una de exclusión molecular, S300. Para empacar las columnas y eluir la proteína se empleó una bomba peristáltica (*BioRad Laboratories*). Durante todo el proceso de purificación se utilizó *buffer* de fosfatos 0.01M, pH 6.0 con Tritón X-100 al 0.1% v/v. Asimismo, todas las columnas se equilibraron con tres volúmenes de elución de la disolución amortiguadora. Se determinó la absorbancia a 280 nm y se graficó el perfil cromatógrafo. Se colectaron fracciones y se determinó la cantidad de proteína al igual que la actividad específica empleando el método espectroscópico.

3.3.1 Buffers empleados en la purificación de la enzima PQQ-ADH

Buffer de fosfatos 10 mM, se disolvieron 1.281 g de KH_2PO_4 y 101 mg de K_2HPO_4 en 1 L de agua. Se ajusta a pH = 6.0 y se adiciona 1 mL de Tritón X-100 (0.1 % v/v).

Buffer de fosfatos 10 mM, se disolvieron 1.281 g de KH_2PO_4 y 101 mg de K_2HPO_4 en 1 L de agua. Se ajusta a pH = 6.0 y se adiciona 1 mL de Tritón X-100 (0.1 % v/v).

Buffer de fosfatos 250 mM, se disolvieron 32.025 g de KH_2PO_4 y 2.525 mg de K_2HPO_4 en 1 L de agua. Se ajusta a pH = 6.0 y se adiciona 1 mL de Tritón X-100 (0.1 % v/v).

Buffer de fosfatos 250 mM y NaCl 250 mM, se disolvieron 1.281 g de KH_2PO_4 , 101 mg de K_2HPO_4 en 1 L de agua. Se ajusta a pH = 6.0, se adicionan 14.61 g de NaCl y 1 mL de Tritón X-100 (0.1 % v/v).

3.3.2 Columna QAE

Se empleó una resina de intercambio aniónico fuerte QAE Toyopearl QAE-550C. La cual fue empacada en una columna de 5 cm de diámetro y 20 cm de altura. La enzima solubilizada se aplicó a dicha columna. Una vez aplicada la muestra se lavó la columna con el *buffer* de fosfatos 0.01 M, pH 6 con Tritón X-100 al 0.1% v/v, empleando un flujo de 2.5 mL/min. Las proteínas retenidas fueron eluidas con una disolución 250 mM de NaCl.

3.3.3 Columna DEAE

La fracción activa que se obtuvo de la columna QAE Toyopearl se aplicó a la columna, 2.5 de diámetro y 20 cm de altura, empacada con la resina de intercambio aniónico débil, DEAE Toyopearl DEAE-650M. La PQQ-ADH fue lavada con el *buffer* de fosfatos 0.01 M, pH 6 con Tritón X-100 al 0.1% v/v, empleando un flujo de 2.5 mL/min. Las proteínas retenidas fueron eluidas con una disolución 250 mM de NaCl.

3.3.4 Columna Ha

Empleando una resina de hidroxiapatita HA-Ultrogel se empacó una columna de 2.5 de diámetro y 20 cm de altura. La fracción activa que se obtuvo de la columna DEAE Toyopearl se aplicó a dicha columna. La PQQ-ADH fue eluída con el *buffer* de fosfatos 0.01 M, pH 6 con Tritón X-100 al 0.1% v/v utilizando un gradiente lineal de 0.01 - 0.25 M de fosfatos. Se colectaron fracciones para ser concentradas mediante un Centricon AMICON® Ultra para su posterior caracterización molecular.

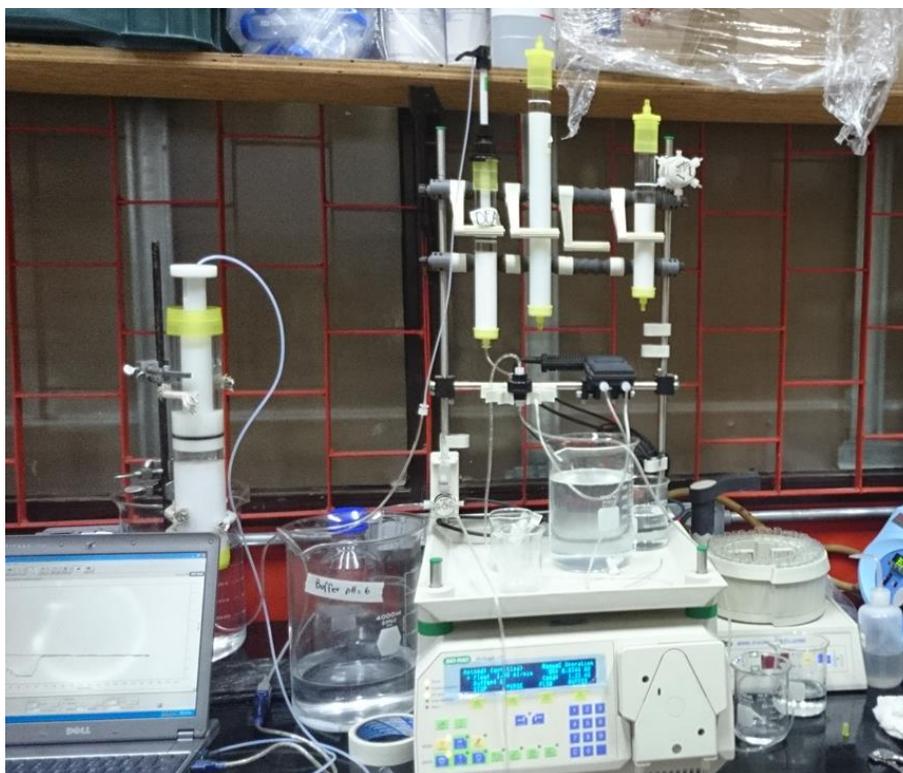


Figura 3.5 Columnas empleadas para la purificación de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

3.3.5 Columna S-100

Se utilizó una resina de exclusión molecular para proteínas entre 1 y 100 kDa, Sephacryl S-100 HR para empacar una columna de 2.5 cm de diámetro y 80 cm de altura. La proteína de interés fue lavada con el buffer de fosfatos 0.01 M, pH 6 con Tritón X-100 al 0.1% v/v empleando un flujo de 2.5 mL/min. Se colectaron fracciones para ser concentradas mediante un Centricon

AMICON® Ultra para su posterior caracterización molecular.

3.4 Caracterización molecular

3.4.1 Buffers y disoluciones empleados

Buffer de corrida para electroforesis desnaturizante, se disolvieron 4.5 g de Tris base (Tris(hidroximetil)aminometano), 21.6 g de glicina y 10 mL de solución de SDS al 10% en 1.5 L de agua.

Buffer de Tris 1.5 M pH = 8.8, se disolvieron 3.63 g de Tris base (Tris(hidroximetil)aminometano) en 20 mL de agua y se ajusta el pH a 8.8 con HCl.

Buffer de Tris 0.5 M pH = 6.8, se disolvieron 1.22 g de Tris base (Tris(hidroximetil)aminometano) en 20 mL de agua y se ajusta el pH a 6.8 con HCl.

Disolución de acrilamida concentrada (30%), se disolvieron 58.4 g de acrilamida y 1.6 g de N,N'-metilenbis-(acrilamida) en 200 mL de agua. Se filtró al vacío con membranas de 0.45 nm y se guardó en un frasco ámbar a 4 °C.

Disolución de SDS (10%), se disuelven 2 g de SDS (dodecilsulfato de sodio) en 20 mL de agua.

Disolución de APS (10%), se disuelven 2 g de APS (persulfato de amonio) en 20 mL de agua.

Disolución lítica: Se prepara una disolución con 150 µL de buffer de Tris 0.5 M, 100 µL de SDS al 10%, 250 µL de glicerol, 1 mL de agua, 100 µL de β-mercaptoetanol y azul de bromofenol. Para desnaturizar las muestras se adicionan 6 µL de solución lítica y 14 µL de muestra y se calientan durante 5 minutos.

Gel de poliacrilamida al 7%, se mezclan 3.2 mL de agua, 1.75 mL de acrilamida al 30%, 1.9 mL de buffer de Tris 1.5 M, 150 µL de SDS al 10% y 150 µL de APS al 10%. Se adicionan 10 µL de Temed (N, N, N'-tetrametilendiamina) para comenzar la polimerización.

Gel de poliacrilamida al 5% para concentrar, se mezclan 2.7 mL de agua, 0.66 mL de acrilamida al 30%, 0.5 mL de buffer de Tris 0.5 M, 40 µL de SDS al 10% y 40 µL de APS al 10%. Se adicionan 4 µL de Temed (N, N, N'-tetrametilendiamina) para comenzar la polimerización.

3.4.2 Electroforesis (SDS-PAGE)

La estructura oligomérica de la PQQ-ADH purificada fue analizada mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Para ello se preparó un gel de corrida que contenía acrilamida al 7% m/v y un gel concentrador de acrilamida al 5% m/v. Se empleó un buffer de corrida para electroforesis desnaturizante con SDS. Las concentraciones finales de la mezcla de digestión en presencia de la proteína fueron: SDS 5 % m/v; β -mercaptoetanol 3 % v/v; glicerol 15 % v/v y TRIS-HCl 125 mM, pH = 6.8, además se le adicionó azul de bromofenol. Ésta se calentó durante 3 minutos a temperatura de ebullición. Para correr el gel se empleó una cámara de electroforesis vertical *Hoefler SE300 miniVE* utilizando una corriente de 120 V a temperatura ambiente. Al finalizar, el gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 al 0.1% m/v con agitación constante. Después de la tinción el gel fue lavado con la disolución desteñidora. La masa molecular de las subunidades fue estimada mediante un marcador de peso molecular comercial (*BioRad Laboratories*).

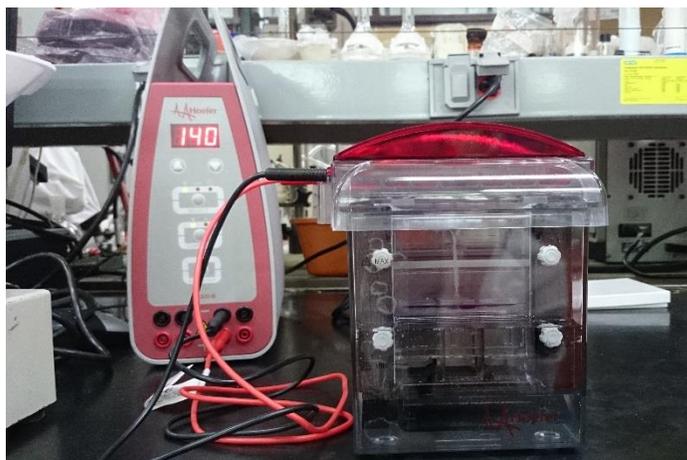


Figura 3.6 Cámara de electroforesis *Hoefler SE300 miniVE* empleada para realizar el gel de electroforesis desnaturizante

3.5 Ensayos enzimáticos

3.5.1 Disoluciones empleadas

Solución de albúmina 1 mg/mL, en un matraz aforado de 50 mL se disuelven 50 mg de albúmina bovina. Se empleó albumina bovina de MP Biomedicals.

Reactivo de Lowry, se mezclan 50 mL de carbonato sódico al 2% en NaOH, 500 μ L de sulfato cúprico al 1% y 500 μ L de tartrato sódico-potásico al 2%.

Reactivo de Folin, se prepara una disolución 1:1 en agua de reactivo de Folin y Ciocalteu.

Carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 M, en 50 mL de agua se disuelven 1 g de Na_2CO_3 y 200 mg de NaOH.

Sulfato cúprico al 1%, se disuelve 0.1 g de CuSO_4 en 10 mL de agua.

Tartrato sódico-potásico al 2%, se disuelven 0.2 g de tartrato de sódico-potásico tetrahidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 10 mL de agua.

3.5.1.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry [94], empleando albúmina bovina como estándar (BSA). Se realizó una curva de calibración con una disolución de albúmina bovina 1 mg/mL, de modo que se prepararon 6 muestras con dicha disolución de acuerdo a la tabla 3.1 Después de esperar 15 minutos se adicionó a cada tubo 250 μ L de reactivo de Folin y se determinó la absorbancia a 660 nm.

Tabla 3.1 Muestras para la curva patrón para cuantificar proteína por el método de Lowry

Tubo	0	1	2	3	4	5
Albúmina (mL)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Agua (mL)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0
Reactivo de Lowry (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

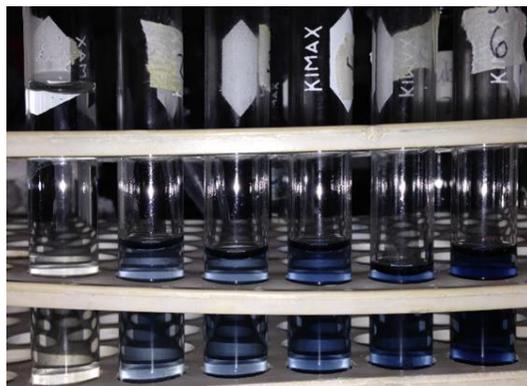


Figura 3.7 Disoluciones empleadas para la cuantificación de proteína mediante el método de Lowry.

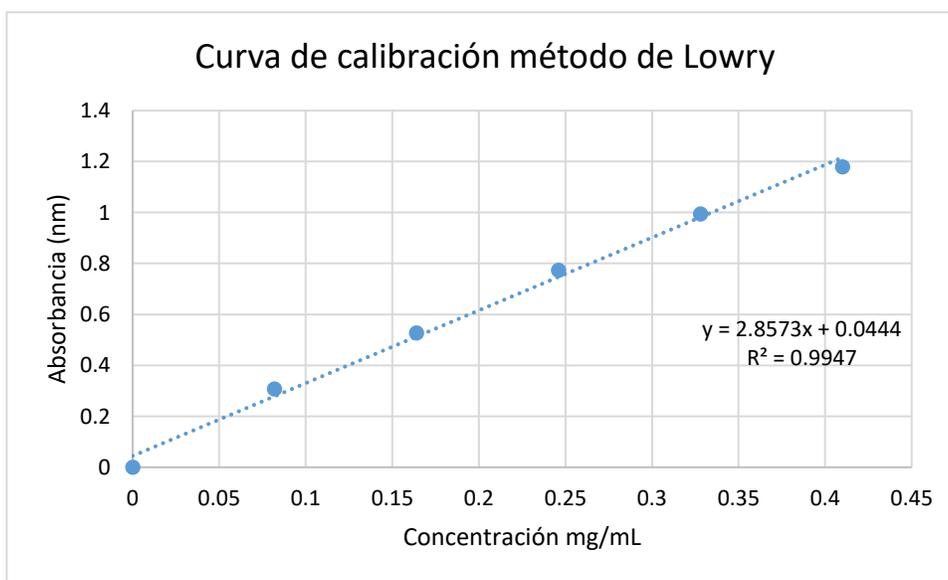


Figura 3.8 Curva patrón para la cuantificación de proteína por el método de Lowry

3.5.2 Cuantificación de la actividad enzimática de alcohol deshidrogenasa

Se empleó el método de ferrocianuro de reductasa para determinar la actividad de la enzima. La mezcla de reacción que contenía: *buffer* de McIlvaine pH = 6 (K_2HPO_4 126 mM y ácido cítrico 37 mM) con $K_3[Fe(CN)_6]$ 0.1 M como aceptor de electrones y etanol 20 mM fue ajustada a 1 mL. La reacción comienza al adicionar 0.03 mg de la enzima y se incubó por 20 min. Para detener la reacción se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Dupanol (SDS 0.3 % m/v, de $Fe_2(SO_4)_3$ 0.5 % m/v y H_3PO_4 8 % m/v, ajustando a 5 mL. Posteriormente se determinó la absorbancia a 680 nm tomando en cuenta que, cada incremento en 0.02 es proporcional a 1 μ mol de etanol oxidado. La unidad de actividad enzimática está definida como la oxidación de 1 μ mol de etanol por minuto [95, 96].

3.6 Caracterización espectroscópica

3.6.1 Espectroscopia de UV-Vis

Los espectros de UV-Vis de la PQQ-ADH se obtuvieron empleando un espectrofotómetro *Agilent 8453* con arreglo de diodos de barrido rápido en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se emplea *buffer* de fosfatos (10 mM, pH 6) con tritón X-100 al 0.12 % v/v como blanco y una muestra de la PQQ-ADH recién aislada con una concentración de proteína de 10 mg/mL, previamente determinada por el método de Lowry.

3.6.2 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE)

Los espectros de RPE se obtuvieron en un espectrómetro *Bruker Elexys E500* en banda X (frec. \approx 9.40 GHz) bajo condiciones de no saturación, a una potencia, $P \approx$ 2 mW y una modulación de 100 kHz. La variación de la temperatura (5 - 55 K) fue controlada mediante un termostato tipo crióstato marca Oxford de flujo continuo de helio líquido. Se utilizó el software de SimFonia[®] de Bruker para simular los espectros y los valores de g se determinaron midiendo los valores de campo magnético y la intensidad de la frecuencia de microondas aplicada. Todos los

Procedimiento experimental

experimentos de RPE se llevaron a cabo en el laboratorio de resonancia paramagnética electrónica de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química.

Se transfirieron 100 μL de la a enzima PQQ-ADH recién aislada a tubos de cuarzo (4 mm, *Wilmad Lab Glass*) y se congeló cuidadosamente en nitrógeno líquido, a fin de evitar la precipitación o desnaturalización de la enzima, para su análisis RPE a baja temperatura (10 K). Inicialmente se registró su espectro RPE a fin de comparar el espectro obtenido en el presente trabajo con lo reportado anteriormente [74].

Posteriormente, se realizó un estudio de saturación progresiva en onda continua a 10 K, empleando un intervalo de potencia 1 a 25 mW y una modulación de 100 kHz. Estos experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de resonancia paramagnética electrónica de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1 Crecimiento de la bacteria *Ga. diazotrophicus*

Para llevar a cabo el crecimiento de la bacteria *Ga. diazotrophicus*, tanto en el laboratorio como en el biofermentador de 350 L, se empleó el medio de cultivo LGIP enriquecido con sacarosa al 5 % m/v. Dicho crecimiento fue monitoreado mediante mediciones de densidad óptica a una absorbancia de 600 m y en la fase de crecimiento exponencial tardía (a las 33 horas) se adicionó etanol al 0.7 % v/v como segunda fuente de carbono.

Asimismo, durante el tiempo de incubación de la bacteria, se controló el pH empleando hidróxido de potasio para evitar que disminuyera de 5.5, En un inicio se mantuvo constante, sin embargo, se observa que el pH disminuye conforme aumenta el crecimiento de *Ga. diazotrophicus*, debido a la formación de ácido acético en el medio.

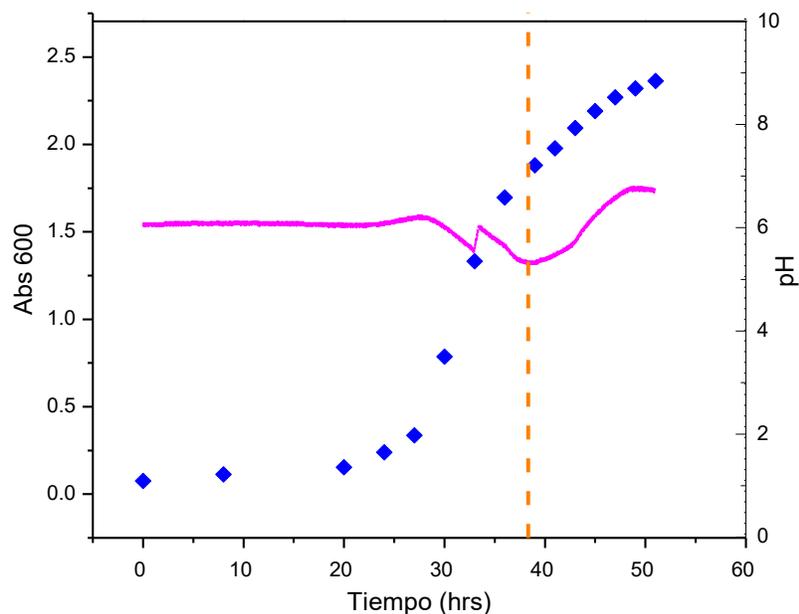


Figura 4.1 Curva de crecimiento de la bacteria *Ga. diazotrophicus* en medio LGIP enriquecido con sacarosa al 5 % m/v en un fermentador de 350 L. (■ crecimiento del cultivo; A_{600} , ■ pH, - - - adición de etanol al 0.5 % v/v a las 39 horas).

Cabe resaltar que la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* se mantiene activa en un intervalo de pH entre 4 y 8. A pesar de haber seguido el método de crecimiento reportado por [93], en el presente trabajo se llevó a cabo un control de pH.

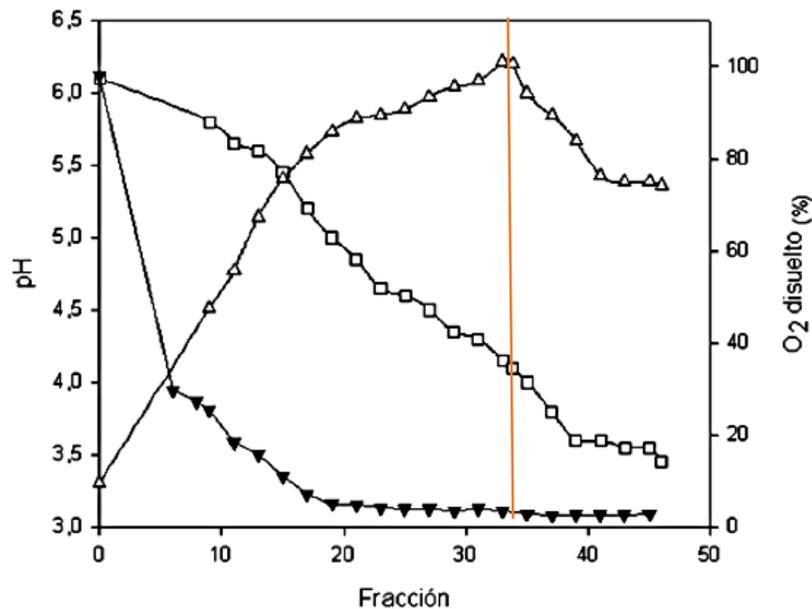


Figura 4.2 Curva de crecimiento reportada para la bacteria *Ga. diazotrophicus* en medio LGIP enriquecido con sacarosa al 5 % m/v en un fermentador de 350 L. (Δ crecimiento del cultivo: $A_{560\text{nm}}$, \blacktriangledown oxígeno disuelto en el medio, \square pH, --- adición de etanol al 0.5 % v/v a las 39 horas) (Adaptado [93]).

Al comparar la curva de crecimiento obtenida en este trabajo con la reportada anteriormente por Gómez-Manzo (figura 4.1 y 4.2), se observa que, en el caso de este último, el pH desciende hasta 3.5 debido a que no fue controlado durante el crecimiento de la bacteria lo cual permitiría explicar el hecho de que se aislara una fracción de PQQ-ADH inactiva [97] mientras que, en el presente trabajo el haber controlado el pH en un rango de entre 5.5 y 7 para garantizar que la enzima se aislara de forma activa (véase tabla 4.1).

4.1.1 Tinción de Gram

Para corroborar la pureza de la cepa se empleó la tinción de Gram. Al microscopio se observa una sola morfología, en este caso bacilos, los cuales están teñidos de rojo, indicativo de una cepa Gram negativa, además, no se observan otras morfologías u otro color en el frotis. De esta manera fue posible determinar que la cepa que se empleó para inocular los medios de cultivo líquido se encontraba pura, garantizando la presencia de un sólo microorganismo, *Ga. diazotrophicus*.

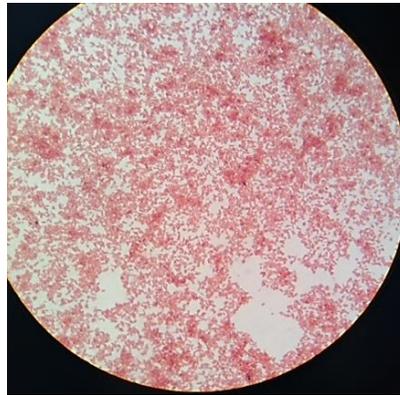


Figura 4.3 Vista al microscopio de la tinción de Gram donde se observa la presencia de un único microorganismo teñido de rojo.

4.2 Purificación de la proteína PQQ-ADH mediante cromatografía en columna

Para separar la proteína de interés del resto que se encuentran en la célula, se emplearon resinas de intercambio aniónico (QAE Y DEAE), afinidad (Hidroxiapatita, Ha) y exclusión molecular (Sephacryl S-100). A continuación se presentan los perfiles de elución que se obtuvieron durante el proceso de purificación de la PQQ-ADH (figura 4.4).

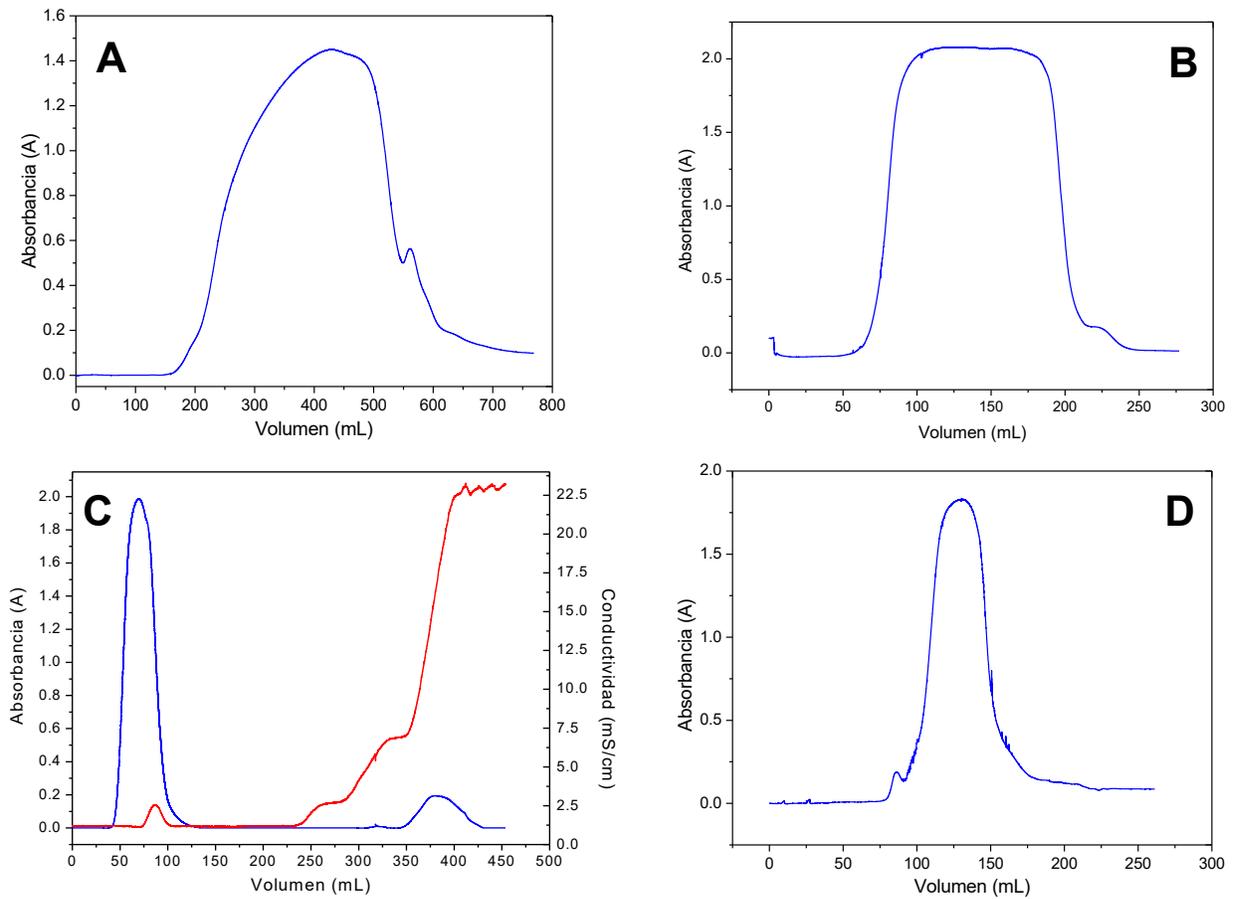


Figura 4.4 Patrones de elución de la purificación de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. A) columna QAE de intercambio aniónico (— absorbancia a 280 nm) B) columna DEAE de intercambio aniónico (— absorbancia a 280 nm) C) columna de Hidroxiapatita, Ha (— absorbancia a 280 nm, — conductividad) D) columna S-100 de exclusión molecular (— absorbancia a 280 nm).

Al finalizar el proceso de purificación se recuperaron 3 mL de la enzima pura y de concentración de 10 mg/mL, los resultados se presentan en la tabla 4.1

Tabla 4.1 Tabla de purificación de la enzima PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)
Solubilizado de membrana	1227	1773	1.4
QAE	188	1670	8.9
DEAE	106	1628	15.4
Ha	20	1619	80.9
Sephacryl S-100	3	718	239.3

De acuerdo con la tabla 4.1, se observa que la actividad específica de la PQQ-ADH va aumentando al pasar por cada columna, sin embargo, es en la fracción membranal recuperada de la columna de hidroxapatita (HA) en la que se observa que dicha actividad comienza a aumentar considerablemente al igual que en la columna Sephacryl S-100 pero, es en esta última en la que se tiene una mayor pérdida de la PQQ-ADH. Resulta importante notar, que en el procedimiento anterior, el cual fue modificado, se empleaba un gradiente de NaCl para eluir la proteína de las columnas QAE y DEAE, ya que se utilizaba un *buffer* con un valor de pH por encima del punto isoeléctrico de la proteína. Por esta razón, era necesario recuperar la proteína mediante diálisis, hecho que propició una pérdida de proteína en las dos primeras columnas, QAE y DEAE, del trabajo anteriormente reportado. En este caso, se empleó un *buffer*, pH = 6.0, inferior al punto isoeléctrico reportado para la proteína. De esta manera, la proteína fue lavada de las columnas de intercambio iónico, sin observar una pérdida considerable de la PQQ-ADH.

4.3 Caracterización espectroscópica

4.3.1 Espectroscopia de UV-Vis

El espectro electrónico de la PQQ-ADH recién aislada a una concentración de 10 mg/mL se muestra en la figura 4.9. El espectro Uv-Vis muestra dos bandas correspondientes al PQQ en 313 y 350 nm debidas a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del anillo aromático, asimismo las bandas (α y β) características de los grupos hemo tipo *c* reducidos en 523 y 554 nm al igual que la banda Soret en 417 nm. Todas las bandas observadas se ajustan muy bien a lo reportado anteriormente (figura 4.5) [74].

A partir de los valores de absorbancias de la banda β de los grupos hemo *c* de la PQQ-ADH fue posible determinar el coeficiente de absortividad molar. Para ello se tomaron los valores de absorbancia de la banda β de la enzima en estado oxidado y reducido, con la diferencia de absorbancias, y se obtuvo un valor de $\epsilon = 782 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para los hemo de la PQQ-ADH.

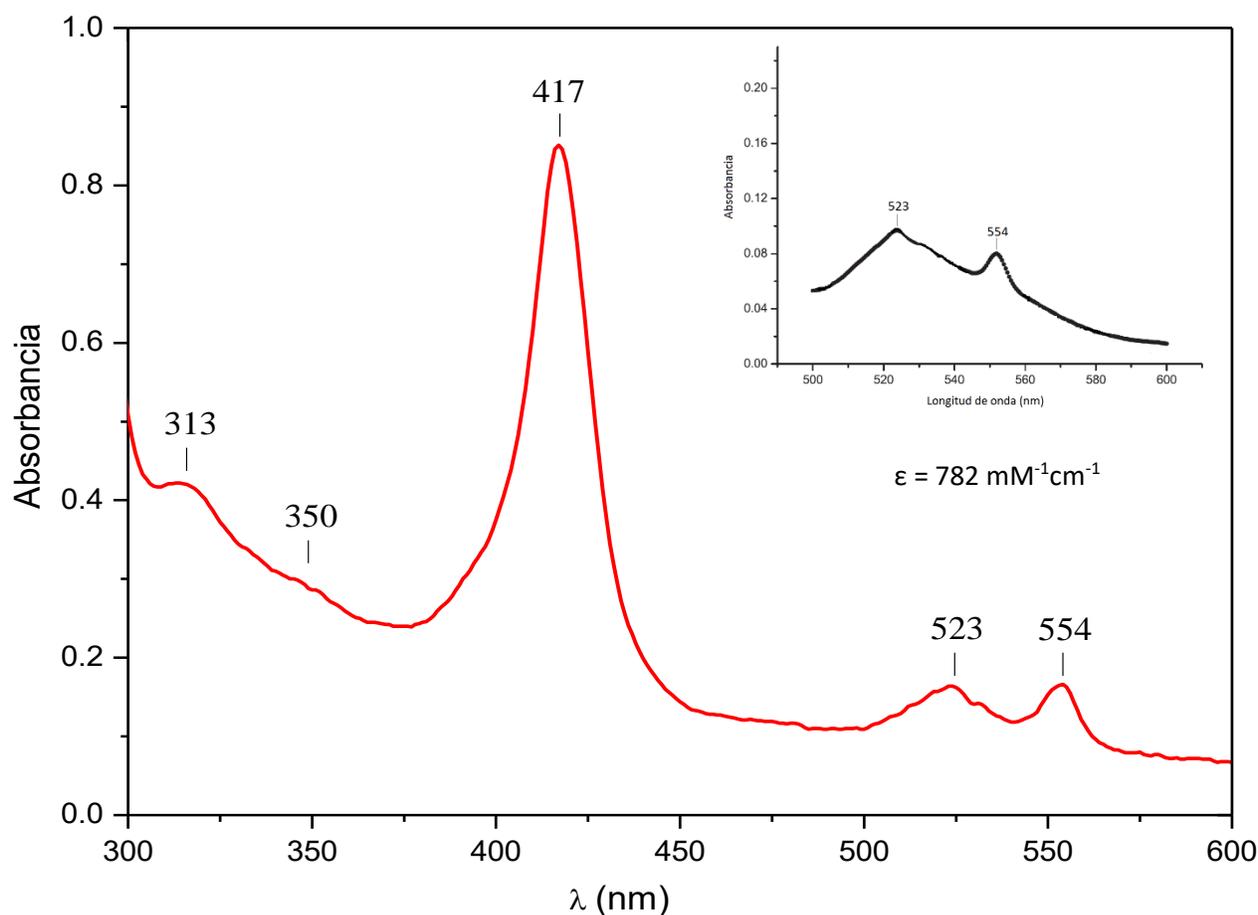


Figura 4.5 Espectro Uv-Vis a temperatura ambiente de la PQQ-ADH recién aislada de *Ga. diazotrophicus* en *buffer* de fosfatos pH = 6.0 con Tritón X-100 al 0.1 % v/v a una concentración de 10 mg/mL. Inserto: PQQ-ADH oxidada.

4.3.2 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE)

El espectro de resonancia paramagnética electrónica en banda X (≈ 9.4 GHz) a 77 K de la PQQ-ADH recién aislada se presenta en la figura 4.6, la cual muestra una señal isotrópica en $g = 2.003$ y un ancho de la señal de 12 G que, de acuerdo a la literatura se asigna a un radical orgánico, en este caso corresponde al cofactor PQQ en su forma de semiquinona, PQQ^\bullet , así mismo una señal de baja intensidad con valores de g menores a 2.00 asignada a la presencia del cúmulo tipo ferredoxina $[\text{2Fe-2S}]^+$. Ambas señales presentan una relación de intensidades aproximadamente de 15:1.

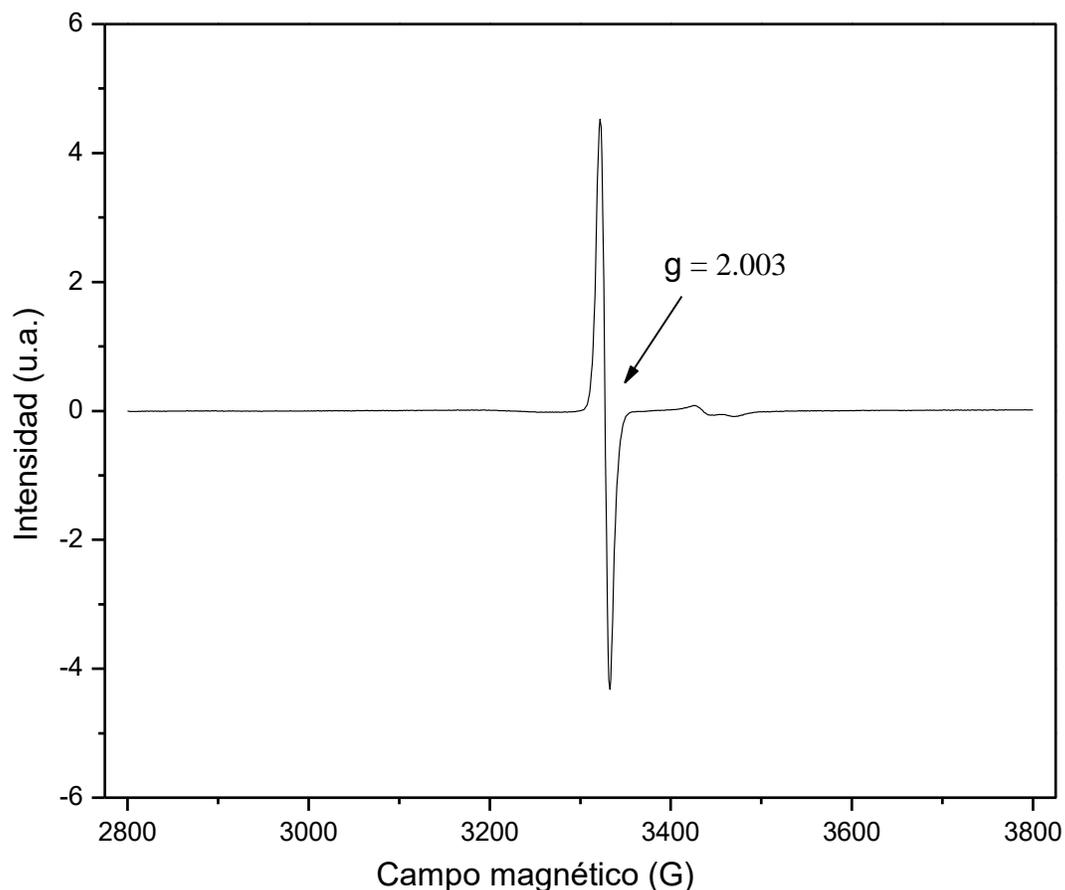


Figura 4.6 Espectro de RPE de la PQQ-ADH recién aislada de *Ga. diazotrophicus* en banda X a 77 K. Condiciones: concentración de proteína 10 mg/mL; potencia, 2 mW; frecuencia, 9.392166 GHz; amplitud, 0.1 mT.

Al disminuir la temperatura a 10 K en el espectro RPE de la muestra en estudio (figura 4.7) se observan nuevamente las dos señales, pero ahora con una relación de intensidades de 5:1; una señal isotrópica centrada en $g = 2.003$ correspondiente al radical semiquinona (PQQ \bullet), y una señal anisotrópica con valores de $g_1 = 1.944$ y $g_2 = 1.918$ asignada al cúmulo [2Fe-2S] $^+$. Es importante señalar que, a través de estudios previos, realizados en nuestro grupo de trabajo [74], se sabe que la señal correspondiente a $g_x = 2.007$ del cúmulo [2Fe-2S] $^+$ se encuentra traslapada por la señal del PQQ \bullet . Así, los valores para la señal del cúmulo [2Fe-2S] $^+$ serían; $g_x = 2.007$, $g_1 = g_y = 1.944$ y $g_2 = g_z = 1.918$ obteniendo así un valor de $g_{prom} = 1.956$, valor de g típica para el cúmulo [2Fe-2S] $^+$ tipo ferredoxina en estado reducido (véase figura 1.25).

Es importante resaltar que es necesario descender a temperaturas de helio líquido ($T \approx 10$ K), de tal forma que se favorezca la distribución de Boltzman, así como aumentar los tiempos de relajación del hierro (III/II) en el cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ que son muy cortos [98]. Debido a esto, la intensidad de la señal RPE del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ aumenta notablemente al disminuir la temperatura en comparación a las señales obtenidas en el espectro RPE a 77 K (figura 4.7).

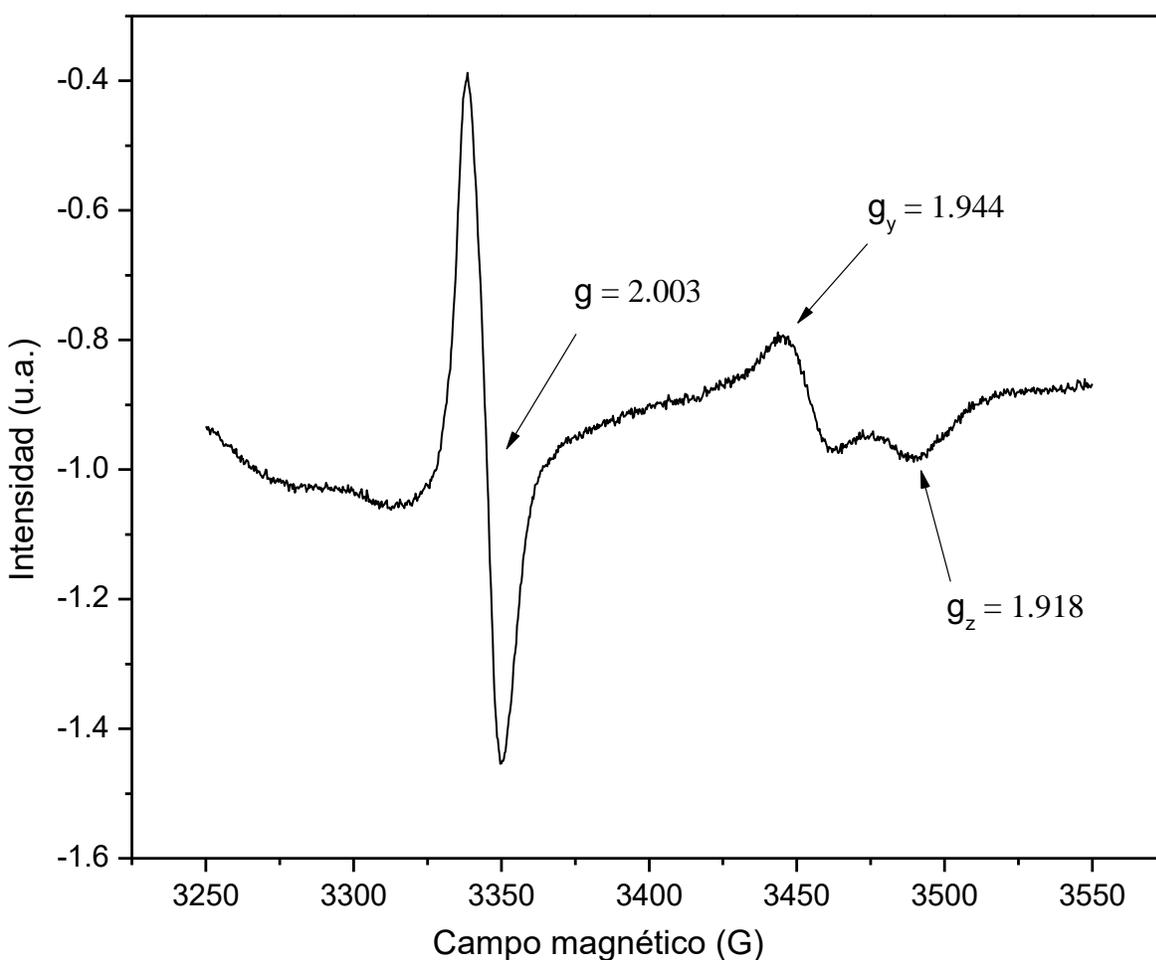


Figura 4.7 Espectro de RPE en banda X a 10 K de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. Condiciones: concentración de proteína 10 mg/mL; potencia, 2 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT.

4.6.2.1 Estudios RPE a temperatura variable

Para determinar el tipo de interacción magnética que existe entre el PQQ• y el [2Fe-2S]⁺ se llevó a cabo un estudio de RPE a temperatura variable, de 5 a 55 K, empleando una muestra de PQQ-ADH recién aislada. Ambas especies son paramagnéticas, por un lado, el cofactor PQQ posee un estado de espín igual a 1/2, debido al radical libre presente en su estado reducido, asimismo los hierros (III/II) del cúmulo [2Fe-2S]⁺ tipo ferredoxina se encuentra acoplados antiferromagnéticamente, presentando un estado de espín total de 1/2. Por lo que una interacción magnética de tipo dipolar es posible entre dichas especies.

En diversos sistemas se han empleado estudios a temperatura variable a fin de determinar el tipo de comportamiento magnético existente entre las especies paramagnéticas [99, 100]. En el caso de la PQQ-ADH, esto es posible ya que el hierro de los hemos tipo c se encuentra en estado reducido, Fe²⁺, siendo una especie diamagnética no presentará señal en RPE y por ende, no sería posible un acoplamiento magnético con el PQQ• y el [2Fe-2S]⁺.

En la figura 4.8 se presentan los espectros RPE de la enzima PQQ-ADH obtenidos en un rango de temperatura de 5 – 55 K. Todos obtenidos bajo condiciones de no saturación, así como los mismos parámetros de medición. En todos ellos se observa el mismo número y posición de señales a las obtenidas en los espectros de RPE a 77 y 10 K, asimismo, al aumentar la temperatura la intensidad de la señal correspondiente al cúmulo [2Fe-2S]⁺ tipo ferredoxina va disminuyendo mientras que, la intensidad de la señal asignada al radical semiquinona aumenta con la temperatura.

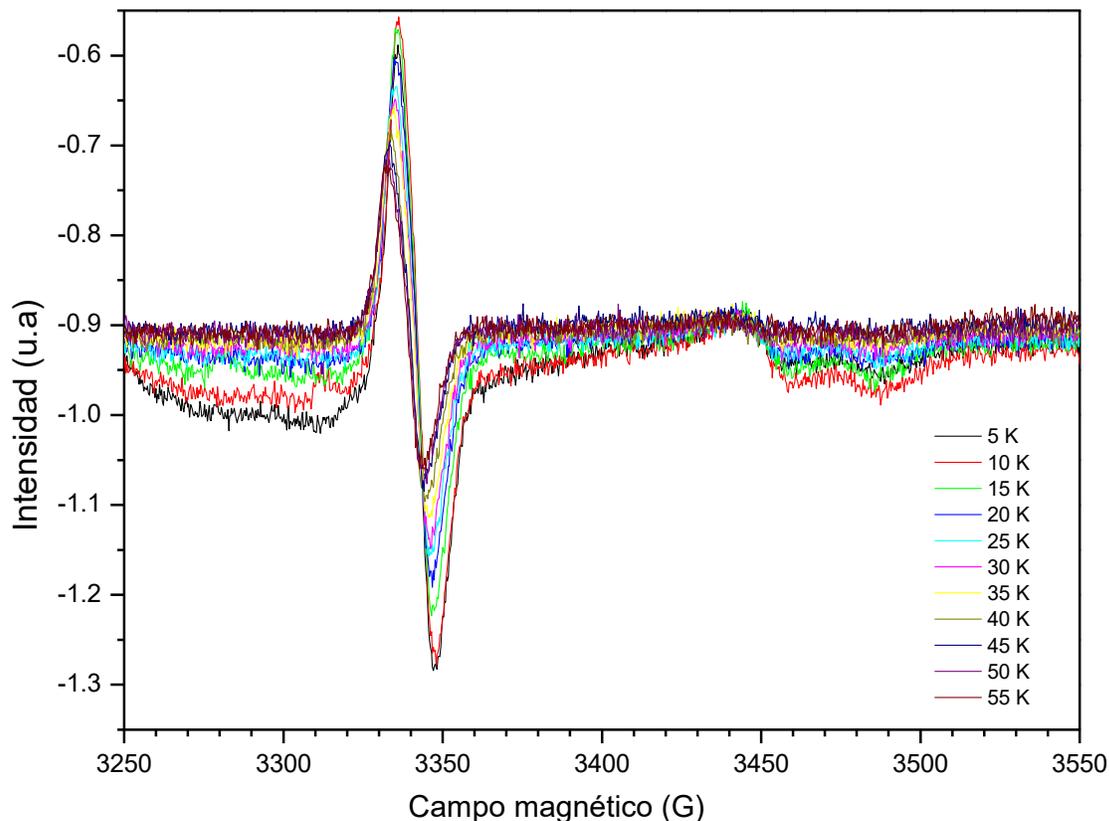


Figura 4.8 Espectros de RPE en banda X de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* medidos en un intervalo de temperatura de 5 a 55 K. Condiciones: concentración de proteína 10 mg/mL; potencia, 2 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT.

Dado que la intensidad de la señal (I) en RPE y la susceptibilidad magnética (χ) se relacionan de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$I = \chi'' \eta Q \sqrt{P Z_0} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Donde χ es la susceptibilidad magnética, η el factor de llenado, Q el factor de calidad del resonador, Z_0 es la impedancia de la línea de transmisión y P la potencia de microondas del resonador [72]. Así, con base en dicha ecuación, podemos relacionar proporcionalmente a la susceptibilidad magnética con la intensidad de la señal RPE:

$$I_{RPE} \propto \chi''$$

De esta manera es posible realizar una gráfica de la intensidad de la señal RPE de los cofactores PQQ• y el cúmulo [2Fe-2S]⁺ contra la temperatura (Figura 4.9).

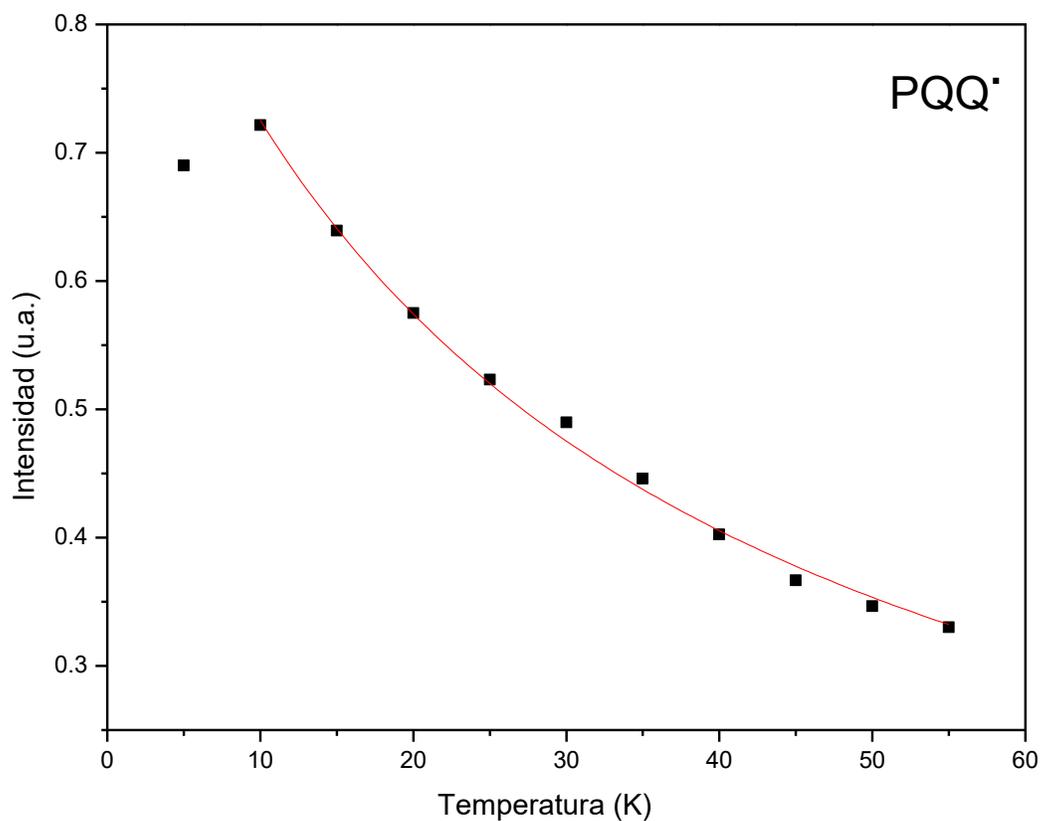


Figura 4.9 Intensidad de la señal observada en RPE en función de la temperatura y ajuste al modelo Curie Weiss para el PQQ•. Condiciones: concentración de proteína 10 mg/mL; potencia, 2 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT. (■ experimental, — ajuste).

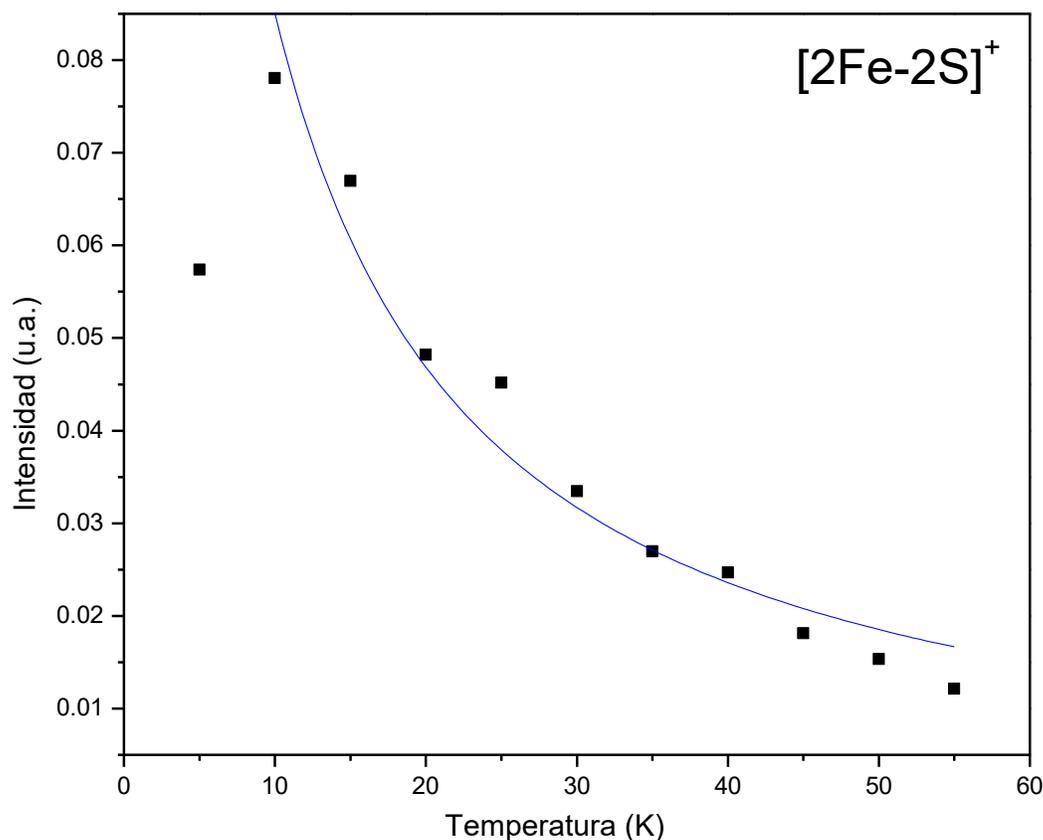


Figura 4.10 Intensidad de la señal observada en RPE en función de la temperatura y ajuste al modelo Curie Weiss para el cúmulo $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$. Condiciones: concentración de proteína 10 mg/mL; potencia, 2 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT. (■ experimental, — ajuste).

En las gráficas de las figuras 4.9 y 4.10, se observa un máximo de la intensidad cercana a 10 K, a temperaturas menores a 10 K la intensidad disminuye conforme decrece la temperatura en tanto que a temperaturas mayores a 10 K hay un decremento gradual de la intensidad conforme la temperatura aumenta. En ambos casos, la intensidad de la señal de RPE es recíproca a la temperatura, principal característica de un sistema paramagnético. Dichos gráficos ajustan a una hipérbola, típico comportamiento Curie-Weiss de antiferromagnetismo, según la ecuación:

$$\chi = \frac{C}{T-\theta} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Donde C la constante de Curie, θ la temperatura de Weiss y χ , la susceptibilidad magnética.

Una manera de verificar dicho comportamiento es trazar una gráfica del inverso de la intensidad de la señal observada en RPE como función de la temperatura. Un valor de ordenada al origen diferente de cero es indicativo de que existe una interacción magnética entre dichas especies paramagnéticas.

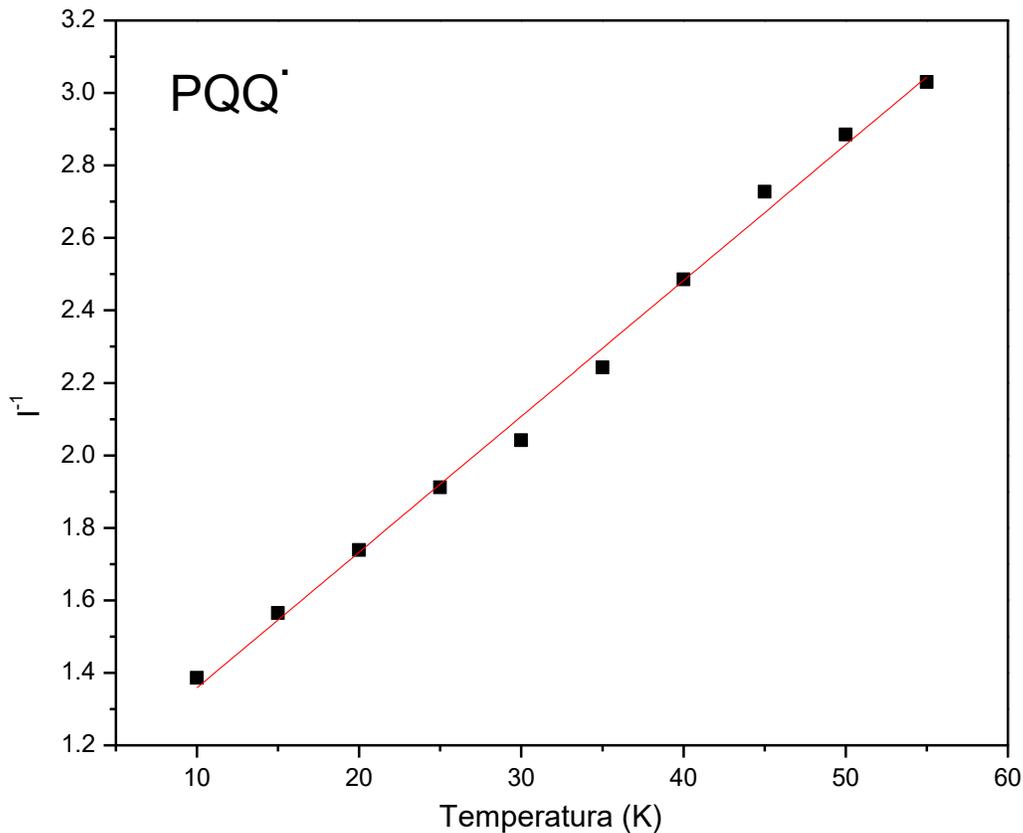


Figura 4.11 Gráfica de la intensidad de la señal del PQQ• observada en RPE en función de la temperatura (■ experimental, — ajuste). Condiciones: temperatura 10–55 K), concentración de proteína 10 mg/mL; potencia, 2 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT.

El valor de la constante de Weiss θ , se obtiene a partir de la gráfica de I^{-1} en función de T. La figura 4.11 muestra la gráfica del inverso de la intensidad de la señal en RPE del PQQ•, en la cual se observa una línea recta cuya pendiente m , corresponde a $m = T/C$ y la ordenada al

origen $b = -\theta/C$. De acuerdo con este ajuste, el valor de la constante de Weiss obtenido es, $\theta = -33 \text{ K}$. Dicho valor negativo manifiesta un acoplamiento de tipo antiferromagnético entre ambas especies paramagnéticas presentes en nuestro sistema en estudio, la enzima PQQ-ADH.

En el caso de la señal asignada al cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ se observa que la tendencia no es lineal (figura 4.12). Esto puede atribuirse a que la intensidad de la señal, con un valor de $g_y = 1.944$, es muy pequeña por lo que se presenta una considerable incertidumbre experimental en la medición de la intensidad de pico a pico, así como la dependencia de T_1 y T_2 con la temperatura, y por ende, este hecho repercutirá en los valores de la intensidad.

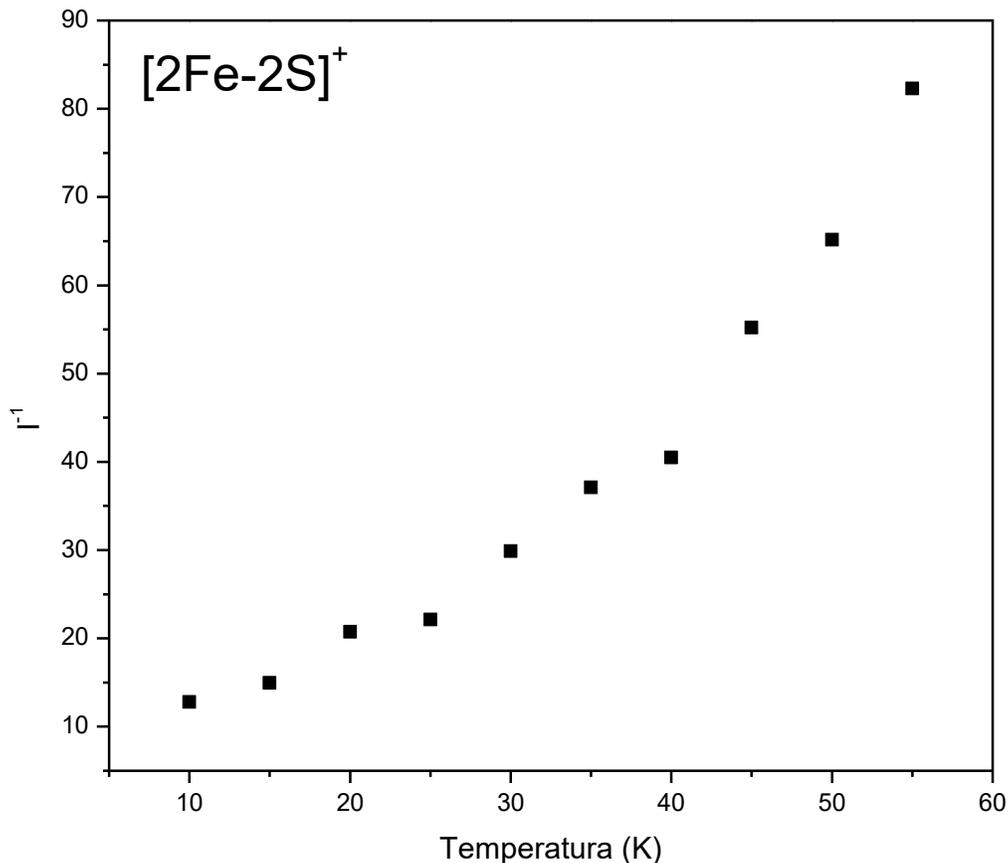


Figura 4.12 Gráfica de la intensidad de la señal del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ observada en RPE en función de la temperatura (■ experimental). Condiciones: temperatura 10 – 55 K, concentración de proteína 10 mg/mL; potencia, 2 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT.

Casos similares donde hay una interacción magnética, en la cual se involucran cofactores de proteínas, han sido reportados. Ejemplo de ello es la enzima ribonucleótido reductasa, la cual cataliza la reducción de ribonucleótidos a sus correspondientes desoxirribonucleótidos, de *E.coli*, contiene un cúmulo dihierro conectado mediante un puente μ -oxo, que se encuentra acoplado antiferromagnéticamente con un radical tirosil [101].

4.6.2.2 Estudios de saturación progresiva

Los estudios de saturación progresiva de potencia de microondas de una señal en RPE a temperatura constante proporcionan información sobre la interacción de dos especies paramagnéticas. Un caso típico en bioinorgánica son las metaloenzimas que llevan a cabo funciones redox y están involucradas en la conversión de energía biológica, realizado dos transferencias secuenciales de un electrón hacia la cadena respiratoria, en cuyo centro activo están presentes dos electrones desapareados, interactuando a cierta distancia, provenientes de un centro metálico que se relaja rápidamente acoplado a un radical orgánico que se relaja lentamente. Tal es el caso del cúmulo $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$ y el PQQ $^\bullet$, considerados como paramagnetos de rápida y lenta relajación [102], respectivamente. Con esto en mente, si ambas especies se encuentran cerca ($< 20 \text{ \AA}$), la relajación del PQQ $^\bullet$ intensificará la relajación del cúmulo $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$, de tal forma que ésta será más rápida y la señal será más difícil de saturar, indicando con ello una interacción magnética, de tipo antiferromagnético ya obtenida, entre ambas especies paramagnéticas [102].

En la literatura especializada, el término potencia media de saturación $P_{1/2}$, es empleado como un parámetro de saturación, que representa la potencia de microondas incidente a la cual la señal en el espectro RPE posee la mitad de la intensidad que tendría en ausencia del fenómeno de saturación de la señal. De esta forma, la siguiente ecuación se emplea para realizar el ajuste de los datos obtenidos mediante el estudio de saturación progresiva en onda continua;

$$A = K\sqrt{P} / [1 + P/P_{1/2}]^{b/2} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

Donde A es la amplitud de la señal en RPE, K es una constante, P es la potencia de microondas, $P_{1/2}$ es la potencia media de saturación y b es el parámetro de no homogeneidad.

Para presentar los datos experimentales resulta conveniente emplear la forma logarítmica de la ecuación 4.3:

$$\log(A/P^{1/2}) = \log(K) - (b/2) \log[1 + P/P_{1/2}] \quad (\text{Ec. 4.4})$$

Al graficar el $\log(A/P^{1/2})$ en función del $\log P$ se obtienen dos regiones lineales que justamente intersectan en el valor donde $P = P_{1/2}$. [102]

Para llevar a cabo el estudio de saturación progresiva de potencia de microondas a la muestra de la enzima PQQ-ADH, se realizaron una serie de mediciones a diferente potencia de irradiación de microondas, en un intervalo de 1 – 25 mW, manteniendo en todas ellas la temperatura constante, 10 K, y por ende condiciones de no saturación en el equipo del detector, obteniendo así una respuesta lineal entre la intensidad de la señal con la población de los estados energéticos de la muestra.

Debido a que una de las componentes asignadas a la señal del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$, $g_x = 2.007$, se traslapa con la señal correspondiente al radical semiquinona, fue necesario simular nuevamente el espectro del cúmulo tipo ferredoxina $[2\text{Fe-2S}]^+$ (figura 4.13), mediante el *software* SimFonia[®] de Bruker. Posteriormente, con el espectro simulado, se llevó a cabo una deconvolución en cada espectro obtenido experimentalmente, de manera que sólo quedara la señal del radical *per se*, sin la contribución del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ para poder determinar, con una mayor precisión, el valor de $P_{1/2}$ para el cofactor PQQ[•].

En el caso de los espectros del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$, no fue necesario realizar dicho procedimiento ya que la señal de interés, $g_y = 1.944$, no traslapa o cuenta con alguna otra contribución que afectara la obtención de los valores de la intensidad de la señal con respecto a la variación de potencia, durante todo el experimento de saturación progresiva de potencia de microondas.

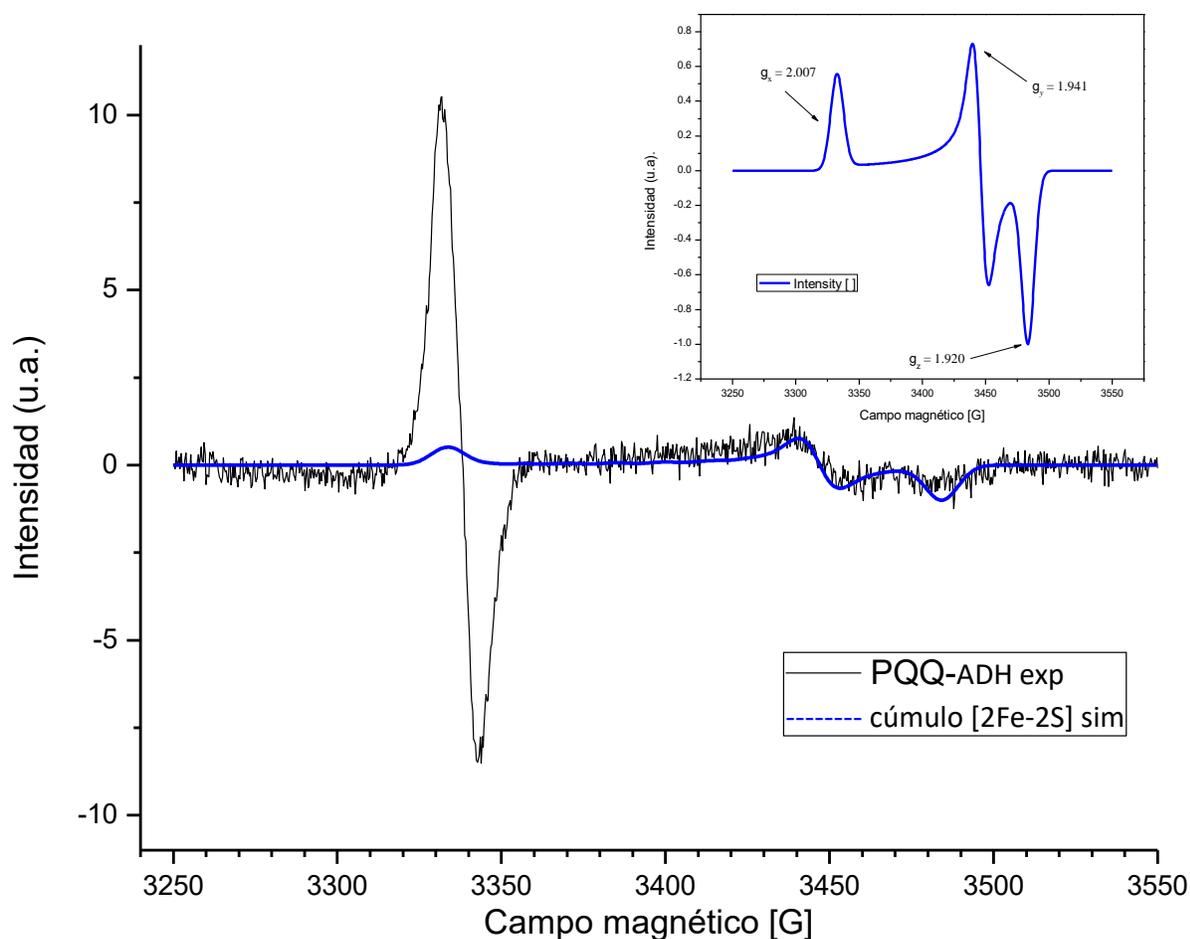


Figura 4.13 Espectro de RPE de la PQQ-ADH de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en banda X a 10 K (— experimental). Inserto: espectro simulado del cúmulo tipo ferredoxina $[2\text{Fe-2S}]^+$; $g_x = 2.007$, $g_y = 1.941$ y $g_z = 1.920$ (—). Condiciones: concentración de proteína 10 mg/mL; potencia, 1.01749 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT.

En la figura 4.13 se muestra uno de los espectros RPE de la PQQ-ADH obtenido experimentalmente durante el experimento de saturación progresiva de microondas.

Asimismo, en el inserto, se observa el espectro RPE simulado mediante el *software* SimFonia[®] correspondiente al cúmulo [2Fe-2S]⁺. Se utilizó una muestra de la enzima PQQ-ADH recién aislada con una concentración de 10 mg/mL. A cada espectro RPE obtenido experimentalmente se restó la contribución de la señal del cúmulo [2Fe-2S]⁺, de modo que la región con g 2.0 del espectro experimental de la PQQ-ADH únicamente tendrá la contribución del radical semiquinona, PQQ[•].

En los espectros obtenidos experimentalmente (en negro, —), es posible observar como aumenta la amplitud de la señal del cúmulo [2Fe-2S]⁺ mientras aumenta la potencia de microondas. Sin embargo, en el caso de la señal asignada al radical ocurre un efecto contrario, es decir, una vez que se ha eliminado la contribución del cúmulo [2Fe-2S]⁺, se observa que la amplitud de la señal del PQQ[•] disminuye conforme aumenta la potencia de microondas. Cabe resaltar, que a las condiciones a las que se realizó el estudio de saturación progresiva no se saturó ninguna de estas dos señales.

Para estudiar el comportamiento de la saturación de las señales correspondientes a los cofactores PQQ[•] y el cúmulo [2Fe-2S]⁺, como se indicó anteriormente, se graficó la variación de la amplitud de la señal en RPE de cada uno de ellos con respecto a la potencia aplicada.

La figura 4.14 muestra la dependencia de la amplitud de las señales RPE del PQQ[•] y del cúmulo [2Fe-2S]⁺ con respecto a la potencia de microondas P, aplicada a temperatura constante, 10 K. Empleando la ecuación 4.4 observamos que, para la curva de saturación del radical semiquinona se tienen dos regiones lineales, cuya intersección nos proporciona el valor de $P_{1/2}$ (tabla 4.2) En el caso del cúmulo [2Fe-2S]⁺ también es posible observar las dos regiones lineales, además el valor de $P_{1/2}$ de saturación para la señal del cúmulo [2Fe-2S]⁺ es mayor con respecto a la del PQQ[•].

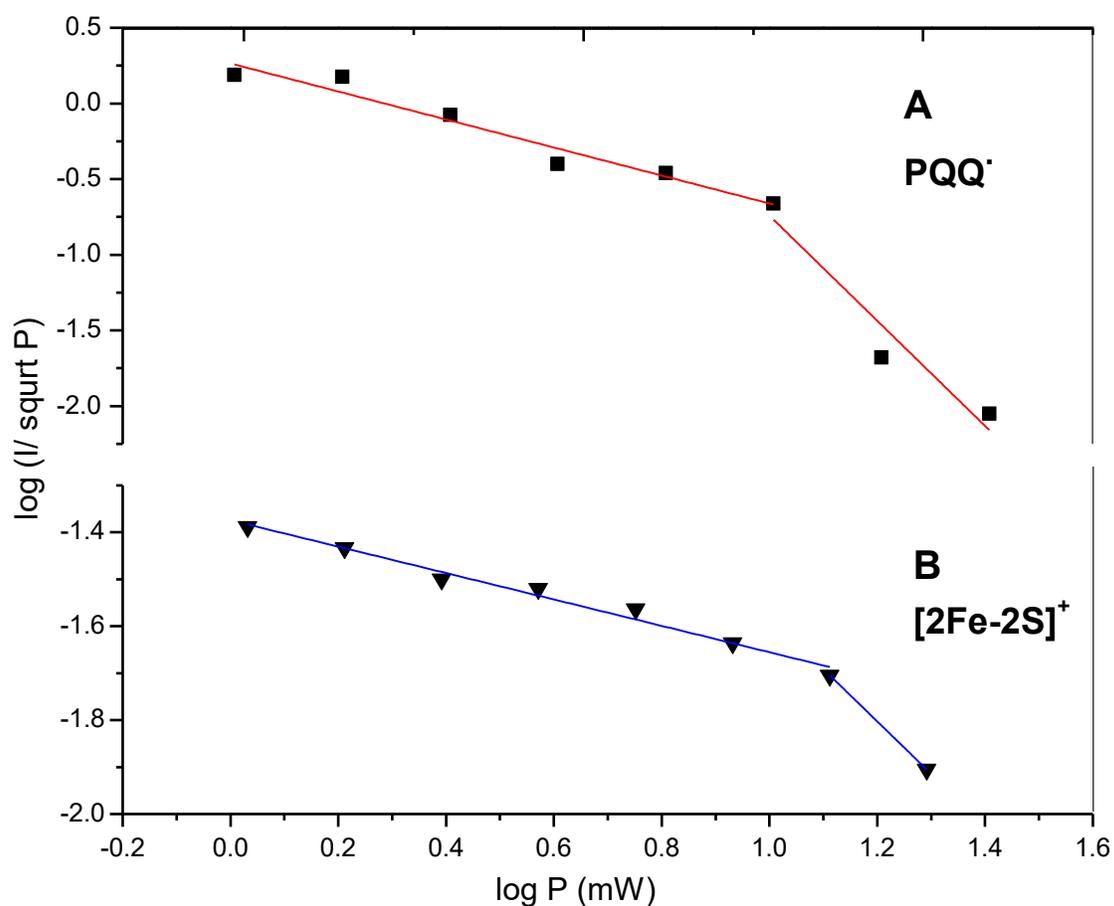


Figura 4.14 Estudio de saturación de potencia progresiva a 10 K de la PQQ-ADH de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. (A) PQQ (■, ajuste lineal —) y (B) cúmulo [2Fe-2S] (▼, ajuste lineal —). Condiciones: concentración de proteína 10 mg/mL; intervalo de potencia, 1 - 25 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT.

Adicionalmente, en el grupo de trabajo se realizó previamente un estudio de saturación progresiva para el radical semiquinona a 77 K, empleando un rango de potencia de 0.5 a 20 mW. La curva de saturación progresiva se muestra en la figura 4.15 y tabla 4.2.

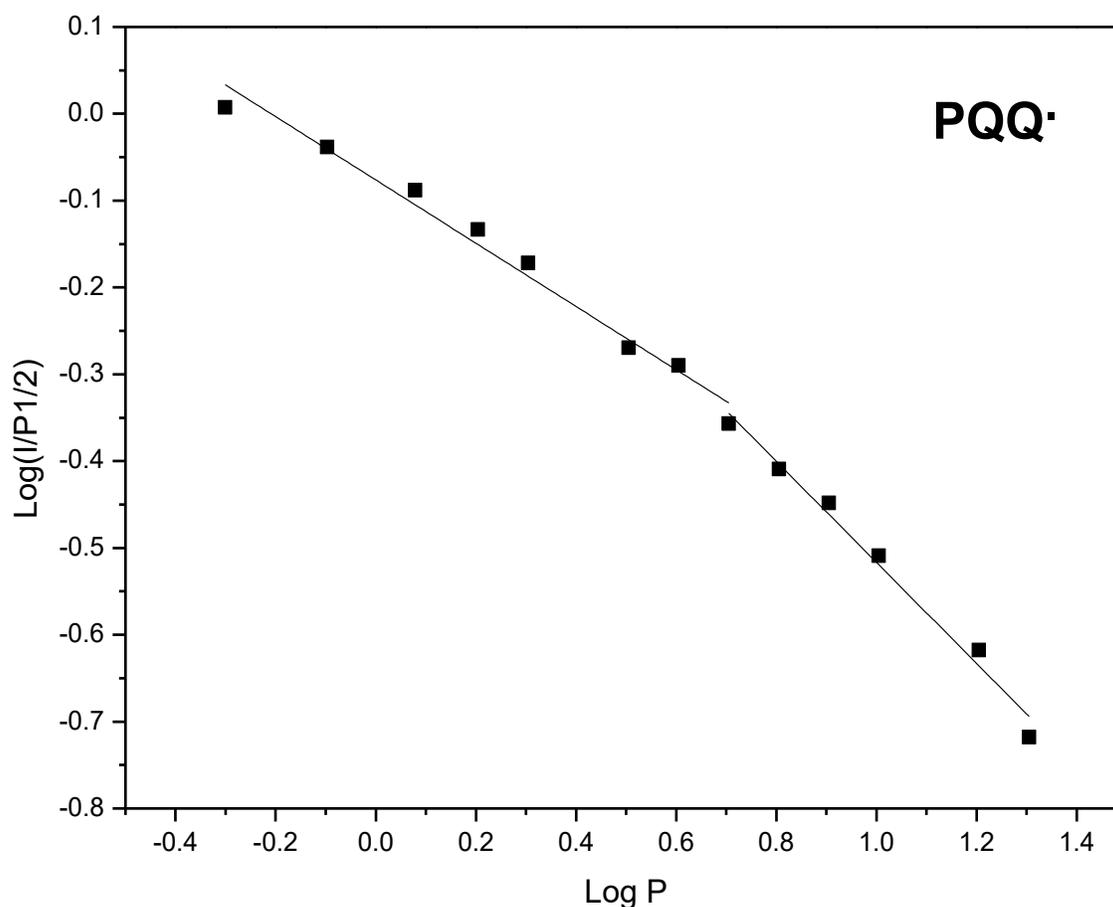


Figura 4.15 Estudio de saturación de potencia progresiva a 77 K de la PQQ-ADH de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. PQQ (■, ajuste lineal —). Condiciones: concentración de proteína 10 mg/mL; intervalo de potencia, 1 - 25 mW; frecuencia, 9.381409 GHz; amplitud, 0.1 mT.

Realizando el ajuste de los datos y determinando el punto donde intersectan ambas rectas se obtienen los siguientes valores:

Tabla 4.2 Parámetros de saturación de la PQQ-ADH a 10 y 77 K

Cofactor	Valor de g	Frecuencia [GHz]	Espín	P1/2 [mW]	Temperatura [K]
PQQ [•]	2.033	9.36	½	5.51	77
PQQ [•]	2.033	9.36	½	9.12	10
[2Fe2S] ⁺	1.944	9.36	½	15.24	10

En el estudio de saturación progresiva a 77 K no se determinó el valor de $P_{1/2}$ para el cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ tipo ferredoxina ya que la intensidad de la señal de dicha especie es muy baja y se dificulta medir la distancia pico a pico de la señal para evaluar su dependencia con la potencia de microondas aplicada.

A partir del ajuste lineal de las curvas de saturación, que se llevó a cabo en este trabajo, se observa que a 10 K la señal del PQQ^\bullet , con un valor de $g = 2.003$, se satura alrededor de 9.12 mW mientras que para la señal del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$, con un valor de $g_y = 1.944$, se satura a una potencia de 15.24 mW, debido a su cercanía con el radical semiquinona ($\approx 3.3 \text{ \AA}$) [103]. Es preciso resaltar que, a bajas temperatura la relajación espín red no es favorable por lo que la relajación espín-espín tomará mayor relevancia. Debido a esto se propone que el electrón desapareado proveniente del radical PQQ^\bullet , le proporciona al cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ un mecanismo alterno de relajación mediante el acoplamiento antiferromagnético, determinado anteriormente, por lo que la señal del cúmulo será más difícil de saturar [88, 62].

Para complementar los estudios de RPE a temperatura variable y de saturación progresiva de microondas, en el presente trabajo, se intentó determinar los valores de T_1 y T_2 para el sistema en estudio, sin embargo, en comunicación directa con Ralph Weber, se sugirió hacerlo mediante RPE de pulsos ya que, a pesar de que se han reportado valores para T_1 y T_2 obtenidos mediante RPE en onda continua, no es el método idóneo [104].

Capítulo 5

Conclusiones

Conclusiones

Se optimizó el crecimiento de la bacteria *Ga. diazotrophicus*, mediante el control del pH durante el proceso de crecimiento en el fermentador de 350 L, de modo que el pH siempre se mantuvo en un intervalo de 5.5 – 7. Lo que nos permitió obtener la PQQ-ADH siempre activa, a comparación de trabajos previos en los que debido a una falta de monitoreo del pH en el medio de cultivo se obtuvo la proteína inactiva, ya que la proteína libera al medio ácido acético, provocando que el pH del mismo disminuya.

Se modificó la nueva metodología para el proceso de purificación mediante cromatografía en columna, de tal forma que no fue necesario utilizar un gradiente de NaCl para eluir la proteína PQQ-ADH en las dos primeras columnas, QAE y DEAE. Asimismo, se separó la enzima PQQ-ADH de otras enzimas de membrana solubles que se encuentran presentes en la cadena respiratoria de la bacteria *Ga. diazotrophicus*.

Empleando la espectroscopia de UV-Vis se corroboró la presencia de los grupos prostéticos PQQ y hemos tipo c en estado reducido de la enzima PQQ-ADH. Por medio de la espectroscopia de RPE se confirmó la presencia del cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$ ($S = \frac{1}{2}$) con valores de $g_y = 1.917$ y $g_z = 1.944$ y del radical semiquinona PQQ^\bullet ($S = \frac{1}{2}$) con un valor de $g = 2.003$.

Se llevó a cabo un estudio a temperatura variable mediante el cual se determinó un acoplamiento de tipo antiferromagnético entre el PQQ^\bullet y el cúmulo $[2\text{Fe-2S}]^+$, que al ajustar la ecuación de Curie-Weiss se obtuvo un valor de $\Theta = -33$ K. Dicho acoplamiento es congruente con la distancia de 3.3 Å [103], entre el cúmulo metálico y el radical semiquinona, propuesta en un trabajo previo.

Mediante un estudio de saturación progresiva de microondas se determinaron los valores de $P_{1/2}$ para el PQQ• a 77 y 10 K siendo 5.51 y 9.22 mW respectivamente. Para la señal RPE del cúmulo [2Fe-2S]⁺ a 10 K se tiene un valor de $P_{1/2} = 15.24$ mW. Los valores de saturación encontrados para el PQQ permiten sugerir que existe una interacción magnética entre los cofactores PQQ• y [2Fe-2S]⁺, de tipo antiferromagnética previamente determinada, de tal forma que el PQQ• (especie de lenta relajación) le proporciona al [2Fe-2S]⁺ (especie de rápida relajación) una relajación adicional que no permite que se sature la señal del cúmulo.

De esta forma, los resultados obtenidos mediante las curvas de saturación complementan los estudios de intensidad de la señal en RPE en función de la temperatura, de modo que la interacción antiferromagnética y la saturación de las especies paramagnéticas dependen fuertemente de la distancia a la que se encuentren las especies paramagnéticas.

Referencias

- [1] Deppenmeier U., Ehrenreich A. «Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*» *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, pp. 69-80, 2009.
- [2] Sengun Y. I., Karabiyikli S. «Importance of acetic acid bacteria in food industry» *Food Control*, vol. 22, pp. 647-656, 2011.
- [3] Sievers M., Swings J. «Family Acetobacteraceae» de *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Nueva York, Springer, 2005.
- [4] Saichana N., Matsushita K., Adachi O., Frébort I., Frebortova J. «Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications» *Biotechnology Advances*, vol. 33, pp. 1260-1271, 2015.
- [5] Yamada Y., Katsura K., Kawasaki H., Widyasturi Y., Saono S., Seki T., Uchimura T., Komagata K. «*Asai bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria» *Int. J. Sys. Evol. Microbiol*, vol. 50, pp. 823-829, 2000.
- [6] E, Leifson, «The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter*» *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 20, pp. 102-110, 1954.
- [7] Komagata K., Lino T., Yamada Y. «The family Acetobacteraceae,» de *The prokaryotes. Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, Cuarta ed., Berlín Heidelberg, Springer-Verlag, 2014.
- [8] Yamada Y., Yukphan P. «Genera and species in acetic acid bacteria» *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 125, pp. 15-24, 2007.
- [9] Toshinobu A., Hiroshi I., Komagata K. «The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains» *J. Gen. Appl. Microbiol*, vol. 10, p. 1964, 95-126.
- [10] J, De Ley, «Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria» *J Gen Microbiol*, vol. 50, pp. 31-50, 1961.
- [11] Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., & Guillamon, J. M. «Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 102, pp. 295-304, 2005.
- [12] Yamada Y., Aida K., Uemura T. «Coenzyme Q10 in the respiratory chain linked to fructose dehydrogenase of *Gluconobacter cerinus*» *Agric. Biol. Chem*, vol. 32, pp. 532-534, 1968.
- [13] Swings J., Gillis M., Kersters K., De Vos P., Gosselé F., De Ley J. «*Frateuria*, a new genus for *Acetobacter aurantius*» *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 30, pp. 547-556, 1980.
- [14] Yamada Y., Kondo K. «*Gluconacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*» *J. Gen. Appl. Microbiol*, vol. 30, pp. 297-303, 1984.

- [15] Urakami T., Tamaoka J., Suzuki K., Komagata K. «Acidomonas gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov.» *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 39, pp. 50-55, 1989.
- [16] Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. «The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level» *Biotechnology and Biochemistry*, vol. 61, pp. 1244-1251, 1997.
- [17] Yamada Y., Yukpan P., Muramatsu Y., Ochaikul D., Nakagawa Y. «Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria» *Ann. Microbiol.*, vol. 62, pp. 849-859, 2012.
- [18] Adachi O., Moonmangmee D., Toyama H., Yamada M., Shinagawa E., Matsushita K. «New developments in oxidative fermentation» *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 60, pp. 643-653, 2003.
- [19] Matsushita K., Toyama H., Adachi O. «Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria» *Adv. In Microbial. Physiol.*, vol. 62, pp. 247-301, 1994.
- [20] Adachi O., Moonmangmee D., Toyama H., Yamada M., Shinagawa E., Matsushita K. «New quinoproteins in oxidative fermentation» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1647, pp. 10-17, 2003.
- [21] Deppenmeier U., Hoffmesiter M., Prust C. «Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains» *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 60, pp. 233-242, 2002.
- [22] Matsushita K., Toyama H., Adachi O. «Respiratory chains in acetic acid bacteria: Membrane bound periplasmic sugar and alcohol respiration» de *Respiration in Archaea and Bacteria. Diversity of prokaryotic respiratory systems.*, D. Zannoni, Ed., Dordrecht, Springer, 2004.
- [23] Kersters K., De Ley J. «The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria» *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 34, pp. 393-408, 1968.
- [24] Mamlouk D., Gullo M., , «Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation,,» *Indian J. Microbiol.*, , vol. 53, pp. 377-384, 2013.
- [25] Raspor P., Goranovic D. «Biotechnological applications of acetic acid bacteria.,» *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 28, pp. 101-124, 2008.
- [26] Greenfield S, Claus G. «Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*» *J. Bacteriol.*, vol. 112, pp. 1295-1301, 1972.
- [27] Gómez S., Arreguín R., Contreras M., Escamilla E. «Las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos: distribución, clasificación, estructura y función» *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 8, nº 1, pp. 28-37, 2005.
- [28] Chinnawirotpisan P., Theeragool G., Limtong S., Toyama H., Adachi O., Matsushita K. «Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production,

- while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 96, pp. 564-571, 2003.
- [29] Toyama H., Mathews Scott F., Adachi O., Matsushita K. «Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 428, pp. 10-21, 2004.
- [30] Kondo K., Horinouchi S. «Characterization of the genes encoding the three-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*» *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, pp. 1131-1138, 1997.
- [31] Yakushi, T. & Matsushita, K. «Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology» *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 86, pp. 1257-1265, 2010.
- [32] Fuentes L.E., Bustillos R., Tapia A., Jiménez T., Wang E.T., Martínez E., Caballero J. «Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp.nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 51, pp. 1305-1314, 2001.
- [33] Loganathan, P., Nair, S. «*Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka)» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54, pp. 1185-1190, 2004.
- [34] Dutta D., Gachhui R.«Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, pp. 1899-1903, 2006.
- [35] Muthukumarasamy R., Cleenwerck I., Revathi G., Vadivelu M., Janssens D., Hoste B., Gum K.U., Park K. D., Son C. Y., Sa T., Caballero J. «Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice» *Syst. And Appl. Microbiol.*, vol. 28, pp. 277-286, 2005.
- [36] Samaddar N., Paul A., Chakravorty S., Chakraborty W., Mukherjee J., Chowdhuri D., Gachhui R., «Nitrogen fixation in *Asaia* sp. (Family *Acetobacteraceae*)» *Curr. Microbiol.*, vol. 63, pp. 226-231, 2011.
- [37] Vu H.T.L., Yukphan P., Chaipitakchoniatham W., Malimas T., Muramatasu Y., Bui U.T.T., Tanasupwat S., Duong K.C., Nakagawa Y., Pham H.T., Yamada Y., «*Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria» *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 59, pp. 153-166, 2013.
- [38] Pedraza O., «Recent advances in nitrogen fixing acetic acid bacteria» *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 125, pp. 25-35, 2008.
- [39] Cavalcante V.A., Döbereiner J. «A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane» *Plant Soil*, vol. 108, pp. 23-31, 1988.

- [40] Gillis M., Kersters K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt R.M., Stephan M.P., Teixeira K.R.S., Döbereiner J., De Ley J. «Acetobacter diazotrophicus sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane» *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 39, pp. 361-364, 1989.
- [41] Burris R.H. «Comparative study of the response of *Azotobacter vinelandii* and *Acetobacter diazotrophicus* to changes in pH» *Protoplasma*, vol. 183, pp. 62-66, 1994.
- [42] Lima E., Boddey R.M., J. Döbereiner J. «Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a ¹⁵N aided nitrogen balance» *Soil Biol. Biochem.*, vol. 19, pp. 165-170, 1987.
- [43] Boddey R.M., Urquiaga S., Reis V.M., Döbereiner J., «Biological nitrogen fixation associated with sugar cane» *Plant and Soil* , vol. 137, pp. 111-117, 1991.
- [44] Fisher K., Newton W. E. «Nitrogenase proteins from *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane-colonizing bacterium,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1750, pp. 154-165, 2005.
- [45] Li R.P., MacRae I.C, «Specific associations of diazotrophic acetobacters with sugar cane» *Soil Biol. Biochem.*, vol. 23, pp. 999-1002, 1991.
- [46] Reis M. V., Döbereiner J.«Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*» *J. Arch. Microbiol.*, vol. 171, nº 13, pp. 13-18, 1998.
- [47] Stephan M.P., Oliveira M., Teixeira K.R.S., Martinez-Drets G., Döbereiner J., , «Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*» *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 77, pp. 67-72, 1991.
- [48] Jiménez T., Fuentes L. E., Tapia A., Mascarua M. A., Martínez E., Caballero J. «*Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria» *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, pp. 3676-3683, 1997.
- [49] Hernández A.T., Bustillos M.R., Jiménez T., Caballero J., Fuentes L.E, «Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plant,» *Microb. Ecol.* , vol. 39, pp. 49-55, 2000.
- [50] Madhaiyan M., Saravanan V.S., Bhakiya Silba Sandal Jovi D., Hyoungeok L., Thenmozhi R., Hari K. «Ocurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats» *India. Microbial Research* , vol. 159, pp. 233-243, 2004.
- [51] Muthukumarasamy R., Cleenwerck I., Revathi G., Vadivelu M., Janssens D., Hoste B., Gum K.U., Caballero J. «Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice» *Sys. and Appl. Microbiol.* , vol. 28, pp. 277-286, 2005.
- [52] Muthukumarasamy R., Revathi G. Seshadri S., Lakshminarasimhan C. «*Gluconacetobacter diazotrophicus* (Syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics» *Current Science*, vol. 83, pp. 137-145, 2002.

- [53] Flores M., Contreras M., Soto L., Aguilar G.R., Baca B.E., Escamilla J.E. «The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5,» *American Society for Microbiology*, vol. 181, nº 22, pp. 6987-6995, 1999.
- [54] González B., Martínez S., Chávez J.L., Lee S., Castro N.A., Domínguez M.A., Gómez S., Contreras M.L., Kennedy C., Escamilla J.E. «Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 evidency for a cyanide-sensitive cytochrome bb and cyanide-resistant cytochrome ba quinol oxidases» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1757, pp. 1614-1622, 2006.
- [55] Luna M.F., Mignone C.F., Boiardi J.L. «The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N-fixing *Acetobacter diazotrophicus*» *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 54, pp. 564-569, 2000.
- [56] Girerd J., Journaux Y. «Molecular Magnetism in Bioinorganic Chemistry,» de *Physycal Methods in Bioinorganic chemistry: Spectroscopy and Magnetism*, Que L., Ed., Sausalito, university Science Books, 2000.
- [57] León J.P., «Propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas de compuestos tetraazamacrocíclicos de Cr(III) y TCNQ» Tesis de Maestría, Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
- [58] Benelli C., Gatteschi D., Introduction to Molecular Magnetism,, Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2009.
- [59] Herrera B., «Síntesis, caracterización estructural y estudio de las propiedades electrónicas y magnéticas de nuevos sistemas superconductores LnTmPno, donde Ln = La, Sm y Gd; Tm = Fe, Ni; Pn = As, Sb y Bi,» *Tesis de Doctorado*, Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
- [60] Solano A., «Estudio de resonancia paramagnética electrónica y de susceptibilidad magnética de compuestos de cromo(III) con ligantes tetraazamacrocíclicos» de *Tesis de Doctorado*, Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
- [61] Kahn O., Molecular Magnetism, USA: Wiley-VCH, 1993.
- [62] Chechik V., Carter E., Murphy D., Elcetron Paramagnetic Resonance, Nueva York: Oxford University Press, 2016.
- [63] Russ H., «EPR Studies of Xanthine Oxidoreductase and Other Molybdenum-Containing Hydroxylases» de *Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR to Metalloenzymes*, Springer, 2010.
- [64] Jeschke G., «EPR techniques for studying radical enzymes,» *Biochim. Biophys. Acta.* , vol. 1707, pp. 91-102, 2005.
- [65] Benecky, M. J., Frew, J. E., Scowen, N., Jones, P., and Hoffman, B. M. «EPR and ENDOR Detection of Compound I from *Micrococcus lysodeikticus* Catalase» *Biochemistry*, vol. 32, pp. 11929-11933, 1993.
- [66] Gambarelli S., Guigliarelli B., More C., Asso M., Chouteau G., Hille R., Bertrand P., «Magnetic interactions between a [4Fe-4S]¹⁺ cluster and a flavin mononucleotide radical in the enzyme trimethylamine dehydrogenase: A high-field electron

- paramagnetic resonance study» *The Journal of Chemical Physics* , vol. 109, nº 24, pp. 10905-10913, 1998.
- [67] Cheesman M., Oganesyanyan V., Watmough N., Butler C., Thomson A., «The nature of the exchange coupling between High-spin Fe(III) heme o₃ and CuB(II) in Escherichia coli quinol oxidase, cytochrome bo₃: MCD and EPR studies» *J.Am.Chem.Soc*, vol. 126, pp. 4157-4166, 2004.
- [68] Hagen W., «EPR Spectroscopy as a probe of metal centres in biological systems» *Dalton Transactions*, vol. 37, pp. 4415-4434, 2006.
- [69] Palmer G., «Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins» de *Methods in Bioinorganic chemistry: Spectroscopy and Magnetism*, Que L., Ed., Sausalito, California., University Science Books, 2000.
- [70] Palmer G., «The electron paramagnetic resonance of metalloproteins» *Biochem Soc Trans.* , vol. 13, nº 3, pp. 548-560, 1985.
- [71] Solano A., Sosa M., «Aplicación de un modelo para la interpretación de espectros de resonancia paramagnética electrónica de sistemas octaédricos de Cr(III)» *Revista de la Sociedad Química de México*, vol. 44, nº 22, pp. 168-175, 2000.
- [72] Eaton, G. R., Eaton, S.S., Barr, D.P., Weber, R.T. , Quantitative EPR, Wien: Springer-Verlag, 2010.
- [73] Sahu I., McCarrick R., Lorigan G., «Use of electron paramagnetic resonance to solve biochemical problems» *Biochemistry*, vol. 52, pp. 5967-5984, 2013.
- [74] Gómez S., Solano A., Saucedo J.P., Escamilla J.E., Kroneck P.M., Sosa M.E., «The membrane-bound quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 carries a [2Fe-2S] cluster» *Biochemistry*, vol. 49, pp. 2409-2415, 2010.
- [75] C. Anthony, «Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes» *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 3, nº 5, pp. 757-774, 2001.
- [76] Sato A., Takagi K., Kano K., Kato N., Duine J.A., Ikeda T. «Ca(2+) stabilizes the semiquinone radical of pyrroloquinoline quinone» *Biochem J.*, vol. 357, pp. 893-898, 2001.
- [77] Williams P.A., Coates L., Mohammed F., Gill R., Erskine P.T., Coker A., Wood S.P., Anthony C., Cooper J.B., «The atomic resolution structure of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*,» *Acta Cryst.*, vol. D61, pp. 75-79, 2005.
- [78] Liu, J., Chakraborty, S., Hosseinzadeh, Yu, Y., Tian, S., Petrik I., Bhagi, A., Lu. Y., «Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron-Sulfur, or Copper Redox Centers» *Cgem. Rev.*, vol. 114, pp. 4366-4469, 2014.
- [79] Smith D. T., Pilbrow J. «ESR of Iron Proteins» de *Biological Magnetic Resonance Vol. 2*, L. J. B. a. J. Reuben, Ed., Nueva York, Plenum Press, 1980, pp. 85-167.
- [80] Cammack R., MacMillan F., «Electron Magnetic Resonance of iron-sulfur proteins in electron-transfer chains: resolving complexity» de *Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR to Metalloproteins*, B. L. Hanson G., Ed., Springer Science, 2010.

- [81] Fukuyama K. «Structure and function of plant-type ferredoxins» *Photosynth Res.* , vol. 81, nº 3, pp. 289-301, 2004.
- [82] Meyer, J., Clay, M.D., Johnson, M.K., Stubna, A., Muenck, E., Higgins, C., Wittung-Stafshede, P. «A Hyperthermophilic Plant-Type [2Fe-2S] Ferredoxin from Aquifex aeolicus Is Stabilized by a Disulfide Bond» *Biochemistry*, vol. 41, nº 9, pp. 3096-3108, 2002.
- [83] MacMunn C.A. «On myohaematin, an intrinsic muscle pigment of vertebrates and invertebrates, on histohaematin, and on the spectrum of the supra-renal bodies» *J. Physiol*, vol. 5, pp. 24-26, 1884.
- [84] Keilin D. «On cytochrome, a respiratory Pigment, Common to Animals, Yeast, and Higher Plants» *Proc. R. Soc. Lond. B* , vol. 98, pp. 312-339, 1925.
- [85] Reedy C. J., Gibney B. R., «Heme protein assemblies» *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 671-649, 2004.
- [86] Stelter M., Melo A. M., Pereira M., Gomes C., Hreggvidsson G., Hjorleifsdottir S., Saraiva L., Teixeira M., Archer M. «A novel type of monoheme cytochrome c: biochemical and structural characterization at 1.23 Å resolution of *Rhodothermus marinus* cytochrome c» *Biochemistry*, vol. 47, pp. 11953-11963, 2008.
- [87] Matsushita K., Toyama H., Yamada M., Adachi O. «Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 58, pp. 13-22, 2002.
- [88] Cammack R., Cooper C. «Electron Paramagnetic resonance Spectroscopy of Iron Complexes and Iron-Containing Proteins» *Methods in Szymology*, vol. 227, pp. 353-384, 1993.
- [89] Cammack R., Patil D.S., Fernandez V.M. «Electron-spin-resonance/electronparamagnetic-resonance spectroscopy of iron-sulfur enzymes» *Biochem. Soc. Trans*, vol. 13, nº 3, p. 572, 1985.
- [90] Kroneck P.M.H., «Electron Paramagnetic REsonance (EPR) A Major Technique in Biology and Bio-Inorganic Chemistry. Practical Aproach,» de *Curso impartido en la Facultad de Química, UNAM*, 2004.
- [91] Pereira I., LeGall J., Xavier A., Teixeira M., «The membrane-bound high-molecular-mass cytochromes c from *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough; EPR and Mössbauer studies,» *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 2, nº 1, pp. 23-31, 1997.
- [92] S. H. Herrick R.C., «Anomalous T Raman spin-lattice relaxation rate of low spin cytochrome P-450 from *Pseudomonas putida*,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 65, p. 4778, 1976.
- [93] Gómez Manzo S., «El papel de la deshidrogenasa periplásmica para etanol de *Gluconacetobacter diazotrophicus*»: Tesis de Doctorado, Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
- [94] Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. «Protein measurement with the Folin Phenol reagent» *J. Biol. Chem.*, vol. 193, pp. 265-275, 1951.

- [95] Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K., Ameyama, M., «Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*» *Agr. Biol. Chem.*, vol. 42, nº 11, pp. 2045-2056, 1978.
- [96] Ameyama M, Adachi O., «Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound,» *Methods Enzymol*, vol. 89, pp. 450-457, 1982.
- [97] Gómez S., González A.A., Oria J., Reyes H., Arreguín R., Kroneck P.M.H., Sosa M.E., Escamilla J.E. «The active (ADHa) and inactive (ADHi) forms of the PQQ-alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* differ in their respective oligomeric structures and redox state of their corresponding prosthetic groups» *FEMS Microbiol. Lett*, vol. 328, pp. 106-113, 2012.
- [98] Hagen R., *Biomolecular EPR Spectroscopy*, New York: CRC Press, 2009.
- [99] Tabares L., Cortez N., Agalidis I., Un S. «Temperature-dependent coordination in *E. coli* Manganese Superoxide Dismutase» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, pp. 6039-6047, 2005.
- [100] Wu K., Li W., Lu Yu, Tong W., Feng Y., Ling S., Zhang L., Zheng X., Yang M., Tian C., «Temperature-dependent esr and computational studies on antiferromagnetic electron transfer in the yeast nadh dehydrogenase *ndi1*» *Phys.Chem.Chem.Phys*, vol. 19, pp. 4849-4854, 2017.
- [101] Sahlin M., Petersson L., Gräslund A., Ehrenberg A., Sjöberg B.M., Thelander L., «Magnetic interaction between the tyrosyl free radical and the antiferromagnetically coupled iron center in ribonucleotide reductase» *Biochemistry*, vol. 26, nº 17, pp. 5541-5448, 1987.
- [102] Innes J. B., Hirsh D.J., Brudvig G.W. «Effects of Dipole-Dipole Interactions on Microwave Progressive Power SATuration of Radicals in Proteins» *Journal of Magnetic Resonance Series B*, vol. 110, pp. 284-287, 1996.
- [103] Sarmiento P., «Análisis funcional y estructural de los sitios redox de la metaloenzima alcohol deshidrogenasa (*adh*) de la bacteria fijadora de nitrógeno *gluconacetobacter diazotrophicus*» Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
- [104] Weber R., «Comunicación personal».